

03058
7



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE ECOLOGIA

ECOLOGIA REPRODUCTIVA Y GENETICA DE
POBLACIONES DE *Agave lechuguilla* (Torr.) EN UN
GRADIENTE LATITUDINAL.

T E S I S

QUE PRESENTA EL BIOLOGO
JOSE ARTURO SILVA MONTELLANO

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN ECOLOGIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS

20.883?

CIUDAD UNIVERSITARIA,

OCTUBRE DEL 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A la gente del Mapimí

*"En un contexto ideológico, la evolución no es ni un hecho ni una teoría,
sino un modo de organizar el conocimiento acerca del mundo."*

R. Lewontin

A Liliana

*"...tu divides la arena con tu fuerza,
tu abres la cabeza de los dragones en el desierto..."*

F. Herbert

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi tutor, Dr. Luis Eguiarte, por aceptarme en su laboratorio y enseñarme a querer el mundo de los magueyes. Por su gran generosidad, paciencia y genialidad tiene todo mi respeto y profunda estima.

Al biólogo Alejandro Cadaval, sin el cual esta tesis jamás hubiera podido realizarse. Por todas esas horas desveladas conduciendo en las carreteras norteñas. El lodo y la arena en el desierto de Mapimí atestiguan su gran capacidad y excelente sentido del humor. Al biólogo Aldo Valera por su apoyo incondicional en el trabajo de campo, laboratorio y en los momentos más difíciles, gracias por ser como eres.

A Sofía Gómez (Chofi) y Gabriela Lankin (Coca) por apoyarme en el trabajo de campo al montar los experimentos de polinización. En el trabajo de laboratorio quiero agradecer a Helga Caballero y Julieta Rosell por tantos geles que corrimos. En especial quiero agradecer al Dr. Alejandro Martínez, por enseñarme las metodologías que él montó para los agaves. A Erika Aguirre, por enseñarme las mañas de la electroforesis de almidón.

Agradezco a , Jordan Golubov y Martha Rocha por su ayuda con las correcciones de los primeros manuscritos. A Juan Fornoni por su gran apoyo con los modelos estadísticos y programas.

A todos mis correctores y sinodales, Drs.: César Domínguez, Carlos Montaña, Francisco Molina, Mauricio Quesada, Juan Núñez, Carlos Martínez del Río y Fabián Vargas. Gracias por darse cuenta de aquellas cosas que ignoré y ayudarme con ello a madurar.

A todos mis compañeros del laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, con quienes he compartido como una familia a largo de los años: Claudia Silva, Antonio Cruz, Salvador Montes, Sra. Lulú Carral, Laura Espinosa, Aura Navarro, Rodrigo González, Ana Escalante, Amanda Castillo, Marcia Tambutti, René Cerritos, Dra. Sara Good, Erika, Martha, Jordan, Aldo y Alejandro. Pero especialmente a la Dra. Valeria Souza por ser el corazón de este laboratorio.

A todos aquellos compañeros del desierto con los cuales establecí amistad frente a las soledades y el calor del sol: Yup Verhulst, Ernesto Vega y Carlos Martorell. A la Dra. Maria del Carmen Mandujano (Meli) a quién estimo y respeto por su capacidad e inteligencia. Y a la gente del desierto de Mapimí por vivir en un lugar tan bello y silencioso.

Quiero agradecer también a mis padres, Carmen Montellano y Jaime Silva por el apoyo que me han brindado en los momentos difíciles de necesidad durante mi vida en el extranjero, los quiero. También quiero agradecer a mi compañera Liliana Rivapalacio, por su comprensión de mis estados de ánimo durante la escritura de esta tesis, te amo.

Este trabajo fue llevado a cabo con el apoyo económico de los proyectos IN211997 Papiit-DGAPA, UNAM; 27983-N CONACyT y PADEP, UNAM. Agradezco la beca de doctorado otorgada por DGAPA, y el apoyo dado por el Instituto de Ecología, UNAM para la finalización del manuscrito de tesis.

SUMARIO

- Dedicatoria	
- Agradecimientos	
- Sumario	3
- Resumen general	5
- Introducción general	6
Tabla A	12
Figura A	13
- Capítulo 1.- Geographical patterns in the reproductive ecology of <i>Agave lechuguilla</i> (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. I. Floral attributes, visitors and fecundity	
Abstract	14
Introduction	15
Materials and Methods	17
Results	20
Discussion	25
Literature cited	31
Figure captions	34
Tables	35
Figures	40
- Capítulo 2.- Geographical patterns in the reproductive ecology of <i>Agave lechuguilla</i> (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. III Genetic variation, differentiation and inbreeding estimates	
Abstract	51
Introduction	52
Materials and Methods	53
Results	55
Discussion	58
Literature cited	61
Figure captions	64
Tables	65
Figures	68

- Capítulo 3.- Ecología reproductiva de <i>Agave lechuguilla</i> (Agavaceae) en el desierto de Chihuahua: Sistema reproductivo, efecto de los gremios de polinizadores, tasas de entrecruzamiento, germinación y depresión por endogamia en dos poblaciones contrastantes	
Resumen	74
Introducción	75
Materiales y Métodos	77
Resultados	81
Discusión	86
Literatura citada	91
Pies de figura	95
Tablas	96
Figuras	102
- Discusión general	109
Literatura citada general	116
Pies de figura	118
Tabla B	119
Figura B	120
- Apéndice 1.- Frecuencias alélicas de las poblaciones del transecto de <i>Agave lechuguilla</i>	124
- Apéndice 2.- Recetas de Buffers y Tinciones.	126
- Apéndice 3.- Geographical patterns in the reproductive ecology of <i>Agave lechuguilla</i> - (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. II. Nectar sugars, volumes and concentrations - Alejandro Cadaval, Arturo Silva-Montellano and Luis E. Eguiarte.	128

RESUMEN GENERAL

En este estudio describimos la variación de las características reproductivas de *Agave lechuguilla* y sus polinizadores, así como la variabilidad y estructura genética en 11 poblaciones a lo largo de un gradiente latitudinal en el desierto chihuahuense. Posteriormente determinamos el efecto de los gremios de polinizadores sobre la eficiencia reproductiva de la especie en dos poblaciones contrastantes del gradiente. En éstas también medimos las tasas de entrecruzamiento como una medida de flujo génico intrapoblacional, paralelamente a la determinación del sistema de cruce de la especie. Encontramos un patrón latitudinal en el color y forma de las flores que tienden a ser más cortas, abiertas y rojas hacia el norte. Los principales polinizadores son esfíngidos y abejas grandes. También ellos varían en abundancia y tipo a lo largo del gradiente. Los patrones de fecundidad reflejan estas observaciones, siendo el “fruit-set” menor en el norte. Examinamos también los niveles de variación de 13 loci isoenzimáticos en todas las poblaciones de *A. lechuguilla* del gradiente latitudinal. El nivel de variación es alto ($H_e = 0.39$, $P = 0.96$), y las poblaciones del sur presentan un exceso de heterocigotos ($F \sim -0.18$). La diferenciación interpoblacional es baja ($\theta = 0.08$), siendo el flujo génico mayor entre las poblaciones sureñas comparadas con las norteñas. En las poblaciones contrastantes encontramos que el sistema reproductivo de *A. lechuguilla* es predominantemente de entrecruza. Los polinizadores nocturnos, son los más eficientes en la producción de semillas en la población sureña. En cambio en la norteña, tanto diurnos como nocturnos parecen ser igualmente eficientes. Las tasas de visita de las diferentes especies corroboran este patrón. Por otro lado, la población norteña presenta niveles de endogamia biparental mayores (Pachuca $t_m = 0.97$, $t_s = 0.98$; Mapimí $t_m = 0.6$, $t_s = 0.49$). Existe un efecto marcado de depresión por endogamia en ambas poblaciones. Estos resultados se discuten en relación a las fuerzas evolutivas relacionadas con la diferenciación de los caracteres florales y el valor adaptativo de las diferencias interpoblacionales.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La gran diversificación de las angiospermas ha sido explicada fundamentalmente como resultado de las interacciones reproductivas con animales; por ejemplo, aquellas familias polinizadas y dispersadas por animales tienen tasas de especiación altas en comparación a otros taxa polinizados y dispersados por factores abióticos (Regal, 1977; Bawa, 1990; Tiffney y Mazer, 1995). En estos procesos evolutivos, los polinizadores tienen un papel muy importante, ya que las diferencias en la composición específica y abundancia de la fauna polinizadora, podrían afectar el flujo génico dentro y entre las poblaciones de plantas, afectando con ello su estructura genética (Handel, 1983). Esto se debe principalmente a que los polinizadores determinan los niveles de polinización cruzada y autopolinización, así como también la distancia en que se mueve el polen. Por esta razón, es posible que el balance entre el flujo génico y otras fuerzas evolutivas, como selección natural, deriva génica y/o endogamia, sea diferente entre poblaciones dadas sus condiciones locales, promoviendo con ello la diferenciación de las poblaciones (Schoen, 1982 a, b; Hamrick y Godt, 1989; Slatkin, 1994).

En general, los caracteres florales son tradicionalmente considerados como atributos adaptativos que han evolucionado como resultado de esas presiones selectivas impuestas por los polinizadores (Faegri y Van der Pijl, 1971). En particular, la morfología y color floral, así como la composición del néctar son interpretadas como adaptaciones que hacen más eficiente la visita de los polinizadores, reflejándose en una mayor fecundidad. Los llamados “síndrome de polinización”- son grupos específicos de estos caracteres florales, de tal manera que conforman un patrón de forma, color, calidad del néctar y antesis correspondientes a determinado tipo de polinizador, siendo convergentes entre especies que incluso pertenecen a diferentes familias (Proctor y Yeo, 1973; Faegri y Van der Pijl, 1979; Baker y Baker, 1983). Por ejemplo, el síndrome de polinización por colibríes habitualmente implica flores rojas y tubulares con néctar medianamente diluido, en cambio el de abejas está generalmente asociado a flores más pequeñas y abiertas de colores amarillo o azul con néctar concentrado y rico en sacarosa. Las flores polinizadas por esfingidos tienden a ser blancas o glaucas, de forma tubular y antesis nocturna; por su lado las de murciélago tienden a ser similares a las de

esfingido, pero más grandes y abiertas y en general más gruesas, resistentes, con néctar muy diluido y rico en hexósas.

Por otro lado, los polinizadores al ser responsables en parte del flujo génico, pueden llegar a determinar la dirección en que evolucionan los sistemas de cruce de las plantas. En este sentido, la depresión por endogamia es una fuerza selectiva sobre los sistemas de cruce, ya que actúa modulando el entrecruzamiento en poblaciones naturales al expresarse genes deletéreos recesivos y reduciendo la adecuación de los individuos endógamos en relación a los exógamos, o bien purgándose dichos genes de la población y evolucionando hacia sistemas de cruzamiento endógamos (Schemske y Lande, 1985; Charlesworth y Charlesworth, 1987). Así, el sistema de cruce de una planta puede interpretarse como una solución adaptativa a las restricciones y variaciones en el tipo y cantidad de polinizadores efectivos. La tasa de entrecruzamiento es entonces la medida que expresa la variación en la eficiencia de los polinizadores o bien la característica terminal de la evolución de un determinado sistema de cruce. De esta manera el sistema de cruce está relacionado con la expresión de los atributos florales, dada la especificidad de los polinizadores en el curso de la evolución de la interacción planta-polinizador.

A pesar de que el concepto de síndrome de polinización resulta intuitivo, algunos autores han cuestionado su validez como una interpretación directa de adaptación (Waser, et al. 1996; Herrera, 1996), ya que está basado en comparaciones interespecíficas que sólo sugieren patrones cualitativos generales. La primera objeción radica en que este concepto requiere de una alta especificidad sobre determinado tipo de polinizador y existe evidencia de que muchas especies de plantas son visitadas por un número muy variado de polinizadores (Thompson y Pellmyr, 1992). Varios de estos podrían ser igualmente eficientes, o una misma especie puede presentar comportamientos alternativos en sus patrones de visita (Temeles, 1996; Bruneau, 1997), haciendo difícil determinar el polinizador efectivo al cual la planta responde. Ahora bien, esto nos lleva a la posibilidad de que el origen de varios de estos caracteres florales sencillamente sea distinto al de los polinizadores actuales. Estas llamadas “exaptaciones” evolucionaron por interacciones con polinizadores del pasado y los caracteres se mantienen sin modificación ya sea porque resultan más o menos adecuados con los

visitantes presentes o por restricciones filogenéticas (Gould y Vbra, 1982; Herrera, 1996). Son pocos los estudios que logran medir el efecto relativo de los polinizadores y otros visitantes sobre a la reproducción en plantas, en función de determinar si los atributos florales corresponden al polinizador más efectivo (Pellmyr y Thompson, 1996). En este contexto, las plantas que son visitadas por animales diurnos y nocturnos ofrecen la posibilidad de examinar con mayor facilidad dicha contribución dada la separación en tiempo de actividad de estos gremios (Eguiarte y Búrquez, 1987; Groman y Pellmyr, 1999), tomando en cuenta que al interior de estas categorías podría haber también mucha variación.

El segundo punto relevante respecto de la dificultad de los estudios acerca del síndrome de polinización, se refiere a la necesidad de llevar a cabo estudios cuantitativos a nivel intra e interpoblacional para demostrar que los caracteres florales son adaptaciones actuales. Básicamente porque las diferencias entre poblaciones en la expresión de esos caracteres, denotan la variabilidad requerida por la selección natural y el valor adaptativo que presentan frente a condiciones locales diferentes (Thompson, 1997). De esta manera las interacciones planta-polinizador pueden variar entre las poblaciones reflejando un patrón adaptativo complejo. Este tipo de escenario subraya la importancia de relacionar la ecología reproductiva con la estructura genética de las poblaciones, a modo de entender el fenómeno evolutivo global de las poblaciones de estudio, teniendo como contraparte la relación de las fuerzas evolutivas entre sí y con las características reproductivas en cuestión. En este contexto, son muy importantes los estudios geográficos que incluyan varias poblaciones en condiciones ecológicas contrastantes. Un ejemplo clásico al respecto son los estudios de Schoen (1982 a y b), que encontró correlación entre los polinizadores, la biología reproductiva, la tasas de entrecruzamiento y los niveles de variación genética de *Gilia achilleifolia* en varias poblaciones de un gradiente altitudinal en California

El género *Agave* está constituido por plantas suculentas y rosetoides de vida larga (Gentry, 1982). Algunas especies de *Agave* ocupan extensas regiones de México, abarcando muchos grados de latitud, principalmente en ambientes xéricos (Gentry, 1982; Nobel, 1988). Schaffer y Schaffer (1979) han planteado que los polinizadores han sido una fuerza importante en la evolución del sistema reproductivo semélparo del

género *Agave*, siendo la causa principal del tamaño de sus despliegues reproductivos. Algunas especies de *Agave* son altamente dependientes de los polinizadores para la formación de frutos y semillas (Howell y Roth, 1981) y se ha demostrado que la depresión por endogamia sería la forma más evidente en que se manifiesta esta dependencia (Trame, Coddington y Paige, 1995), en el sentido de que sólo la entrecruza permitiría a los individuos producir semillas viables.

Tradicionalmente se asume que el género *Agave* es polinado por murciélagos, principalmente del género *Leptonycteris* (Howell, 1979; Arizaga et al., 2000 a, b). Sin embargo, se han registrado una gran cantidad de otras especies de visitantes florales entre los que destacan insectos y aves (Schaffer y Schaffer, 1977; Martínez del Rio y Eguiarte, 1987; Slauson, 2000). La posibilidad que algunos de ellos también sean polinizadores efectivos es evidente. Más aún, Schaffer y Schaffer (1977) describen que varias especies del subgénero *Littaea* (*A. schotii*, *A. parviflora* y *A. toumeyana*) presentan una morfología floral y néctar claramente melitofílicos, siendo polinizadas por al menos dos géneros de abejas en Arizona (*Bombus* y *Xylocopa*). También Freeman et al. (1983) encontraron que el néctar de 22 especies de agaves presentaba variaciones en las proporciones y concentración de azúcares, asociadas posiblemente a los diferentes tipos de visitantes (Baker y Baker, 1983). Así, Freeman et al. (1983) postulan que existe una tendencia evolutiva del género a desarrollar síndromes de polinización diferentes al quiropterófilo.

La intención de este proyecto es explorar los procesos evolutivos que han actuado sobre la ecología reproductiva de una especie de *Agave* de amplia distribución, especialmente sobre la variación de sus atributos florales y sistema de cruce como producto de las interacciones con sus polinizadores en un gradiente geográfico.

Especie de estudio y observaciones preliminares- *Agave lechuguilla* Torr. (Agavaceae, subgénero *Littaea*) es una de las especies del género de más amplia distribución, típica del Desierto Chihuahuense. Su distribución actual abarca desde el Valle de México hasta Texas y Nuevo México (Gentry, 1982; Freeman y Ried, 1985). Su período de floración abarca de fines de mayo hasta septiembre y la antésis de sus flores es nocturna (Gentry, 1982; Freeman y Ried, 1985). Su inflorescencia es espigada, característica de *Littaea*. La

información preliminar sobre la especie nos mostraba que *A. lechuguilla* podía ser polinizada por murciélagos (Freeman y Ried, 1985), aunque no existían datos sólidos de visitas. Datos puntuales mostraban que en poblaciones de Texas la concentración de sacarosa en el néctar de *A. lechuguilla* era muy variable, llegando a ser cercano al 20% en algunos individuos y nula (0%) en otros de la misma población (Freeman et al., 1983). Esto contrastaba con las expectativas del síndrome quiropterófilo, ya que los murciélagos del nuevo mundo prefieren néctar dominante en hexosas (Baker y Baker, 1983). Además en las poblaciones de Texas había néctar diurno remanente, aunque el pico de producción era nocturno (Freeman y Ried, 1985). Asimismo, se había reportado variación morfológica en varios caracteres florales como el tamaño y el color (este último varía entre glauco, amarillo y rojo; Gentry, 1982); observaciones de ejemplares de herbario corroboraban estos datos (Silva y García-Mendoza, obs. pers.).

La distribución y abundancia de los polinizadores potenciales de *A. lechuguilla* cambiaba a lo largo de sus 15° de latitud. En los límites sureños resultaba ser más diversa y abundante tanto para murciélagos (Arita, 1991) como para colibríes (Johnsgard, 1993). En abejas, en cambio, el patrón resultaba opuesto dada la gran abundancia y diversidad de abejas en el Desierto Chihuahuense y Altiplano Norte (Ayala et al., 1993). Los murciélagos magueyeros, especialmente *Leptonycteris*, presentan períodos migratorios (Fleming et al., 1993), lo que indicaba que esto podría afectar la respuesta reproductiva de *A. lechuguilla*.

Basados en esta información, tratamos de contestar las siguientes preguntas: ¿Cómo es el patrón de variación de características tales como el color y morfología floral entre las poblaciones de un gradiente geográfico? ¿Cambia realmente la fauna de polinizadores con la latitud? ¿Corresponden los polinizadores con el síndrome de polinización “tradicional” a lo largo del gradiente? ¿Cuáles son las fuerzas evolutivas que han actuado en las poblaciones de *A. lechuguilla*? ¿Cómo es el sistema reproductivo y tasas de entrecruzamiento de la especie?

Estructura del estudio y objetivos - En primer término, enfocamos una aproximación microevolutiva que involucraba tanto a la ecología reproductiva como a la genética de poblaciones. La primera definida en función de los atributos florales, el sistema de cruce y la interacción con los polinizadores de la especie en

cuestión. Luego, optamos por un diseño práctico que planteaba, primero que nada, la descripción de las poblaciones a través de un transecto latitudinal y posteriormente estudios detallados en dos poblaciones contrastantes.

El transecto fue diseñado para abarcar lo máximo posible dentro del rango de distribución de la especie que se encuentra en territorio mexicano (Figura A), procurando elegir poblaciones en cada grado de latitud (Tabla A). Las poblaciones fueron elegidas en las inmediaciones de cada punto del transecto en virtud de sus condiciones de accesibilidad, poca intervención humana y tamaño poblacional suficiente para llevar a cabo el estudio de acuerdo a los protocolos preestablecidos. Las poblaciones fueron numeradas de acuerdo a las fechas en que fueron muestreadas desde el sur hacia el norte. La población ubicada en la Reserva de la Biósfera de Mapimí fue nominada como "M", ya que a pesar de ubicarse entre la 6 y la 7 sólo pudo ser muestreada hasta el final del recorrido, debido a malas condiciones climáticas que impidieron en su momento acceder a la población. En esta población no fue posible coleccionar la totalidad de los datos ya que para la fecha de muestreo la floración había acabado, de esta manera esta nomenclatura resalta su condición especial. Esta parte del trabajo se llevó a cabo durante el verano de 1996. Posteriormente y con base en el análisis de los primeros datos del transecto, se eligieron dos poblaciones que contrastaban en sus características (Capítulo 3). Los datos y muestras de estas poblaciones fueron tomados durante el verano de 1997.

Los objetivos en términos de la ecología reproductiva de *A. lechuguilla* fueron describir la variación de los atributos florales a lo largo del gradiente latitudinal, así como la variación en el gremio de polinizadores. Posteriormente, determinar el sistema de cruce y los gremios de polinizadores efectivos (diurnos vs. nocturnos) en las poblaciones contrastantes.

En el caso de la genética de poblaciones, el objetivo fue primero describir la variación genética y determinar cuáles fuerzas evolutivas han actuado dentro y entre poblaciones a lo largo del gradiente latitudinal. Posteriormente, determinar las tasas de entrecruzamiento para poblaciones contrastantes, como medida del flujo génico intrapoblacional.

Si existen diferencias latitudinales en el gremio de polinizadores de acuerdo a los datos preliminares, nuestras predicciones fueron las siguientes: Variación en los atributos florales correspondiente al grupo de polinizadores más efectivo, flores pálidas y tubulares de tipo quiropterófilo en las poblaciones sureñas y más abiertas y coloridas de tipo más melifilico en el norte. Asimismo el néctar debería ser más concentrado y con una mayor proporción de sacarosa en el norte. Para el caso de la genética de poblaciones esperamos encontrar mayor variabilidad genética en las poblaciones del sur, así como mayor diferenciación interpoblacional en el norte. Debería haber mayor flujo génico entre las poblaciones sureñas.

Esta tesis está formada por 5 secciones: Una introducción general, 3 capítulos, el primero sobre la variación de los caracteres florales y polinizadores en el transecto, el segundo sobre la estructura y variación genética en esas poblaciones y el tercero sobre los experimentos de polinización y las tasas de entrecruzamiento en dos poblaciones contrastantes; una discusión general y tres apéndices, las frecuencias alélicas de las poblaciones del transecto, las recetas de las tinciones y buffers de las electroforesis y el artículo de la tesis de A. Cadaval sobre la variación en la composición del néctar en las poblaciones del transecto.

Tabla A .-Localización y fechas de visita a las poblaciones de *Agave lechuguilla*, pertenecientes al transecto latitudinal efectuado durante el verano de 1996.

Nº Población	Estado	Localidad	Coordenadas	Altitud (m)	Fecha
1	Hidalgo	Pachuca	20°08'N; 98°44'O	1950	3 Julio
2	Hidalgo	Zimapán	20°43'N; 99°20'O	1800	11 Julio
3	San Luis Potosí	Zaragoza	22°04'N; 100°40'O	2100	18 Julio
4	San Luis Potosí	Matehuala	23°49'N; 100°32'O	1920	9 Agosto
5	Coahuila	Saltillo	25°15'N; 101°05'O	1980	11 Agosto
6	Durango	Bermejillo	26°14'N; 103°50'O	1260	16 Agosto
7	Chihuahua	Jimenez	27°14'N; 104°46'O	1580	18 Agosto
8	Chihuahua	Aldama	28°57'N; 105°42'O	1380	22 Agosto
9	Chihuahua	Ojinaga	29°44'N; 104°36'O	990	26 Agosto
10	Chihuahua	Cd. Juarez	31°40'N; 106°32'O	1530	1 Sept.
M	Durango	Mapimí	26°40'N; 103°44'O	1260	4 Sept.

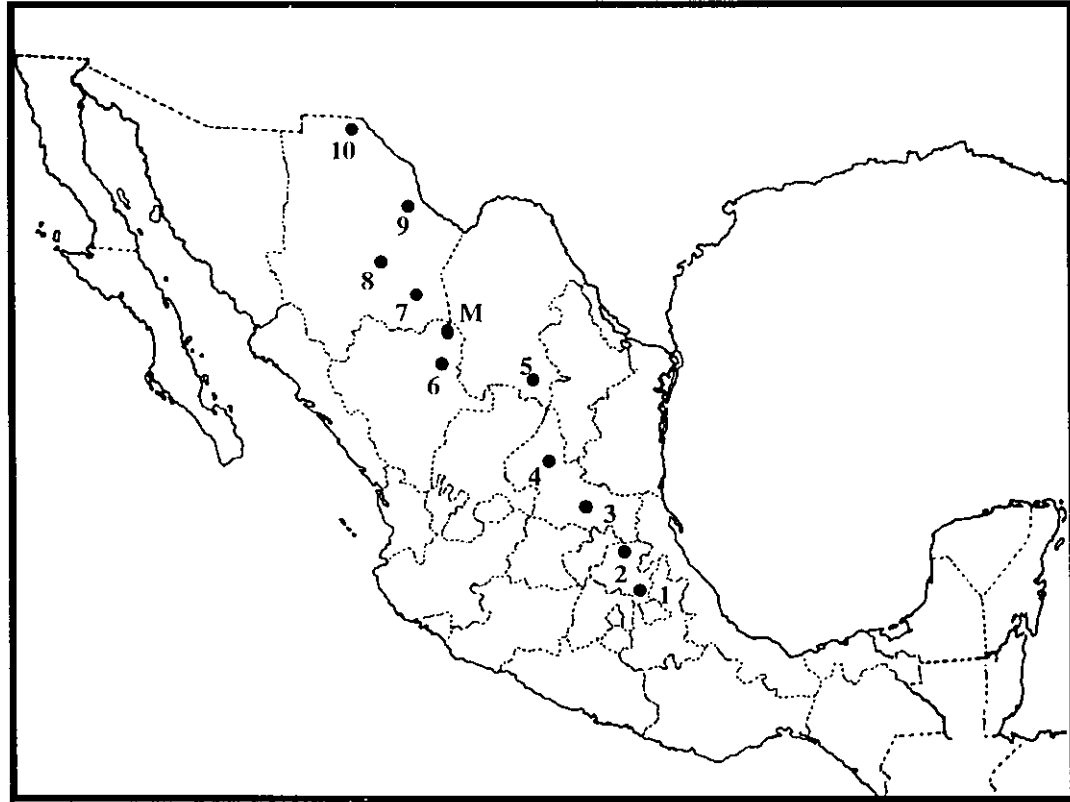


Figura A.- Poblaciones muestreadas de *Agave lechuguilla*, a lo largo del transecto latitudinal.

Capítulo 1

Geographical patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. I. Floral morphology and color, visitors and fecundity

Abstract.- Floral characteristics, such as morphology and flower color have been interpreted as adaptive traits that evolved by selective pressures generated by pollinators. The “pollination syndrome” is a general concept which describes suites of floral attributes in relation to specific pollinator types. Differences among populations in the expression of those floral characters, could result from natural selection for their adaptive value to local conditions. We describe the patterns of variation of flower morphology, color and fecundity of *Agave lechuguilla*, in 10-11 populations along a latitudinal gradient encompassing the whole range of the species in the Chihuahuan desert. We also recorded the variation of flower visitation, discriminating between pollinators and floral robbers. We found a latitudinal pattern on flower shape and color. Flowers tended to be shorter, more open and colorful toward the northern part of the transect. The main pollinators were nocturnal hawkmoths (*Hyles lineata*) and diurnal large bees (*Bombus pennsylvanicus* and *Xilocopa californica*). At all populations large bees were the most abundant pollinators. However their abundance varied along the transect as the rest of pollinators. The number of visits by all pollinators, decreased significantly with latitude. Fecundity seemed to correlate with latitude and also decreased from south to north.

INTRODUCTION

Floral traits are usually considered adaptive attributes that have evolved as a result of selective pressures imposed by pollinators (Percival, 1965; Baker and Hurd, 1968; Faegri and Van der Pijl, 1971; Proctor and Yeo, 1973). In particular, morphology and flower color have been interpreted as adaptations to make the visits of pollinators more efficient. The convergent set of floral traits in species belonging to even different families is known as the “pollination syndrome” (Faegri and Van der Pijl, 1979; Wyatt, 1983). For instance, the hummingbird pollination syndrome usually implies red and tubular flowers, while the bee syndrome in general is associated to smaller and more open flowers in yellow or blue colors. Hawkmoth pollinated flowers are usually white or glaucous, tubular with nocturnal anthesis, while bat pollinated flowers are similar, but the flowers are more open, larger and in general more sturdy.

Nevertheless, several authors (Feinsinger, 1983; Waser, 1983, Waser, et al 1996; Herrera, 1996) have challenged the direct interpretation of the syndromes as adaptations, because are based on interspecific comparisons that only suggest general qualitative patterns. These authors stress the need to carry out quantitative studies at the intraspecific level to really demonstrate that the floral traits are current adaptations, because it is possible that the origin of several of this floral traits could be adaptively different from the present pollinators. These “exaptations”, may have evolved from interactions with past floral visitors, and the traits remain non-modified, either because they function more or less adequately with the present pollinators or because of phylogenetic restrictions (Gould and Vbra, 1982; Herrera, 1996). Moreover, the concept of pollinator syndrome requires highly specificity to a determined pollinator type, and there is evidence that plants species can be visited by a varied number of pollinators (Thompson and Pellmyr, 1992; Sahley, 1996; Nassar, Ramírez and Linares, 1997). Several species of pollinators may be efficient, or a single species can be more or less good pollinator using alternative behavioral ways and visitation patterns (Temeles, 1996; Bruneau, 1997). The above argument indicate that the pollination syndrome usually involve a much more complex scenario.

On the other hand, although several studies have interpreted floral morphology and color as an adaptation to the locally most efficient pollinators, relatively few of them have studied these traits within and among populations (Armbruster, 1990; Johnston, 1991; Herrera, 1990 a,b,1993; Andersson and Widen, 1993; Conner, Davis and Rush, 1995; Galen, 1989, 1996; Melendez-Ackerman, Cambell and Waser, 1997; Inoue, Maki and Masuda, 1996). Detailed intra and inter-population studies are also relevant, as they allow to explore the ideas of the geographic mosaic model proposed by Thompson (1994, 1997): plant-pollinator interactions can vary among populations, generating a complex pattern of differential adaptation in a shifting-balance like process. In this paper we analyze and compare the variation in floral traits, fecundity and the associated changes in their floral visitors in 11 populations of *Agave lechuguilla* on a latitudinal gradient in the Chihuahuan desert.

The plants in the *Agave* genus are long-lived succulent rosettes (Gentry, 1982). *Agave* can be abundant and dominant in vast areas of Mexico, in particular in xerophytic environments (Gentry, 1982; Nobel, 1988). Schaffer and Schaffer (1979) suggested that pollinators are the most important factor in the evolution of their reproductive biology and life history, in particular their monocarpy. Also a high dependence of pollinators has been suggested in some species of the genus (Howell and Roth, 1981; Eguiarte, Souza and Silva-Montellano, 2000). Usually, it is assumed that bats, mainly the genus *Leptonycteris*, pollinate *Agave* (Howell, 1979; Gentry, 1982; Arizaga and Ezcurra, 1995; Arizaga et al, 2000 a, b). Nevertheless, a large number of species of insects and birds also visit *Agave* flowers (Schaffer and Schaffer 1977; Kuban, Lawley and Neill, 1983; Martínez del Rio and Eguiarte, 1987; Slauson, 2000; Eguiarte, Souza and Silva-Montellano, 2000). Schaffer and Schaffer (1977) found that several species in the *Littaea* subgenus (*A. schotii*, *A. parviflora* and *A. toumeyana*) in Arizona, have flower and nectar traits that suggest co-adaptation to pollination by bees, and are mainly pollinated by large bees from the genera *Bombus* and *Xylocopa*.

Agave lechuguilla is an excellent system to study plant pollinator interactions in a geographic mosaic context, as this is one of the species in the genus with the broadest distribution. *A. lechuguilla* is found

throughout Chihuahuan desert *sensu lato*, ranging from the Valley of Mexico up to southern Texas and New Mexico (Gentry, 1982; Briones, 1994). Additionally, Gentry (1982) described geographic variation in the size and color of its flowers. Moreover, the distribution of potential pollinators change along *A. lechuguilla* distribution. In its southern range, nectarivorous bats and hummingbirds are more abundant and diverse (Arita, 1991; Johnsgard, 1993; Arita and Santos del Prado, 1999). In contrast, toward the northern part of the species range, the diversity of bees increases (Ayala, Griswold and Bullock, 1993). Based on that information, we addressed the following questions: How does flower color and morphology of *A. lechuguilla* vary along this latitudinal gradient? Does the pollinators assemblage change with latitude? If syndrome adaptation to a specific pollinator occurs in the case *A. lechuguilla*, we may expect to find clinal variation in floral traits according with the variation in the pollinators.

MATERIALS AND METHODS

Study species- *Agave lechuguilla* Torr. (Agavaceae, subgenus *Littaea*, *Marginatae* Group; Gentry, 1982) is found mainly on limestone soils. The flowering season corresponds to the summer, from late May to September (Gentry, 1982). The inflorescence is a spike, as in all species in the subgenus *Littaea*, and the flowers produce pollen and nectar during the night (Gentry, 1982; Freeman and Ried, 1985). Flowers are protandric. Pollen is produced from the first day that flowers opened. Stigmas are receptive on the 3 to 4 following days. Nectar production declines continuously with flower age (Freeman and Ried, 1985). Nectar characteristics are described in Freeman et al. (1983) and in Cadaval (1999).

Studied populations- Sampling was designed to cover most of the natural distribution of the species in a latitudinal gradient, and we attempted to locate each study site every latitudinal degree (Fig. A; Table A). We studied 11 populations, starting from Pachuca, Hidalgo (Population 1), in the Northern Valley of Mexico, up to Ciudad Juarez, Chihuahua (Population 10), near the USA border. For the Mapimi population (M hereafter)

we have only partial data because we were not able to reach the population during the raining season. Data lacking correspond to flower parameters and visitors.

Field work was done during the 1996 flowering period of *A. lechuguilla* (early July to early September) (Table A). The flowering season starts earlier in the southern populations, and then proceeds following the latitudinal gradient, starting in September in the northern population. This flowering pattern allowed us to study the 11 populations in a single season.

We calculated the Lang's humidity index for each locality (= total annual precipitation (mm) / mean annual temperature (°C); Mohr and Van Baren, 1954) using information from their nearest climate station (García, 1988). Figure 1 shows that aridity increased towards the northern populations, being more mesic in populations 1 to 4, whereas the more arid ones were 9, 10, 6 and M.

Density of rosettes was directly estimated in 100 m² quadrants (4 replicates per site). The density of reproductive individuals (inflorescences) was estimated using nearest neighbor method (Krebs, 1989). We followed the standard sampling procedure: setting 12 random points in the field (ca. 3 ha), we recorded the distance from those points to the nearest inflorescence and from these to a second one. That gives a first density estimation, which was corrected from possible biases using Diggle's formula (Krebs, 1989). We performed 4 replicates of this sampling procedure per site in order to compare among populations.

Flower color and morphology- In each population (except M), we randomly selected 15 to 20 reproductive individuals. From each individual we analyzed 7 flowers at the same stage, i.e., young flowers before of anther dehiscence (Freeman and Ried, 1985). Fresh color was registered in each flower with a Munsell chart (Wilde and Voigt, 1952). Color data were obtained as the addition of the values of chroma and hue, which permits distinguishing individual differences within populations. The flowers were video-filmed, digitized and measured using the Morphosys program (Fig. 2; Meacham and Duncan, 1990), following Domínguez et al. (1998) procedures.

Floral visitors- . For eight focal inflorescences per population (except M), we registered all floral visitors. Pollinators were distinguished from pollen or nectar robbers by their behavior (Dafni, 1992). Focal inflorescences were selected because they were easy to observe, in particular during the night. For each focal inflorescence, we measured its total height, we approximated the volume of the rosette in liters (*L*) using its diameters (widest and narrowest) and height, and we counted the number of open flowers and estimated the total number of flowers.

In each site, observations were done from 07:00 to 10:00 h and from 19:00 to 22:00 h. Selected inflorescences were those in which natural illumination and contrast against the dark background were enough to detect visits. All observations were done in silence a few meters away from the focal plant to avoid any disturbance to visitors. Each focal inflorescence was observed in rounds of 10 minutes until 3 hours were completed. These observations lasted two days for each site, accumulating a total of 12 observation hours (6 diurnal and 6 nocturnal) per site. Visitors were identified as morphospecies in the field, using collections of insects from the same sites, while vertebrates (birds) were identified using field guides. The identifications were corroborated by sending specimens to specialists. Data of nocturnal visitors in population 3 is also lacking because of bad (strong rains) climatic conditions during the sampling days.

Fecundity estimates- Fecundity data were collected during March of 1997. In each population, we randomly selected 30 to 50 inflorescences from the previous reproductive season. For each inflorescence we registered the total number of flowers (as the number of flower scars) and the total number of mature fruits. We measured for each sampled plant the volume of the rosette (using its diameters and height), and the height of the inflorescence, to control the effect of mother size on reproductive output.

Statistical analyses- Differences among populations in densities of rosettes and inflorescences were tested using one way ANOVAs. Linear regression were used to test the relation between size of the plants and number of flowers, transforming both variables to natural logarithm to improve linearity. Correlations were

used to compare flower morphology characters. Based on these correlations we decide to perform a Principal Component analysis, to reduce the number of variables. We retain the two first principal components because they had eigenvalues superior to 1. We compared the variation of flower morphometry among populations with nested ANOVAs (Sokal and Rohlf, 1995), using the individual scores of the two first Principal Components for populations, individuals within populations and flowers within individuals. Individuals within population was assigned as random variable in the analysis. Changes in latitude for all measured characteristics were tested using regressions for repeated values of Y, that every point in each latitude correspond to an individual plant value (Sokal and Rohlf, 1995). Color data is presented as the proportion one specific color (red) of the individuals in each population along the latitudinal gradient, and transformed to $\arcsin\sqrt{\cdot}$ to fit normality. We used ANCOVA analysis to control the effect of rosette volume over the variation in reproductive output among populations. The relation between fecundity and frequency of visits were checked again with simple correlation, but using the populations averages due to differences in sample size between the variables. All the analyses were done using JMP program (SAS, 1995) in non-transformed or transformed data, as indicated for each case.

RESULTS

Densities and morphometry of the individuals- The density of rosettes (Grand mean = 2.04 rosettes/m², *SD* = 0.77; range: 1.78 in Population 1 to 2.96 Population 7) and of reproductive individuals (Grand mean = 0.0071 inflorescences/m², *SD* = 0.0113; Range: 0.0018 in Population 3 to 0.01 in Population 6) were not different among the 11 populations (ANOVA rosettes/m²; $n = 44$, $df = 10$, $F = 1.1$, $P = 0.38$; ANOVA inflorescences/m²; $n = 44$, $df = 10$, $F = 1.92$, $P = 0.076$).

Overall, there was a strong correlation between the size of a rosette and the total number of flowers the inflorescence produced (Fig. 3; using all the measured plants: $n = 350$, $R^2 = 0.546$, $F = 419.9$, slope = 0.81, $t = 20.5$, $P < 0.0001$). There were also significant differences in both characters among populations (ANOVA volume rosette: $n = 350$, $df = 10$, $F = 22.8$, $P < 0.0001$; ANOVA number of flowers: $n = 350$, df

=10, $F = 43.47$, $P < 0.0001$). In the south the individuals are larger and each one produces more than 400 flowers, while in the north the individuals are smaller, producing less than 250 flowers. These correlations occur also within each of the 11 populations ($n = 30-32$ rosettes per population; ranges: $R^2 = 0.23$, $F = 8.8$, slope = 0.43, $t = 2.9$, $P = 0.006$ in Population 2; to $R^2 = 0.65$, $F = 55.2$, slope = 0.89, $t = 7.3$, $P < 0.0001$ in Population 5).

Flower morphometry- The basic statistics of floral morphometry of all flowers (all populations pooled) are given in Table 1. The Coefficient of Variation ($SD / \text{mean} * 100$) indicates that the five measured traits were fairly variable. The length of the flower tube (52.2%) was the most variable trait, whereas the total length of the flower was the less variable (19.2%). Floral traits were positively correlated among them, with the exception of the corolla diameter, which was negatively or not correlated to the other measures (Table 2). To describe the variation of these characteristics with an integrated descriptor, we performed a Principal Components analysis. The first Principal Component (CP1, Table 2), which accounted for 55.6% of the total variance, was positively related to size of the flowers and corolla's length, and negatively to the diameter of the corolla. The second one (CP2, Table 2) accounted for 31.3% of the total variance and was strongly associated with the diameter of the corolla and flower tube.

There is a clear latitudinal change in flower length, decreasing to northern populations (Fig. 4a, PC1: $n = 1229$, $F = 1401$, $df = 160$, $R^2 = 0.533$, $P < 0.0001$; slope = -0.368, $t = -37.4$, $P < 0.0001$). By contrast, the flower width displays differences that increases toward the north (Fig. 4b; PC2: $n = 1229$, $F = 244.5$, $df = 160$, $R^2 = 0.166$, $P < 0.0001$; slope = 0.121, $t = 15.6$, $P < 0.0001$). Differences among populations using nested ANOVAs for both Principal Components (Table 3) shows that population accounted for most of the variation in the case of PC1 (74.2%), although there was a substantial proportion related to differences among individual plants within the populations (16.4%). For the PC2, the population explained less variation (43.1%) but the variability accounted for the individuals was larger (38.9%). This analysis is relevant because

points out that variation in flower morphology have an important individual component, which is the target of natural selection.

For descriptive purposes, we plotted the populations means of both principal components (CP1 versus CP2, Fig. 5). The figure shows that the populations distribute in two main groups: southern populations (1,2,3,4), with long and relatively narrow flowers and another group with including most of the northern populations (7,8 and 9), with short flowers. Population 5 and 6 were intermediate while population 10 was isolated from the rest, displaying very wide flowers.

Color of flowers- Flower color varied from pale light-green (glaucous) to deep-red. The flower structures that change in color were the tepals/corolla (thereafter tepals) and the stamens filaments (thereafter filaments). The proportion of red color in the tepals in the populations increased with latitude (Fig. 6a; data transformed to arcsin√: $n = 200$, $F = 421.6$, $R^2 = 0.680$, $P < 0.0001$; slope = -0.114, $t = 20.5$, $P < 0.0001$), being in the south very low (less than 20% in populations 1,2 and 3), to reach more than 70% in the northernmost populations (7 to 10). It is apparent that the proportion of red tepals increases in an almost stepwise fashion with a threshold at 26°N, but for descriptive purposes we present them as a linear change. The filaments show a parallel change (Fig. 6b; $n = 200$, $F = 479.7$, $R^2 = 0.708$, $P < 0.0001$; slope = 0.049, $t = 21.9$, $P < 0.0001$), although the southernmost populations (1 to 3) had an important proportion of red filaments (around 50%), to reach almost 100% in populations 6 to 10. In this case the trend seems asymptotic.

Floral visitors- We accumulated a total of 114 observation hours. The total list of visitors is shown in Table 4, and they were classified either as pollinators, if they contacted the stigmas and the anthers because of their size and behavior on the flowers, or as robbers, if they took resources but were not likely to pollinate the flowers, because they never touch the anthers and the stigma.

In the majority of the populations, the most abundant visitor was the introduced European bee *Apis mellifera*, accounting for a total of 50.5% of all the visits. We classified *A. mellifera* as a floral robber, as it

was too small to touch the stigmas while foraging for pollen and/or nectar in the flowers. The next most important group of visitors was the large native bees, *Bombus pennsylvanicus sonorus* and *Xylocopa californica arizonensis*, with a total of 23.4% of the total visits. *B. pennsylvanicus* was found only in the populations 1 to 5 (range: 26.5% in Population 2 to 77 % in Population 4 of the visits by pollinators) and was completely substituted in the north (populations 6 to 10) by *X. californica* (range 11.7% in Population 8 to 63% in Population 9 of the visits by pollinators).

The next important visitor was the hawkmoth *Hyles lineata*, which was the most abundant pollinator in populations 2, 7 and 8 (accounting to 65%, 44% and 83.5% of the visits by pollinators, respectively). Some hummingbird visits were recorded in all populations, and accounted for 11.1% of the visits by pollinators (4.1% of all the visits). The most common hummingbird species was *Eugenes fulgens*, in particular in the southern populations 1 to 5. Note than in Population 1, a *Selasphorus spp.* hummingbird was considered also as a robber because of its behavior. The remaining visitors were a heterogeneous collection of insects, mainly bees and wasps, which accounted to 12.3% of the total visits, and robbed nectar or pollen. Due to their heterogeneity and low proportion per species, were not further analyzed. In the 60 total hours of nocturnal observation, we were not able to detect a single bat visit, despite our expectations. This lack of visits by bats was confirmed by further more detailed observations next year in selected populations (Chapter 3).

The daily pattern of visits is described in Fig. 7, using the number of visits for southern populations (Fig. 7a) and for northern populations (Fig. 7b) separately. Diurnal animals (mainly bees and hummingbirds) start visiting the flowers in the morning, using the remainder of the nectar and pollen produced in the precedent night. The peak of activity by hummingbirds, *A. mellifera* and large bees (*B. pennsylvanicus* + *X. californica*) was around 08:00 h to 08:30 h. The bees had another small peak of activity at dusk (19:30 hr.), when the plants start to produce pollen and nectar. The hawkmoth activity started by this time, to reached a peak by 20:30, and decreasing later. Differences between south and north were mainly on the amounts of visits.

We estimated the actual frequency of visits per flower (number of visits/ number flowers, in each inflorescence) in all the populations, to avoid the effect on the pollinators due to the larger amount of flowers in the southern plants. For the total of pollinators, we found differences among populations as a function of latitude (Table 5, Fig. 8a; slope = -0.039, $t = -4.76$, $P < 0.0001$), which explains 24% of the variance in frequency of visitation, decreasing toward northern populations. For each of the major pollinators, we detected the same patterns of differences in frequency of visits per flower (Table 5). For *Hyles lineata* (Fig. 8b; slope = -0.016, $t = -2.82$, $P = 0.0063$), latitude explains 10% of the variance in visitation frequency. For large bees (Fig. 8c; slope = -0.029, $t = -4.36$, $P < 0.0001$), latitude represents almost 20% of that variance, and the hummingbirds (Fig. 8d; slope = -0.009, $t = -2.27$, $P = 0.0261$) had a similar pattern in latitude, which explains 6% of the variance, although their visits were ca. of an order of magnitude smaller. In relation to the main robber, *Apis mellifera*, the visitation patterns were completely different from the pollinators (Fig. 9), although there were differences among populations, we found no pattern related to latitude (Table 5).

Fecundity patterns- The total number of fruits per inflorescence decreases toward northern populations (Fig. 10a; $n = 347$, $F = 154.2$, $R^2 = 0.473$, $P < 0.0001$; slope latitude = -95.26, $t = -5.2$, $P < 0.0001$; slope latitude² = 1.44, $t = 3.9$, $P = 0.0001$). But size of plants seemed to have an important effect on this pattern (Table 6). As the inflorescences were smaller in the north, to better understand the fruit production patterns we decided to evaluate the fecundity in terms of fruit-set (total of produced fruits/ total produced flowers). The clinal pattern in the fecundity was very clear (Fig. 10b; $n = 347$, $F = 73.2$, $R^2 = 0.156$, $P < 0.0001$; slope = -0.068, $t = -8.55$, $P < 0.0001$). The probability that a flower becomes a fruit is on average more than 0.5 in populations 1 to 3 (mean range = 0.55-0.59), and less than 0.4 in populations 7 through 10 (mean range = 0.33-0.35), reaching only 0.235 in population 9. The differences in fruit-set were not due to differences in sizes of the plants (Table 6) but correlate with the visitation frequency per flower ($r = 0.667$, $df = 7$, $P < 0.05$), suggesting that the plants in the cline were not limited in their fecundity by resources, but were somehow limited by pollinators.

DISCUSSION

Morphology and reproductive traits- We found clear geographic differentiation following a clinal pattern on latitude along the Chihuahuan desert: general plant morphometry, size, shape and color of the flowers and fecundity of *A. lechuguilla*. The plants in the south were larger, their flowers were longer, tubular and of a glaucous color and the fruit-set is high, while in the north the plants were smaller, the flowers were shorter, more open and red and the fruit-set is lower. Nectar characteristics also show a similar clinal pattern: in the south there was more nectar per flower, with lower sugar concentration, and very concentrated nectar in lower volume in the northern populations (Cadaval, 1999). These traits suggests adaptation in the south to nocturnal pollinators, such as bats and/or hawkmoths, whereas in the north they could suggest that we were witnessing the initial steps of adaptation to diurnal pollinators, mainly bees.

In all the studied traits, we found not only this clinal behavior, but we also found significant differences among most of the populations, indicating geographic differentiation and adaptation at a local scale. Additionally, in most of the traits we found that a substantial component of the variation were the differences among individuals within the populations. This may indicate genetic differences among them, and will favor the possibility of natural selection acting within each population. Unfortunately, we do not know the genetic basis of this morphological differentiation, and explicit genetic experiments will be needed to advance in this point.

We found more visits by pollinators towards the south and less in the north, accounting (at least in part) for the differences in fruit-set. We expected to correlate the differences in the reproductive traits among populations with differences in the pollinators on the latitudinal gradient: more bat visits in the south and more by bees in the north. Nevertheless, the visitor data indicated not a single bat visit and no clear differences in the proportions of the different groups of visitors in the gradient. In general, bees are the most important visitors to the flowers in all the gradient. The cause of differences in flower morphology may be due that in the north the plants were more limited in their fecundity, because they were less visited, and thus the selective pressures for adapting to the effective pollinators (bees in this case) are more intense, and this is

why we see the differences in flower morphology and color. Also it is possible that in the south there is more gene flow from other populations (as suggested by isozyme data, Chapter 2), swamping the effectiveness of adaptation to local conditions.

On the other hand, we know that there are clear environmental differences among the studied sites, and some of the differences in the reproductive traits may be due to adaptive responses to the more arid environment in the northern part of the transect, as indicated by the Lang's index (Fig. 1). Several plants at higher latitudes tend to be shorter and the leaves to be smaller (Dominguez et al., 1998). Moreover, it is also possible that the detected differences in morphology and color were not only due to genetic differences, and some of them were just plastic responses to the more drastic environments in the north. Taking all together, it is logic to consider that the differences among the populations are a complex mixture of the three possible causes (adaptation to pollinators, adaptation to the environment and non-genetic differences because they are in different environments).

To analyze the genetic basis of the differentiation in a long-lived perennial such as *Agave* is a difficult task because it will require the planting and attention of common garden (Colunga-GarcíaMarín and May-Pat, 1997) for more than 15 years. The differences in fecundity due to pollinators or environmental conditions are difficult to disentangle, as we would need to make reciprocal transplants to sites with similar aridity but different pollinators pools, and design detailed pollination protocols (Parra-Tabla, Vargas and Eguiarte, 1998; Arizaga et al., 2000b).

Floral visitors- The general shape of the flowers, and the pale color of at least the southern flowers as we mentioned above, would indicate that the coadapted pollinators are nocturnal animals, bats or hawkmoths. The *Agave* genus is traditionally regarded to be bat pollinated (Arizaga et al, 2000a,b), but hawkmoths and other animals are important visitors to their flowers (Slauson, 2000; Eguiarte, Souza and Silva-Montellano, 2000). Hawkmoth pollinated flowers are very similar to bat pollinated flowers, only smaller and with less resources (Baum, 1995; Cadaval, 1999). Nevertheless, we were surprised by the total lack of visits by

nectarivorous bats in all the range of distribution of *A. lechuguilla*. This may be just because our observations were limited, i.e., in other populations or sites or in other years bats may be present or even abundant. At present we only know that observations of other years in selected populations of *Agave* spp. (including *A. lechuguilla*) in the Chihuahuan desert also have not detected a single bat visit (Silva, Mandujano and Golubov, unpubl. data). Declines in the population sizes of nectarivorous bats, in particular *Leptonycteris*, have been reported (Howell, 1979; Howell and Roth, 1981; Wilson et al., 1985; Eguiarte and Búrquez, 1988). This, coupled with the fact that they are a far rarer species in the Chihuahuan desert than in the Sonoran desert and on the Pacific slope of Mexico, and with their migratory habits and foraging behavior may make them rare and unreliable pollinators in the Chihuahuan desert (Howell, 1979; Cockrum, 1991; Fleming and Nuñez da Silveira, 1993).

Hawkmoths were the most important pollinators in three of the nine evaluated populations. As mentioned above, hawkmoths are common visitors to *Agave* flowers, and in some cases may be the most important pollinators. On the other hand, hawkmoths are very unreliable pollinators, as they may not be active in cold nights, because of physiological restrictions. It is common in one night to detect abundant visits by hawkmoths and in the next colder night to register no visits (Martinez del Rio and Búrquez, 1986). Also their population sizes may fluctuate as a consequence of changes in their larval feeding plant populations, differences in weather or in parasitoid populations in the previous year (Janzen, 1988).

Overall, the more common visitors to *Agave lechuguilla* flowers were bees. The visitation frequency of large bees are higher in the south than in the north, but the relative abundances were similar along the transect. Nevertheless, given the morphology of the flowers, we suspect that in the north they were more important as pollinators, because the sizes would allow them better pollen transportation and because northern *A. lechuguilla* plants seem to be more limited by pollinators in its fecundity. Considering their foraging behavior and the local sizes and shapes of the flowers, *Xylocopa californica* bees of the north may be more efficient pollinators than the *Bombus pennsylvanicus* of the south. Data of other years in detailed experiments suggest that this is true (Chapter 3). The hummingbirds had a secondary role, because of their

lower visitation frequency, and they seemed to use the flowers opportunistically, depending on the other available resources and competition with other organisms.

The efficiency of the pollinators is shown as fruit production only if they were the main factor that limits the fecundity. Controlled pollination experiments are needed to advance in the understanding of the factors that limit the fecundity in *A. lechuguilla* (Parra-Tabla, Vargas and Eguiarte, 1998). As there was no correlation between fruit-set and size, but there was a correlation between visitation frequency and fruit-set, we consider that northern populations were limited by pollinators. Thus, a single visit by a bee may be more important than several visits of different pollinators in the south, and may explain the differences in the morphology.

Our results agree with the interspecific observations of Schaffer and Schaffer (1977) and of Freeman et al. (1983) on the evolution of nectar and morphology adapted to bee pollination in some northern (Arizona) species of *Agave*. This change is what we found within *A. lechuguilla*. Two critical questions arise: Why the southern populations maintain the bat pollination syndrome, if there are not bats? And why the flowers even in the north maintain the nectar and pollen production at night? The easiest answer may be just to summon “phylogenetic restrictions”, but the fact that northern population had changed in floral morphology indicates that some of the traits can be changed. This situation may be explained in different scenarios: 1) perhaps in the south the selective pressures are less strong; 2) probably the northern populations have had more time to adapt, because in the south the bat populations have more recently disappeared, or gene flow with other southern bat pollinated populations or species had swamped the efficiency of natural selection. We do not have data at the present moment to solve this problem, and we do not think is going to be easy to answer it.

The other question, why the nocturnal nectar and pollen production is maintained in all the populations? That could be related to more canalized “phylogenetic restrictions”, as all the species in *Agave* and *Manfreda* that have been studied (see review in Eguiarte, Souza and Silva-Montellano, 2000) had similar nectar production and pollen release patterns, and may be tied to their CAM metabolism. Nevertheless, it

would be interesting to see if some of the bee or even suspected hummingbird pollinated species are producing some nectar or pollen during the day.

General pattern and evolution- In a similar study, Domínguez et al. (1998) analyzed the flowers of *Rhizophora mangle* in the coast of Mexico. They found similar overall levels of morphological variation (CV range 19.22 to 30.06%), and there were strong differences among populations and among individuals within populations, but not clear latitudinal patterns. Unfortunately, they had no fecundity or pollinator data for that study, and apparently those flowers were mainly wind pollinated. They considered that the differentiation was due to genetic drift and founder events, as the different populations apparently started from very few colonizing genotypes, and, as there are no pollinators, most of the floral morphology behaves as a neutral, non-constrained character. Isozyme data for *R. mangle* confirmed the idea of genetic differentiation via drift in that species (Nuñez-Farfán, et al. 2001). In contrast, we consider that for *A. lechuguilla* the differences are mainly adaptive, given the consistency of the clinal patterns and the huge sizes and abundances of the populations, coupled with very high levels of genetic variation and gene flow (Chapter 2).

The detected patterns in *A. lechuguilla*, both on reproductive traits and animal visitors, highlight the problem of understanding both the process of adaptation to the pollinators and the reproductive ecology of a species. For each population, the constellation of reproductive traits is different. There is not a single “typical” or “average” population. In this particular case, the variation in most traits is more or less congruent and coordinated, and follows a clear clinal pattern. The situation for the visitors seem to be more critical, as we showed that they change in space, but given that the floral visitors data is really a instantaneous “photograph” of a couple of days in a few plants, it is logical that there are going to be large variations in its behavior within and among sites and years. These patterns clearly relate to the coevolution mosaic ideas of Thompson (1997). Although Thompson discussed mainly in negative plant-animal interactions (i.e., herbivory), it is clear that the ideas are also relevant for pollination interactions and possible coevolution. In each population the distribution of floral characters may be different, and the pollinators will be different (in

species or abundance). The result is differential adaptation to each population, which coupled with gene flow and extinction and colonization, will generate a complicated tapestry of adaptation and coevolution, not very different to the shifting balance ideas of Wright. Eventually, in a given population, a successful trait or set of traits may arise, and may disperse to different populations, even if it does not represent the optimal set of traits for the floral visitors in that population at a given moment.

Conclusion- It is clear from the differences and variability of patterns not only among populations, but also among individuals in each population, that the syndrome characterization, although attractive as a practical and general descriptive tool, may be more of a burden than an asset in detailed evolutionary studies (Waser, 1983; Waser, et al 1996; Herrera, 1996). The requirement of specificity to the most effective pollinator could be one of the major restrictions to use this concept in a practical way. Specially if there are several different pollinators with the concomitant difficulties in determining their respective efficiency, or categorizing alternative behaviors ways and visitation patterns of one pollinator in particular (Thompson and Pellmyr, 1992; Temeles, 1996; Sahley, 1996; Bruneau, 1997). Resource rich flowers, such as the ones of *Agave*, attract a large list of animals that use the flowers, and in some conditions may behave as efficient pollinators. Many of the floral traits may be better understood as general exaptations rather than good adaptations to the pollinators we may see in a given moment (Gould and Vbra, 1982). Geographic and temporal variation in floral visitors, reproductive traits and their interaction, and serious studies of adaptation should acknowledge the complex tapestry geographic mosaic of the interaction (Thompson, 1997), in a model involving differential adaptation, local extinction and colonization in a metapopulation landscape generating a shifting balance-like evolution. This is a daunting perspective, but if it is not taking into account, we will only have inadequate cartoons on how are really evolving the reproductive traits of flowering plants.

LITERATURE CITED

- Andersson, S., and B. Widen. 1993. Pollinator-mediated selection on floral traits in a synthetic population of *Senecio integrifolius* (Asteraceae). *Oikos* 66: 72-79.
- Arita, H. 1991. Spatial segregation in long-nosed bat, *Leptonycteris nivalis* and *Leptonycteris curasoae*, in Mexico. *Journal of Mammalogy* 72: 706-714.
- Arita, H., and K. Santos del Prado. 1999. The conservation of nectar-feeding bats in Mexico. *Journal of Mammalogy* 80: 31-41.
- Armbruster, W.S. 1990. Estimating and testing the shapes of adaptive surfaces: the morphology and pollination of *Delechia* blossoms. *American Naturalist* 135: 14-31.
- Arizaga, S., and E. Ezcurra. 1995. Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks. *Oecologia* 101: 329-334.
- _____, S., E. Ezcurra, E. Peters, F. Ramirez de Arellano, and E. Vega. 2000a. Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a mexican tropical desert. I. Floral biology and pollination mechanisms. *American Journal of Botany* 87: 1004-1010.
- _____, S., E. Ezcurra, E. Peters, F. Ramirez de Arellano, and E. Vega. 2000b. Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a mexican tropical desert. II. The role of pollinators. *American Journal of Botany* 87: 1011-1017.
- Ayala, R., T. Griswold, and H. Bullock. 1993. The native bees of Mexico. In, T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot and J. Fa (eds.), Biological diversity of Mexico. 179-228 Oxford University Press, Oxford.
- Baker, H. y P. Hurd. 1968. Intrafloral Ecology. *Annual Review of Entomology* 13: 385-414.
- Baum, D. 1995. The comparative pollination and floral biology of baobabs (*Adansonia*-Bombacaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 322-348.
- Briones, O. 1994. Origen de los desiertos mexicanos. *Ciencia*. 45: 263-279
- Bruneau, A. 1997. Evolution and homology of bird pollination syndromes in *Erythrina* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 84: 54-71.
- Cadaval, A. 1999. Estudio evolutivo de los azúcares del néctar de *Agave lechuguilla* en el desierto de Chihuahua. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Conner, J., R. Davis, and S. Rush. 1995. The effect of wild radish floral morphology on pollination efficiency by four taxa of pollinators. *Oecologia* 104: 243-245.
- Cockrum, L. 1991. Seasonal distribution of northwestern populations of the long-nosed bats *Leptonycteris sanborni* (Phyllostomatidae). *Annales del Instituto de Biología, UNAM. Sección Zoología* 62: 181-202.
- Colunga-GarcíaMarín, P., and F. May-Pat. 1997. Morphological variation of henequen germplasm and its wild ancestor under uniform growth conditions: diversity and domestication *American Journal of Botany* 85: 637-643.
- Eguiarte, L., and A. Búrquez. 1988. Reducción en la fecundidad de *Manfreda Brachystachya*, (Cav.) Rose, una agavácea polinizada por murciélagos: los riesgos de la especialización en la polinización. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 48: 147-149.
- _____, V. Souza, and A. Silva-Montellano. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: Filogenia, ecología evolutiva de la reproducción y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 66: 131-150.
- Dafni, A. 1992. Pollination biology: a practical approach. Oxford University Press. Oxford, United Kingdom
- Dominguez, C., L. Eguiarte, J. Nuñez-Farfan, and R. Dirzo. 1998. Flower morphometry of *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae): geographical variation in mexican populations. *American Journal of Botany* 85: 637-643.
- Faegri, K., and L. van der Pijl. 1971. The principles of pollination ecology. 2nd ed. Pergamon Press, Oxford.

- _____, and _____. 1979. The principles of pollination ecology. 3rd ed. Pergamon Press, Oxford.
- Feinsinger, P. 1983. Coevolution and pollination. In D. Futuyma and M., Slatkin (eds). Coevolution, 282-310. Sunderland, Mass.
- Fleming, T., R. Nuñez, and L. da Silveira. 1993. Seasonal changes in the diets of migrant and non-migrant nectarivorous bats as revealed by carbon stable isotope analysis. *Oecologia* 94: 72-75.
- Freeman, E. and W. Ried. 1985. Aspects of the reproductive biology of *Agave lechuguilla* (Torr). *Desert Plants* 7: 75-80.
- _____, E., W. Ried, J. Becvar, and R. Scogin. 1983. Nectar sugar composition in some species of *Agave* (Agavaceae). *Madroño* 30: 153-158.
- Galen, C. 1989. Measuring pollinator-mediated selection on morphometric floral traits bumblebees and the alpine sky pilot, *Polemonium viscosum*. *Evolution* 43: 882-890.
- _____. 1996. Rates of floral evolution: adaptation to bumblebee pollination in alpine wildflower, *Polemonium viscosum*. *Evolution* 50: 120-125.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köpen. D.F., México.
- Gentry, H. 1982. Agaves of Continental North America. University of Arizona Press, Tucson.
- Gould, S. and E. Vbra. 1982. Exaptation—a missing term in the science of form. *Paleobiology* 8: 4-15.
- Herrera, C. 1990a. The adaptedness of the floral phenotype in a relict endemic, hawkmoth-pollinated violet. 1. Reproductive correlation of floral variation. *Biological Journal of Linnean Society* 40: 263-274.
- _____. 1990b. The adaptedness of the floral phenotype in a relict endemic, hawkmoth-pollinated violet. 2. Patterns of variation among disjunct populations. *Biological Journal of Linnean Society* 40: 275-271
- _____. 1993. Selection on floral morphology and environmental determinants of fecundity in a hawkmoth-pollinated violet. *Ecological Monographs* 63: 251-175.
- _____. 1996. Floral traits and plant adaptation to insect pollinators: a devil's advocate approach. In D., Lloyd and S. Barret (eds.) *Floral Biology: Studies in floral evolution of animal-pollinated plants*. 65-87. Chapman and Hall, New York.
- Howell, D.J. 1979. Flock foraging in nectar-feeding bats: Advantages to the bats and the host plants. *American Naturalist* 144: 23-49.
- Howell, D.J. and, B. Roth. 1981. Sexual reproduction in agaves: the benefits of bats; the cost of semelparous advertising. *Ecology* 62: 1-7.
- Inoue, K., M. Maki, and M. Masuda. 1996. Evolution of *Campanula* flowers in relation to insect pollinators in islands. In D., Lloyd and S., Barret (eds.) *Floral Biology: Studies in floral evolution of animal-pollinated plants*, 377-400. Chapman and Hall, New York.
- Janzen, D. H., 1988. Ecological characterization of a costa rican dry forest caterpillars fauna. *Biotropica* 20: 120-135.
- Johnsgrad, P. 1993. The Hummingbirds of North America. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Johnston, M. 1991. Natural selection on floral traits in two species of *Lobelia* with different pollinators. *Evolution* 45: 1468-1479.
- Kuban, J., J. Lawley, and R. Neill. 1983. The partitioning of flowering century plants by Black-chained and Lucifer hummingbird. *The Southwestern Naturalist* 28: 143-148.
- Krebs, C. 1989. Ecological Methodology. Harper and Row, New York.
- Melendez-Ackerman, E., D. Cambell, and N. Waser. 1997. Hummingbird behavior and mechanisms of selection on flower color in *Ipomopsis*. *Ecology* 78: 2532-2541.
- Martinez del Rio, C, and A. Búrquez. 1986. Nectar production and temperature dependent pollination in *Mirabilis jalapa* L. *Biotropica* 18: 28-31

- Martinez del Rio, C. and L. Eguiarte, 1987. Bird visitation to *Agave salmiana*: comparisons among hummingbirds and perching birds. *The Condor* 89: 357-363.
- Meacham, C. and T. Duncan. 1990. MorphoSys. University of California, Berkeley.
- Mohr, E. C., and F. A. van Baren. 1954. Tropical soils. In N. V. Vitg and W. van Hove (eds). Interscience Publish.
- Nassar, J. M., N. Ramirez, and O. Linares. 1997. Comparative pollination biology of venezuelan columnar cacti and the role of nectar-feeding bats in their sexual reproduction. *American Journal of Botany* 84: 918-927.
- Nobel, P. 1988. Environmental biology of agaves and cacti. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Núñez-Farfán, J., C. A. Domínguez, L. E. Eguiarte, A. Cornejo, M. Quijano, and R. Dirzo. 2001. Genetic divergence among Mexican populations of red mangrove (*Rhizophora mangle*): geographic and historic effects. Mans.
- Parra-Tabla, V., C. Vargas, and L. Eguiarte. 1998. Is *Echeveria gibbiflora* (Crasulaceae) fecundity limited by pollen availability?: an experimental study. *Functional Ecology* 12: 591-595.
- Percival, M. 1965. Floral Biology. Pergamon press. Oxford, United Kingdom.
- Proctor, M., and P. Yeo. 1973. The pollination of flowers. Collins, London.
- SAS. 1995. JMP statistics and graphics guide. SAS institute, Cary. N.C.
- Schaffer, W., and V. Schaffer. 1977. The reproductive biology of Agavaceae I: pollen and néctar production in four Arizona agaves. *The Southwestern Naturalist*. 22: 157-168.
- _____, and _____. 1979. The adaptative significance of variations in reproductive habit in Agavaceae II: Pollinator foraging behavior and selection for increased reproductive expenditure. *Ecology* 60: 1051-1069.
- Shaley, C. T. 1996. Bat and hummingbird pollination of an autotetraploid columnar cactus *Weberbauerocereus weberbaueri* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 83: 1329-1336.
- Slauson, L. A. 2000. Pollination biology of two chiropterophilous agaves in Arizona. *American Journal of Botany* 87: 825-836.
- Sokal, R. and F. J. Rohlf. 1995. Biometry. 3° ed. W. H. Freeman and Company. New York.
- Temeles, E. 1996. A new dimension to hummingbird-flower relationship. *Oecologia* 105: 517-523.
- Thompson, J. 1994. The coevolutionary proces. University of Chicago press, Chicago.
- _____. 1997. Evaluating the dynamics of coevolution among geographically structured populations. *Ecology* 78: 1619-1623.
- _____, and O. Pellmyr. 1992. Mutualism with pollinating seed parasites amid co-pollinators: constraints on specialization. *Ecology* 73: 1780-1791.
- Waser, N. 1983. The adaptative nature of floral traits: ideas and evidence. In L., Real (ed.) *Pollination Biology*, 163-201. Academic Press, Orlando.
- Waser, N. M., L. Chittka, M. V. Price, N. M. Williams, and J. Ollerton. 1996. Generalizations in pollination systems, and why it matters. *Ecology* 77: 1043-1060.
- Wilde, S. A., and G. K. Voigt. 1952. The determination of color of plant tissues by the use of standard charts. *Agronomy Journal* 44: 499-500.
- Wilson, D.E., R. Medellín, D. V. Lanning, and H. Arita. 1985. Los murciélagos del noreste de México, con una lista de especies. *Acta Zoológica Mexicana* 8: 1-26.
- Wyatt, R. 1983. Pollinator-plant interactions and the evolution of breeding systems. In L., Real (Ed.) *Pollination Biology*, 51-86. Academic Press, Orlando.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1 .- Lang's humidity index for the populations of *A. lechuguilla* along the latitudinal transect (García, 1988). (Lang's I.= Total annual precipitation /mean annual T°).

Figure 2.- Morphometric floral characters measured for *Agave lechuguilla* in 10 populations along the latitudinal gradient: a) Floral length; b) Corolla length; c) Corolla diameter; d) Ovary length; e) Tube length; f) Tube diameter.

Figure 3.- Linear regression between rosette volume (L) and the number of flowers per individual of all populations of *A. lechuguilla*; data is presented transformed to natural logarithm (\ln).

Figure 4.- Latitudinal variation of two principal components for floral traits in 10 populations of *A. lechuguilla*: a) PC1; b) PC2.

Figure 5.- Plot of the *A. lechuguilla* populations as function of two principal components. Points and circles around them represent mean and SE for population. Numbers correspond to latitude (population number).

Figure 6.- Variation in proportion of red in flower structures of individuals in 10 populations of *A. lechuguilla* along the latitudinal transect: a) Red tepals; b) Red filaments.

Figure 7.- Number of visitors according to hour of day for species and/or groups of species a) Total account for southern populations (1 to 5); Northern populations (6 to 10).

Figure 8.- Variation in frequency of pollinators visits per flower (Number of visits/Number of flower), estimated from 8 focal inflorescences per site in 12 hours of observation per population along the latitudinal transect : a) Total pollinators; b) *Hyles lineata*; c) Large bees; d) Hummingbirds.

Figure 9.- Variation in frequency of *Apis mellifera* visits per flower (Number of visits/Number of flower), estimated from 8 focal inflorescences per site in 12 hours of observation per population along the latitudinal transect.

Figure 10.- Latitudinal variation in fecundity in all populations of *A. lechuguilla*: a) Number of fruits per individual; b) Fruit-set per individual (N°Fruits/ N°Flowers).

Table 1.- Descriptive statistics and the two first componentes from the principal components analysis, of the floral morphometric variables in 10 populations of *Agave lechuguilla* along the latitudinal transect. (Number of flowers per population n (range) = 96-140, N (total)= 1229 flowers; Coeficient of variation = $DS/media*100$).

Variable	Mean (mm)	SD	Coef. of Variation	C. P. 1	C. P. 2
Floral length	55.08	10.62	19.28	0.465	0.236
Corolla length	15.34	3.59	23.4	0.493	-0.213
Corolla diameter	19.28	5.43	28.16	-0.182	0.810
Ovary length	16.76	3.31	19.74	0.399	0.262
Tube length	2.47	1.29	52.23	0.481	-0.183
Tube diameter	6.93	2.42	34.9	0.345	0.489
(%) Variance				55.6%	31.3%
Total					86.9%

Table 2.- Pearson's correlation coefficients (r) for the floral morphometric variables measured in 10 populations of *Agave lechuguilla* (Number of flowers per population n (range) = 96-140, N (total)= 1229 flowers)

Traits	Corolla length	Corolla diameter	Ovary length	Tube length	Tube diameter
Floral length	0.75***	-0.18 ns	0.65***	0.81***	0.35**
Corolla length		-0.64***	0.56**	0.81***	0.25*
Corolla diameter			-0.002ns	-0.47**	0.14 ns
Ovary length				0.59***	0.20*
Tube length					-0.32**

* $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$

Table 3.- Values of nested ANOVA (population, individual) for both principal components, calculated for the floral morphometric variables measured over the flowers ($n = 1229$) in 10 populations of *Agave lechuguilla*.

Variable	Factor	<i>df</i>	<i>SC</i>	<i>F</i> (% Var.)	<i>P</i>
Comp. P. 1	Population	9	2873.8	89.8 (74.2)	< 0.00001
	Individual [Pop.]	176	635.5	15.1 (16.4)	< 0.00001
	Model	185	3626.4	82.2 (93.6)	< 0.00001
	Total	1228	3875.3		
Comp. P. 2	Population	9	575.6	22.1 (43.1)	< 0.00001
	Individual [Pop.]	176	517.3	14.6 (38.9)	< 0.00001
	Model	185	1123.5	30.2 (83.3)	< 0.00001
	Total	1228	1333.2		

Table 4.- Number of observed visitors, by species and percentage for groups of species in 10 populations of *Agave lechuguilla* , along latitudinal transect (% calculated over total de visitors).

Visitors/Populations	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total spp.	Group (%)
Pollinators												
<i>Hyles lineata</i>	6	22	---	4	2	2	4	14	3	3	60	Hawkmoths (9.47)
<i>Xylocopa californica</i>	0	0	0	0	0	4	3	2	7	4	20	
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	31	9	46	27	15	0	0	0	0	0	128	Large bees (23.4)
<i>Eugenes fulgens</i>	4	3	2	3	3	0	1	0	0	1	17	
<i>Calothorax lucifer</i>	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	4	
<i>Archilochus alexandri</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	4	
<i>Selasphorus spp.</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	Hummingbirds (4.11)
Total Population	43	34	48	35	21	7	9	17	11	9	234	Pollinators (36.97)
Robbers												
<i>Apis mellifera</i>	41	51	17	46	41	20	48	10	29	17	320	Bees (50.55)
<i>Selasphorus spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
Vespidae	4	1	0	2	2	1	0	0	0	0	10	
Other little bees	15	10	6	8	6	5	11	0	2	5	68	Other (12.64)
Total Population	60	62	23	56	49	26	59	10	32	22	399	Robbers (63.03)
Total visitors	103	96	71	91	70	33	68	27	43	31	633	

Tabla 5 .- ANOVA and linear regression values for each visitor or group of visitors, in *Agave lechuguilla*, as a function of frequency of visits per flower along the latitudinal gradient.

Nº of visit per flower	Factor	df	SC	F	R ²	P
Total Pollinators	Population	8	1.13	4.05	0.339	0.0006
	Total	71	3.33			
	Latitude	1	1.47	22.62	0.244	< 0.0001
	Total	71	6.05			
<i>Hyles lineata</i>	Population	8	0.18	3.34	0.298	0.0030
	Total	71	0.61			
	Latitude	1	0.24	7.95	0.102	0.0063
	Total	71	2.41			
Large bees	Population	9	0.85	5.07	0.395	< 0.0001
	Total	79	2.15			
	Latitude	1	0.89	19.04	0.196	< 0.0001
	Total	79	4.55			
Hummingbirds	Population	9	0.02	2.74	0.261	0.0083
	Total	79	0.09			
	Latitude	1	0.07	5.14	0.062	0.0261
	Total	79	1.23			
<i>Apis mellifera</i>	Population	9	0.43	3.12	0.286	0.0032
	Total	79	1.49			
	Latitude	1	0.02	0.497	0.006	0.4829
	Total	79	3.68			

Table 6 .- ANCOVA values for the fecundity variables according to all factors of the tested model in 10 populations of *Agave lechuguilla*. (Vol*Pop.= interaction between two factors).

Source	Factor	<i>df</i>	<i>SC</i>	<i>F</i> (%Var)	<i>P</i>
N° fruits	Latitude	1	51.69	164.1 (20)	< 0.0001
	Rosette Volume	1	15.62	49.6 (6.1)	< 0.0001
	Model	2	149.75	50.1 (58)	< 0.0001
	Total	346	258.17		
Fruit-set	Latitude	1	12.92	73.2 (15.6)	< 0.0001
	Rosette Volume	1	0.14	0.8	0.36
	Model	2	21.94	62.1 (27)	< 0.0001
	Total	346	82.69		

Fig. 1

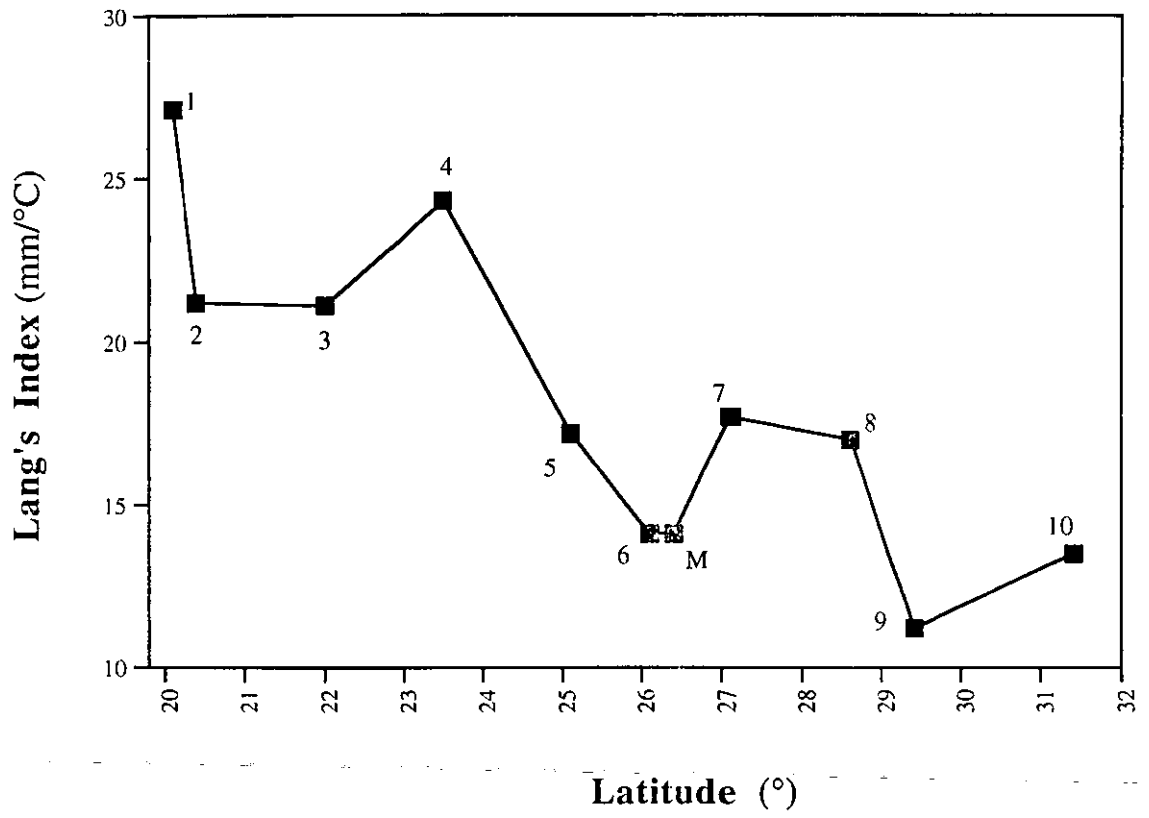


Fig. 2

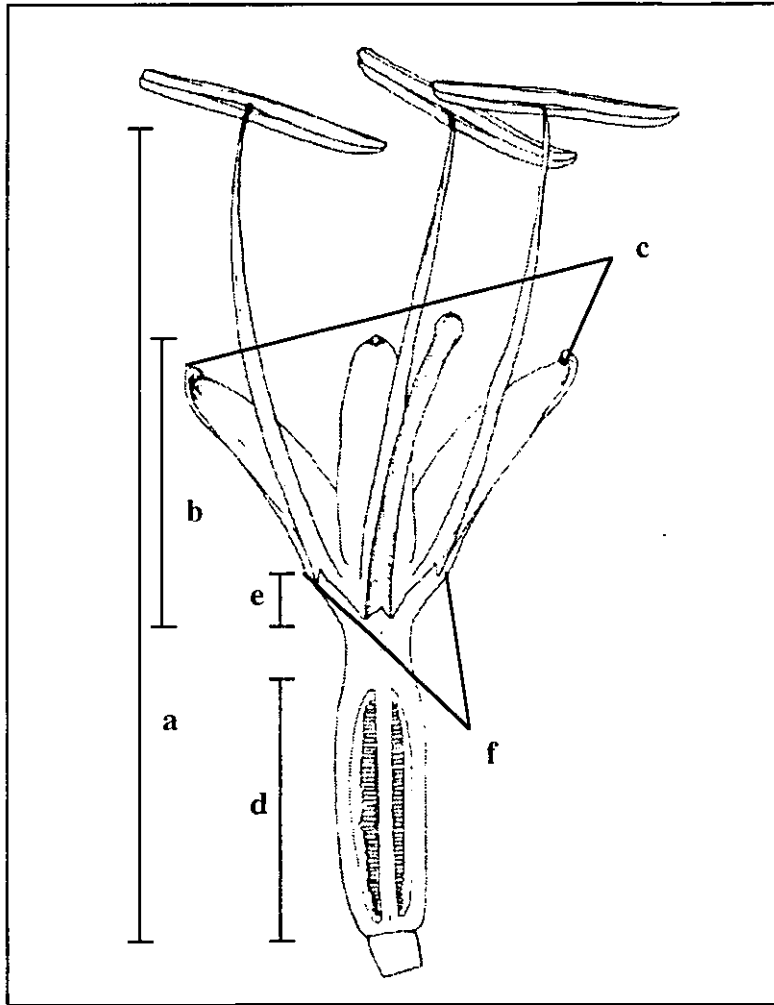


Fig. 3

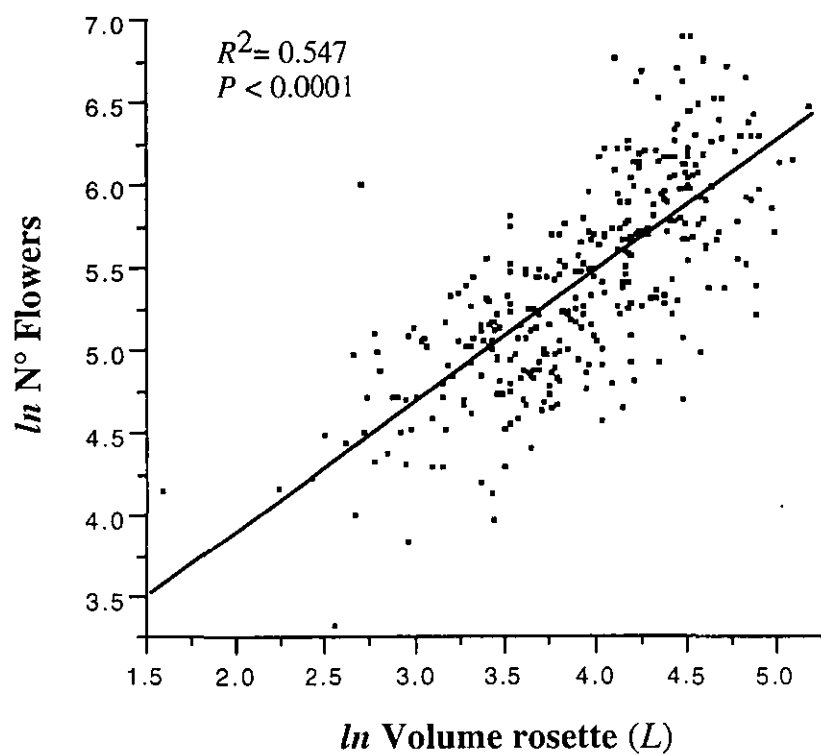


Fig. 4

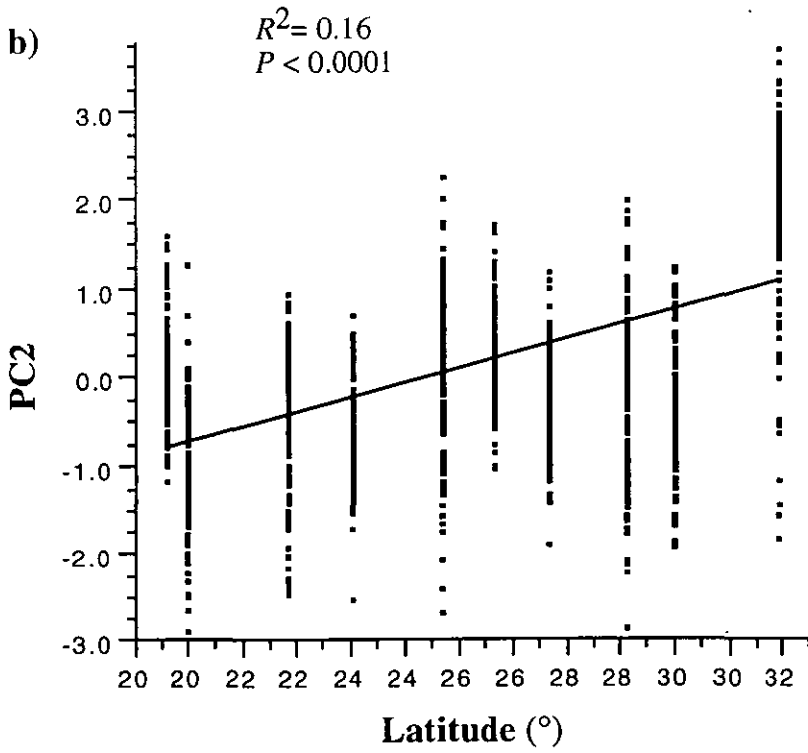
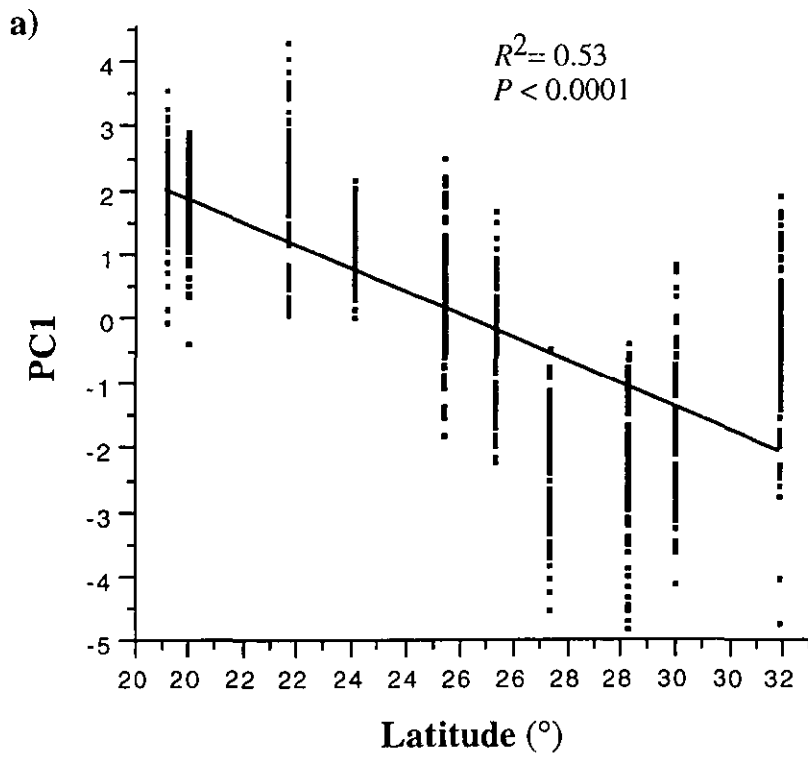


Fig. 5

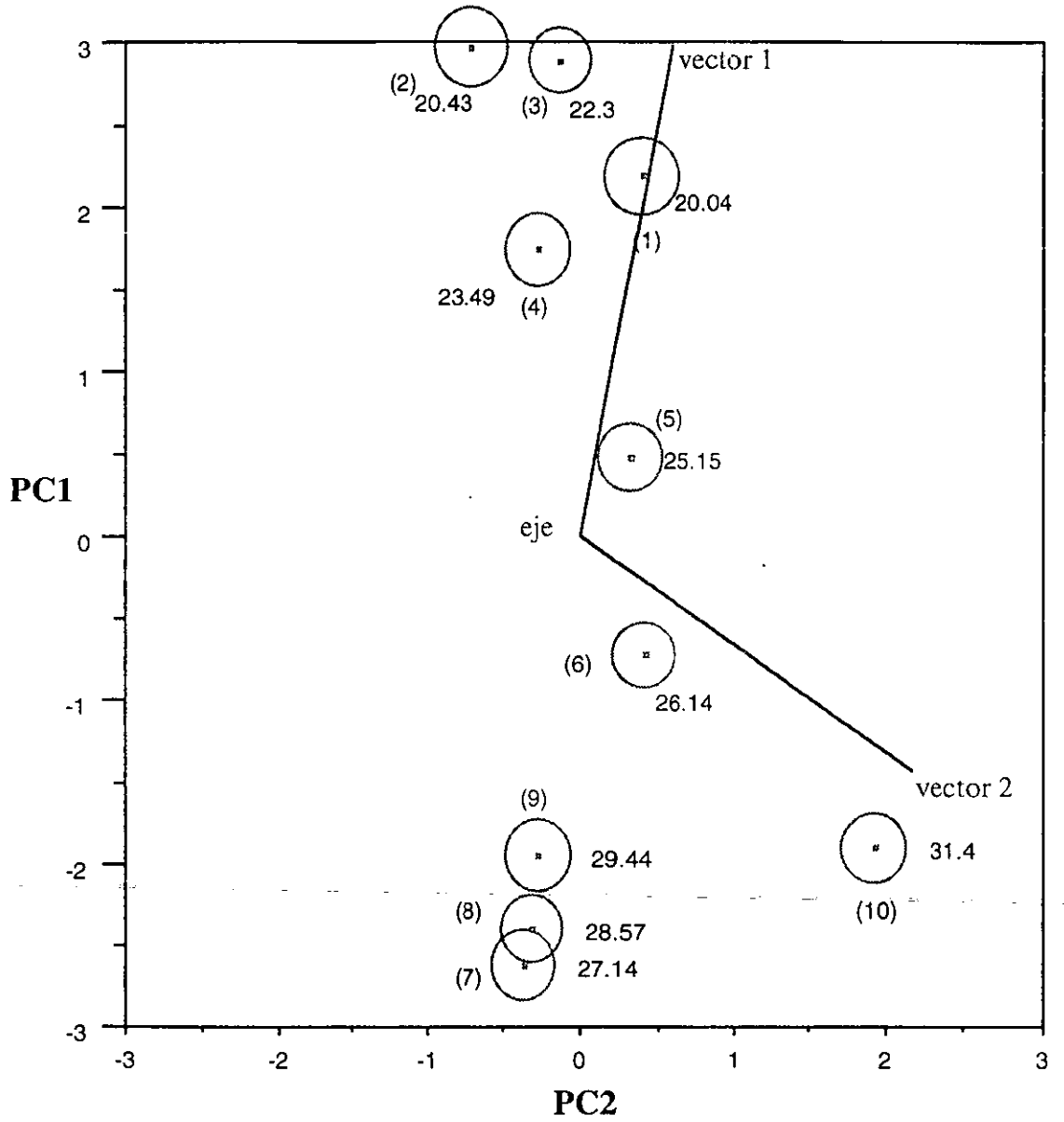
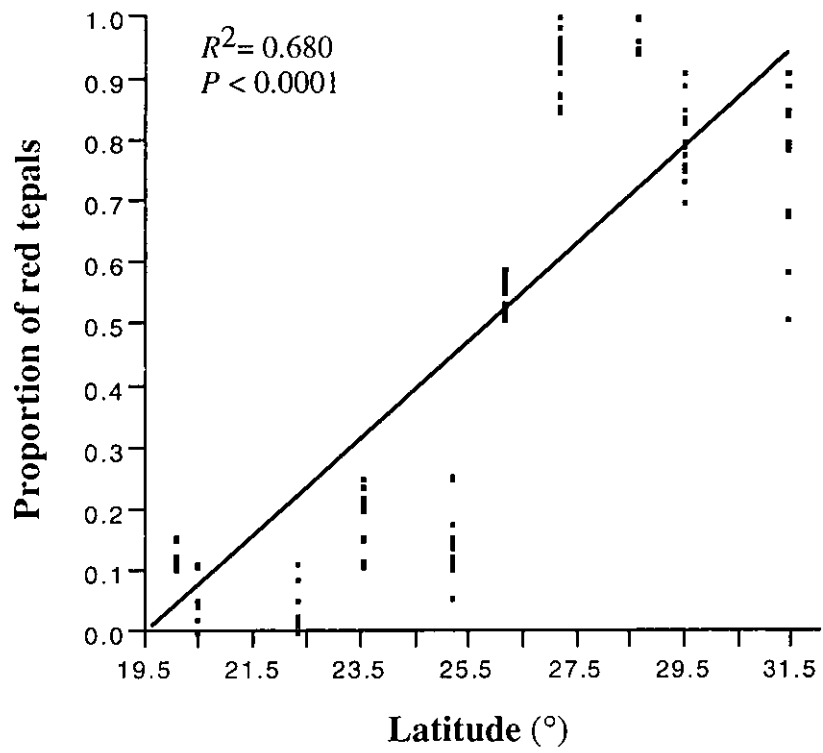


Fig. 6

a)



b)

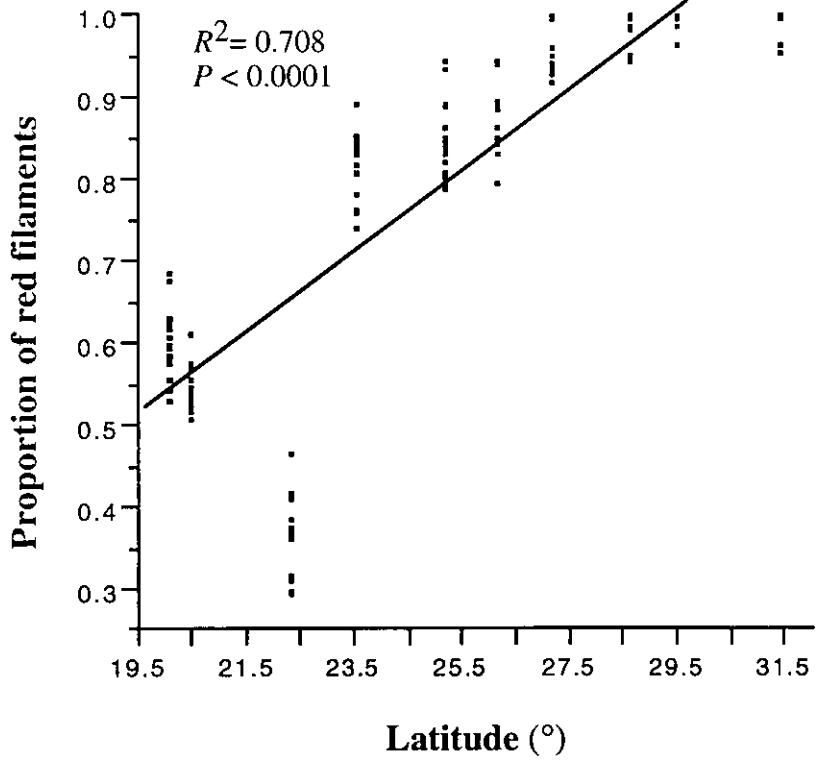


Fig. 7

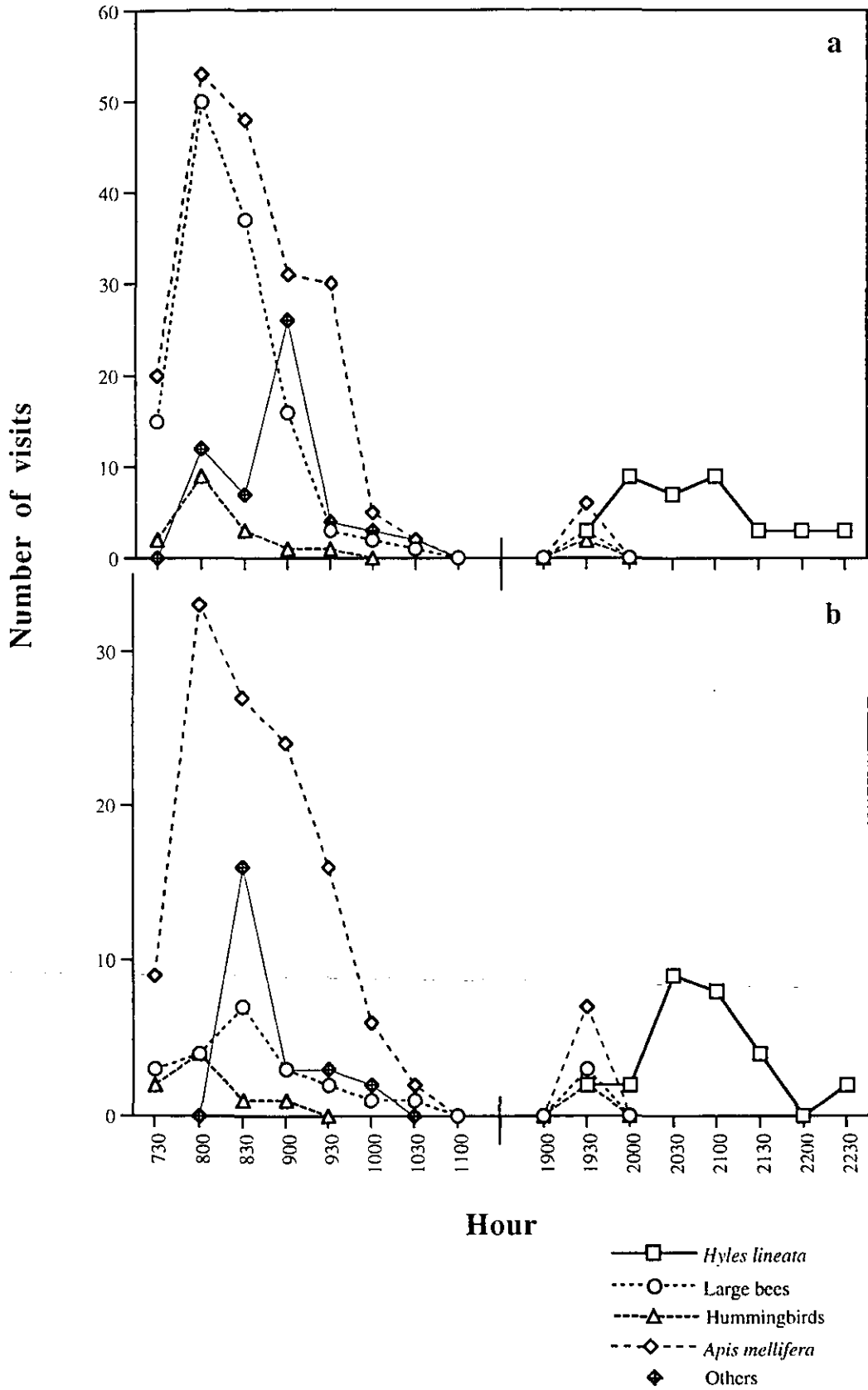


Fig. 8

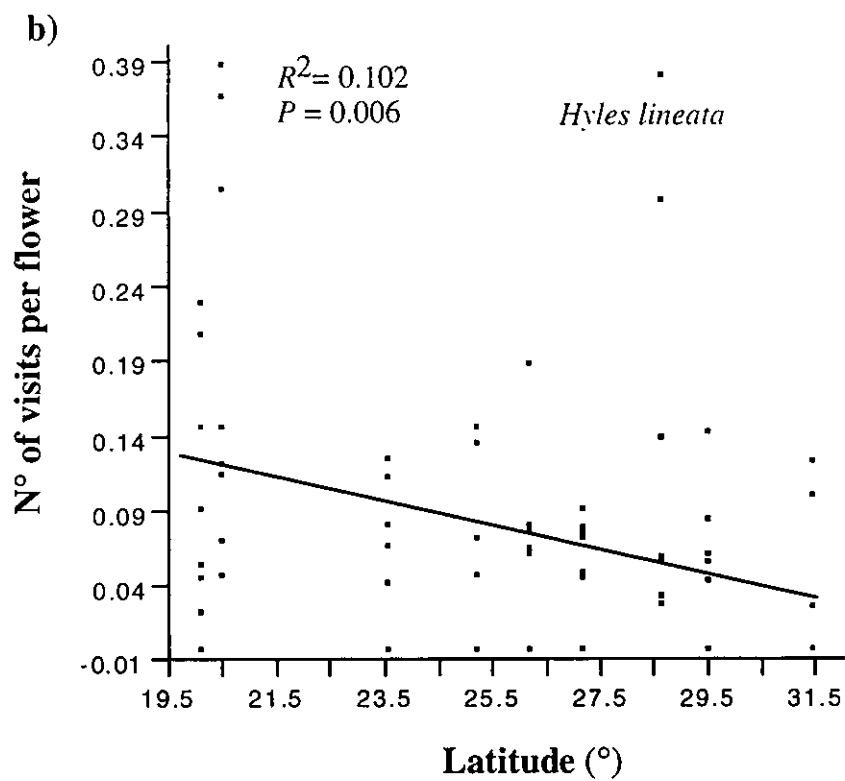
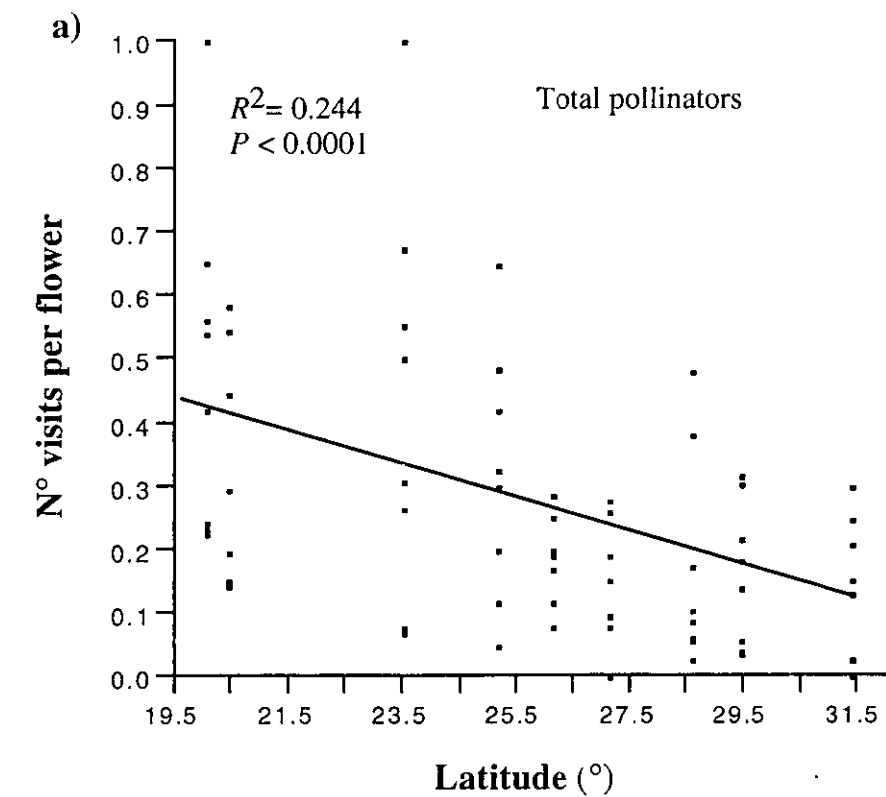


Fig. 8

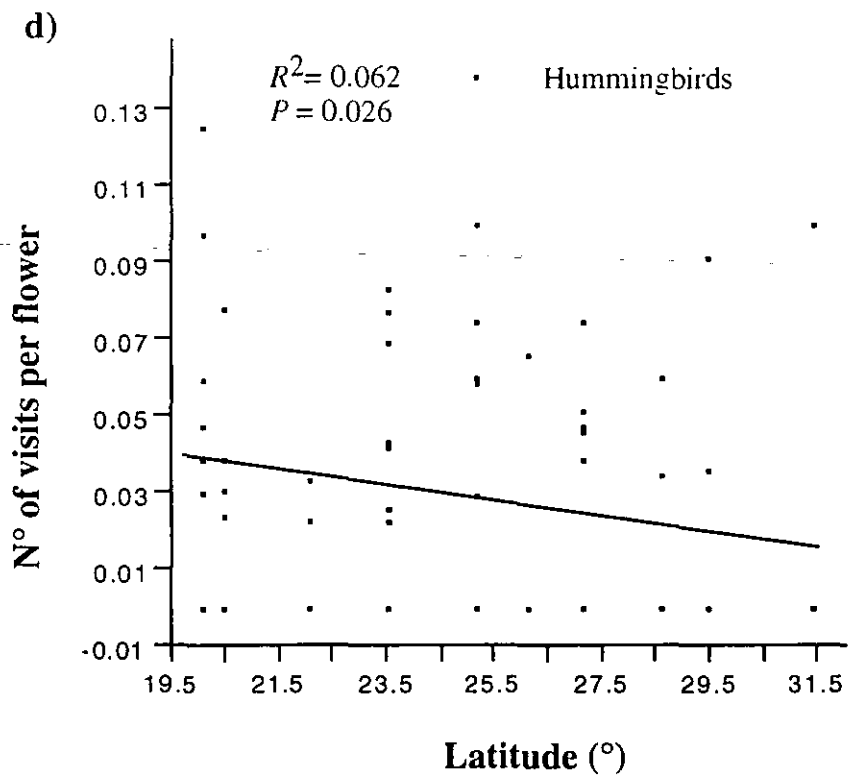
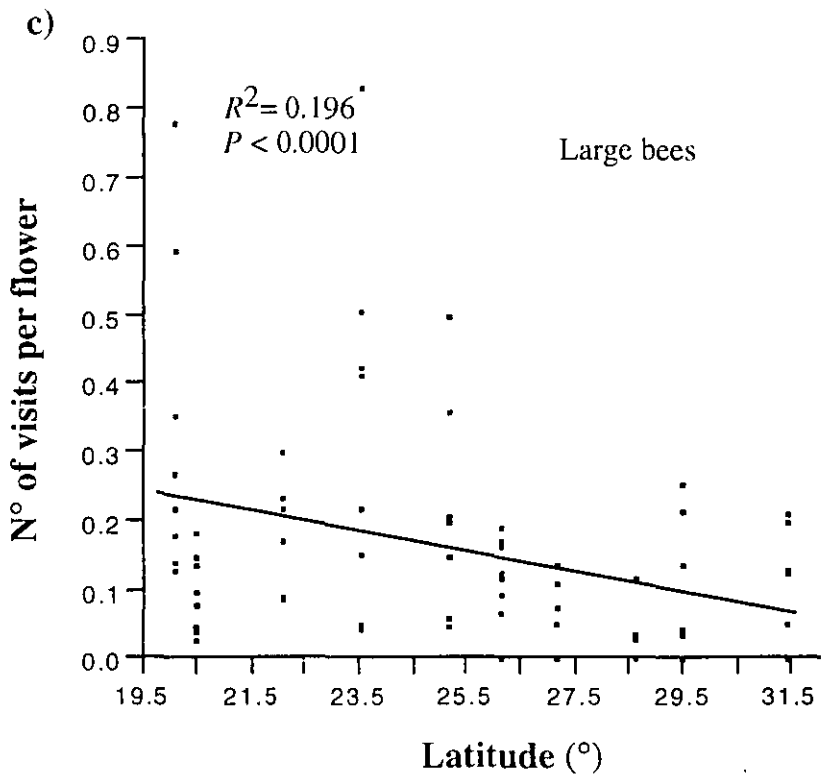


Fig. 9

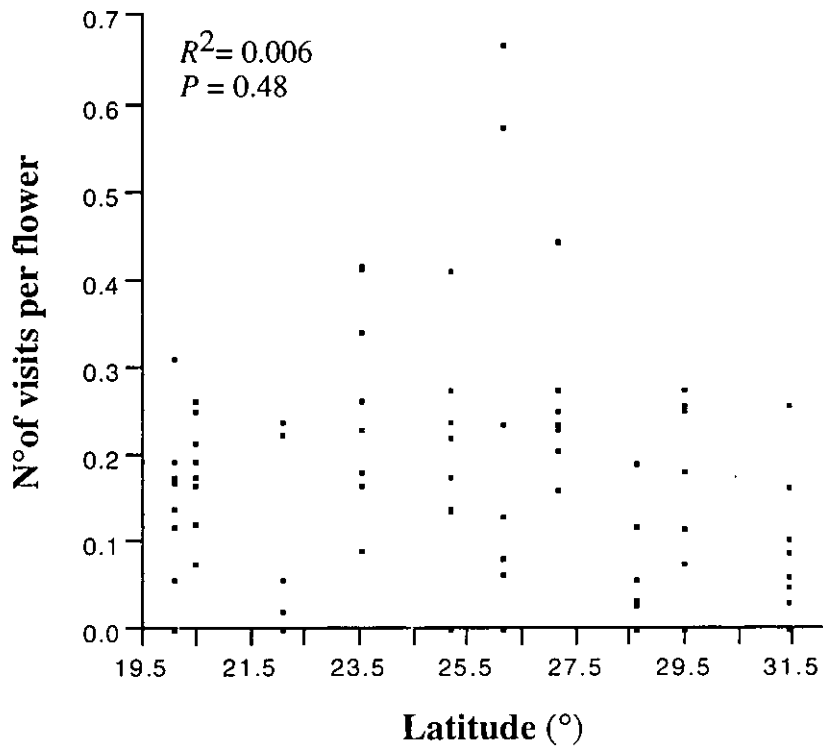
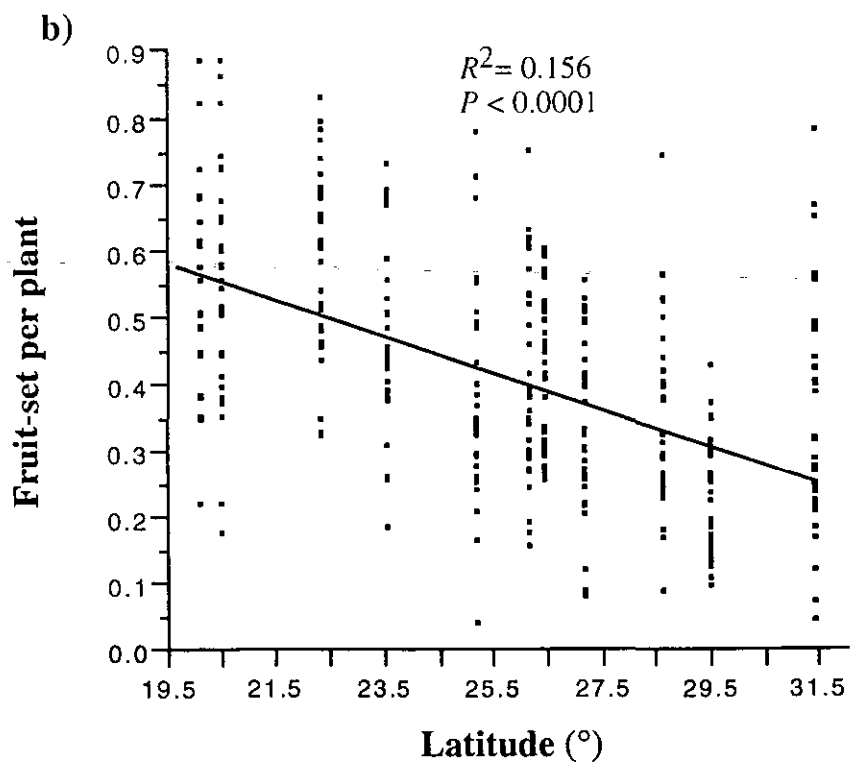
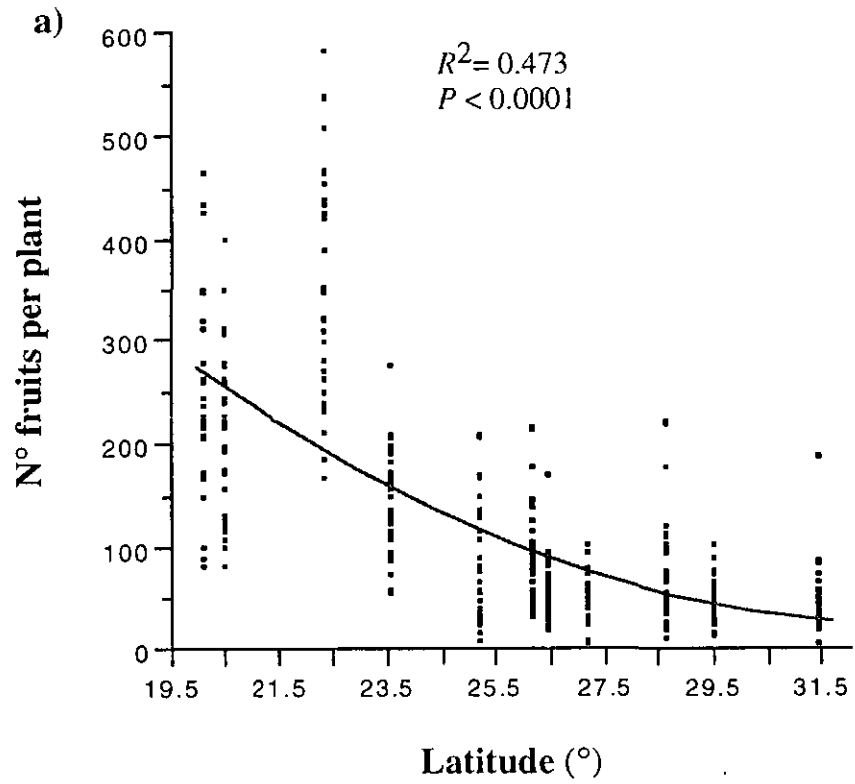


Fig. 10



Geographical patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. III. Genetic variation, differentiation and inbreeding estimates

Abstract.- Reproductive ecology affects the genetic structure of populations and determines the levels of gene flow among them and the level of inbreeding. Plants which present variation in floral traits, and hence in reproductive ecology, can be useful models to analyze the roles of natural selection and other evolutionary forces on the genetic structure of natural populations. *Agave lechuguilla* shows a clear latitudinal pattern in floral morphology, color and nectar production along its distributional range. Moreover, the type and abundance of its pollinators also change with latitude. Using starch electrophoresis we examined the levels and patterns of variation of 13 polymorphic allozyme loci in 11 populations of *A. lechuguilla*. The level of genetic variability was high ($H = 0.394$). The most southern populations had excess of heterozygotes in relation to the Hardy-Weinberg equilibrium expectations, in contrast the northern populations displayed an excess of homozygotes. Total differentiation among populations was low ($\theta = 0.083$), although gene flow (Nm) varied among groups of populations. Southern populations had the highest levels of gene flow whereas northern populations had the lowest levels. This pattern is consistent with variation in floral traits and pollinator visits in the same populations of the species, and supports a view of current evolution of floral characters and mating system in *A. lechuguilla*.

INTRODUCTION

Reproductive ecology and genetic structure of natural populations are deeply interconnected. Reproductive ecology determines the amount of self and cross-pollination as well as the distance that pollen and seeds move within a population, affecting the levels of inbreeding within populations (Schoen, 1982a,b; Handel, 1983; Schoen and Clegg, 1985; Hamrick and Loveless, 1989; Hamrick and Godt, 1989; Eguiarte et al., 1993). Additionally, reproductive ecology can influence the amount of gene flow among populations, and the effective population sizes and potential for natural selection (Hamrick and Loveless, 1989; Hamrick and Godt, 1989; Parra, Vargas and Eguiarte, 1993; Eguiarte et al., 1993; Slatkin, 1994). On the other hand, genetic structure determines the evolution of reproductive traits, which in turn depend upon the availability of useful genetic variation and on effective population sizes (Hedrick, 1983; Parra, Vargas and Eguiarte, 1993). Although the literature on plant reproductive ecology and genetic structures is vast, few studies have explicitly studied the joint variation of reproductive ecology and genetic structure geographically (Schoen, 1982a,b; Ohara et al., 1996; Wong and Sun, 1999). Geographic studies that include several populations with contrasting environmental conditions, that may generate differences in the reproductive ecology and in the genetic variation, are useful for understanding the process of evolution at species level. For instance, Schoen (1982a and b) studied *Gilia achilleifolia* in California and found correlations between the pollinator identity, the reproductive biology, out-crossing rates and levels of genetic variation among several populations. Similar patterns were found in *Trillium kamtschaticum* in several populations of Hokkaido by Ohara et al. (1996). In *T. kamtschaticum* variation in breeding system and genetic diversity of populations are related to the presence of pollinators in different parts of the island.

We studied the relationship between the reproductive ecology and the genetic structure in several populations of *Agave lechuguilla* along a latitudinal gradient in the Mexican portion of the Chihuahuan desert. Along this gradient, the species shows clear variation in floral traits: southern populations have long and tubular pale flowers that produce large amounts of diluted nectar, and that are intensively visited by nocturnal and diurnal pollinators. In contrast, the northern populations have shorter and more open reddish

flowers, which produce smaller quantities of concentrated nectar and are less intensely visited (Chapter 1). The efficiency of fruit production is also higher in southern than in northern populations (see Chapter 1). Here we analyze the genetic structure of *A. lechuguilla* along its distributional range, and investigate possible correlations between interpopulation differences in floral biology and differences in levels of genetic variation, inbreeding and differentiation. Because flowers are less frequently visited in the north, we expected higher inbreeding and higher genetic differentiation in northern populations, and in the south, we expected higher gene flow.

MATERIALS AND METHODS

Study species.- *Agave lechuguilla* Torr. (Agavaceae, subgenus *Littaea*, Marginateae Group; Gentry, 1982) is one of the most abundant *Agave* species. This small century plant is abundant throughout the Chihuahuan desert. Chapter 1 and Cadaval (1999) describe the general characteristics and floral biology of *A. lechuguilla*.

Studied populations.- We studied 11 populations along a latitudinal gradient that extends through most of the Mexican portion of the Chihuahuan desert (Table A). Those populations show no statistical differences in density of rosettes and inflorescences (Chapter 1). Samples for genetic analyses were collected from June to September 1996. Forty different individuals were collected in each population from an area of approximately 2 ha. To avoid repeatedly sampling members of clones, we collected tissues from individuals that were more than 2 meters apart (see Trame, Coddington and Paige, 1995). We sampled the younger expanded leaf of each rosette, and collected a small portion from its base. Samples were transported in liquid N₂ and stored at -80 °C until used.

Allozyme procedures.- We followed standard procedures for starch-gel electrophoresis (Soltis et al., 1983; Martínez-Palacios, Eguiarte and Furnier, 1999). Samples were mechanically disrupted with an electric drill, using 15 to 20 drops of the extraction buffer described in Aguirre-Planter, Furnier and Eguiarte (2000).

Extracts were absorbed in 12 x 1.5 mm paper wicks and stored at -80 °C. Allozymes were run in 12% starch gels for 7 h at 60 mA, using buffer system 8 of Soltis et al. (1983) with gel buffer at pH 7.6. We analyzed 10 enzymes, giving a total of 13 loci: Phosphoglucose isomerase (PGI, E.C. [Enzyme Commission number] 5.3.1.9, 2 loci), Glutamate oxaloacetate transaminase (GOT, E.C. 2.6.1.1, 1 locus), Leucine aminopeptidase (LAP, E.C. 3.4.11.1, 1 locus), Esterase (EST, E.C. 3.1.1.1, 1 locus), Diaphorase (DIA, E.C. 1.6.4.3, 2 loci), Malic enzyme (ME, E.C.1.1.1.40, 1 locus), Phosphoglucomutase (PGM, E.C. 2.7.5.1, 2 loci), Acid phosphatase (ACPH, E.C.3.1.3.2, 1 locus), Anodic peroxidase (APX, E.C. 1.11.1.7, 1 locus) and Cathodic peroxidase (CPX, E.C. 1.11.1.7, 1 locus). Staining procedures correspond to those of Soltis et al. (1983), with minor modifications available from the authors.

The fastest loci and alleles were scored as 1, the second 2, and so on, following genetic interpretations of the closely related species, *Agave victoriae-reginae* (Martínez-Palacios, Eguiarte and Furnier, 1999) for the 9 loci common to both species. One population of *A. victoriae-reginae* (population 7, see Martínez-Palacios, Eguiarte and Furnier, 1999) was used in the analysis both as an outgroup (see below) and for comparison of the loci and alleles, including the 13 loci of the present study.

Statistical analyses.- Most of the statistical genetic analyses were done using TFPGA (Miller, 1997), unless indicated otherwise. We obtained the allelic frequencies for each locus, and from these frequencies we calculated the proportion of polymorphic alleles (P), the observed (H_o) and expected (H_e) heterozygosities, the average number of alleles per locus (A) and the effective number of alleles (A_e) (Hedrick, 1983). To analyze the deviations from Hardy-Weinberg equilibrium, we estimated the fixation index (F) for each locus from each population with BIOSYS (Swofford and Selander, 1981), using χ^2 test to evaluate if deviations were different from 0 (Li and Horvitz, 1953). Clinal variation of expected and observed heterozygosities per locus and fixation index per locus along the latitudinal gradient, were tested using regression for repeated measures of Y (Sokal and Rohlf, 1995) which includes an ANOVA for differences among populations.

Wright's F statistics were obtained following Weir and Cockerham (1984; F , f and θ , equivalent to F_{it} , F_{is} and F_{st} , respectively) procedures. Single locus values for each index was tested if different from 0 using χ^2 tests (Li and Horvitz, 1953; Workman and Niswander, 1970) and averaged by means of a jack-knife procedure (Weir, 1990). 95% confidence interval of each statistic was obtained from 1000 bootstrap samples. Nm was approximated from θ using Crow and Aoki (1984) formula.

We used a Mantel test (Manly, 1987) to assess the model of isolation by distance using the genetic distance for pairs of populations (Nei, 1978), and geographic distance among these populations. Also the Nei's genetic distance was employed to obtain an UPGMA phenogram, after 1000 bootstrap samples.

RESULTS

Levels of genetic variation and inbreeding within populations.- All analyzed loci in all populations segregated a similar pattern to that observed in *A. victoriae-reginae*, facilitating genotypes scoring, interpretation and comparisons. Allelic frequencies are available from the authors upon request. All loci (Table 1) were polymorphic in most (6) populations, resulting in very high levels of genetic variation. The average number of alleles per locus (A) was 2.28, the effective number of alleles per locus (A_e) was 1.72, and expected heterocigosity (H_e) was 0.394. Although the three southernmost populations had higher genetic variation (Table 2; H_e range 0.449-0.457), there were no statistical differences in H_e among populations (ANOVA, $n = 143$; $df = 10$, $F = 1.7$, $P = 0.087$). In contrast, we found significant differences in observed heterozygosity (H_o) among populations (ANOVA, $n = 143$, $df = 10$, $F = 4.56$, $P < 0.0001$). H_o decreased significantly along the latitudinal gradient (Fig. 1b; $n = 143$, $R^2 = 0.193$, $F = 33.7$, $P < 0.0001$; slope = -0.03, $t = -5.8$, $P < 0.0001$). The interpopulation differences in H_o are due to deviations from Hardy-Weinberg equilibrium, as shown by the fixation indices (Table 2 and Fig. 2). In the southernmost populations (1 to 3) there was a proportion of loci with F significantly negative (Table 2; Fig. 2). In contrast, in the north a proportion of loci had a positive and significant F value (Table 2, population 5 to 10, including M). The

average of F index per loci differed among populations (ANOVA, $n=143$; $df=10$; $F=4.65$; $P<0.0001$) and increased with latitude (Fig. 2, $n=143$; $R^2=0.203$; $F=36.01$, $P<0.0001$; slope = 0.056, $t=6.0$, $P<0.0001$). F was highest in population 8 (with 8 significantly positive loci, average $F=0.542$). This latitudinal pattern indicates that populations in the south (1 to 3) had an excess of heterozygous in relation to the expected from the allelic frequencies. Populations 4 and 5 were near Hardy-Weinberg equilibrium, and in the northern populations had an excess of homozygous individuals, particularly in populations 6, 8, 9 and 10, suggesting high levels of inbreeding.

Wright's F statistics.- On average, $f=0.105$ (Table 3) was not statistically different from 0. Although there was variation among loci, as some of them were significantly higher than 0, suggesting in general low inbreeding within populations for the species. θ was relatively small (0.083), but different from 0, indicating low but significant genetic differentiation among populations. As a consequence, F was significantly positive (0.179).

In order to understand the patterns of inbreeding and differentiation, we divided the 11 populations into three geographical groups: south (1 to 3), central (4 to 6, including M), and north (7 to 10, Table 3). The southern populations had a negative f (-0.175) that was significantly different from 0. The f value was slightly higher in central populations (0.132), but it was not significantly different from 0. The northern population had a much higher f values (0.355) that were significantly different from zero. This latitudinal pattern is consistent with the single locus and population analysis of fixation indices: excess of heterozygous in the south, Hardy-Weinberg proportions in the central populations, and excess of homozygous in the north.

There was no genetic differentiation among populations in the southern populations ($\theta=0.009$, not different from zero, according to the 95% Confidence intervals), there was a detectable amount of differentiation among the central populations ($\theta=0.059$, different from zero, 95% CI), and there was higher differentiation among the northern populations ($\theta=0.115$). In the later, θ was also significantly different from zero.

For single locus estimates, Nm was always higher than 1 (average $Nm = 2.28$; Table 3) suggesting that gene flow may be important force in *A. lechuguilla*. Considering each of our arbitrary South to North regions, Nm declined from south to north. Nm was on average 12.23 in the south, suggesting high levels of gene flow among populations. Nm was lower in the central populations (2.23) and even lower in the northern populations (1.08).

Allelic frequencies along the latitudinal gradient and distribution of rare alleles.-

The most common allele in each locus was plotted as a function of population latitude. In most cases we were not able to detect clear patterns in the changes of allelic frequencies. Only two loci (GOT, 3 and APX, 1) showed marginally significant ($P \approx 0.05$) latitudinal increases or decreases in allelic frequencies (Fig. 3).

Rare alleles (with an allelic frequency less than 0.05) were more abundant in some populations (1, 6, M, 7 and 9), than in others (1, 2, 3, 4, 5 and 10, Fig. 4). The frequency of rare alleles is negatively related to gene flow (Slatkin, 1985; Slatkin and Barton, 1989). Hence, the low amount of private alleles (alleles detected in only one population; 1 at population 8, locus DIA1-3) is congruent with the overall low θ and high gene flow estimated previously.

Genetic distances and phenogram.- We used Nei's genetic distance to explore the genetic relationships among populations. The average distance between all pairs of population was low ($D = 0.07$). It was highest between populations 6 and 10 ($D = 0.143$) and lowest between populations 2 and 3 ($D = 0.007$). A Mantel test indicated that the relationship between the geographic and genetic distances was not significant (10,000 permutations; $z = 2176.2$, $r = 0.22$, $P = 0.11$). The reason for this lack of significance becomes clear by a UPGMA analysis using *A. victoriae-reginae* as an outgroup (Fig. 5). Populations 1 to 3 form a clear cluster (average $D = 0.064$), and some central populations were clustered together (4, 5 and 6, average $D = 0.035$). The rest of the populations were not too similar to geographically nearby populations. The bootstrap values were in some cases low (groups 4-8 and M-9), as could be expected given the low differentiation and large

gene flow among populations. It is noteworthy that population 10 was genetically the most differentiated (average to all the populations $D = 0.13$). We found that this population was divergent in general morphology and reproductive biology (see Chapter 1). The outgroup position (Fig. 5) also suggest that the more “primitive” populations may be the northern ones, in particular 10 and 7, and the more divergent the southern ones (1 to 6).

DISCUSSION

Genetic variation.- The levels of genetic variation in *A. lechuguilla* populations were high (range 0.33 – 0.457) relative to those of other long lived perennials (Eguiarte, 1990; Hamrick, Godt and Sherman-Broyles, 1992; i.e., average of long-lived perennial outcrossers H_e , at the species level = 0.211, $n = 51$; and at the population level = 0.163, $n = 66$). Similar high levels of H_e were also reported in the closely related but more geographically restricted *A. victoriae-reginae* (Martínez-Palacios, Eguiarte and Furnier, 1999, H_e range 0.21 to 0.41) and in species of the *A. deserti* complex, using RAPDs (Navarro-Quezada, 1999, H_e range 0.12 – 0.26). Some populations of *A. lechuguilla* showed higher levels of variation. In particular the three southernmost populations had the highest H_e levels of the gradient. Nevertheless, there were no latitudinal patterns, and thus our expectation of higher levels of genetic variation in the south and lower levels in the north was falsified.

The comparison with *A. victoriae-reginae* suggests that *Agave* species, even if they do not display population sizes as large as those of *A. lechuguilla*, can still maintain high levels of genetic variation. Long lived desert perennials have variable levels of genetic variation, ranging from very low, as in the palm *Washingtonia filifera* (McClenaghan and Beauchamp, 1986) to quite large as in the cactus *Echinocereus engelmannii* (Neel, Clegg and Ellstrand, 1996) and other Cactaceae (Hamrick, Nason and Fleming, 2000), and also in species of different families analyzed by Schuster et al. (1994, average $H_e = 0.173$). The high levels of genetic variation detected in wild *Agave* species seem not to be a general characteristics of desert

plants (see also Comes and Abbot, 1999). In contrast, domesticated *Agave* species seem to display very low levels of genetic variation (see Colunga-GarcíaMarín et al., 1999).

Fixation indices and inbreeding within populations.- Our data revealed a latitudinal trend in the departure from Hardy-Weinberg equilibrium. Latitude accounted for 20% of the variance in our regression model. Heterozygosity decreased from south to north. Populations in the south (1 to 3) had an excess of heterozygous individuals, whereas population in the central section (4 to 6, including M) were near to Hardy-Weinberg equilibrium. Populations in the north display an excess of homozygous individuals. This pattern was consistent with our predictions based on the higher level of visits and higher fruit-set in the south. Lower pollination visitation rates may explain the lower fruit production efficiencies and higher inbreeding in northern population. The excess of heterozygous individuals can be generated by several different mechanisms (Hedrick, 1983; Waser, 1987). The most important one is probably heterosis: the more heterozygous individuals are more vigorous and survive better (Linhart et al., 1987; Eguiarte, Perez-Nasser and Piñero, 1992). This is consistent with the large size of *A. lechuguilla* populations. Moreover, the low levels of genetic differentiation in the southern populations suggest very high levels of gene flow, and thus they may be evolving like a single panmictic population. In these very large populations, natural selection favoring the heterozygous individuals may be very efficient. In the north the situation is the opposite, as the populations were more isolated, and genetically more distant. Flowers in northern populations received fewer pollinators visits, and apparently generate inbreeding by self-pollination among individual flowers within a given inflorescence or by moving pollen among the different inflorescences in the same genet (Chapter 3). If all the inbreeding in the northern populations (7 to 10) is due to self pollination, the outcrossing rate can be approximated with $F = 1 - t / 1 + t$ (Haldane, 1923; Hedrick, 1983). This equation yields a t value ($t = 0.467$) which suggests that about half of all seeds are produced by self-pollination. This expectation of higher outcrossing in the southern populations and lower in the northern ones was supported by subsequent series of experiments and genetic analyses (Chapter 3)

Genetic differentiation.- We were able to detect genetic differentiation in populations of *A. lechuguilla* along a latitudinal transect in the Chihuahuan desert. The pattern of population differentiation along this transect was congruent with patterns of morphological and reproductive differentiation found in a previous study (chapter 1). The average θ (0.083) found in of *A. lechuguilla* was significantly different from zero, and was lower than the value found for *Agave victoriae-regina* ($\theta = 0.236$). The latter species is found only in 10 very localized populations in a relatively small area of the central Chihuahuan desert. These differences in θ may be caused by the large population sizes and wide distribution of *A. lechuguilla*. On the other hand, low levels of interpopulation genetic differentiation were detected in *Agave deserti* (θ in this species ranged from 0.08 to 0.13, Navarro-Quezada, 1999). *A. deserti* is relatively abundant and widespread in the Sonoran desert. We also found strong patterns of differentiation between northern and southern populations. Southern populations of *A. lechuguilla* were genetically similar, central populations were more differentiated (mostly due to the M population), whereas northern populations were highly differentiated. This phenomenon can be explained by differences in pollinator abundances and taxa across the transect. Pollinators seem to be less abundant and to have more restricted range of movement in the north than in the south. The movements of more abundant and more mobile pollinators would generate greater genetic connectivity among southern than among northern populations.

The UPGMA analysis suggests that the more primitive populations may be those in the north (in particular population 10). This result, contrast with the view that suggest that *Agave* species originated in the south, in Central Mexico, and then migrated to the north (i.e., Alvarez de Zayas, 1989). If the topology suggested by our analysis is correct, then *A. lechuguilla* seems to have originated in the north, and more recently colonized the south. A similar pattern, was detected using RAPDs in the *A. deserti* complex of the Sonoran desert, comprising several subspecies of *A. deserti* and of *A. cerulata* and *A. subsimplex* (Navarro-Quezada, 1999). If this scenario is correct, then the traits of the southern populations (larger flowers and higher outcrossing) are derived. An alternative hypothesis is the increment in aridity to the north (Ortega, 1995) has led to a decline in nocturnal pollinators in the north (Chapter 3). Hence, the southern population

may represent the ancestral traits before the changes occurred. In that way, northern populations have had more time to adapt to diurnal pollinators with consequent changes of more inbreeding and genetic differentiation among them. In support this second point, it is considered that the common pollination syndrome for genus *Agave* is chiropterophily (Schaffer and Schaffer, 1977; Howell, 1979; Howell and Roth, 1981) and we have evidence that pollination syndrome in northern populations could be evolved toward diurnal pollination (Chapter 1). Unfortunately the information of biogeography and phylogeny of the genus *Agave* is not enough to help in solving this point (see Eguiarte, Souza and Silva-Montellano, 2000). We need more detailed experiments and observations in the field to corroborate these interpretations, along with molecular evolution and population genetics analyses of the Marginateae group of the *Agave* species.

LITERATURE CITED

- Aguirre-Planter, E., G. R. Furnier and L. E. Eguiarte. 2000. Low levels of genetic variation within and high levels of genetic differentiation among population of species of *Abies* from southern Mexico and Guatemala. *American Journal of Botany* 87: 362-371.
- Alvarez de Zayas, A. 1989. Distribucion geográfica y posible origen de las Agavaceae. *Revista del Jardín Botánico Nacional* 10: 25-36.
- Cadaval, A. 1999. Estudio evolutivo de los azúcares del néctar de *Agave lechuguilla* en el desierto de Chihuahua. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Colunga-GarcíaMarín, P., J. Coello-Coello, L.E. Eguiarte, and D. Piñero. 1999 Isoenzymatic variation and phylogenetic relations between henequén *Agave furcroydes* Lem. and its wild ancestor *A. angustifolia* Haw. *American Journal of Botany* 86: 115-123.
- Comes, H., and R. Abbott. 1999. Population genetic structure and gene flow across arid versus mesic environments: a comparative study of two parapatric *Senecio* species from the near east. *Evolution* 53: 36-54.
- Crow, J. and K. Aoki. 1984. Group selection for a phylogenetic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 81: 6073-6077
- Eguiarte, L. E.. 1990. Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. en Los Tuxtlas, Veracruz. Doctoral Thesis. Centro de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F.
- _____, N. Perez-Nasser, and D. Piñero. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity* 69: 217-228.
- _____, A. Búrquez, J. Rodríguez, M. Martínez-Ramos, J. Sarukhán and D. Piñero. 1993. Direct and indirect estimates of neighborhood and effective population size in a tropical palm, *Astrocaryum mexicanum*. *Evolution* 47: 75-87.
- _____, V. Souza, and A. Silva-Montellano. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: Filogenia, ecología evolutiva de la reproducción y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 66: 131-150.
- Gentry, H. 1982. *Agaves of continental North America*. University of Arizona Press. Tucson.

- Haldane, J. B. 1924. A mathematical theory of natural and artificial selection. II *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*. 23: 19-41.
- Hamrick, J. L. and M. Loveless. 1989. The genetic structure of tropical tree population: Association with reproductive biology *In* J. Bock and Y. Linhart [eds.]: *The evolutionary ecology of plants*, 129-146. Westview Press. Boulder, Colorado.
- _____, and M. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species. *In* A. Brown, M. Clegg, A. Kahler and B. Weir [eds.]. *Plant population genetics, breeding and genetic resources*, 43-63. Sinauer press. Sunderland. Mass.
- _____, _____, and S. Sherman-Broyles, 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species *In* W.T. Adams, S. H. Strauss, D. L. Copes and A.R. Griffin [eds.]. *Population genetics of forest trees*, 95-124. Kluwer Academic Publishers. London.
- _____, J. D. Nason, and T. H. Fleming. 2000. Genetic diversity in columnar cacti. *In* T. Fleming and A. Valiente [eds.]. Chapter for symposium for meeting on Evolution, Ecology and Conservation of columnar cacti and their mutualists. Tehuacán, México.
- Handel, S. 1983. Pollination ecology, plant population structure, and gene flow. *In* L. Real [ed.]. *Pollination Biology*, 163-211. Academic Press. Orlando.
- Hedrick, P.W. 1983. *Genetics of populations*. Science Books Int.. Boston
- Howell, D.J. 1979. Flock foraging in nectar-feeding bats: Advantages to the bats and the host plants. *American Naturalist* 114: 23-49.
- Howell, D.J. and, B. Roth. 1981. Sexual reproduction in agaves: the benefits of bats; the cost of semelparous advertising. *Ecology* 62: 1-7.
- Li, C. and D. Horvitz. 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *American Journal of Human Genetics* 107: 511-523.
- Linhart, Y.B., J. B. Mitton, K. B. Sturgeon and M.L. Davis. 1981. Genetic variation in space and time in a population of Ponderosa pine. *Heredity* 46: 407-426.
- McClenaghan, L. and A. Beauchamp. 1986. Low genetic differentiation among isolated populations of California fan palm (*Washingtonia filifera*). *Evolution* 40: 315-322.
- Manly, B. 1987. *The statistics of natural selection on animal populations*. Chapman and Hall. New York.
- Martínez-Palacios, A., L. E. Eguiarte and G. R. Furnier. 1999. Genetic diversity of endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. *American Journal of Botany* 86: 1093-1098.
- Miller, M. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3. Computer software. Distributed by the author.
- Navarro-Quezada, Aura. 1999. Estructura genética y procesos de especiación de *Agave cerulata* (Trel.) y *A. subsimplex* (Trel.) en el desierto Sonorense a partir de RAPD's. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Neel, M., J. Clegg, and N. Ellstrand. 1996. Isozyme variation in *Echinocereus engelmannii* var. *Munzii* (Cactaceae). *Conservation Biology* 10: 622-631.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Ohara, M., H. Takeda, Y. Ohno, and Y. Shimamoto. 1996. Variations in the breeding system and the population genetic structure of *Trillium kamschaticum* (Liliaceae). *Heredity* 76: 476-484.
- Ortega, J. R. 1995. Los Paleoambientes holocénicos de la laguna de Babicora, Chihuahua, México. *Geofísica Internacional* 34: 107-116.

- Parra, V., C. F. Vargas and L. E. Eguiarte. 1993. Reproductive biology, pollen and seed dispersal, and neighborhood size in the hummingbird-pollinated *Echeveria gibbiflora* (Crassulaceae). *American Journal of Botany* 80: 153-159.
- Schaffer, W., and V. Schaffer. 1977. The reproductive biology of Agavaceae I: pollen and néctar production in four Arizona agaves. *The Southwestern Naturalist*. 22: 157-168.
- Schoen, D. 1982a. The breeding system of *Gilia achileifolia*: Variation in floral characteristics and outcrossing rate. *Evolution* 36: 352-360.
- _____. 1982b. Genetic variation and the breeding system of *Gilia achileifolia*. *Evolution* 36:361-370.
- _____, and M. Clegg. 1985. The influencing of flower color on outcrossing rate and male reproductive success in *Ipomoea purpurea*. *Evolution* 39: 1242-1249.
- Schuster, W. S., D. R. Sandquist, S. L. Phillips, and J. R. Ehleringer. 1994. High levels of genetic variation in populations of four dominant arid land plant species in Arizona. *Journal of Arid Environments* 27: 159-167.
- Slatkin, M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39: 53-65.
- _____, and N. H. Barton. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1368.
- _____. 1994. Gene flow and population structure. In: L. Real [ed.], *Ecological Genetics*, 4-17. Princeton University Press. New Jersey.
- Sokal, R. and F. J. Rohlf. 1995. *Biometry*. 3^o ed. W. H. Freeman and Company. New York.
- Soltis, D., C. Haufler, D. Darrow, and G. Gastony. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining Schedules. *American Fern Journal* 73: 9-27.
- Swofford, D., and R. Selander, 1989. BIOSYS-1: a computer program for the analysis of allelic variation in population genetic and biochemical systematics. Release 1.7. Natural History Survey, Champaign, Illinois.
- Thompson, J. 1997. Evaluating the dynamics of coevolution among geographically structured populations. *Ecology* 78: 1619-1623.
- Trame, A.M., A. Coddington and K. Paige. 1995. Field and genetic studies testing optimal outcrossing in *Agave schottii*, a long-lived clonal plant. *Oecologia* 104: 93-100.
- Waser, N. M. 1987. Spatial genetic heterogeneity in a population of the montane perennial plant *Delphinium nelsonii*. *Heredity* 58: 249-256.
- Weir, B. S. 1990. *Genetic data analysis*. Sinauer Associated, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- _____, and C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wong, K. C. and M. Sun. 1999. Reproductive biology and conservation genetics of *Goodyera procera* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 86:1406-1413.
- Workman, P., and J. Niswander. 1970. Population studies on southwestern indian tribes II. Local genetic differentiation in the Papago. *American Journal of Human Genetics*. 22: 24-49.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1.- Average expected heterozygosity (H_e) (Fig. 1.a) and observed heterozygosity (H_o) (Fig. 1.b) (\pm SE) for 13 loci along a latitudinal transect of 11 populations of *Agave lechuguilla* in the Chihuahuan desert. The numbers above the symbol indicate the name of the population. Different letters below indicate that the populations are statistically different, ($P < 0.05$), contrast t test: a) No differences among populations; Regression formula: $y = -0.006 * x + 0.557$, where slope have $t = -1.92$, $P < 0.056$.; b) A-B, $t > 2.2$, $P < 0.03$; A-BC, $t > 3.5$, $P < 0.0007$; A-C, $t > 3.5$, $P < 0.0005$; B-C, $t > 2.1$, $P < 0.04$. Regression formula: $y = -0.03 * x + 1.12$, where slope have $t = 6.0$, $P < 0.0001$.

Figure 2.- Average fixation indices (\pm SE) for 11 populations of *Agave lechuguilla* along the Chihuahuan desert. The numbers above the symbol indicate the name of the population and asterisks means those which are statistically different from zero (χ^2 test = * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$). Different letters below indicate that the populations are statistically different, according to contrast t test: A-B, $t > 2.1$, $P < 0.04$; A-BC, $t > 3.2$, $P < 0.002$; A-C, $t > 4.9$, $P < 0.00001$; B-C, $t > 2.4$, $P < 0.02$. Regression formula: $y = 0.056 * x + 1.28$, where slope have $t = -5.8$, $P < 0.0001$.

Figure 3.- Allelic frequencies of the most common allele for each of the 13 analyzed loci of 11 populations of *Agave lechuguilla* in the Chihuahuan desert. A linear regression as a function of the latitude was adjusted in each locus, only GOT-3 and APX-1 were (marginally) significant ($P \approx 0.05$).

Figure 4.- Number of rare alleles (alleles with a total = 28; allelic frequency of 0.05 or less) for 11 populations of *Agave lechuguilla* along the Chihuahuan desert.

Figure 5.- UPGMA phenogram constructed using Nei's (1978) genetic distance and *A. victoriae-reginae* as an outgroup population (Martinez-Palacios, Eguiarte and Furnier, 1999) of 11 populations of *Agave lechuguilla* in the Chihuahuan desert. The numbers above the branches indicate genetic distance, the numbers below in italics show the proportion of times the bifurcation was found in 10,000 bootstrap samples.

Table 1.- Genetic diversity for the studied populations of *Agave lechuguilla* where: n = mean number of plants assayed per locus (SE); A = mean number of alleles per locus; A_e = effective number of alleles per locus; P = proportion of polymorphic loci (most common allele); He = expected heterozygosity (SE ; unbiased estimator, Nei, 1978).

Population	n	A	A_e	P	He
1	33.5 (0.6)	2.5	1.86	1.0	0.455 (0.024)
2	40.3 (0.2)	2.2	1.84	1.0	0.449 (0.026)
3	38.2 (0.3)	2.3	1.85	1.0	0.457 (0.023)
4	38.7 (0.8)	2.3	1.64	1.0	0.380 (0.028)
5	38.9 (0.9)	2.4	1.71	0.92	0.378 (0.048)
6	38.6 (0.7)	2.2	1.58	1.0	0.346 (0.04)
M	38.1 (0.3)	2.2	1.57	0.92	0.334 (0.045)
7	35.4 (0.4)	2.2	1.56	0.85	0.330 (0.047)
8	35.4 (1.0)	2.3	1.7	0.92	0.381 (0.048)
9	31.8 (1.8)	2.4	1.84	1.0	0.437 (0.036)
10	31.5 (0.8)	2.1	1.69	0.92	0.397 (0.037)
Average	36.4	2.28	1.72	0.96	0.394

Table 2.- Fixation index (F) per locus for each population of *Agave lechuguilla* along the latitudinal transect, number of loci and populations which differ significantly from Hardy-Weinberg's equilibrium (H-W): + = Positively different ; - = Negatively different.

Population	1	2	3	4	5	6	M	7	8	9	10	H-W N° pop.	
												+	-
<i>Pgil</i>	-0.489**	-0.224	-0.434**	-0.279	-0.075	-0.212	-0.482**	-0.129	0.318	-0.256	-0.771**	0	4
<i>Pgi2</i>	-0.751**	-0.662**	-0.900**	-0.854**	-0.497**	-0.578**	-0.854**	-0.458**	0.074	-0.345*	-0.242	0	9
<i>Got</i>	-0.277	0.132	-0.022	0.237	-0.066	0.414**	-0.101	0.593**	0.564**	0.123	0.458*	4	0
<i>Lap</i>	-0.028	0.059	0.092	0.218	-0.051	-0.083	0.286	0.300	0.751**	-0.269	0.073	1	0
<i>Est</i>	-0.149	-0.046	-0.185	0.225	-0.069	0.871**	0.685**	-0.014	0.621**	0.250	0.559**	4	0
<i>Dial</i>	0.158	-0.496**	0.470**	0.590**	1.000**	0.771**	0.773**	0.017	0.863**	0.872**	0.469**	8	1
<i>Dia2</i>	-0.294	-0.125	-0.484**	0.140	-0.139	0.375*	0.061	-0.071	0.013	0.351*	0.608**	3	1
<i>Me</i>	-0.014	0.049	-0.147	0.411**	0.533**	0.479**	0.118	0.056	0.766**	0.624**	0.238	5	0
<i>Pgm1</i>	-0.619**	-0.432**	-0.379*	0.259	-0.213	-0.188	-0.014	0.786**	-0.014	0.125	1.000**	2	3
<i>Pgm2</i>	-0.117	-0.338*	0.180	0.464**	0.648**	0.683**	0.206	0.937**	1.000**	0.833**	1.000**	7	1
<i>Acph</i>	-0.047	-0.061	0.269	0.126	0.055	0.474**	0.409*	-0.042	0.786**	0.408**	-0.018	4	0
<i>Apx</i>	0.059	-0.105	-0.277	-0.290	0.122	0.240	0.567**	0.252	0.713	0.512**	0.242	2	0
<i>Cpx</i>	-0.213	-0.067	0.081	0.202	0.216	0.337*	0.675**	0.382*	0.595**	0.485**	0.241	5	0
H-W N° loci												Total	
+	0	0	1	3	3	8	5	4	8	7	6	45	
-	3	4	4	1	1	1	2	1	0	1	1	19	

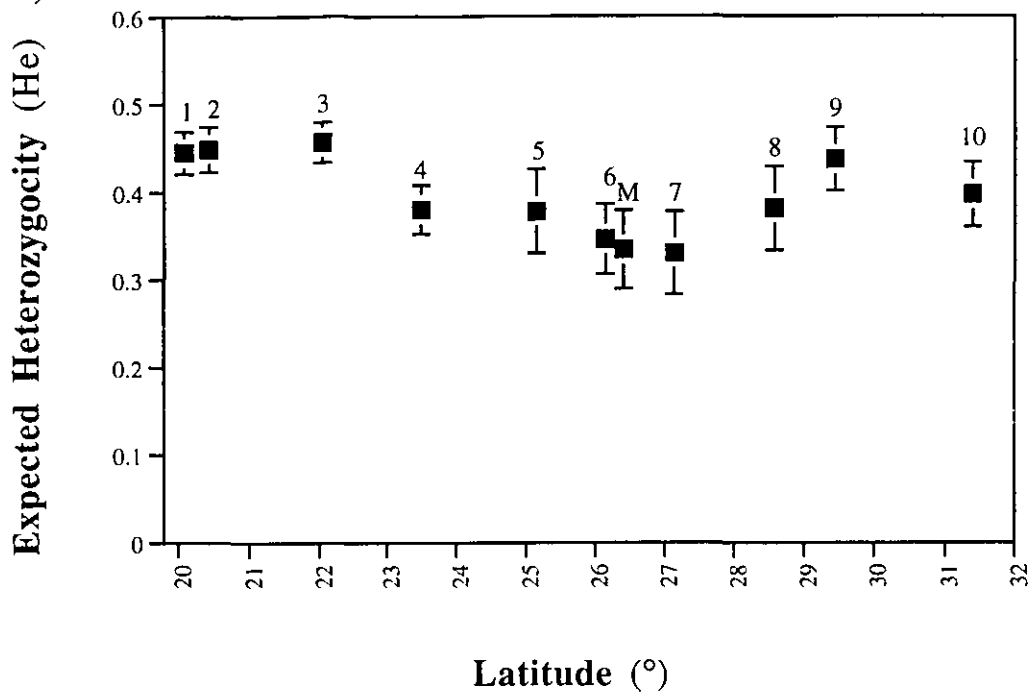
(* P<0.05; ** P<0.001).

Table 3.- Wright's F statistics (Weir and Cockerham, 1984) and Nm (Crow and Aokya, 1984) per locus for all sampled populations of *Agave lechuguilla*, total and partial (mean) for the groups of populations from south (1, 2 and 3) center (4, 5, 6 and M) and north (7, 8, 9 and 10) of its distribution. (SD = Standard deviation, Jackknife; 95% CI = Confidence intervals at 95%, bootstrap= 1000 iterations; all the single locus estimates are significantly different from zero ($P < 0.01$) unless stated "ns.").

Locus	f	F	θ	Nm
<i>Pgi1</i>	-0.289	-0.216	0.057	3.42
<i>Pgi2</i>	-0.534	-0.472	0.04	4.96
<i>Got</i>	0.167	0.231	0.077	2.48
<i>Lap</i>	0.127	0.174	0.054	3.62
<i>Est</i>	0.259	0.296	0.049	4.01
<i>Dial</i>	0.376	0.471	0.153	1.14
<i>Dia2</i>	0.043 ns.	0.162	0.124	1.46
<i>Me</i>	0.298	0.369	0.102	1.82
<i>Pgm1</i>	-0.022 ns.	0.123	0.142	1.25
<i>Pgm2</i>	0.483	0.519	0.071	2.70
<i>Acph</i>	0.247	0.276	0.039	5.09
<i>Apx</i>	0.204	0.261	0.072	2.66
<i>Cpx</i>	0.276	0.333	0.079	2.41
Average	0.105	0.179	0.083	2.28
SD	0.087	0.01	0.091	
95% CI	(-0.06, 0.26)	(0.02, 0.33)	(0.06, 0.1)	
South	-0.175	-0.164	0.009	12.23
SD	0.072	0.073	0.007	
95% CI	(-0.33, -0.05)	(-0.322, -0.04)	(-0.02, 0.02)	
Center	0.132	0.184	0.059	2.23
SD	0.124	0.119	0.019	
95% CI	(-0.09, 0.34)	(-0.04, 0.39)	(0.03, 0.1)	
North	0.355	0.429	0.115	1.08
SD	0.101	0.093	0.019	
95% CI	(0.16, 0.54)	(0.25, 0.6)	(0.08, 0.15)	

Fig. 1

a)



b)

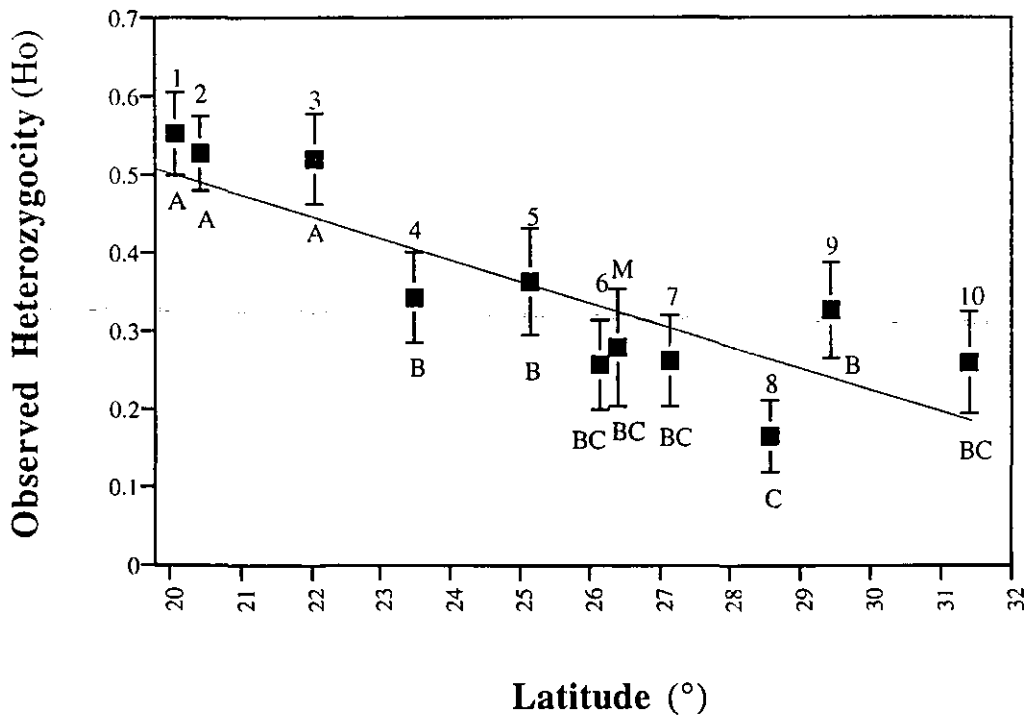


Fig. 2

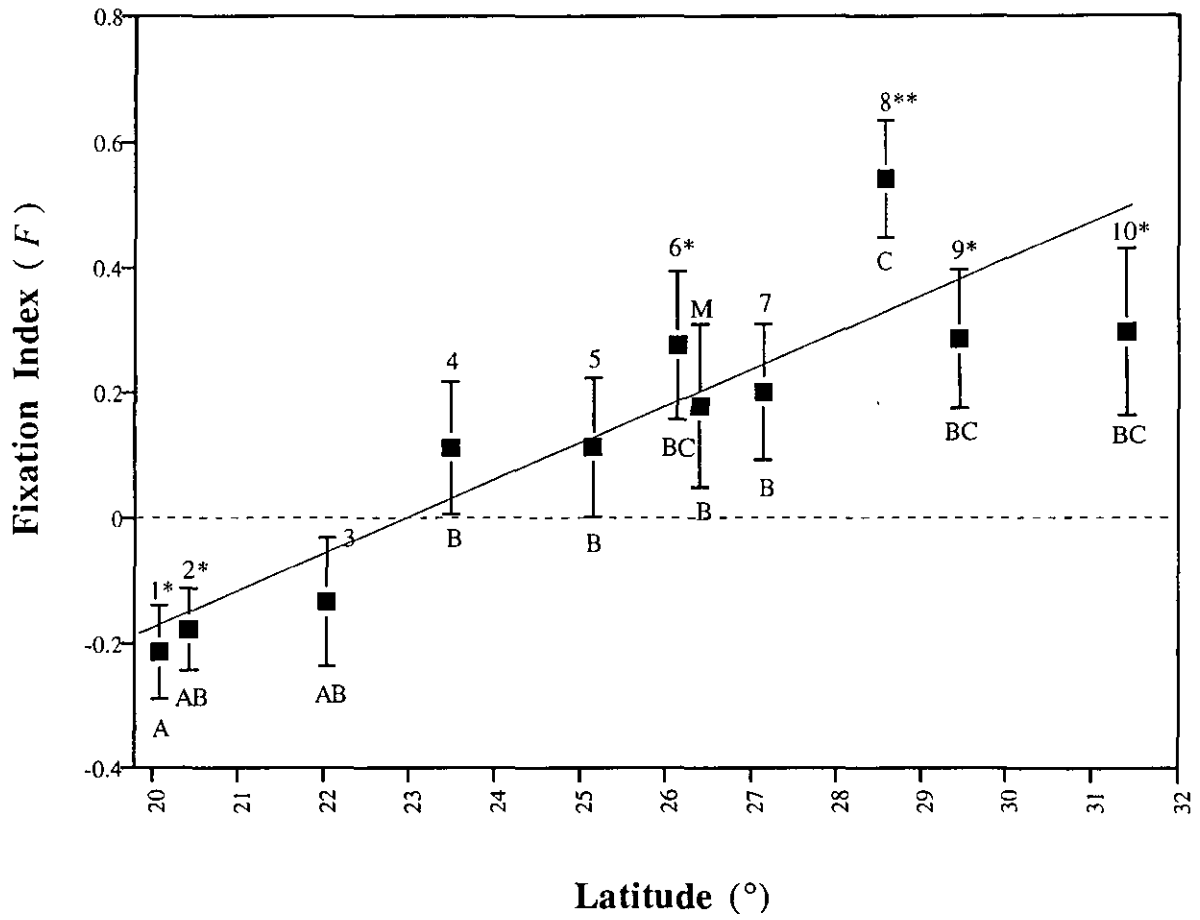


Fig. 3

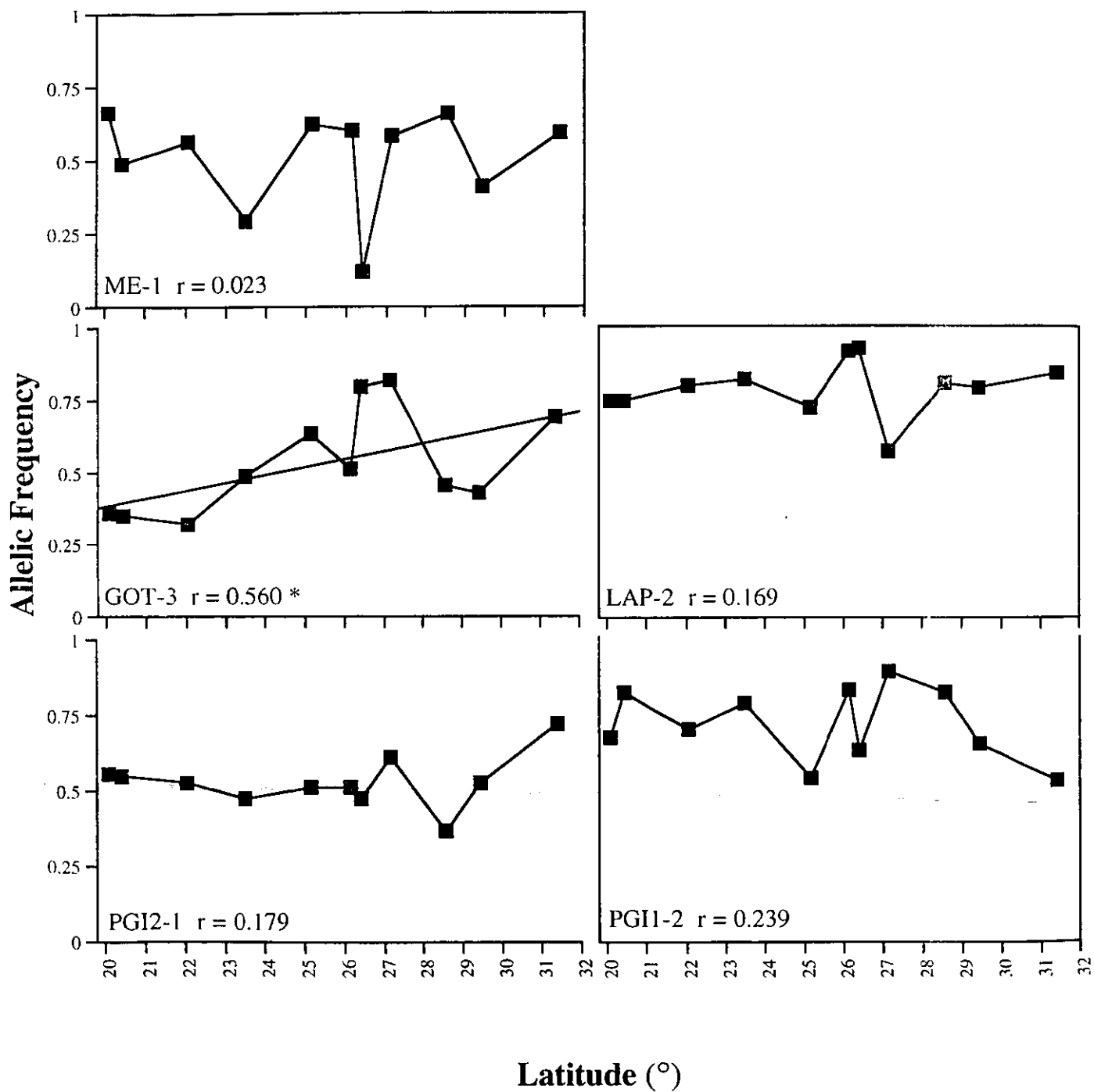


Fig. 3

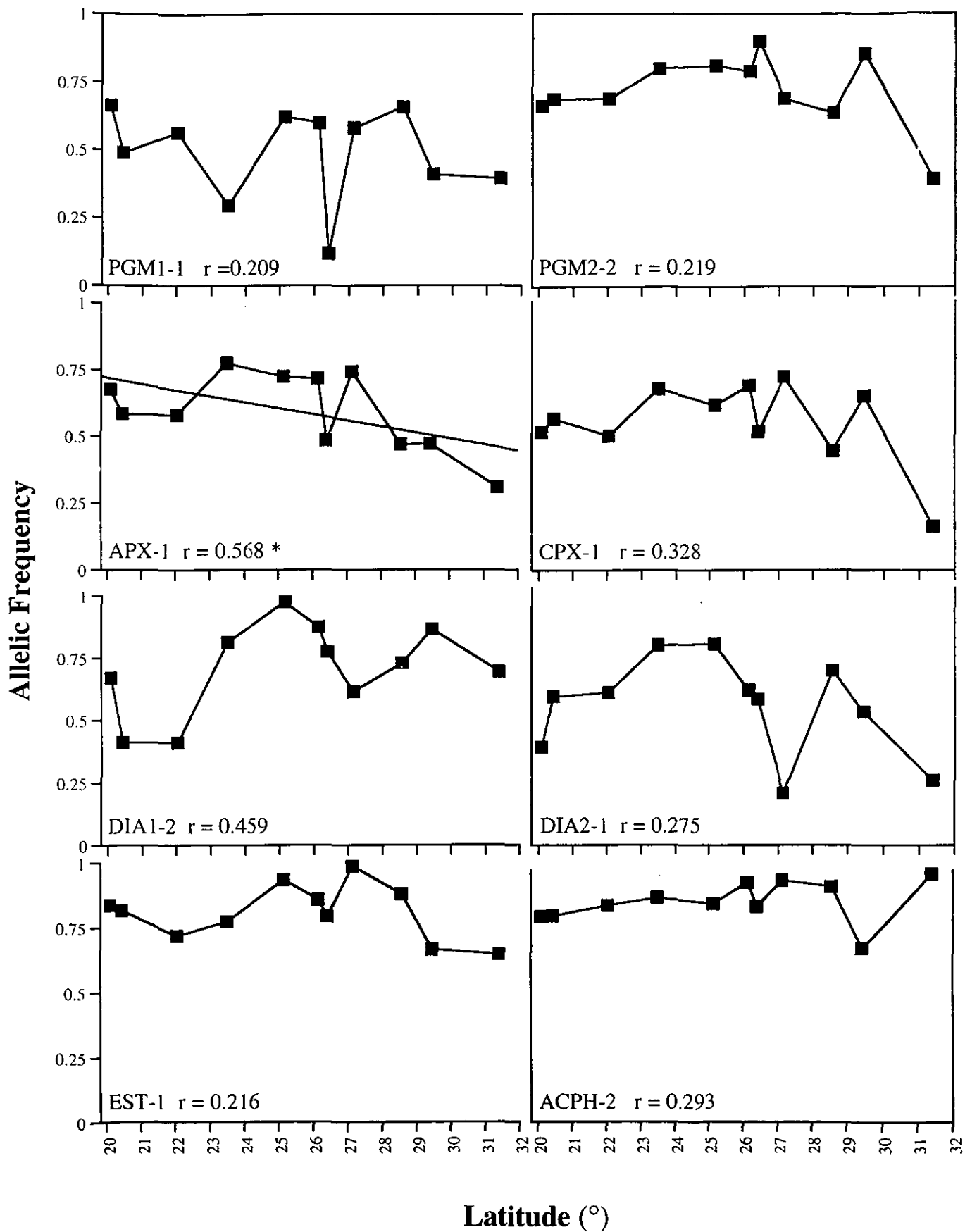
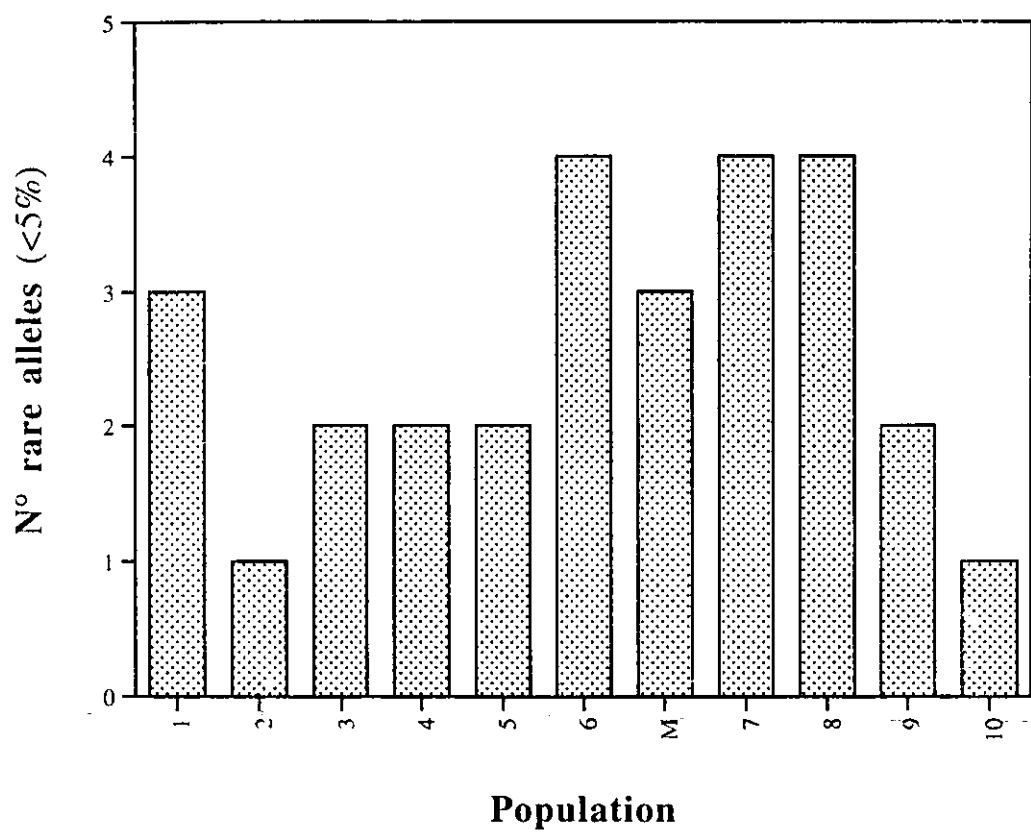


Fig. 4



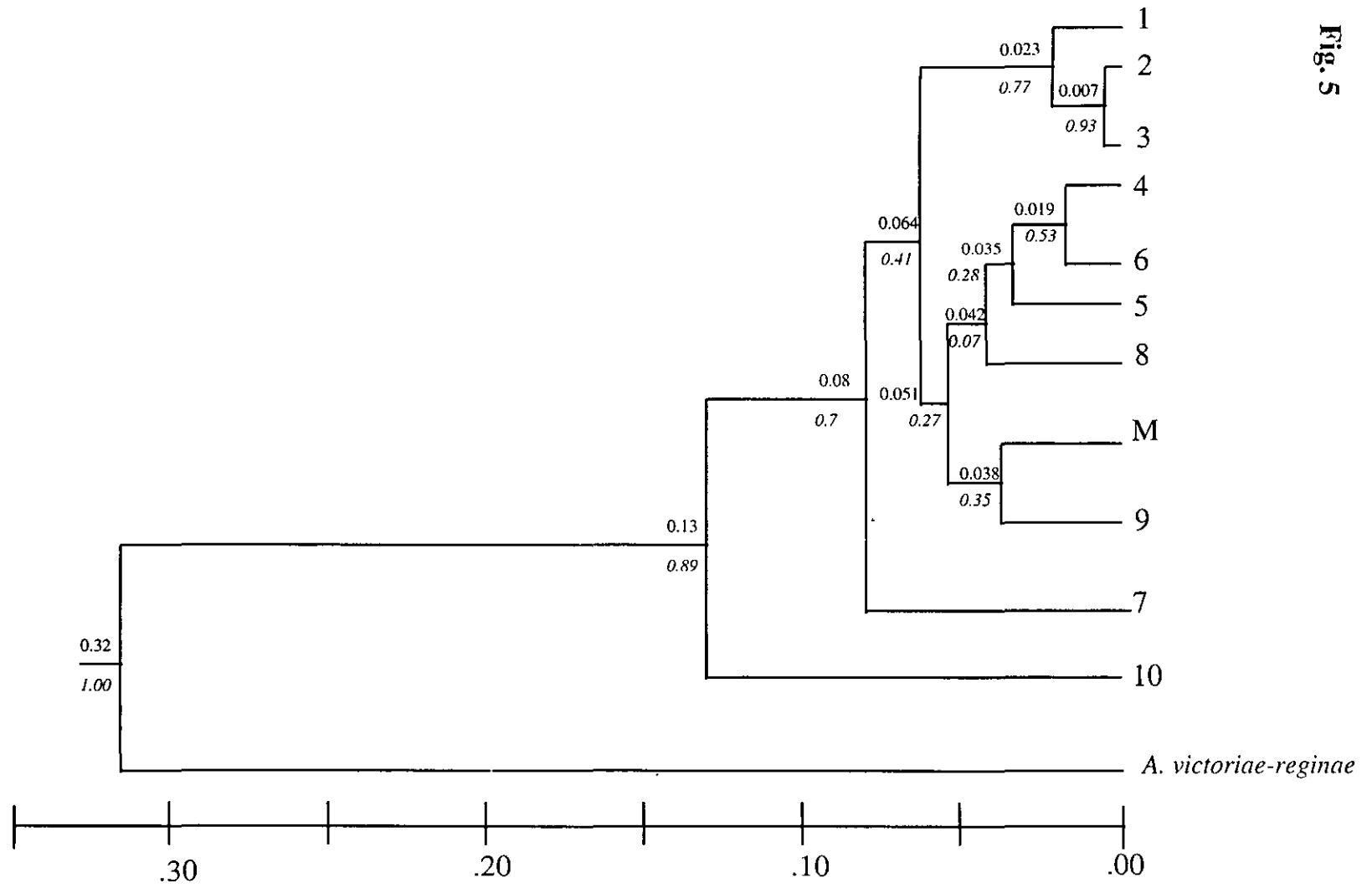


Fig. 5

Ecología reproductiva de *Agave lechuguilla* (Agavaceae) en el desierto de Chihuahua: Sistema reproductivo, efecto de los gremios de polinizadores, tasas de entrecruzamiento, germinación y depresión por endogamia en dos poblaciones contrastantes

Resumen- El efecto de los polinizadores en el sistema reproductivo de las plantas puede modificar el flujo génico en las poblaciones y con ello los niveles de endogamia al interior de las mismas. El síndrome floral de polinización ha sido interpretado como una adaptación en respuesta al polinizador más efectivo. *Agave lechuguilla* es una especie fuertemente dependiente de los polinizadores para su reproducción. Esta especie presenta un patrón de variación latitudinal en sus caracteres florales y sus polinizadores también varían latitudinalmente en abundancia y tipo. Estos son principalmente nocturnos, pero las poblaciones del norte del gradiente latitudinal presentan algunas características florales diurnas. En este trabajo estudiamos detalladamente el sistema reproductivo de *A. lechuguilla*, así como el papel de los gremios de polinizadores, diurnos y nocturnos, sobre la producción de semillas. Al mismo tiempo determinamos los niveles de endogamia a través de la estimación de la tasa de entrecruzamiento (con 6 loci aloenzimáticos) y el coeficiente de depresión por endogamia en dos poblaciones contrastantes. Nuestros datos indican que el sistema reproductivo de *A. lechuguilla* es predominantemente de entrecruza (Pachuca $t_m = 0.97$, $t_s = 0.98$; Mapimí $t_m = 0.6$, $t_s = 0.49$). Los polinizadores nocturnos, esfíngidos en este caso, son los más eficientes en la producción de semillas de la población sureña. En cambio en la población norteña, tanto diurnos como nocturnos parecen ser igualmente eficientes. Las tasas de visita de las diferentes especies de polinizadores corroboran este patrón. Por otro lado, la población norteña presenta niveles de endogamia biparental mayores. Los experimentos de cruce no muestran diferencia aparente en los índices de depresión por endogamia entre ambas poblaciones, sin embargo el porcentaje de germinación de las semillas sureñas, así como el tamaño de sus plántulas a los 30 días fue mayor. En ambas poblaciones el porcentaje de germinación correlaciona con la tasa de entrecruzamiento por familia. Estos resultados se discuten en relación a las fuerzas evolutivas relacionadas con la diferenciación de los caracteres florales y el valor adaptativo de las diferencias interpoblacionales.

INTRODUCCIÓN

Los polinizadores afectan los niveles de flujo génico en las poblaciones de plantas ya que determinan la distancia a la cual el polen llega, variando de esta manera el monto de la polinización cruzada y autopolinización y los niveles de endogamia al interior de las poblaciones (Hamrick y Loveless, 1989; Hamrick y Godt, 1989; Parra ,Vargas y Eguiarte, 1993; Eguiarte et al., 1993; Slatkin, 1994). Los polinizadores también pueden determinar la dirección y eficiencia de la selección natural sobre los sistemas de cruce de las plantas. La tasa de entrecruzamiento (Outcrossing-rate) puede interpretarse como característica de un determinado sistema de cruce (Schoen, 1982a,b; Schoen y Clegg, 1985; Cruzan et al., 1994; Belaoussoff y Shore, 1995; Trame, Coddington y Paige, 1995, Norman, Weller y Sakai, 1997). Por su parte, la depresión por endogamia actúa como una fuerza selectiva paralela a la evolución del sistema de cruce, determinando el nivel de entrecruzamiento al expresarse genes deletéreos recesivos y reduciendo la adecuación de los individuos endógamos en relación a los exógamos (Lande y Schemske, 1985; Charlesworth y Charlesworth, 1987). Esta suma de factores está relacionada con la expresión de determinados atributos florales tales como forma, color y antesis, dada la especificidad de los polinizadores en la evolución de la interacción planta-polinizador (Schoen, 1982a; Schoen y Clegg, 1985; Holtsford y Ellstrand, 1992; Cruzan et al., 1994; Belaoussoff y Shore, 1995; Kephart, Brown y Hall, 1999).

Estos atributos florales, que tomados en conjunto han sido descritos como una respuesta adaptativa a determinado tipo de polinizador, constituyen los llamados síndromes de polinización (Faegri y Van der Pijl, 1971, 1979; Proctor y Yeo, 1972; Baker y Baker, 1983). Esta idea asume que existe una alta especificidad en la interacción planta-polinizador (Waser et al., 1996), sin embargo una alta proporción de plantas es visitada por muchas especies diferentes (Thompson y Pellmyr, 1992; Sahley, 1996; Nassar, Ramírez y Linares, 1997; Slauson, 2000; Arizaga et al., 2000a,b), haciendo difícil determinar el polinizador más efectivo al cual la planta responde. Son pocos los estudios que logran medir la contribución de los diferentes polinizadores a la reproducción de las plantas, junto con observaciones que los distinguan de otros visitantes, para determinar si los atributos florales corresponden al polinizador más efectivo (Pellmyr y Thompson, 1996). En este sentido, las plantas que son visitadas por animales diurnos y nocturnos ofrecen la posibilidad de examinar con mayor

facilidad dicha contribución dada su separación en tiempo de actividad de estos gremios (Morse y Fritz, 1983; Eguiarte y Búrquez, 1987; Fleming, Tuttle y Horner, 1996; Barthell y Knops; 1997; Nassar, Ramírez y Linares, 1997; Groman y Pellmyr, 1999; Slauson, 2000; Arizaga et al., 2000b).

Tradicionalmente se asume que el género *Agave* es polinizado por murciélagos, principalmente del género *Leptonycteris* (Howell, 1979; Gentry, 1982; Arizaga y Ezcurra, 1995, Arizaga et al., 2000a). Sin embargo, se han registrado una gran cantidad de otras especies de visitantes florales entre los que destacan insectos y aves (Schaffer y Schaffer, 1977; Kuban, Lawley y Neill, 1983; Martínez del Río y Eguiarte, 1987; Slauson, 2000; Eguiarte, Souza y Silva-Montellano, 2000). Schaffer y Schaffer (1977) describen que algunas especies del subgénero *Littaea* (*A. schotii*, *A. parviflora* y *A. toumeyana*) presentan una morfología floral y néctar claramente melitofílicos, siendo polinizadas por al menos dos géneros de abejas grandes en Arizona (*Bombus* y *Xylocopa*). En este trabajo presentamos datos detallados acerca del sistema de cruce, tasas de entrecruzamiento y efecto de los diferentes gremios de polinizadores sobre la reproducción de *Agave lechuguilla*.

A. lechuguilla es un excelente modelo de estudio, ya que presenta variación en sus características florales a lo largo de su distribución geográfica (Capítulo 1), que abarca todo el desierto chihuahuense (*sensu lato*). Las flores en la región sur (centro de México) son más largas, tubulares y verdosas, en cambio en el norte (Chihuahua) son más cortas, abiertas y rojas. La concentración y volumen del néctar, así como la proporción de sacarosa cambia con el gradiente geográfico (Cadaval, 1999), siendo más concentrado, con menor volumen y con más sacarosa en el norte. Así, las flores *A. lechuguilla* parecen cambiar de características de polinización nocturna en el sur, hacia otras de tipo diurno en el norte. Esto coincide con el hecho de que los polinizadores de *A. lechuguilla* también cambian en frecuencia de visitas y en composición en el gradiente, siendo su frecuencia general de visita mucho menor en el norte. Por otra parte, datos de genética de poblaciones (Capítulo 2) indican que los niveles de endogamia parecen ser más altos en el norte. En este trabajo estudiamos detalladamente el sistema de cruce de *A. lechuguilla*, así como el papel de los gremios de polinizadores, diurnos y nocturnos, sobre la producción de semillas. Al mismo tiempo

determinamos las tasas de entrecruzamiento, como medida del flujo génico intrapoblacional y niveles de depresión endogamia, en dos poblaciones contrastantes en términos de sus características reproductivas.

MATERIALES Y METODOS

Sitios de estudio y datos generales.- El estudio fue realizado en 2 poblaciones contrastantes de la distribución de *Agave lechuguilla* en función de las variación en las características reproductivas y genéticas descritas en los Capítulos (1 y 2) y en Cadaval (1999). El primer sitio se encuentra en el extremo sur de su distribución y corresponde a la población de Pachuca, Hgo. (20° 08' N; 98° 44' O; alt. 1950 mt.). La segunda población está ubicada en la reserva de la Biosfera de Mapimí, Dgo. (26° 36' N; 103° 59' E; alt. 1200 mt). Los trabajos de campo fueron realizados entre el 1 y 15 de Julio de 1997 en la población de Pachuca y entre el 3 y el 17 de agosto de 1997 en la población de Mapimí. Los frutos y las semillas producidas como resultado de los experimentos de polinización controlada y fecundidad natural de las poblaciones, así como muestras de tejido foliar fueron colectadas durante la tercera semana de Noviembre del mismo año. Ambas poblaciones no difieren en términos de sustrato, básicamente calcáreo, sin embargo la población de Mapimí es considerablemente más seca que la sureña (Capítulo 1). También se registró la densidad de individuos reproductivos, así como la densidad de rosetas en cada localidad a través de los métodos de "vecino más cercano" (Krebs, 1989) y cuadrantes de 100 m² respectivamente. Para ambos casos se efectuaron 4 muestreos por sitio. La mayoría de los análisis estadísticos fueron hechos usando el programa JMP (SAS, 1995).

Polinizadores y fecundidad.- En 16 inflorescencias focales por población registramos a los visitantes florales, diferenciando aquellos que presentaban comportamiento de polinizador y aquellos que eran ladrones (Dafni, 1992) al contactar o no regularmente el estigma de las flores. Fueron colectados ejemplares de los insectos visitantes y montados para identificación. Las observaciones fueron hechas entre 7 y 10 AM y entre 7 y 10 PM, en rondas de 10 minutos por individuo focal (Capítulo 1). El procedimiento de observación fue el mismo usado en estudios previos (Capítulo 1). Para la población de Pachuca se tienen 77 horas totales, 40 diurnas y 37 nocturnas. Para la población de Mapimí se tienen 53 horas totales, 30 diurnas y 23 nocturnas. A cada

individuo focal se le midió la altura de la inflorescencia y el volumen de la roseta (L), también la proporción de la espiga cubierta por flores y el número de flores abiertas en ese momento. Con base en estas observaciones se estimó la tasa de visita definida como el número de visitas por hora por flor ($Nv. /h.* flor$), de tal manera de estandarizar dichas observaciones, dada la diferencia en horas de observación entre poblaciones y la cantidad de flores por inflorescencia focal.

En cada población se muestrearon al azar alrededor de 30 inflorescencias en las que se registró su número de frutos y cicatrices florales, de esta manera pudimos estimar la fecundidad total y la eficiencia en la producción de frutos (fruit-set, estimado como la proporción de frutos en relación al total de flores). Para la producción de semillas por fruto se tomaron al azar 7 individuos por población y se contaron las semillas de 3 frutos por planta, registrando además el volumen de los frutos (cm^3). Se diferenciaron las semillas viables de las abortadas para estimar la eficiencia en la producción de semillas (seed-set, estimado como la proporción de semillas viables en relación al total de óvulos). También fueron tomados datos del volumen de la roseta y altura de la inflorescencia de cada individuo al cual se le midió su fecundidad, para controlar el efecto del tamaño de los individuos sobre la reproducción.

Experimentos de polinización controlada.- En ambas poblaciones se llevaron a cabo dos experimentos de polinización controlada para estudiar con detalle el sistema de cruce de *Agave lechuguilla* y el aporte relativo de los gremios de polinizadores, diurnos o nocturnos, sobre la fecundidad de la especie.

En el caso del sistema de cruce se escogieron al azar 16 inflorescencias en Pachuca y 9 en Mapimí, a las cuales se les aplicó los siguientes tratamientos en cuatro flores por planta por tratamiento: 1) Entrecruza, que consistió en aplicar polen manualmente sobre el estigma en fase receptiva (Freeman y Ried, 1985), dicho polen provenía de otra planta alejada más de 200 metros (ver Trame et al., 1995). Las flores fueron emasculadas previamente a la apertura de las anteras y mantenidas cubiertas con bolsas de red fina desde el día anterior a que abrieran, de tal manera de evitar cualquier contaminación. 2). Autocruza, consistió en aplicar manualmente polen fresco de otras flores de la misma planta sobre el estigma receptivo. Al igual que el tratamiento anterior las flores se mantuvieron cubiertas desde el principio y también fueron emasculadas. 3)

Polinización automática, este tratamiento consistió en mantener las flores embolsadas durante todo su desarrollo sin emascular. 4) Control, corresponde a flores marcadas previamente y dejadas intactas sin embolsar expuestas a la polinización natural.

El experimento de gremios de polinizadores consistió en cubrir y descubrir alternativamente flores emasculadas durante el atardecer y amanecer. Para ello también se seleccionaron 14 inflorescencias en Pachuca y 8 en Mapimí a las cuales se les aplicaron los siguientes tratamientos en 4 flores por tratamiento: 1) Polinización diurna, las flores fueron cubiertas durante la noche con bolsas de red fina y descubiertas al amanecer. 2) Polinización nocturna, las flores permanecían cubiertas durante el día y eran descubiertas al anochecer. 3) Control de embolsamiento, las flores permanecían todo el tiempo embolsadas salvo al amanecer y atardecer en que eran movidas al mismo tiempo que los otros tratamientos. 4) Control, las flores permanecieron todo el tiempo descubiertas y expuestas a todos los polinizadores.

En ambos experimentos las flores fueron marcadas con láminas de aluminio en su base con el fin de identificarlas una vez formados los frutos. El número de frutos producidos en cada tratamiento se analizó con un modelo log-lineal anidado de los individuos en las poblaciones y los tratamientos en individuo y población (Tablas 4a y 5a) dada la distribución Poisson de los conteos de frutos por tratamiento. Por su parte, el análisis del número de semillas por fruto y del seed-set se realizó por medio de un ANOVA split-plot (Underwood, 1997). El modelo involucra a los individuos (Inflorescencias) anidados en las poblaciones y los efectos de los tratamientos por población e individuo, (ver Tablas 4b y 5b). Las variables fueron transformadas, usando logaritmo y $\arcsen\sqrt{\quad}$, respectivamente.

A partir del número de frutos, semillas por fruto y fruit-set en los tratamientos de autocruza (A) y exocruza (H) del experimento de sistemas de cruza de *A. lechuguilla*, se calculó el coeficiente de de`resión por endogamia (δ) para ambas poblaciones mediante la siguiente ecuación $\delta = 1 - (WA / WH)$ (Hedrick, 2000), con base en los atributos de la adecuación correspondientes a fruit-set, número de semillas por fruto y seed-set.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA.

Germinación y electroforesis.- El material foliar de 20 madres por población corresponde a la hoja más nueva de cada roseta, de tal manera de estandarizar la condición fisiológica de las hojas. De cada hoja se cortó un pedazo de 2*2 cm de su base, luego de rotulados fueron mantenidos en nitrógeno líquido y posteriormente almacenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las semillas provenientes de cada madre fueron germinadas en condiciones controladas de invernadero entre $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Freeman, 1973; Pritchard y Miller, 1995). Se sembraron 100 semillas por familia, seleccionadas al azar en cajas separadas a las cuales se registró su porcentaje de germinación a los 15 y 30 días después de sembradas. El peso de las semillas por familia (*mg*) se estimó a partir de 10 semillas por familia, usando una balanza analítica. Luego de 30 días de germinadas, se seleccionaron al azar 5 plántulas por familia a las cuales se les midió su altura como estimador de la depresión por endogamia. Posteriormente se eligieron al azar 16 plántulas por familia para proceder a electroforesis.

Se siguió un protocolo estándar para electroforesis en geles de almidón (Soltis et al., 1983). Las hojas fueron maceradas mediante un disruptor de tejidos, usando de 15 a 20 gotas de un buffer de extracción compuesto de una mezcla de buffer YO (Yhe y O'Malley, 1980) y buffer Veg II (Pitel y Cheliak, 1984) en proporción 3:1 respectivamente. En cambio, para las plántulas se maceró el material fresco con mortero de mano usando 3 a 4 gotas de la misma mezcla. Para ambos casos, el extracto fue absorbido en "wicks" de papel cromatográfico de $12*1.5\text{ mm}$ y luego guardado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta las electroforesis.

Las enzimas fueron corridas en geles de almidón al 12% (450 mL) y durante la noche (14 hrs.) a 30 mA usando el sistema de buffers LiOH 8 de Soltis et al. (1983) con el gel a pH 7.6. Se analizaron 4 enzimas con un total de 6 loci que corresponden a: Fosfoglucosa isomerasa (PGI, E.C. 5.3.1.9, 2 loci), Glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT, E.C. 2.6.1.1, 1 locus), Leucina aminopeptidasa (LAP, E.C. 3.4.11.1, 1 locus), Diaforasa (DIA, E.C. 1.6.4.3, 2 loci). Las recetas de tinción de las enzimas fueron extraídas de Soltis et al. (1983) con modificaciones menores. Los loci y alelos fueron numerados de acuerdo a su rapidez de corrida; así, el más rápido es 1, el segundo, 2, etc.

Las tasas de entrecruzamiento poblacionales por locus (t_s) y multiloci (t_m) fueron estimadas con base en el procedimiento de Ritland y Jain (1981). Los errores estándar de t y de las frecuencias alélicas de polen

óvulos para cada locus fueron estimadas mediante 1000 bootstrap. Las estimaciones multiloci para cada familia se obtuvieron mediante el mismo procedimiento (Ritland y Jain, 1981), usando 30 bootstrap por familia para el cálculo del error estándar. Para todos los cálculos se utilizó el programa MLT (Multilocus Estimation Program, Ritland, 1990).

RESULTADOS

Densidad y morfometría.- La densidad de rosetas de *Agave lechuguilla* (Pachuca media = 1.8 ± 0.42 , Mapimí media = 2.04 ± 0.417 rosetas por m^2 ; ANOVA $df=6$; $F = 0.16$; $P = 0.7$) no resulta estadísticamente diferente entre poblaciones y lo mismo sucede con la densidad de inflorescencias (Pachuca media = 0.000772 ± 0.00071 ; Mapimí media = 0.00223 ± 0.00072 inflorescencias por m^2 ; ANOVA $df = 6$; $F = 2.09$; $P = 0.19$). Por otra parte, existe entre ambas poblaciones una diferencia significativa con respecto al volumen de las rosetas (Diámetro mayor * Diámetro menor * Altura, (L); Pachuca $n = 31$, media = $204.7 \pm 16.12 L$; Mapimí $n = 30$, media = $140.2 \pm 16.39 L$; ANOVA $df = 60$, $F = 7.89$; $P = 0.0067$;) y al número total de flores por inflorescencia (Pachuca media = 420.71 ± 18.68 ; Mapimí media = 212.13 ± 18.37 ; ANOVA $df = 60$, $F = 63.35$; $P < 0.00001$), teniendo Pachuca plantas más grandes que producen más flores. Asimismo, en cada población existe una correlación entre el volumen de la roseta y el número de flores por inflorescencia (Pachuca $n = 31$, $R^2 = 0.27$, $F = 9.9$, pendiente = 0.6 , $P = 0.0039$; Mapimí $n = 30$, $R^2 = 0.53$, $F = 34.3$, pendiente = 0.42 $P < 0.0001$).

Polinizadores y fecundidad natural.- Los visitantes observados se muestran en la Tabla 1. A partir de las observaciones, los visitantes se clasificaron como polinizadores efectivos, si tocan el estigma de las flores y como ladrones de polen y/o néctar si no lo contactaban (Tabla 1). Los principales polinizadores corresponden a las abejas grandes (*Bombus pennsylvanicus sonorus* y *Xylocopa californica arizonensis*), cuyo porcentaje de visita fue de aproximadamente el doble para Pachuca (22%) en relación a Mapimí (11.9%). Los esfingidos (*Hyles lineata*), por su parte tienen el 12.8% en Pachuca y en Mapimí el 7.8%. Los colibríes en conjunto (*Eugenes fulgens*, *Calotorax lucifer*, *Archilochus alexandri*) presentan un porcentaje mucho menor, siendo

cercano al 1% para ambas poblaciones. Tal como sucedió en observaciones previas no registramos visitas de murciélagos nectarívoros (Capítulo 1). De los ladrones por su parte, sólo registramos a *Apis mellifera* con una alta frecuencia de visitas (Tabla 1), que representan el 63 % del total de visitantes en Pachuca y en Mapimí el 79%, otros ladrones no fueron registrados en este estudio, pero más información de ellos se encuentra en el Capítulo (1).

X. californica sólo se observó en la población de Mapimí, mientras que *B. pennsylvanicus* sólo está en Pachuca. Ambos visitan *A. lechuguilla* tanto por néctar como por polen, pero su comportamiento difiere, ya que *X. californica* visita las flores de manera directa, es decir entra en la flor de frente a la corola, mientras que *B. pennsylvanicus* trepa entre las flores entrando en ellas lateralmente y manteniéndose en la inflorescencia por más tiempo.

La única especie de esfingido registrada, *Hyles lineata*, está presente en ambas poblaciones y generalmente visita las flores de manera directa, revoloteando en frente, aunque a veces se posa sobre ellas. De los colibríes, *Eugenes fulgens* está presente sólo en Pachuca y *Archilochus alexandri* sólo se registró en Mapimí, en cambio *Calothorax lucifer* está presente en ambas poblaciones. *E. fulgens* es la especie que presenta mayor porcentaje de visita a *A. lechuguilla* (Tabla 1).

El horario de los polinizadores se expone en la figura 1, que corresponde a las visitas acumuladas por población para los diferentes horarios. En la población de Pachuca *B. pennsylvanicus* presenta actividad desde las primeras horas del día y alcanza su máximo alrededor de las 8:30 AM, luego se vuelven registrar visitas al atardecer, pero de monto mucho menor. En Mapimí sucede algo similar con *X. californica*, aunque el máximo sucede a las 8 AM y se hace cero después de las 9:30. Para el caso de los esfingidos, sólo se observa actividad vespertina. En Mapimí su actividad se inicia más tarde que en Pachuca y en ambas poblaciones su actividad tiende a mantenerse hacia la noche. El caso de los colibríes semeja al de las abejas grandes, pero con un nivel de visitas mucho menor que éstas.

La tasa de visita por flor (Número de visitas por hora por flor) fue analizada mediante un ANOVA anidado (polinizador-población) para los tres principales grupos de polinizadores (Fig. 2, Tabla 2), en función de determinar si existen diferencias entre las poblaciones. El análisis indica que ambas fuentes de variación

son significativas (Tabla 2), es decir que existen diferencias entre las poblaciones y además diferencias entre los polinizadores de cada población, siendo esta última la que tiene la mayor proporción de la varianza. Claramente la tasa de visita por flor es mayor en Pachuca, siendo *B. pennsylvanicus* quién tiene la mayor tasa, seguido por *Hyles lineata* (Fig. 2). Los polinizadores de Mapimí no presentan diferencias significativas entre sí, aunque en promedio *X. californica* tiene más visitas que *H. lineata*. Los colibríes por su parte mantienen un perfil bajo y no muestran diferencias significativas entre poblaciones.

La fecundidad también difiere entre ambas poblaciones. El número de frutos por inflorescencia fue mayor en Pachuca (Tabla 3; Pachuca media = 253 ± 13.01 ; Mapimí media = 73 ± 13.21). Dado que también hay un efecto significativo del tamaño de la roseta sobre la producción de frutos (Tabla 3), la eficiencia de la polinización medida como fruit-set indica que esta diferencia en fecundidades es consistente, ya que en Mapimí es en promedio la mitad que en la población sureña (Tabla 3; Pachuca media = 0.605 ± 0.0248 ; Mapimí media = 0.302 ± 0.0252). Así mismo el número de semillas por fruto resulta mayor en Pachuca (Tabla 3; Pachuca media = 97.09 ± 5.52 ; Mapimí media = 37.85 ± 5.53), existiendo también una diferencia significativa en el volumen de los frutos ($\text{Largo cm} * \pi * (\text{ancho}/2)^2 \text{ (cm}^3\text{)}$; Pachuca media = 21 , $X = 2.9 \pm 0.21 \text{ cm}^3$; Mapimí media = 21 , $X = 2.23 \pm 0.230 \text{ cm}^3$; ANOVA $df = 41$, $F = 4.26$, $P = 0.044$). La eficiencia en la polinización medida como seed-set también se muestra significativamente mayor para la población de Pachuca (Tabla 3; Pachuca media = 0.55 ± 0.031 ; Mapimí media = 0.43 ± 0.032).

Experimentos de polinización controlada.- Los resultados del experimento de sistema de cruce en *A. lechuguilla* se muestran en la Figura 3 (a, b y c) y en la Tabla 4 (a y b). Para el caso de la cantidad de frutos producidos en cada tratamiento por individuo (Fig 3a, Tabla 4a) el modelo muestra que la varianza está explicada sólo por las diferencias entre tratamientos. El comportamiento de los experimentos es similar para ambas poblaciones, la heterocruza produjo más frutos que el control y la autocruza representa un porcentaje mucho más bajo de la producción de frutos. La polinización automática es prácticamente nula.

En el caso de la producción de semillas y el seed-set, el análisis muestra que la mayor parte de la varianza está explicada por las diferencias entre tratamientos (Tabla 4a) y sólo existen diferencias

significativas entre poblaciones para el seed-set. La mayoría de los demás factores son significativos pero con porcentajes de varianza mucho más bajos. Cabe destacar el efecto significativo de los individuos independientemente de los tratamientos y en el caso del seed-set la interacción entre tratamiento y población resulta no significativa. Los tratamientos por población muestran, a nivel del número de semillas por fruto (Fig. 3b), que la mayor cantidad de semillas producidas corresponde al control seguido por heterocruza para ambas poblaciones. Sin embargo, en el caso de Mapimí este valor es significativamente menor que el control ($t = 3.6, P < 0.001$), cosa que no ocurre en Pachuca. La autocruza por su parte aparece representada solamente en la población de Pachuca. La polinización automática es prácticamente inexistente en ambas poblaciones. A nivel del seed-set (Fig. 3c) no existen diferencias entre la heterocruza y el control en ambas poblaciones, teniendo Mapimí un menor seed-set en todos los tratamientos.

En el experimento de gremios de polinizadores (Fig. 4a,b y c; Tabla 5a y b), de la misma manera que en el experimento anterior las diferencias en los tratamientos son responsables exclusivas de la varianza para el caso de la cantidad de frutos producidos por individuo en cada tratamiento (Tabla 5a) y mayoritaria tanto para el número de semillas producidas como para la eficiencia en la polinización (Tabla 5b y c). Otros factores aparecen con diferentes grados de significancia, aunque con porcentajes de la varianza mucho menores. En Pachuca los polinizadores nocturnos tienen un efecto mayor que los polinizadores diurnos en todas las características de adecuación de *A. lechuguilla* registradas, en cambio en Mapimí no existen diferencias significativas entre polinizadores diurnos y nocturnos en ninguno de los casos. En ambas poblaciones la suma del número de semillas por fruto es similar que el control respectivo tanto para flores polinizadas por visitantes diurnos como por nocturnos (Pachuca $t = 0.39, df = 74, P = 0.69$; Mapimí $t = 0.32, df = 44, P = 0.74$), indicando la proporción en que cada gremio de polinizadores se reparte la totalidad de la reproducción de *A. lechuguilla*. En ambas poblaciones y para todos los casos el efecto de la manipulación de las bolsas fue nulo.

Tasas de entrecruzamiento.- Las frecuencias alélicas para todos los loci analizados por población se exponen en la tabla 6. Para el caso de las enzimas LAP y GOT las frecuencias de los alelos 2 y 3 respectivamente, son

más altas en la población de Mapimí. En el resto de las enzimas las frecuencias alélicas son similares en ambas poblaciones.

Las tasas de entrecruzamiento tanto multiloci (t_m) como por locus (t_s) resultan menores para la población de Mapimí (Tabla 7). En Pachuca estas no difieren de 1, en cambio para Mapimí resultan claramente diferentes de 1 (0.6 y 0.49). La diferencia entre ambas tasas (Tabla 7) sólo es mayor de cero en el caso de Mapimí, indicando que en esa población existen procesos de endogamia biparental. Por otra parte la distribución de frecuencias de t_m por familia se ilustra en la figura 5, donde Mapimí exhibe una variación mayor, en cambio Pachuca tiene la mayoría de sus familias con valores cercanos a 1.

Germinación y depresión por endogamia.- Los porcentajes de germinación de las semillas por familia son en promedio casi el doble para Pachuca en relación a Mapimí (Fig. 6; ANOVA germinación 30 días, $df = 39$, $F = 43.8$; $P < 0.0001$) y en ambos casos prácticamente no existe diferencia en los porcentajes de germinación entre los 15 y 30 días luego de sembradas (Fig. 6). El promedio de la altura a los 30 días es más alto en Pachuca que en Mapimí (Tabla 8; $n = 100$, Pachuca media = 1.87 ± 0.059 cm; Mapimí media = 1.33 ± 0.059 cm). Existe un componente familiar que es responsable del 46.7% de la varianza, muy cercano al representado por el factor población (51.8%). El peso de las semillas por familia no muestra diferencias entre poblaciones (Tabla 8; $n = 200$, Pachuca media = 3.7 ± 0.28 mg; Mapimí media = 3.4 ± 0.29 mg), siendo la familia el único factor significativo con el 51.2% de la varianza.

El coeficiente de depresión por endogamia (Tabla 9) muestra que ambas poblaciones no difieren entre si en sus valores promedio, sólo existe una diferencia significativa, aunque pequeña, en el caso del número de semillas por fruto (C. I. 95%). Pachuca presenta valores menores que Mapimí. Los valores en general son altos, superiores al 80 % para los atributos calculados, indicando el costo en adecuación que significa la endogamia en la especie de estudio.

Por otra parte, el porcentaje de germinación por familia está altamente correlacionado con la tasa de entrecruzamiento familiar para ambas poblaciones (Fig. 7 a y b). Para Pachuca esta regresión presenta una mayor dispersión que en el caso de Mapimí (Pachuca $n = 20$, $R^2 = 0.33$, $F = 8.87$, $P = 0.008$; Mapimí $n = 20$,

$R^2 = 0.66$, $F = 35.5$, $P < 0.0001$). Las pendientes, así como las ordenadas al origen de ambas rectas calculadas no presentan diferencias significativas (Pachuca $y = 50.7x + 21.8$; Mapimí $y = 49.5x + 13.6$; Pendientes $t = 0.75$, $P = 0.46$; Ordenada al origen, $t = 0.28$, $P = 0.75$), sugiriendo que las diferencias en la germinación entre ambas poblaciones se deben a cuan endogámicas son las semillas en particular y no a algún vigor especial de las población sureña. La altura final a 30 días de las plántulas por familia no muestra relación con su correspondiente tasa de entrecruzamiento en ninguna de las poblaciones (Pachuca $n = 20$, $R^2 = 0.02$, $F = 2.3$, $P = 0.13$; Mapimí $n = 20$, $R^2 = 0.001$, $F = 0.05$, $P = 0.8$).

DISCUSIÓN

Polinizadores y respuesta adaptativa.- Nuestros datos sobre las diferencias en las tasas de visita de polinizadores entre ambas poblaciones coinciden con la fecundidad general registrada. Sólo en Pachuca los polinizadores nocturnos son más importantes que los diurnos en la eficiencia de la polinización. Sin embargo a pesar de la mayor cantidad de visitas de abejas grandes en Pachuca, estos polinizadores diurnos son más eficientes al norte que en el sur, llegando a ser tan importantes como los nocturnos. Esto muestra que *Xylocopa* podría ser un polinizador más efectivo que *Bombus*, dado su comportamiento al visitar las flores. El síndrome de polinización de *Agave lechuguilla* concuerda con el esperado para polinización nocturna en la población sureña y sirve de predictor para su polinizador más efectivo, en este caso esfíngidos. En Mapimí en cambio, parece haber un desplazamiento de caracteres, aunque no total, hacia la polinización diurna (Capítulo 1) lo que corresponde a la importancia relativa de los polinizadores diurnos.

Existe una controversia en la literatura reciente respecto al papel de los polinizadores en el género *Agave*. Arizaga et al. (2000a,b) encuentran que la reproducción en *A. macroacantha* es fuertemente dependiente de murciélagos nectarívoros en el centro de México, lo que concuerda con otros estudios previos (Howell, 1979; Howell y Roth, 1981; Arizaga y Ezcurra, 1995). En cambio, Saluson (2000) encuentra que en Arizona *A. palmeri* y *A. chrysantha* no presentan dependencia con respecto a los murciélagos y éstos no están presentes en los sitios de estudio al momento de hacer las observaciones, también encuentra que los caracteres florales de estas especies presentan variación hacia polinizadores diurnos. Esto puede ser más

importante en el caso de *A. chrysantha*, cuya distribución geográfica se encuentra fuera del rango de los murciélagos polinizadores (Slauson, 2000). En todo caso, la polinización nocturna en esas especies es relevante y es llevada a cabo por la misma especie de esfingido registrada en nuestras observaciones (*Hyles lineata*). Los hábitos migratorios de los murciélagos magueyeros (Howell, 1979; Cockrum, 1991; Fleming y Nuñez da Silveira, 1993) junto con la disminución de sus poblaciones (Howell y Roth, 1981; Wilson et al., 1985; Eguiarte y Búrquez, 1988) parecen generar este desplazamiento de caracteres al convertirse estos en polinizadores menos predecibles. Estos trabajos en conjunto apuntan hacia la idea general de que la variación ambiental y diversidad de la fauna polinizadora es un factor más importante en la evolución de las características florales que un polinizador particular. Nuestros datos corroboran este punto, con la ventaja de tratarse de una sola especie en un amplio rango geográfico, que evita los efectos histórico-filogenéticos de trabajar con varias especies. Tal como plantean Schaffer y Schaffer (1977), el subgénero *Littaea* (inflorescencias espigadas) parece haber desarrollado adaptaciones hacia la polinización por esfingidos, con una tendencia hacia la polinización diurna, mientras que el subgénero *Agave* (inflorescencias paniculadas), mantendría la polinización por murciélagos en la medida de que éstos permanezcan constantes en las poblaciones. Este comportamiento parece también ser común en otras agaváceas cercanamente emparentadas con *Agave*, como el caso del género *Manfreda* (Eguiarte y Búrquez, 1987; Groman y Pellmyr, 1999; Eguiarte, Souza, y Silva-Montellano, 2000) donde los polinizadores diurnos también juegan un papel importante en la reproducción.

Sistema de cruce, tasas de entrecruzamiento y depresión por endogamia.- El resultado de nuestros experimentos en ambas poblaciones indican que el sistema de cruce de *A. lechuguilla* es predominantemente de entrecruza, lo que está de acuerdo con la protandria de sus flores (Freeman y Ried, 1985). Las tasas de entrecruzamiento promedio muestran una clara diferencia entre las dos poblaciones, sugiriendo niveles de flujo génico altos para Pachuca e intermedios para Mapimí (Schemske y Lande, 1985). Este es el primer reporte de la tasa de entrecruzamiento para el género *Agave*, y el segundo para la familia Agavaceae, donde *Yucca filamentosa* presenta tasas de entrecruzamiento altas ($t_m = 0.971$ y $t_s = 0.977$; Massey y Hamrick,

1999). Schemske y Lande (1985) plantean que las tasas de entrecruzamiento intermedias no son evolutivamente estables al analizar 62 especies vegetales, pertenecientes a 15 familias, en función de su modelo de equilibrio entre el sistema reproductivo y la depresión por endogamia (Lande y Schemske, 1985). De esta manera, las especies evolucionarían hacia sistemas reproductivos entrecruzados o autocruzados dependiendo del balance de la depresión por endogamia. Sin embargo, las variaciones de la tasa de entrecruzamiento pueden ser grandes en taxa emparentados, incluso a nivel intraespecífico (ej. *Clarkia tembloriensis*; Holtsford y Ellstrand, 1992). Estudios más recientes sugieren que las tasas de entrecruzamiento intermedias podrían ser frecuentes (Cruzan et al., 1994; Khon y Biardi, 1995; Norman, Weller y Sakai, 1997; Sakai et al., 1997; Kittelson y Maron, 2000). En este sentido, las tasas de entrecruzamiento también dependen de factores históricos, ambientales o de forma de vida paralelamente al efecto de los polinizadores, configurando un escenario complejo donde las poblaciones parecerían no encontrarse en equilibrio (Eguiarte, Pérez-Nasser y Piñero, 1992; Holtsford y Ellstrand, 1992), que parecería ser al caso de *A. lechuguilla*.

Nuestros resultados muestran que los niveles de flujo génico predichos concuerdan con las tasas de visita de los polinizadores y sugerirían que las poblaciones de *A. lechuguilla* del extremo norte podrían estar experimentando procesos evolutivos diferentes a aquellas del sur de su distribución geográfica. La endogamia biparental parece ser en este caso una fuerza evolutiva importante. Por otro lado, nuestros resultados del experimento de sistema de cruza sugieren que ambas poblaciones podrían presentar limitación por recursos más que por polen, al resultar la eficiencia de la polinización manual cruzada estadísticamente igual a los respectivos controles (Parra-Tabla, Vargas y Eguiarte, 1998; Slauson, 2000).

Agave lechuguilla presenta autocompatibilidad y aunque el monto de semillas producidas por autopolinización manual es pequeño, sólo en Pachuca es importante. A este respecto, el índice de depresión por endogamia (δ) calculado es alto, superior a 0.8 dependiendo del atributo medido. Para otras especies del género la depresión por endogamia es incluso más alta, como en *Agave macroacantha* (0.92, fruit-set; Arizaga et al., 2000a) y en *A. palmeri* y *A. crysantha* (0.91; 0.97, fruit-set; Slauson, 2000) respectivamente. Para *Manfreda brachystachya* en cambio, el índice de depresión por endogamia es relativamente bajo (0.32,

seed-set; Eguiarte y Búrquez, 1987). Estos datos sugieren que para el género *Agave* la depresión por endogamia es muy alta, no ocurriendo lo mismo con géneros emparentados, como *Manfreda*. Otra especie, que coocurre con *A. lechuguilla*, *Opuntia rastrera*, también presenta altos índices de depresión por endogamia en el fruit-set (0.87; Mandujano, Montaña y Eguiarte, 1996).

La teoría predice que, en el equilibrio, las poblaciones con alta entrecruza tendrán niveles de depresión por endogamia altos, en cambio aquellas con autofertilización tendrán niveles de depresión por endogamia bajos debido a la purga de los alelos recesivos de la población (Lande y Schemske, 1985; Charlesworth y Charlesworth, 1987; Barrett y Charlesworth, 1991). Numerosos trabajos sugieren que, en términos generales, el modelo predice la relación entre el comportamiento del sistema reproductivo y la depresión por endogamia (Agren y Schemske, 1993; David, Savy y Brabant, 1993; Khon y Biardi, 1995; Kittelson y Maron, 2000; Goodwillie, 2000), pero existen numerosas excepciones como en nuestros estudios (niveles altos de depresión por endogamia en poblaciones con alto nivel de autofertilización; Johnston y Schoen, 1996; Sakai et al., 1997; Kephart, Brown y Hall, 1999).

El caso de *A. lechuguilla*, aunque se ajusta a la predicción, no parece tan simple, ya que la población de Pachuca está fuera del equilibrio de Hardy-Weimberg, con un exceso de heterócigos (Capítulo 2). De tal manera que las diferencias en la magnitud de la depresión por endogamia entre ambas poblaciones podrían obedecer a las presiones de las diferentes fuerzas evolutivas implicadas, selección natural, endogamia etc. en el proceso de estabilización poblacional hacia el equilibrio, ya que es posible que la condición actual de mayor endogamia en Mapimí sea relativamente reciente en términos generacionales, dada la posible reducción de las poblaciones de murciélagos (Howel, 1979; Eguiarte y Búrquez, 1988) frente a la desertificación durante el holoceno temprano (Ortega, 1995), no dando tiempo a que se purguen los genes deletéreos y manteniendo el sistema reproductivo entrecruzado.

Por otra parte, la depresión por endogamia puede manifestarse en varios niveles del desarrollo de los individuos, especialmente las especies entrecruzadas que pueden mostrar depresión por endogamia en estados tempranos (producción de semillas y germinación) como también en estadios más tardíos (crecimiento y reproducción) (Husband y Schemske, 1996). En nuestro caso, sólo presentamos datos de la producción de

semillas, porcentaje de germinación y tamaño de las plántulas, siendo imposible, por el momento, presentar datos del éxito reproductivo de la progenie analizada, ya que *A. lechuguilla* tarda entre 15 y 20 años en reproducirse (Eguiarte, Souza, y Silva-Montellano, 2000). En este punto las diferencias encontradas entre poblaciones, especialmente a nivel del porcentaje de germinación parecen indicar un efecto mayor de la depresión por endogamia en Mapimí, especialmente porque correlaciona con la tasa de entrecruzamiento familiar. El tamaño de las plántulas, a pesar de las diferencias poblacionales, no presenta correlación con la tasa de entrecruzamiento, por lo tanto tampoco podemos saber si es buen predictor de la depresión por endogamia, ya que es posible que la diferencia entre poblaciones obedezca a variación ambiental. En todo caso, el peso de las semillas no varía entre las poblaciones, lo que sugiere que la expresión del tamaño de las plántulas proviene de una característica intrínseca de la progenie. De cualquier manera la ventana de observación a los procesos evolutivos del sistema reproductivo de *Agave lechuguilla* es estrecha por el momento, haciéndose necesario un estudio más profundo respecto al papel que juega la depresión por endogamia en la mantención y evolución del sistema reproductivo en el género.

Conclusión.- Este estudio apunta hacia los procesos microevolutivos que ha experimentado *Agave lechuguilla* y en conjunto con trabajos previos (Capítulos 1 y 2; Cadaval, 1999), muestra como el problema de la respuesta floral de las plantas hacia sus polinizadores puede ser abordado mediante una aproximación interpoblacional. En particular, la interpretación del síndrome de polinización sólo mediante las características florales resulta poco confiable (Waser et al. 1996), ya que los polinizadores pueden comportarse como visitantes oportunistas o cambiar en el tiempo. El nivel de entrecruzamiento y las consecuencias a nivel de la depresión por endogamia están influenciados por los cambios en la disponibilidad de los polinizadores más efectivos, generando con ello presiones de selección diferentes en poblaciones sometidas a condiciones también diferentes.

LITERATURA CITADA

- Arizaga, S., and E. Ezcurra. 1995. Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks. *Oecologia* 101: 329-334
- _____, S., E. Ezcurra, E. Peters, F. Ramirez de Arellano, and E. Vega. 2000. Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a mexican tropical desert. I. Floral biology and pollination mechanisms. *American Journal of Botany* 87: 1004-1010.
- _____, S., E. Ezcurra, E. Peters, F. Ramirez de Arellano, and E. Vega. 2000. Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a mexican tropical desert. II. The role of pollinators. *American Journal of Botany* 87: 1011-1017.
- Agren, J. and D. Schemske. 1993. Outcrossing rate and inbreeding depression in two annual monoecious herbs, *Begonia hirsuta* and *B. semiovata*. *Evolution* 47: 125-135.
- Baker, H.G. and Baker, I. 1983. Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: Handbook of Experimental Pollination Biology. Eds. Jones, E. and Little, J. Scientific and Academic Editions. New York.
- Barrett, S. C. and, D. Charlesworth. 1991. Effects of change in the level of inbreeding on the genetic load. *Nature* 352: 522-524.
- Barthell, J. F., and J. M. Knops. 1997. Visitation of evening primrose by carpenter bees: evidence of a "mixed" pollination syndrome. *The Southwestern Naturalist* 42: 86-93.
- Belaoussoff, S., and J. Shore. 1995. Floral correlates and fitness consequences of mating-system variation in *Turnera ulmifolia*. *Evolution* 49: 545-556.
- Cadaval, A. 1999. Estudio evolutivo de los azúcares del néctar de *Agave lechuguilla* en el desierto de Chihuahua. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Charlesworth, D., and B. Charlesworth. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annal review of Ecology and Systematics*. 18: 237-268.
- Cockrum, L. 1991. Seasonal distribution of northwestern populations of the long-nosed bats *Leptonycteris sanborni* (Phyllostomatidae). *Annales del Instituto de Biología, UNAM. sección Zoología* 62: 181-202.
- Cruzan, M. B., J. Hamrick, M. Arnold, and B. Bennett. 1994. Mating system variation in hybridizing irises: Effects of phenology and floral densities on family outcrossing rates. *Heredity*. 72: 95-105.
- Dafni, A. 1992. Pollination biology: a practical approach. Oxford University Press. Oxford, United Kingdom
- David, J. L., Y. Savy, and P. Barbant. 1993. Outcrossing and selfing evolution in populations under directional selection. *Heredity*. 71: 642-651.
- Eguiarte, L., and A. Búrquez. 1987. Reproductive ecology of *Manfreda Brachystachya* an iteroparous species of Agavaceae. *The Southwestern Naturalist* 32: 169-178.
- _____, and _____. 1988. Reducción en la fecundidad de *Manfreda Brachystachya*, (Cav.) Rose, una agavácea polinizada por murciélagos: los riesgos de la especialización en la polinización. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 48: 147-149.
- _____, N. Perez-Nasser, and D. Piñero. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity* 69: 217-228.
- _____, A. Búrquez, J. Rodríguez, M. Martínez-Ramos, J. Sarukhán and D. Piñero. 1993. Direct and indirect estimates of neighborhood and effective population size in a tropical palm, *Astrocaryum mexicanum*. *Evolution* 47: 75-87.
- _____, V. Souza, and A. Silva-Montellano. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: Filogenia, ecología evolutiva de la reproducción y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 66: 131-150.
- Faegri, K., and L. van der Pijl. 1971. The principles of pollination ecology. 2nd ed. Pergamon Press, Oxford.
- _____, K. and van der Pijl, L. 1979. The principles of pollination ecology. 3^o Ed. Pergamon Press, Oxford.
- Fleming, T., R. Nuñez, and L. da Silveira. 1993. Seasonal changes in the diets of migrant and non-migrant nectarivorous bats as revealed by carbon stable isotope analysis. *Oecologia* 94: 72-75.

- _____, M. Tuttle, and M. Horner. 1996. Pollination biology and the relative importance of nocturnal and diurnal pollinators in three species of sonoran desert columnar cacti. *The Southwestern Naturalist* 41: 257-269.
- Freeman, C. E..1973 Some germination responses of lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.). *The Southwestern Naturalist* 18: 125-134.
- _____, and W. Ried. 1985. Aspects of the reproductive biology of *Agave lechuguilla* (Torr). *Desert Plants* 7: 75-80.
- Gentry, H. 1982. Agaves of continental North America. University of Arizona Press. Tucson.
- Goodwillie, C. 2000. Inbreeding depression and mating systems in two species of *Linanthus* (Polemoniaceae) *Heredity* 84: 283-293.
- Groman, J. D. and O. Pellmyr. 1999. The pollination biology of *Manfreda virginica* (Agavaceae): relative contribution of diurnal and nocturnal visitors. *Oikos* 87: 373-381.
- Hamrick, J. and M. Loveless. 1989. The genetic structure of tropical tree population: Association with reproductive biology In: The evolutionary ecology of plants. Eds. Bock, J. and Linhart, Y.. Westview Press. Boulder, Colorado.
- _____, and Godt, M. 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Plant population genetics, breeding and genetic resources. Eds. Brown, A., Clegg, M., Kahler, A. and Weir, B. Sinauer press. Sunderland. Mass.
- Hedrick, W. P. 2000. Genetics of populations. 2nd ed.. Jones and Bartlett Publishers. Mass.
- Holtsford, T. P., and N. Ellstrand. 1992. Genetic and environmental variation in floral traits affecting outcrossing rate in *Clarkia tembloriensis* (Onagraceae). *Evolution* 46: 216-225.
- Howell, D.J. 1979. Flock foraging in nectar-feeding bats: Advantages to the bats and the host plants. *American Naturalist* 144: 23-49.
- _____, and, B. Roth. 1981. Sexual reproduction in agaves: the benefits of bats; the cost of semelparous advertising. *Ecology* 62: 1-7.
- Husband, B. C., and D. W. Schemske. 1996. Evolution of magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution* 50: 54-70.
- Johnston, M.O., and D. J. Schoen. 1996. Correlated evolution of self-fertilization and inbreeding depression: an experimental study of nine populations of *Amsinckia* (Boraginaceae) *Evolution* 50: 1478-1491
- Kephart, S., E. Brown, and J. Hall. 1999. Inbreeding depression and partial selfing: Evolutionary implications of mixed-mating in a coastal endemic, *Silene douglasii* var. *oraria* (Caryophyllaceae). *Heredity* 82: 543-554.
- Kittelson, P.M., and J. Maron. 2000. Outcrossing rate and inbreeding depression in the perennial yellow bush lupine, *Lupinus arboreus* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 87: 652-660.
- Kohn, J. R. and J. E. Biardi. 1995. Outcrossing rates and inferred levels of inbreeding depression in gynodioecious *Cucurbita foetidissima* (Cucurbitaceae). *Heredity*. 75: 77-83.
- Krebs, C. 1989. Ecological Methodology. Harper and Row, New York.
- Kuban, J., J. Lawley, and R. Neill. 1983. The partitioning of flowering century plants by Black-chained and Lucifer hummingbird. *The Southwestern Naturalist* 28: 143-148.
- Lande, R., and D. Schemske. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution* 39: 24-40.
- Mandujano, M., C. Montaña y L. Eguiarte. 1996. Reproductive ecology and inbreeding depression in *Opuntia rastrera* (Cactaceae) in the Chihuahuan desert: why are sexually derived recruitments so rare? *American Journal of Botany* 83: 63-70.
- Martinez del Rio, C. and L. Eguiarte, 1987. Bird visitation to *Agave salmiana*: comparisons among hummingbirds and perching birds. *The Condor* 89: 357-363.
- Massey, L. and J. Hamrick. 1999. Breeding structure of *Yucca filamentosa* (Agavaceae) population. *Evolution* 53: 1293-1298.

- Morse, D. H., and R. S. Fritz. 1983. Contributions of diurnal and nocturnal insects to the pollination of common milkweed (*Asclepias syriaca* L.) in a pollen limited system. *Oecologia* 60:190-197.
- Nassar, J. M., N. Ramirez, and O. Linares. 1997. Comparative pollination biology of venezuelan columnar cacti and the role of nectar-feeding bats in their sexual reproduction. *American Journal of Botany* 84(7): 918-927.
- Norman, J. K., S. Weller, and A. Sakai. 1997. Pollination biology and outcrossing rates in hermaphroditic *Schiedea lydgatei* (Caryophyllaceae) *American Journal of Botany* 84: 641-648.
- Ortega, J. R. 1995. Los Paleoambientes holocénicos de la laguna de Babicora, Chihuahua, México. *Geofísica Internacional* 34: 107-116.
- Parra, V., C. F. Vargas and L. Eguiarte. 1993. Reproductive biology, pollen and seed dispersal, and neighborhood size in the hummingbird-pollinated *Echeveria gibbiflora* (Crassulaceae). *American Journal of Botany* 80: 153-159.
- Parra-Tabla, V., C. Vargas, and L. Eguiarte. 1998. Is *Echeveria gibbiflora* (Crasulaceae) fecundity limited by pollen availability?: an experimental study. *Functional Ecology* 12: 591-595.
- Pellmyr, O., and J. Thompson. 1996. Sources of variation in a pollinator contribution within a guild: the effects of plant and pollinators factors. *Oecologia*. 107: 595-604.
- Pitel, J., and Cheliak, W. 1984. Effect of extraction buffers on characterization of isoenzymes from vegetative tissues of five's conifers species: a user's manual. Information report PI-X-34, Petawawa National Forestry Institute, Canadian Forestry Service, Chalk River, Ontario, Canada.
- Pritchard, H. W. and A. Miller. 1995. The effects of constant temperatures, light and seed quality on the germination characteristics of *Agave americana*. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 57: 11-14.
- Proctor, M., and P. Yeo. 1973. The pollination of flowers. Collins, London.
- Ritland, K. and S. Jain. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using n independent loci system. *Heredity*. 47: 35-52.
- _____, 1990. A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating system. *Journal of Heredity*. 81: 235-237.
- Sakai, A. K., S. Weller, M-L. Chen, S-Y. Chou, and C. Tazanont. 1997. Evolution of gynodioecy and maintenance of females: the role of inbreeding depression, outcrossing rates, and resource allocation in *Schiedea adamantis* (Caryophyllaceae). *Evolution* 51: 724-736.
- SAS. 1995. JMP statistics and graphics guide. SAS institute, Cary, N.C.
- Schaffer, W., and V. Schaffer. 1977. The reproductive biology of Agavaceae I: pollen and nectar production in four Arizona agaves. *The Southwestern Naturalist*. 22: 157-168.
- Schemske D., and R. Lande. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. *Evolution* 39: 41-52.
- Schoen, D..1982a. The breeding system of *Gilia achilleifolia*: Variation in floral characteristics and outcrossing rate. *Evolution* 36: 352-360.
- _____, 1982b. Genetic variation and the breeding system of *Gilia achilleifolia*. *Evolution* 36: 361-370
- _____, and Clegg, M..1985. The influencing of flower color on outcrossing rate and male reproductive success in *Ipomoea purpurea*. *Evolution* 39: 1242-1249.
- Shaley, C. T. 1996. Bat and hummingbird pollination of an autotetraploid columnar cactus *Weberbauerocereus weberbaueri* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 83: 1329-1336.
- Slatkin, M.1994. Gene flow and population structure. In: L. Real [ed.], *Ecological Genetics*, 4-17. Princeton University Press. New Jersey.
- Slauson, L. A. 2000. Pollination biology of two chiropterophilous agaves in Arizona. *American Journal of Botany* 87: 825-836.

- Soltis, D., Haufler, C., Darrow, D. and Gastony, G.. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining Schedules. *American Fern Journal* 73: 9-27.
- Thompson J., and O. Pellmyr. 1992. Mutualism with pollinating seed parasites amid co-pollinators: constraints on specialization. *Ecology* 73: 1780-1791.
- Trame, A.M., A. Coddington and K. Paige. 1995. Field and genetic studies testing optimal outcrossing in *Agave schottii*, a long-lived clonal plant. *Oecologia* 104: 93-100.
- Underwood, A. J.. 1997. Experiments in Ecology: their logical design and interpretation using analysis of variance. Cambridge University Press. U. K.
- Waser, N. M., L. Chittka, M. V. Price, N. M. Williams, and J. Ollerton. 1996. Generalizations in pollination systems, and why it matters. *Ecology* 77: 1043-1060.
- Wilson, D.E., R. Medellín, D. V. Lanning, and H. Arita. 1985. Los murciélagos del noreste de México, con una lista de especies. *Acta Zoológica Mexicana* 8: 1-26.
- Yeh, F., and M. O'Malley. 1980. Enzyme variation in natural populations of Douglas-fir. *Psuedotsuga menziesii* (Mirb.) Franco from British Columbia. I. Genetic variation patterns in coastal populations. *Silvae Genetica* 29: 83-92.

PIES DE FIGURA

Figura 1.- Tasa de visita (N°visitas/h) de los grupos de polinizadores de *Agave lechuguilla* respecto de la hora del día para ambas poblaciones.

Figura 2.- Tasa de visita por flor (N°visitas/h por flor, media \pm SE) de los diferentes grupos de polinizadores en ambas poblaciones. Sólo presentan diferencias significativas entre poblaciones los grupos de abejas grandes (A.G.) y esfíngidos (E.) entre si ($t=5.6$, $p<0.0001$ y $t=2.9$, $P=0.0042$ respectivamente) y sólo en Pachuca existen diferencias significativas entre grupos de polinizadores (A.G. vs. E. $t=3.5$, $p<0.001$; A.G vs. Colibríes (C.) $t=7.5$, $p<0.0001$ y E. vs. C. $t=3.9$, $p<0.001$).

Figura 3.- Experimento de sistema de cruce para ambas poblaciones de *Agave lechuguilla*, media \pm SE por tratamiento: a) Número de frutos por individuo: $N=100$, Autocruza (U) vs. Heterocruza (H) $\chi^2=46.9$, $DF=25$, $P=0.005$; Automática (A) vs. otros rango χ^2 , 72-120, $DF=25$, $P<0.0001$. b) Número de semillas por fruto: $N=255$, U vs H.- Pachuca $t=14.1$, $P<0.0001$.- Mapimí $t=7.8$, $P<0.0001$; U vs Control (C).- Pachuca $t=14.9$, $P<0.0001$.- Mapimí $t=11.2$, $P<0.0001$.; H vs C, Mapimí $t=3.4$, $P=0.0013$. c) Seed-set: $N=255$, U vs H.- Pachuca $t=15.2$, $P<0.0001$.- Mapimí $t=12.2$, $P<0.0001$; U vs C.- Pachuca $t=15.6$, $P<0.0001$.- Mapimí $t=12.5$, $P<0.0001$.

Figura 4.- Experimento de gremios de polinizadores para ambas poblaciones de *Agave lechuguilla*, media \pm SE por tratamiento: a) Número de frutos por individuo: $N=88$, Embolsado (B) vs otros rango χ^2 , 36-80, $DF=22$, $P<0.0001$. b) Número de semillas por fruto: $N=244$, Diurno (D) vs Nocturno (N), Pachuca $t=7.3$, $P<0.0001$; Control (C) vs D, .-Pachuca $t=11.4$, $P<0.0001$.- Mapimí $t=5.3$, $P<0.0001$; C vs N.-Pachuca $t=4.1$, $P=0.0001$.- Mapimí $t=4.1$, $P=0.0001$. c) Seed-set: $N=244$, D vs N, Pachuca $t=6.3$, $P<0.0001$; C vs D, .- Pachuca $t=9.7$, $P<0.0001$.- Mapimí $t=3.7$, $P=0.0003$; C vs N.-Pachuca $t=3.4$, $P=0.001$.

Figura 5.- Distribución de frecuencias de las tasas de entrecruzamiento (t_m) por familia para ambas poblaciones de *Agave lechuguilla*, usando 20 madres por población y 16 hijos por familia.

Figura 6.- Porcentaje promedio (\pm SE) de germinación por familia a los 15 y 30 días para ambas poblaciones de *Agave lechuguilla* (100 semillas por familia y 20 familias por población).

Figura 7.- Regresión lineal entre el porcentaje de germinación por familia y la tasa de entrecruzamiento por familia (t_m) de *Agave lechuguilla* para ambas poblaciones (100 semillas por familia y 20 familias por población).

Tabla 1.- Número de visitantes observados, número de visitas por hora y porcentaje de visitas por especie para ambas poblaciones de *Agave lechuguilla*. El número de visitas por hora fue calculado usando las horas de observación para cada gremio de polinizadores en cada población, 40 h diurnas y 37 h nocturnas para Pachuca, en cambio para Mapimí, 30 h diurnas y 23 h nocturnas (% fue calculado a partir del total de visitas por hora).

Visitantes/ Poblaciones	Pachuca		Mapimí	
	Numero de visitas	N visitas por h (%)	Numero de visitas	N visitas por h (%)
Polinizadores				
<i>Hyles lineata</i>	363	9.81 (12.8)	62	2.69 (7.8)
<i>Xylocopa californica</i>	-----	-----	123	4.1 (11.89)
<i>Bombus pennsylvanicus</i>	682	17.05 (22.3)	-----	-----
<i>Eugenes fulgens</i>	25	0.62 (0.8)	-----	-----
<i>Calothorax lucifer</i>	13	0.33 (0.4)	4	0.13 (0.4)
<i>Archilochus alexandri</i>	-----	-----	6	0.2 (0.6)
Ladrones				
<i>Apis mellifera</i>	3744	48.6 (63.6)	1450	27.36 (79.4)
Visitantes totales	4827	76.4	1645	34.48

Tabla 2.- Valores ANOVA anidado de las tasas de visita por flor (Número de visitas* h por flor) de los polinizadores de *Agave lechuguilla* analizados en función de las tres categorías principales de polinizadores: abejas grandes, colibríes y esfingidos.

Variable	Fuente de variación	de DF	SC	F (% Var.)	P
	Población	1	1.289	26.29 (16.2%)	< 0.0001
Tasa de visita por flor	Polinizador [Pob.]	4	2.849	14.52 (35.8%)	< 0.0001
	Modelo	5	4.138	16.87 (51.9%)	< 0.0001
	Total	83	7.964		

Tabla 3.- Resultado del ANOVA y del ANCOVA de la fecundidad natural para ambas poblaciones de *Agave lechuguilla* de acuerdo con todos los factores del modelo probado. (Vol.*Pob.= interacción entre dos factores).

Variable	Fuente de variación	de DF	SC	F (% Var.)	P
	Población	1	45456.8	10.03 (5.7%)	0.0025
	Volumen roseta	1	30324.3	6.69 (3.8%)	0.012
Nº frutos	[Vol.*Pob]	1	6268.1	1.38	ns
	Modelo	3	545184.2	40.1 (67.8%)	< 0.0001
	Total	60	803273.3		
Fruit-set	Población	1	1.578	70.1(54.3%)	<0.0001
	Total	60	2.906		
	Población	1	5510.23	8.59 (8.3%)	0.0057
	Volumen frutos	1	803.12	1.25	ns
Nº semillas	[Vol.*Pob]	1	43.72	0.068	ns
	Modelo	3	38038.94	19.77 (60.9%)	< 0.0001
	Total	41	62406.50		
Seed-set	Población	1	0.186	7.25 (16%)	0.0105
	Total	41	1.166		

Tabla 4a.- Valores del modelo log-lineal para la variable de número de frutos producidos por tratamiento en el experimento de sistema de cruza. Los análisis (Tab 4b) son diferentes debido a la falta de grados de libertad para aplicar ANOVA split-plot en esta primera variable.

Fuente de variación	χ^2 (%var.)	DF	P
Población	0.89	1	ns
Individuo[Pob.]	6.19	23	ns
Trata. [Ind.*Pob.]	141.74 (76.3%)	23	<0.0001
Total	185.76	99	

Tabla 4b.- Valores de ANOVA “split-plot” para el modelo probado de acuerdo a las variables de número de semillas por fruto y seed-set del experimento de sistema de cruza, a partir de N= 255 frutos totales producidos en ambas poblaciones.

Variable	Fuente de variación	de DF	SC	F (% Var.)	P
	Población	1	1.25	5.19	ns
	Individuo[Pob.]	23	1.83	2.49 (5.7%)	0.0019
	Tratamiento	3	20.23	34.95 (63.6%)	0.0078
N° semillas por fruto	Trata.*Pob.	3	0.58	6.05 (1.8%)	0.001
	Trata.*Ind. [Pob.]	69	2.19	4.33 (6.9%)	< 0.0001
	Modelo	99	29.77	40.94 (93.5%)	< 0.0001
	Total	254	31.82		
	Población	1	0.63	7.02 (1.3%)	0.04
	Individuo[Pob.]	23	1.45	1.67	ns
	Tratamiento	3	34.72	178.55 (71.2%)	0.0007
Seed-set	Trata.*Pob.	3	0.19	1.72	ns
	Trata.*Ind.[Pob.]	69	2.6	2.06 (4.2%)	< 0.0001
	Modelo	99	43.68	24.14 (89.5%)	< 0.0001
	Total	254	48.79		

Tabla 5a.- Valores del modelo log-lineal anidado para la variable de número de frutos producidos por tratamiento en el experimento de gremios de polinizadores en ambas poblaciones de *Agave lechuguilla*. Los análisis (Tab 5b) son diferentes debido a la falta de grados de libertad para aplicar ANOVA split-plot en esta primera variable.

Fuente de variación	de χ^2 (%var.)	DF	P
Población	1.09	1	ns
Individuo[Pob.]	6.51	20	ns
Trata. [Ind.*Pob.]	74.99(69.9%)	22	<0.0001
Total	107.22	87	

Tabla 5b.- Valores de ANOVA anidado para el modelo probado de acuerdo a las variables de número de semillas por fruto y seed-set del experimento de gremios de polinizadores, a partir de N= 244 frutos totales producidos en ambas poblaciones.

Variable	Fuente de variación	de DF	SC	F (% Var.)	P
N° semillas por fruto	Población	1	0.85	4.05	ns
	Individuo[Pob.]	20	1.29	3.77 (7.6%)	< 0.0001
	Tratamiento	3	10.05	16.87 (58.9%)	0.017
	Trata.*Pob.	3	0.49	10.11 (2.9%)	< 0.0001
	Trata.*Ind. [Pob.]	60	1.03	4.51 (6%)	< 0.0001
	Modelo	87	16.46	49.68 (96.5%)	< 0.0001
	Total	243	17.05		
Seed-set	Población	1	0.16	1.6	ns
	Individuo[Pob.]	20	0.95	2.31(3.6%)	0.0065
	Tratamiento	3	19.18	85.25(73%)	0.0021
	Trata.*Pob.	3	0.23	3.88(0.88%)	0.013
	Trata.*Ind.[Pob.]	60	1.23	5.01 (4.7%)	< 0.0001
	Modelo	87	25.63	72.34 (97.6%)	< 0.0001
	Total	243	26.26		

Tabla 6 .- Frecuencias alélicas (\pm SE) para cada locus en ambas poblaciones.

locus	alelos	Pachuca	Mapimí
PGI1	1	0.331 (0.026)	0.318 (0.040)
	2	0.669 (0.026)	0.682 (0.040)
PGI2	1	0.538 (0.010)	0.508 (0.034)
	2	0.446 (0.012)	0.441 (0.031)
	3	0.016 (0.007)	0.051 (0.030)
DIA1	1	0.360 (0.027)	0.347 (0.066)
	2	0.640 (0.027)	0.653 (0.066)
DIA2	1	0.486 (0.026)	0.514 (0.043)
	2	0.514 (0.026)	0.486 (0.043)
LAP	1	0.278 (0.023)	0.094 (0.033)
	2	0.650 (0.027)	0.891 (0.032)
	3	0.071 (0.020)	0.015 (0.008)
GOT	1	0.274 (0.024)	0.088 (0.036)
	2	0.416 (0.022)	0.395 (0.056)
	3	0.310 (0.023)	0.517 (0.051)

Tabla 7.- Promedio (\pm SE) de las tasas de entrecruzamiento de ambas poblaciones Obtenidas por electroforesis a partir de 20 madres por población y 16 hijos por madre.

t_m = tasa multiloci, t_s = tasa por locus.

	Pachuca	Mapimí
t_m	0.972 (0.025)	0.600 (0.055)
t_s	0.983 (0.032)	0.491 (0.061)
$t_m - t_s$	-0.011 (0.025)	0.109 (0.024)

Tabla 8.- ANOVA anidado para la altura de las plántulas (N=200) a los 30 días de la germinación y el peso semillas (N=400) para ambas poblaciones de *Agave lechuguilla*.

Variable	Fuente de variación	de	DF	SC	F (% Var.)	P
Altura Plántulas	Población		1	14.96	41.88 (51.8%)	< 0.0001
	Familia [Pob.]		38	13.57	158.1 (46.9%)	< 0.0001
	Modelo		39	28.53	323.86 (98.7%)	< 0.0001
	Total		199	28.89		
Peso Semillas	Población		1	15.64	1.01	ns
	Familia [Pob.]		38	588.14	10.23 (51.2%)	< 0.0001
	Modelo		39	603.78	10.23 (52.6%)	< 0.0001
	Total		399	1148.25		

Tabla 9.- Valores del índice de depresión por endogamia por familia ($\delta \pm SE$) para ambas poblaciones de *Agave lechuguilla* de acuerdo a los atributos de la adecuación presentados.

Atributo	δ Pachuca (SE)	δ Mapimí (SE)	Pachuca C.I. 95%	Mapimí C.I. 95%
Fruit-set	0.813 (0.06)	0.805 (0.08)	0.62- 0.99	0.68-0.95
Semillas por fruto	0.849 (0.03)	0.962 (0.02)	0.79-0.91*	0.92-1.00 *
Seed-set	0.799 (0.04)	0.889 (0.05)	0.72-0.88	0.79-0.99

*p<0.05

Fig. 1

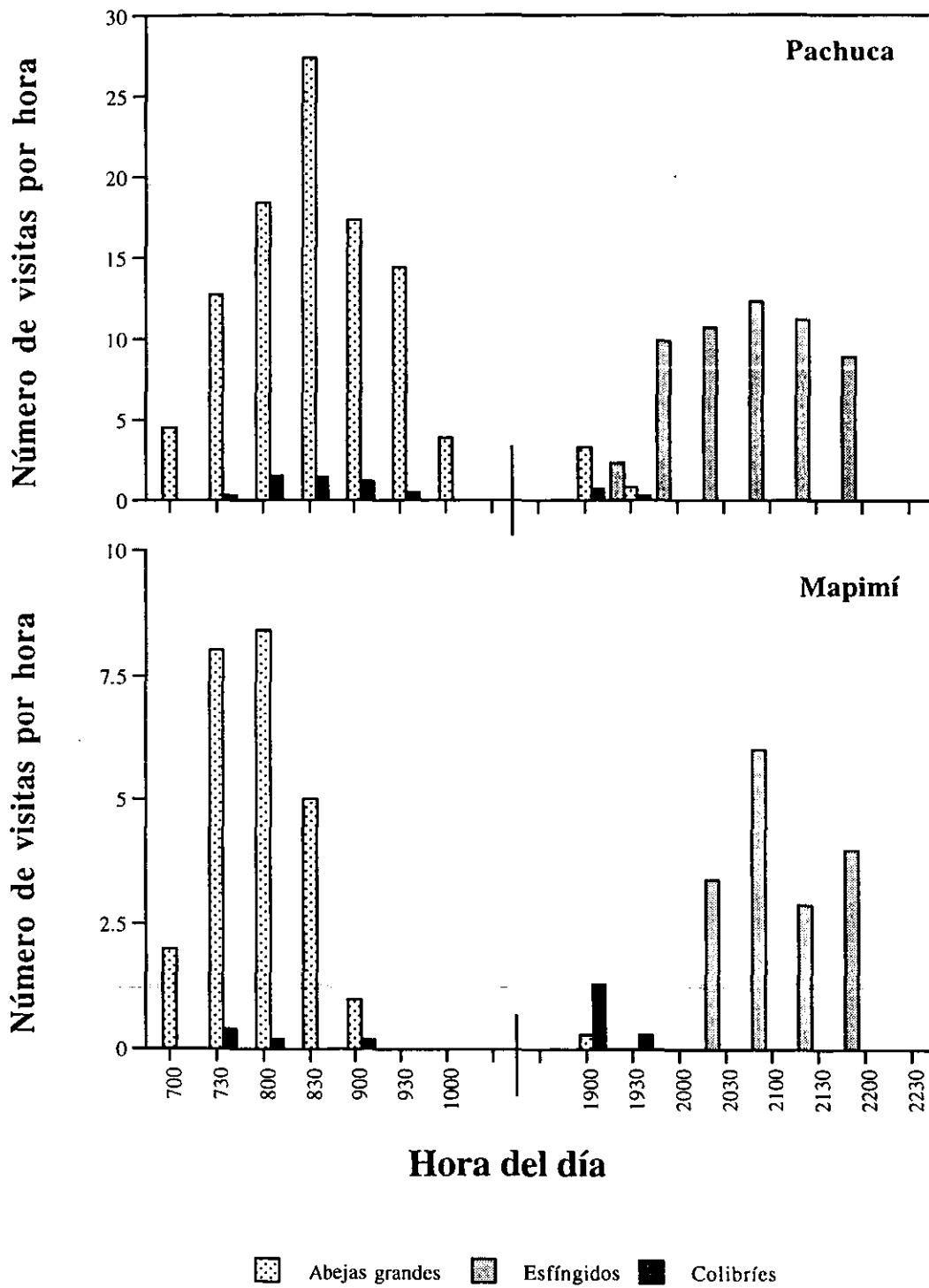


Fig. 2

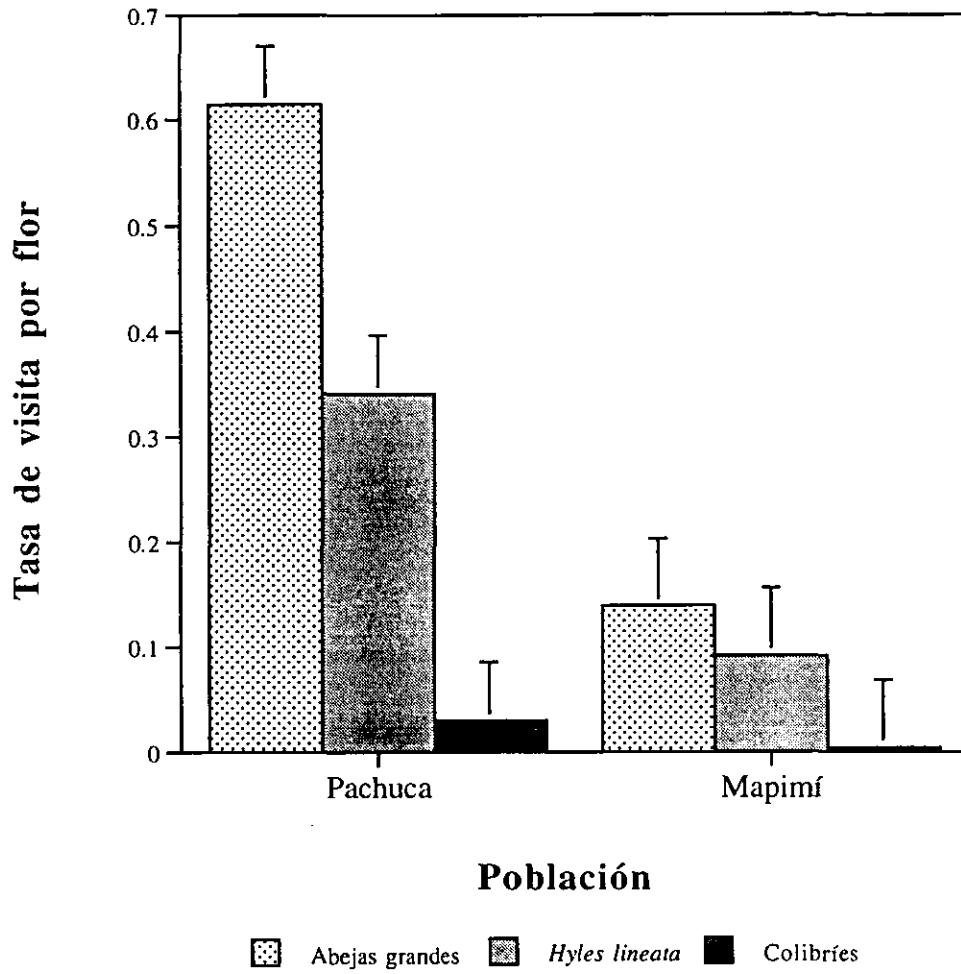


Fig. 3

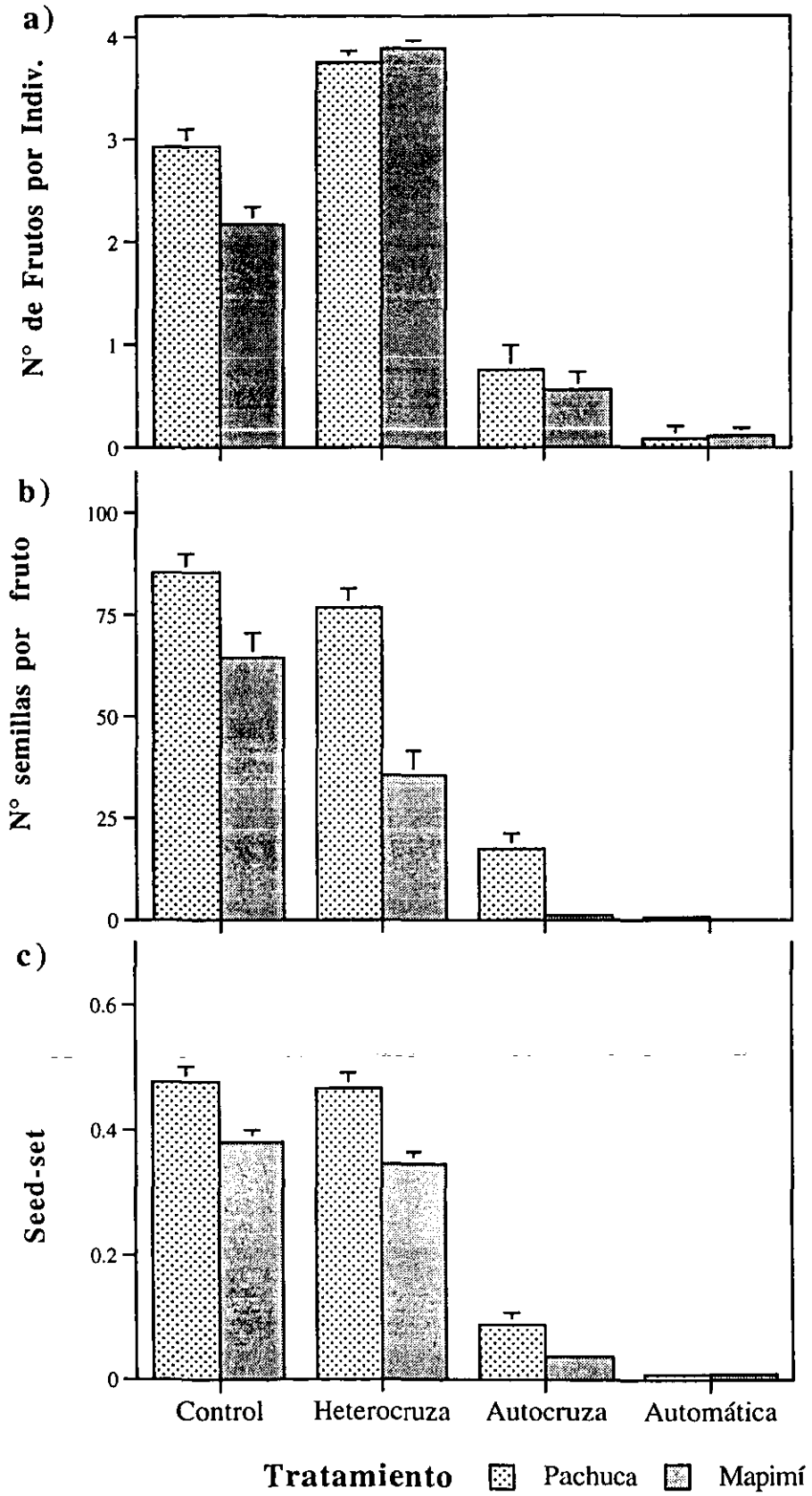


Fig. 4

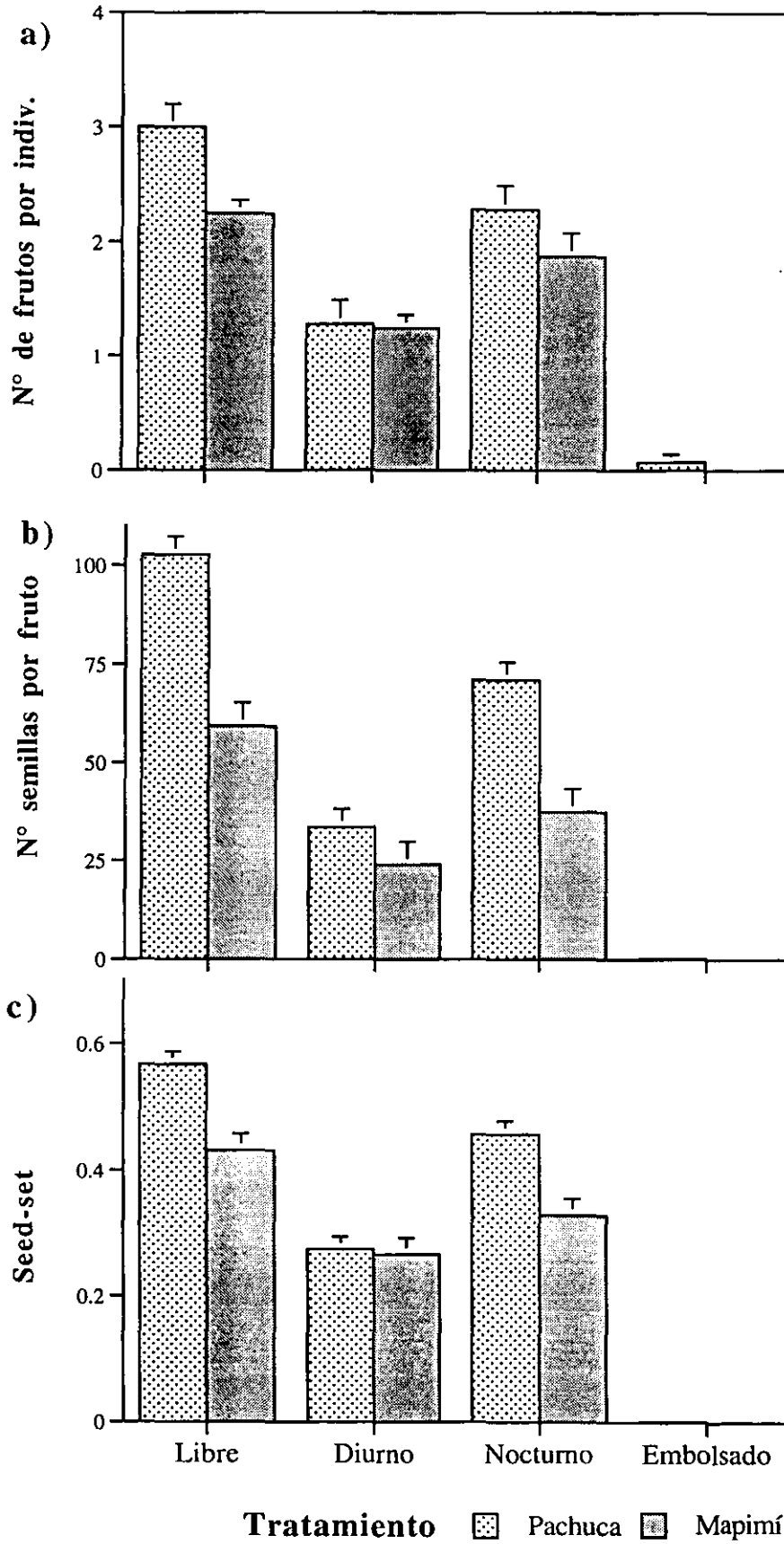


Fig. 5

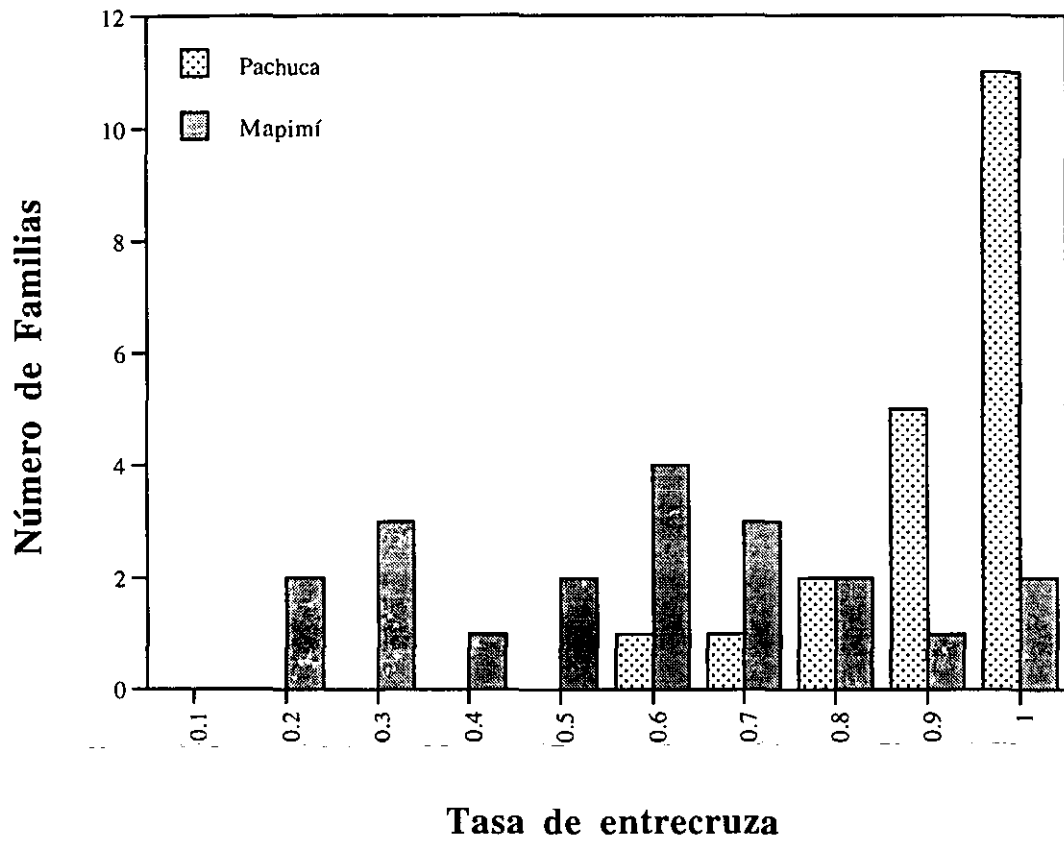


Fig. 6

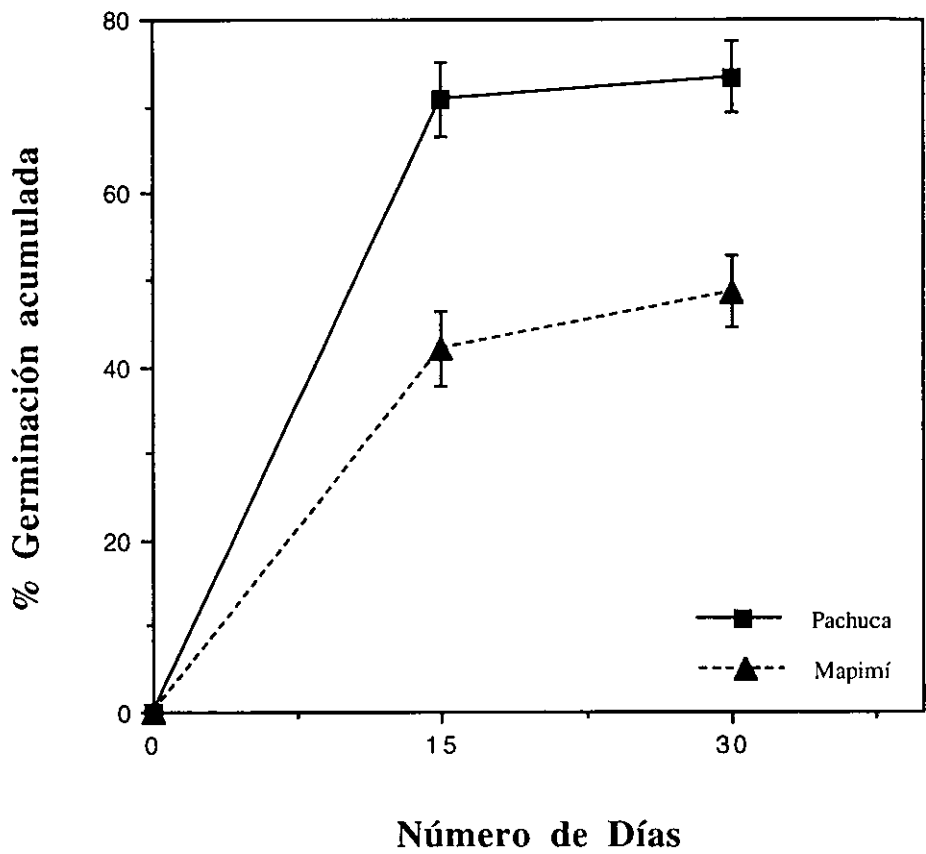
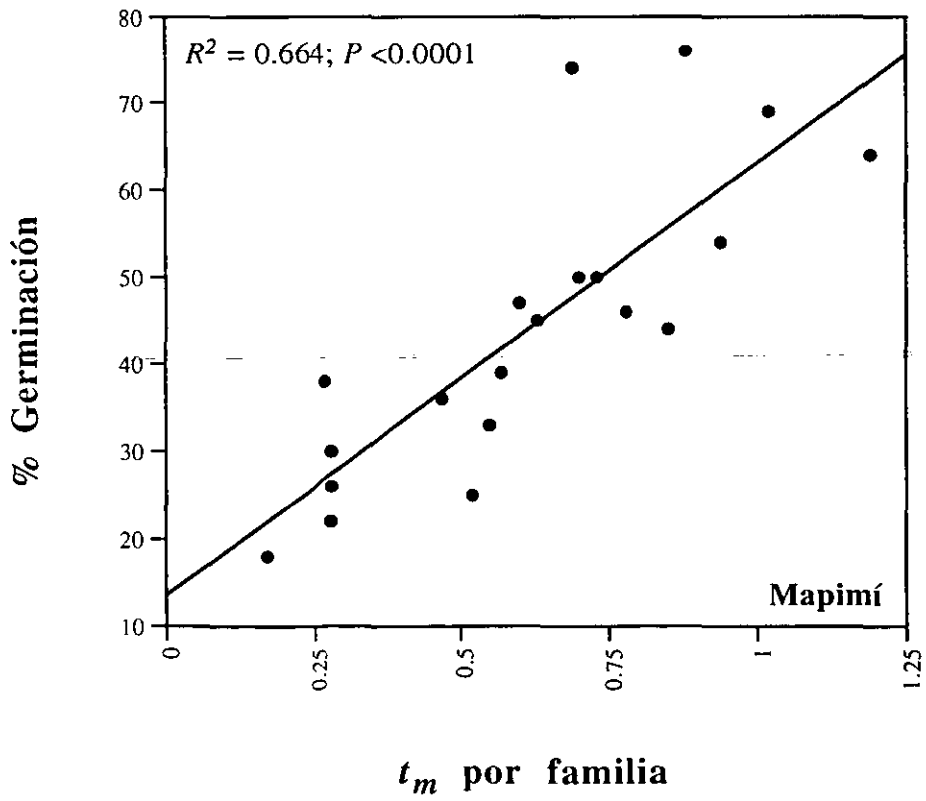
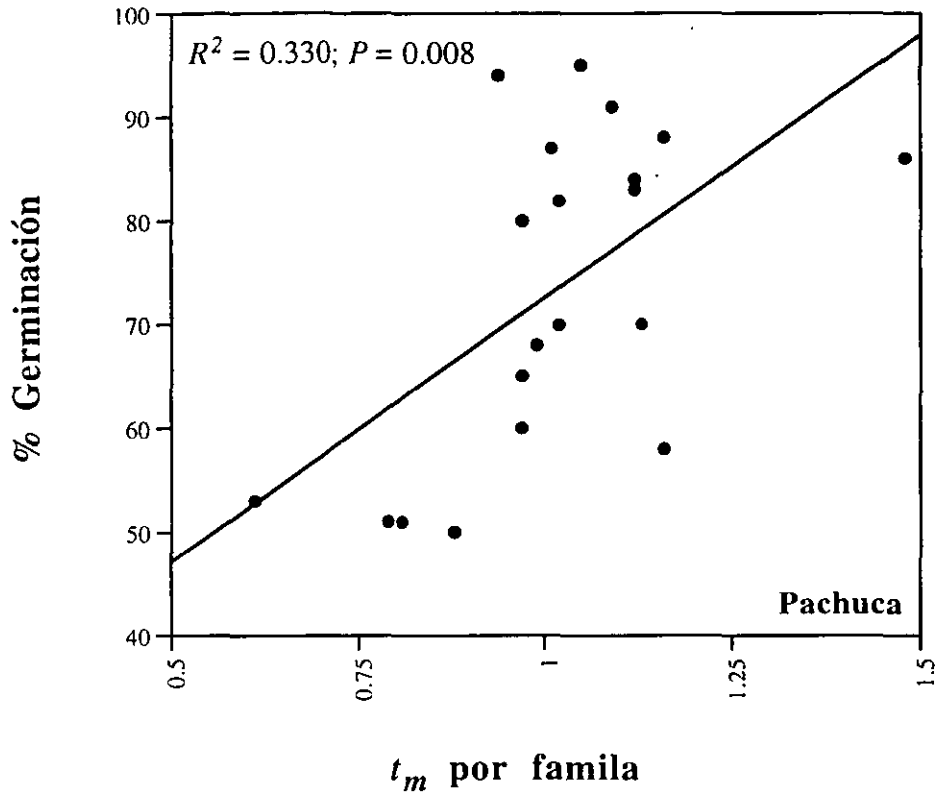


Fig. 7



DISCUSION GENERAL

Variación floral y fuerzas evolutivas.- El presente estudio demuestra un patrón claro de diferenciación geográfica clinal a lo largo de la distribución de *Agave lechuguilla* respecto de la morfometría general de las rosetas, el tamaño, forma y color de las flores y la fecundidad de la especie. También encontramos diferencias significativas de estos caracteres entre las poblaciones, sugiriendo adaptación local en un contexto de diferenciación geográfica. Además, en la mayoría de los caracteres encontramos que una parte importante de la variación se debía a diferencias entre individuos dentro de las poblaciones, indicando diferencias genéticas entre ellos y la posibilidad de que la selección natural actúe en cada población.

La exposición nocturna de néctar y polen (Cadaval, 1999), la forma general de las flores y el color glauco de las flores sureñas, deberían indicar que el polinizador coadaptado es un animal nocturno, murciélago o esfíngido. Tradicionalmente el género *Agave* está asociado a la polinización por murciélago (Arizaga et al, 2000a,b), pero los esfíngidos y otros animales también son polinizadores importantes (Eguiarte, Souza and Silva-Montellano, 2000). Además las flores polinizadas por esfíngidos son similares a las de murciélago, sólo que más pequeñas y con menos recursos (Baum, 1995). Sin embargo, es sorprendente la ausencia de visitas de murciélagos nectarívoros en todo el rango de distribución de *A. lechuguilla*. Esta observación fue confirmada durante las observaciones efectuadas en dos poblaciones contrastantes (capítulo3). A este respecto, ha sido sugerida la disminución en las poblaciones de *Leptonycteris nivalis* (Eguiarte and Búrquez, 1988), además de que son especies raras en el desierto Chihuahuense comparado con el Sonorense, presentan hábitos migratorios y conductas de forrajeo que los convierten en polinizadores poco predecibles en el desierto Chihuahuense (Howell, 1979; Cockrum, 1991).

En general la frecuencia de visitas de polinizadores tiende a disminuir hacia las poblaciones norteñas. Las abejas son los visitantes más comunes en las flores de *A. lechuguilla*, aunque los esfíngidos (*Hyles lineata*) son los polinizadores más abundantes en tres de las poblaciones del transecto. Las abejas grandes, en este caso *Xylocopa californica* y *Bombus pennsylvanicus* parecen ser polinizadores efectivos. A lo largo del

transecto las frecuencias de visita de las abejas grandes resulta mayor en el sur. Datos de las poblaciones experimentales (capítulo 3) confirman que los polinizadores nocturnos son los más importantes en la eficiencia de la polinización, sin embargo a pesar de la mayor cantidad de visitas de abejas grandes en el sur, estos polinizadores diurnos son más eficientes al norte con respecto a su contrapartida sureña, llegando a ser igual de importantes que los nocturnos en Mapimí. Esto sugiere que *X. californica* podría ser un polinizador más efectivo que *B. pennsylvanicus*, dado su comportamiento al visitar las flores.

Todos estos resultados coinciden con las observaciones interespecíficas de Schaffer y Schaffer (1977) y de Freeman et al. (1983) sobre la evolución de la morfología floral y el néctar adaptado a la polinización por abejas en ciertas especies norteadas de *Agave* (Arizona). Este cambio interespecífico es lo que encontramos en las poblaciones de *A. lechuguilla* pero a un nivel intraespecífico. Dos preguntas críticas se plantean: ¿Por qué las poblaciones del sur mantienen el síndrome quiropterófilo, si éstos no están presentes? y ¿Por qué las flores, aun las más norteadas, mantienen la producción de polen y néctar en la noche? La respuesta inmediata podría ser la suma de las restricciones filogenéticas, pero de hecho las poblaciones del norte presentan morfología floral diferente, indicando que ciertos caracteres pueden cambiar. Esto puede ser explicado en dos escenarios diferentes: 1) tal vez las presiones de selección en el sur son menos fuertes; 2) probablemente las poblaciones norteadas han tenido más tiempo para adaptarse debido a que las poblaciones de murciélagos han desaparecido hace más tiempo, o el flujo génico en las poblaciones sureñas ha eclipsado la eficiencia de la selección natural. En cambio, para la segunda pregunta creemos que está mejor canalizada hacia las restricciones filogenéticas, dado que todas las especies de *Agave* y *Manfreda* que han sido estudiadas presentan el mismo patrón de liberación de polen y néctar (Eguiarte, Souza y Silva-Montellano, 2000) y es probable que estén atadas a su metabolismo CAM, que implica fijación de carbono nocturno, base de los azúcares del néctar.

Los niveles de variación genética en las poblaciones de *A. lechuguilla* son altos, en particular las poblaciones más sureñas. Además nuestros datos indican un claro patrón latitudinal en relación al equilibrio de Hardy-Weinberg. Las poblaciones sureñas tienen un exceso de heterocigos, las centrales están cerca del

equilibrio y las norteñas presentan un exceso de homócigos. Este patrón está de acuerdo con nuestras predicciones basadas en el alto nivel de visitas y alto fruit-set en el sur, mientras que el nivel bajo de visitas en el norte explicaría la baja eficiencia en la producción de frutos y la mayor endogamia. El exceso de individuos heterócigos puede ser generado por diferentes mecanismos (Hedrick, 1983). Está relacionado usualmente a la heterosis, en el sentido de que los individuos más heterócigos son más vigorosos y sobreviven mejor (Linhart et al., 1987). La diferenciación genética entre poblaciones también sigue un patrón latitudinal congruente con la diferenciación morfológica y reproductiva. A pesar de que la diferenciación promedio de todas las poblaciones del transecto es relativamente baja, es interesante notar que las poblaciones del sur son genéticamente muy similares, las centrales son más diferentes mientras que las más norteñas presentan gran diferenciación. Este patrón sugiere altos niveles de flujo génico en las poblaciones sureñas, pudiendo haber evolucionado como una sola gran población panmíctica. Esto es congruente con el gran tamaño de las poblaciones de *A. lechuguilla*, tal vez de varios millones de individuos, y la amplia distribución de estas poblaciones, haciendo posible encontrar a *A. lechuguilla* prácticamente en cualquier parte del desierto Chihuahuense. En estas poblaciones extensas, la selección natural sería muy eficiente al favorecer a los individuos heterócigos. En el norte la situación es la opuesta, estando las poblaciones más aisladas y genéticamente más distantes. Consideramos que este fenómeno puede ser explicado principalmente en base a las diferencias en los polinizadores, que son menos abundantes en la parte norte del transecto, generando altos niveles de endogamia al restringir el movimiento del polen.

Estos patrones han sido confirmados al evaluar directamente la tasa de entrecruzamiento en dos poblaciones contrastantes del transecto (capítulo 3). Las tasas de entrecruzamiento promedio muestran una clara diferencia entre las dos poblaciones, sugiriendo niveles de flujo génico altos para la población sureña e intermedios para la población de Mapimí. Estos resultados también concuerdan con las tasas de visita de los polinizadores y sugerirían que las poblaciones de *A. lechuguilla* del extremo norte podrían estar experimentando procesos evolutivos diferentes a aquellas del sur de su distribución geográfica. La endogamia biparental parece ser en este caso una fuerza evolutiva importante .

Por otra parte, el sistema de cruce de *A. lechuguilla* es predominantemente entrecruzado, lo que está de acuerdo con la protandria de sus flores (Freeman y Ried, 1985). Sin embargo, existe autocompatibilidad, aunque el monto de semillas producidas por autopolinización manual es pequeño y sólo en Pachuca es importante. A este respecto, el índice de depresión por endogamia (δ) calculado es alto (> 0.8), no habiendo diferencias entre ambas poblaciones. A este respecto la teoría predice que, en el equilibrio, las poblaciones con alta entrecruza tendrán niveles de depresión por endogamia altos, en cambio aquellas con autofertilización tendrán niveles de depresión por endogamia bajos, debido a la purga de los alelos recesivos de la población (Charlesworth y Charlesworth, 1987). El caso de *A. lechuguilla*, aunque se ajusta a la predicción, no parece tan simple, ya que la población de Pachuca está fuera del equilibrio de Hardy-Weimberg, con un exceso de heterócigos. De tal manera que la expresión de la autocompatibilidad en la población sureña podría obedecer a presiones diferentes de las fuerzas evolutivas implicadas, selección natural, endogamia etc. en el proceso de estabilización poblacional hacia el equilibrio.

Evolución de caracteres reproductivos y ecológicos en A. lechuguilla.- Para analizar y discutir los patrones encontrados en los distintos capítulos de esta tesis llevamos a cabo una descripción comparativa, usando los caracteres ecológicos, reproductivos y de genética de poblaciones descritos en los capítulos 1 y 2 y en Cadaval (1999), en base a la topología del análisis UPGMA (Capítulo 2). Para ello usamos el programa MacClade ver. 3.0.1 (Maddison y Maddison, 1992), con la opción “mostrar el estado más parsimonioso para cada nodo”. Los valores medios de los caracteres para cada población, se muestran en la tabla B. Consideramos que esta es una buena manera de explorar la evolución de estos caracteres, ya que la posición del grupo externo sugiere que la reconstrucción topológica es adecuada y que el análisis de F_{st} indica una diferenciación genética significativa entre las poblaciones. Para facilitar la comprensión de estos patrones, dividimos los caracteres continuos en categorías discretas siguiendo los análisis estadísticos descritos en cada manuscrito. Presentaremos estos resultados de manera descriptiva sin pretender por el momento entregar una correlación estadística entre los caracteres, particularmente debido a que existe una discusión en la literatura

ecológica actual respecto del análisis comparativo a nivel intraespecífico (Mazer, 1998, Venable et al., 1998), de tal manera que sólo presentaremos una descripción cualitativa.

Si el dendrograma de UPGMA es el adecuado y si la posición de la raíz es verdadera, la especie parece originarse en un lugar árido, y se han adaptado independientemente en dos ramas a un ambiente más mésico: en el linaje que conduce a las poblaciones más sureñas (1 a 3) y el que conduce a la población 4, la próxima población sureña (Fig. B1). Varios de los caracteres morfológicos, tanto de la roseta como florales son paralelos, al menos en parte, a este cambio ambiental. Las plantas más grandes están presentes en el grupo de las poblaciones más sureñas (1 a 3), en el que incluye a las poblaciones 4 y 6, y en el linaje que conduce a la población 9. El número de flores tiene un patrón claro: resulta bajo en algunas poblaciones más norteñas (M, 7 y 10), incrementando en las poblaciones del grupo central (4, 5, 6 y 8), en la población 9 y en las tres poblaciones más (Fig. B1). Esta interpretación adaptativa requiere supuestos acerca de la heredabilidad de estos caracteres y no sólo mera plasticidad fenotípica de acuerdo con la disponibilidad de agua. Las condiciones climáticas del desierto chihuahuense fueron más mésicas que las actuales durante el Pleistoceno y Holoceno temprano (Ortega, 1995), sugiriendo que las posibles explicaciones de estos patrones podrían ser más complicadas.

Las flores de la población 10 son largas (Fig. B2), pero el resto de las poblaciones norteñas tienen flores cortas. El carácter de flores largas ha evolucionado en dos grupos independientes incluidos los de las 6 poblaciones más sureñas (Fig. B2). También la población 10 tiene las flores más anchas. Mientras que la mayoría de las demás son intermedias, las flores estrechas han evolucionado dos veces independientemente, en el grupo de las poblaciones 2 y 3 y en el de población 4 (Fig. B2). Respecto del color de las flores, todas las poblaciones norteñas son rojas, volviéndose glaucas de nuevo en dos grupos independientes, en el que contiene a las poblaciones de 1 a 3 y en el que contiene a las población 4 a 6. (Fig. B2). Los estambres en cambio son rojos en la mayoría de las poblaciones y sólo evolucionaron hacia color glauco en el grupo más sureño (1 a 3, Fig. B2).

El volumen del néctar (apéndice 3) es generalmente bajo, y sólo cambia hacia volúmenes altos en los grupos 1 a 3 y en las poblaciones 4 y 5 (Fig. B3). La concentración de azúcar en el néctar es baja en las poblaciones extremas (población 10 y grupo 1 a 3), es intermedia en la mayoría de las demás, salvo en tres poblaciones 4, 6 y 9, que tienen altas concentraciones de azúcar (Fig. B3).

La frecuencia de visitas es baja en las poblaciones 10 y 7, siendo intermedias en la mayoría de las demás poblaciones, altas en las poblaciones 1 y 4 y bajas en la población 6 (Fig. B3). El fruit-set es en general intermedio, bajo en la población 9, y alto en la población 4 y en el grupo más sureño (1 a 3, Fig. B4). La variación genética es similar en la mayoría, siendo más alta en el grupo 1 a 3 y en la población 9 (Fig. B4). Los índices de fijación son positivamente moderados en la mayoría de las poblaciones, pero son altos y positivos en la población 8 y negativos en el grupo más sureño (1 a 3, Fig. B4).

Si la posición del grupo externo es correcta, esta descripción nos lleva a dos escenarios diferentes: Si las poblaciones norteñas son ancestrales, de plantas pequeñas con flores abiertas y rojas, observamos una tendencia a evolucionar hacia plantas grandes con flores glaucas, grandes y estrechas que producen más néctar aunque diluido en las poblaciones sureñas. En este proceso, las poblaciones se vuelven menos endógamas y aumenta su variación genética. Esto sugiere una adaptación progresiva desde polinización diurna, probablemente abejas grandes, hacia polinización nocturna (esfingidos y murciélagos), con el cambio concomitante en el sistema reproductivo (más entrecruzadas en el sur) y la estructura genética (mayor variación y tamaños efectivos más grandes). En el otro escenario, las condiciones climáticas han cambiado en las poblaciones norteñas, volviéndose más cálido y seco. Esto produce un fuerte decremento en la fauna de polinizadores nocturnos, murciélagos en este caso. De esta manera las poblaciones sureñas mantienen los caracteres ancestrales, de antes de que los cambios climáticos ocurrieran y son mantenidos mediante flujo génico. Por esta vía, las poblaciones norteñas han tenido más tiempo para adaptarse a polinizadores diurnos, con el cambio consecuente de mayor endogamia y diferenciación genética entre ellas. La idea general de que el síndrome de polinización común para *Agave* es el quiropterófilo avala este segundo punto (Schaffer y Schaffer, 1977; Howell y Roth, 1981, Arizaga et al. 2000 a, b). Sin embargo, se necesitan experimentos más

detallados y observaciones de campo para aclarar estas interpretaciones, paralelamente con evolución molecular y análisis de genética de poblaciones del grupo Marginateae en las especies del género *Agave*. En todo caso una filogenia con caracteres moleculares independientes, de las poblaciones de *A. lechuguilla* podría aclarar el origen de la especie.

Conclusión.- A pesar de que esta breve descripción indica como cambian varios caracteres de manera similar en dos grupos evolutivos diferentes que contienen a las poblaciones más sureñas, la mayoría de los cambios, tanto en caracteres ecológicos como morfológicos, han evolucionado en diferentes poblaciones y condiciones. Cada población, con la posible excepción de las tres más sureñas, ha evolucionado de manera particular, con características ecológicas y genéticas diferentes. Este patrón geográfico nos lleva hacia las ideas sugeridas por Thompson (1997), respecto de su modelo de mosaico geográfico de evolución, que está claramente relacionado con el modelo de “shifting balance” propuesto por Sewall Wright: las especies son colecciones de poblaciones diferentes bajo procesos evolutivos similares pero distintos para cada población. En algunas de ellas la selección natural parece más importante, en otras la endogamia es aparentemente mayor. Aun así, las poblaciones están conectadas por flujo génico que permite dispersar adaptaciones efectivas a través de las poblaciones, incluso si estas no representan el óptimo para los visitantes florales en un momento dado. Este estudio subraya la necesidad de coordinar los estudios de ecología reproductiva en varias poblaciones paralelamente con análisis genéticos. Los análisis sobre poblaciones únicas sólo pueden indicar aspectos muy parciales de las ideas en ecología y evolución de las especies.

LITERATURA CITADA

(Sólo introducción y discusión generales)

- Arita, H. 1991. Spatial segregation in long-nosed bat, *Leptonycteris nivalis* and *Leptonycteris curasoae*, in Mexico. *Journal of Mammalogy* 72: 706-714.
- Arizaga, S., E. Ezcurra, E. Peters, F. Ramirez de Arellano, and E. Vega. 2000a. Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a mexican tropical desert. I. Floral biology and pollination mechanisms. *American Journal of Botany* 87: 1004-1010.
- _____, S., E. Ezcurra, E. Peters, F. Ramirez de Arellano, and E. Vega. 2000b. Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a mexican tropical desert. II. The role of pollinators. *American Journal of Botany* 87: 1011-1017.
- Ayala, R., T. Griswold, and H. Bullock. 1993. The native bees of Mexico. In, T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot and J. Fa (eds.), *Biological diversity of Mexico*. 179-228 Oxford University Press, Oxford.
- Baker, H.G. and Baker, I. 1983. Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: *Handbook of Experimental Pollination Biology*. Eds. Jones, E. and Little, J. Scientific and Academic Editions. New York.
- Baum, D. 1995. The comparative pollination and floral biology of baobabs (*Adansonia*-Bombacaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 322-348.
- Bawa, K.. 1990. Plant-Pollinator interactions in tropical rain forest. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 399-422.
- Bruneau, A. 1997. Evolution and homology of bird pollination syndromes in *Erythrina* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 84: 54-71.
- Cockrum, L. 1991. Seasonal distribution of northwestern populations of the long-nosed bats *Leptonycteris sanborni* (Phyllostomatidae). *Anales del Instituto de Biología, UNAM. Sección Zoología* 62: 181-202.
- Cadaval, A. 1999. Estudio evolutivo de los azúcares del néctar de *Agave lechuguilla* en el desierto de Chihuahua. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Charlesworth, D, and B. Charlesworth. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual review of Ecology and Systematics*. 18: 237-268.
- Eguiarte, L, and A. Búrquez. 1988. Reducción en la fecundidad de *Manfreda Brachystachya*, (Cav.) Rose, una agavácea polinizada por murciélagos: los riesgos de la especialización en la polinización. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 48: 147-149.
- _____, V. Souza, and A. Silva-Montellano. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: Filogenia, ecología evolutiva de la reproducción y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 66: 131-150.
- Faegri, K., and L. van der Pijl. 1971. *The principles of pollination ecology*. 2nd ed. Pergamon Press, Oxford.
- _____, and _____. 1979. *The principles of pollination ecology*. 3rd ed. Pergamon Press, Oxford.
- Fleming, T., R. Nuñez, and L. da Silveira. 1993. Seasonal changes in the diets of migrant and non-migrant nectarivorous bats as revealed by carbon stable isotope analysis. *Oecologia* 94: 72-75.
- Freeman, E. and W. Ried. 1985. Aspects of the reproductive biology of *Agave lechuguilla* (Torr). *Desert Plants* 7: 75-80.
- _____, E., W. Ried, J. Becvar, and R. Scogin. 1983. Nectar sugar composition in some species of *Agave* (Agavaceae). *Madroño* 30: 153-158.
- Gentry, H. 1982. *Agaves of continental North America*. University of Arizona Press. Tucson.
- Gould, S. and, E. Vbra. 1982. Exaptation-a missing term in the science of form. *Paleobiology* 8: 4-15.

- Groman, J. D. and O. Pellmyr. 1999. The pollination biology of *Manfreda virginica* (Agavaceae): relative contribution of diurnal and nocturnal visitors. *Oikos* 87: 373-381.
- Hamrick, J. L. and M. Godt. 1989. Allozyme diversity in plant species. In A. Brown, M. Clegg, A. Kahler and B. Weir [eds.]. Plant population genetics, breeding and genetic resources, 43-63. Sinauer press. Sunderland. Mass.
- Handel, S. 1983. Pollination ecology, plant population structure, and gene flow. In L. Real [ed.]. Pollination Biology, 163-211. Academic Press. Orlando.
- Herrera, C. 1996. Floral traits and plant adaptation to insect pollinators: a devil's advocate approach. In D., Lloyd and S. Barret (eds.) Floral Biology: Studies in floral evolution of animal-pollinated plants. 65-87. Chapman and Hall, New York.
- Hedrick, P.W. 1983. Genetics of populations. Science Books Int.. Boston
- Howell, D.J. 1979. Flock foraging in nectar-feeding bats: Advantages to the bats and the host plants. *American Naturalist* 144: 23-49.
- _____, and, B. Roth. 1981. Sexual reproduction in agaves: the benefits of bats; the cost of semelparous advertising. *Ecology* 62: 1-7.
- Johnsgard, P. 1993. The Humingbirds of North America. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Linhart, Y.B., J. B. Mitton, K. B. Sturgeon and M.L. Davis. 1981. Genetic variation in space and time in a population of Ponderosa pine. *Heredity* 46: 407-426.
- Maddison, W. P., and D. R. Maddison. 1992. MacClade 3.01. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland. Mass.
- Martinez del Rio, C. and L. Eguiarte, 1987. Bird visitation to *Agave salmiana*: comparisons among hummingbirds and perching birds. *The Condor* 89: 357-363.
- Mazer, S. 1998. Alternative approaches to the analysis of comparative data: compare and contrast. *American Journal of Botany* 85: 1194-1199
- Nobel, P. 1988. Environmental biology of agaves and cacti. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Ortega, J. R. 1995. Los Paleoambientes holocénicos de la laguna de Babícora, Chihuahua, México. *Geofísica Internacional* 34: 107-116.
- Pellmyr, O., and J. Thompson. 1996. Sources of variation in a pollinator contribution within a guild: the effects of plant and pollinators factors. *Oecologia*. 107: 595-604.
- Proctor, M., and P. Yeo. 1973. The pollination of flowers. Collins, London.
- Regal, P. 1977. Ecology and evolution of flowering plant dominance. *Science* 196: 622-629.
- Schaffer, W., and V. Schaffer. 1977. The reproductive biology of Agavaceae I: pollen and nectar production in four Arizona agaves. *The Southwestern Naturalist*. 22: 157-168.
- Schoen, D. 1982a. The breeding system of *Gilia achilleifolia*: Variation in floral characteristics and outcrossing rate. *Evolution* 36: 352-360.
- _____. 1982b. Genetic variation and the breeding system of *Gilia achilleifolia*. *Evolution* 36:361-370.
- Slauson, L. A. 2000. Pollination biology of two chiropterophilous agaves in Arizona. *American Journal of Botany* 87: 825-836.
- Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. In: L. Real [ed.], Ecological Genetics, 4-17. Princeton University Press. New Jersey.
- Tiffney, B. and S. Mazer 1995. Angiosperms growth habit, dispersal and diversification reconsidered. *Evolutionary Ecology* 9: 93-117.
- Thompson, J. 1997. Evaluating the dynamics of coevolution among geographically structured populations. *Ecology* 78: 1619-1623.

- _____, and O. Pellmyr. 1992. Mutualism with pollinating seed parasites amid co-pollinators: constraints on specialization. *Ecology* 73: 1780-1791.
- Temeles, E. 1996. A new dimension to hummingbird-flower relationship. *Oecologia* 105: 517-523.
- Treme, A.M., A. Coddington and K. Paige. 1995. Field and genetic studies testing optimal outcrossing in *Agave schottii*, a long-lived clonal plant. *Oecologia* 104: 93-100.
- Venable, D. L., E. Dyreson, D. Piñero, and J. X. Becerra. 1998. Seed morphometrics and adaptative geographic differentiation. *Evolution* 52: 344-354.
- Wilson, D.E., R. Medellín, D. V. Lanning, and H. Arita. 1985. Los murciélagos del noreste de México, con una lista de especies. *Acta Zoológica Mexicana* 8: 1-26.
- Waser, N. M., L. Chittka, M. V. Price, N. M. Williams, and J. Ollerton. 1996. Generalizations in pollination systems, and why it matters. *Ecology* 77: 1043-1060.

PIES DE FIGURA

Figura B.- Dendrogramas comparativos basados en la topología del análisis fenético UPGMA (Capítulo 2) para las poblaciones de *Agave lechuguilla* a lo largo del transecto latitudinal. Los caracteres fueron la distribuidos mediante el programa MacClade (Maddison y Maddison, 1992). 1) Condiciones climáticas, tamaño de las plantas y número de flores; 2) Tamaño y color de las flores; 3) Concentración y volumen del néctar y tasa de visita de polinizadores; 4) Fecundidad, índices de fijación y variabilidad genética.

Tabla B.- Medias de los valores de los caracteres ecológicos y reproductivos de cada población *Agave lechuguilla* en el transecto latitudinal

Población	1	2	3	4	5	6	M	7	8	9	10
Índice de Lang	27	21	21	23	16	12	12	17	16	11	12
Número of flores	600	420	410	300	220	230	150	160	220	230	140
Volumen de Roseta (L)	95	110	85	70	45	75	40	40	45	60	45
Largo de la flor (mm)	65	64	65	58	59	52	----	42	44	46	58
Diámetro de la Corola (mm)	19	13	15	15	18	22	----	21	21	20	28
% Tepalos rojos	20	15	13	28	29	46	----	80	92	72	77
% Filamentos rojos	60	75	58	80	76	92	----	91	94	94	95
Frecuencia de visita por flor	0.48	0.31	----	0.43	0.32	0.18	----	0.13	0.17	0.16	0.13
Volumen del néctar (mL)	120	160	170	190	110	60	----	55	----	50	65
Conc. del néctar (gr/mL)	19	10	14	18	29	42	----	26	----	55	16
Fruit -set	55	56	60	50	40	41	45	34	35	23	35
He	0.455	0.449	0.457	0.38	0.378	0.346	0.334	0.33	0.381	0.437	0.397
F	-0.22	-0.18	-0.14	0.11	0.11	0.29	0.18	0.21	0.55	0.29	0.3

Fig. B

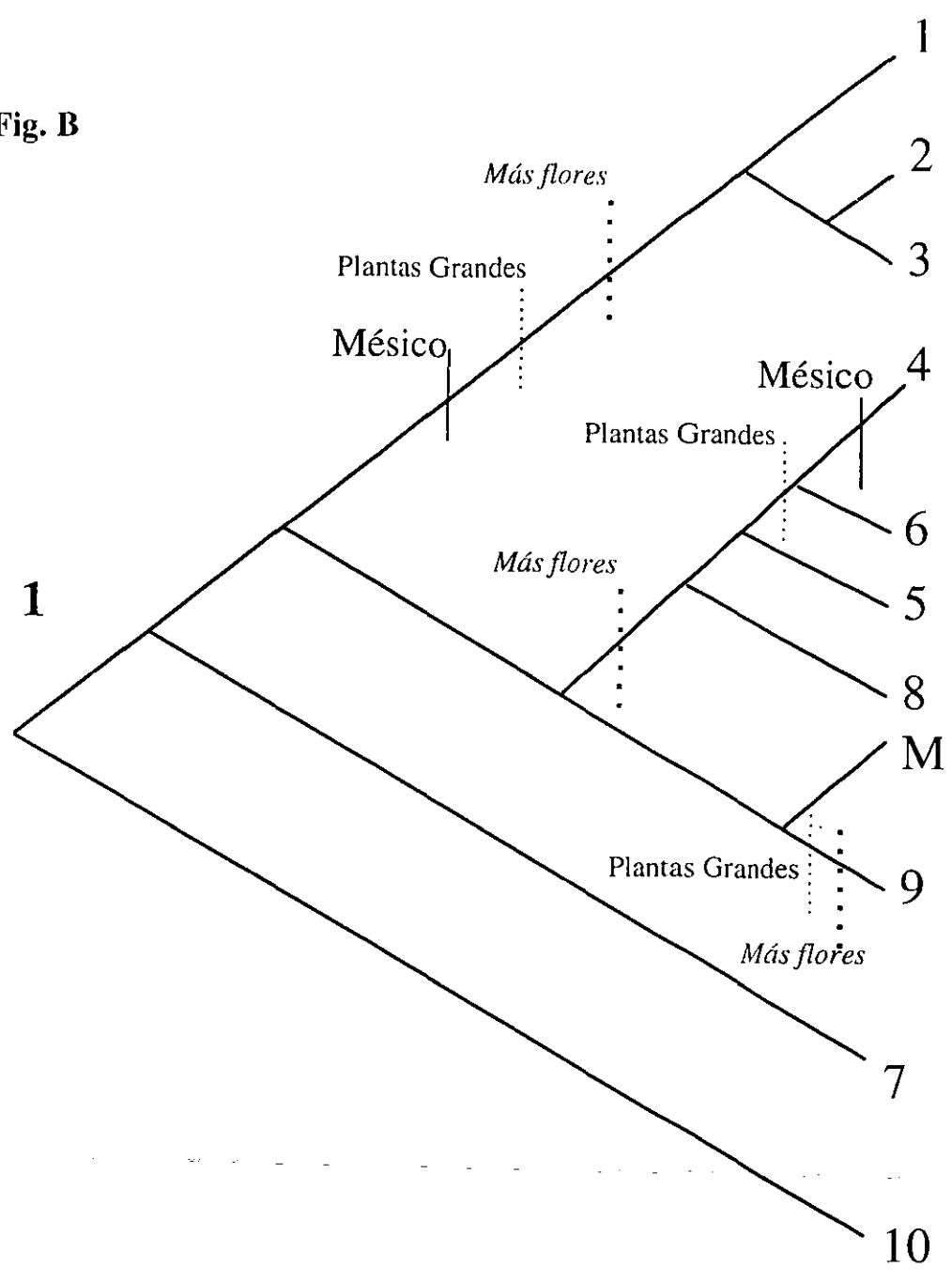


Fig. B

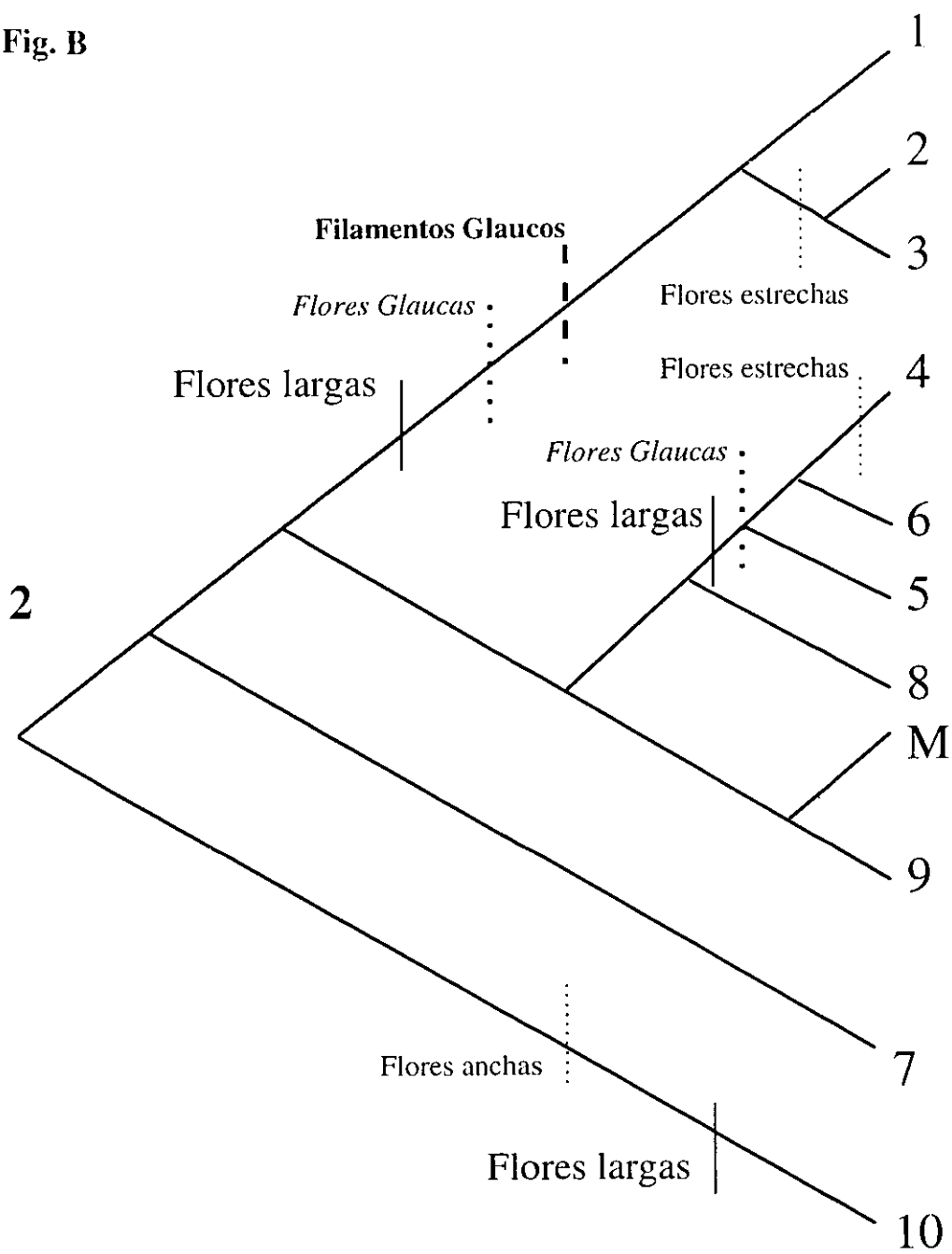
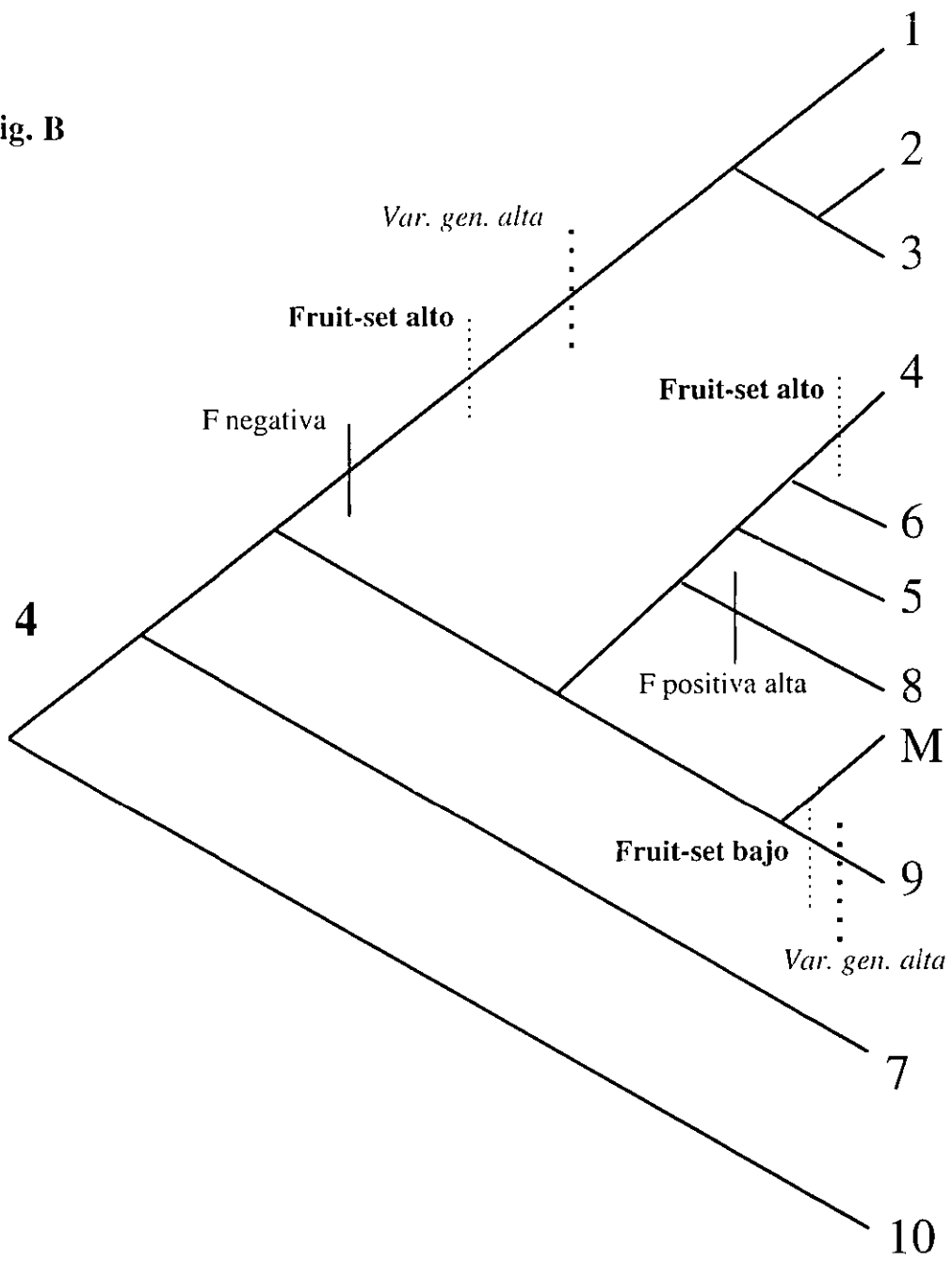


Fig. B



Apéndice 1.- Frecuencias alélicas para las poblaciones de *A. lechuguilla* en el transecto latitudnal. (N = Número de individuos por locus)

Población

Locus	1	2	3	4	5	6	M	7	8	9	10
PGI-1											
(N)	35	41	38	39	40	40	39	35	38	37	34
1	.329	.183	.303	.218	.338	.175	.372	.114	.158	.324	.471
2	.671	.817	.697	.782	.538	.825	.628	.886	.816	.649	.529
3	.000	.000	.000	.000	.125	.000	.000	.000	.026	.027	.000
PGI-2											
(N)	35	41	38	39	40	40	39	36	38	37	34
1	.557	.549	.526	.474	.512	.512	.474	.611	.368	.527	.721
2	.429	.390	.474	.513	.225	.463	.513	.361	.500	.297	.279
3	.014	.061	.000	.013	.262	.025	.013	.028	.132	.176	.000
GOT-1											
(N)	32	40	39	40	41	40	39	33	33	35	26
1	.156	.112	.128	.112	.061	.013	.000	.000	.045	.114	.000
2	.484	.538	.551	.400	.256	.475	.205	.182	.485	.429	.308
3	.359	.350	.321	.488	.634	.512	.795	.818	.455	.429	.692
4	.000	.000	.000	.000	.049	.000	.000	.000	.015	.029	.000
LAP-1											
(N)	35	39	39	41	41	40	39	35	38	33	28
1	.243	.256	.167	.134	.110	.075	.064	.429	.197	.212	.161
2	.743	.744	.795	.817	.720	.913	.923	.571	.803	.788	.839
3	.014	.000	.038	.049	.171	.013	.013	.000	.000	.000	.000
EST-1											
(N)	34	41	39	31	31	32	39	36	25	18	27
1	.838	.817	.718	.774	.935	.859	.795	.986	.880	.667	.648
2	.118	.171	.218	.129	.065	.141	.205	.014	.120	.333	.093
3	.044	.012	.064	.097	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.259
DIA-1											
(N)	35	40	39	40	41	40	38	35	37	34	31
1	.329	.587	.590	.188	.024	.125	.224	.357	.270	.132	.306
2	.671	.412	.410	.813	.976	.875	.776	.614	.730	.868	.694
3	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.029	.000	.000	.000
DIA-2											
(N)	33	40	39	40	41	40	39	35	37	37	34
1	.379	.575	.590	.775	.780	.600	.564	.200	.676	.514	.250
2	.561	.425	.410	.225	.220	.400	.436	.800	.324	.486	.750
3	.061	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
ME-1											
(N)	34	40	39	41	41	40	38	37	38	22	33
1	.662	.488	.564	.293	.622	.600	.118	.581	.658	.409	.394
2	.338	.512	.436	.707	.378	.400	.882	.419	.342	.591	.606
PGM-1											
(N)	34	40	37	36	37	38	37	37	35	28	33
1	.382	.425	.378	.250	.176	.158	.014	.068	.014	.143	.455
2	.618	.575	.622	.750	.824	.842	.986	.932	.986	.857	.545

Población

Locus	1	2	3	4	5	6	14	7	8	9	10
PGM-2											
(N)	34	40	37	35	37	38	35	37	33	24	33
1	.338	.313	.311	.200	.189	.211	.100	.311	.364	.146	.606
2	.662	.688	.689	.800	.811	.789	.900	.689	.636	.854	.394
ACPH-1											
(N)	27	41	39	41	41	40	39	37	38	37	29
1	.111	.183	.128	.110	.134	.050	.154	.041	.066	.257	.017
2	.815	.817	.859	.890	.866	.950	.846	.959	.934	.689	.983
3	.074	.000	.013	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
4	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.054	.000
APX-1											
(N)	34	41	37	40	40	39	37	35	35	37	34
1	.676	.585	.581	.775	.725	.718	.486	.743	.471	.473	.309
2	.324	.415	.419	.225	.275	.282	.514	.257	.529	.527	.691
CPX-1											
(N)	33	40	37	40	35	35	37	32	35	34	34
1	.515	.563	.500	.675	.614	.686	.514	.719	.443	.647	.162
2	.485	.438	.500	.325	.386	.314	.486	.281	.557	.353	.838

Apéndice 2.- Recetas de tinción de enzimas y buffres de corrida y extracción.

SISTEMA #8 LiOH (Soltis et al.,1983)

Buffer del Gel. (pH 7.6)

0.042 M Tris (T-1378)	5.04gr
0.007 M Ac. Cítrico (monhdr) (anhydr. 1.35 gr.)	1.47gr
0.004 M LiOH	0.16gr
0.025 M Ac. Bórico	1.56gr
H ₂ O destilada (aforar a)	1000ml
Ajustar pH 7.6 con HCl 1M	

Buffer del Electrodo. (pH 8.0)

0.039 M LiOH	1.64gr
0.263 M Ac. Bórico	16.23gr
H ₂ O destilada (aforar a)	1000ml
Se puede ajustar con NaOH ó HCl, no necesariamente.	

GOT (= AAT; Glutamato oxaloacetato transaminasa; E.C. 2.6.1.1. Wyatt, 1989, 1 gel.). Añadir:

0.2 M Tris- HCl pH 7.0	50ml
Sustrato GOT pH 7.0	5ml
Incubar en obsc. a 37°C (sist. Mitton PP)	
Pesar:	
Pyridoxal 5-Phosphate	4mg
Fast Blue BB salt	150mg

ACPH (fosfatasa ácida, Hakim-Elahí, 1976, 1gel) Añadir:

Buffler 1M de Acetato de Sodio (Na Acet.)pH 5.0	4ml
H ₂ O destilada	40ml
MgCl ₂ 1M (10%)	1ml
a-Naphthyl acid phosphate 1%....2ml. (Sodium salt)	
Incubar en Obsc. a temperatura ambiente	
Pesar:	
Fast Garnet GBC salt	75mg

ME (Enzima Mállica; E.C.1.1.1.40) (modificada de Soltis et al, 1983) (1 gel) Añadir:

0.2M tris-HCl pH 8.0	40ml
1M DL-malato pH 7.0	5ml
MgCl ₂ 1M (10%)	1ml
TPN (=NADP) 1%	1ml
PMS 1%	1ml
MTT 1%	0.2ml
incubar en obsc. a 30°C	

LAP (leucina aminopeptidasa; E.C.3.4.11.1 Werth, 1985, 1gel) Añadir:

Buffer 0.2M tris-maleato pH 5.2	50ml
L-leucina-b-naftilamida-HCl 2.5 %	1ml
Incubar en Obsc. a 37°C durante 30 min. y posteriormente añadir el Fast Black K Salt ya disuelto. Dejar incubando a la misma T° hasta que aparezcan las bandas.	
Pesar: Fast Black K Salt	100mg
disolver muy bien en 5 ml de agua destilada justo antes de teñir.	

EST (esterasa, Hakim-Elahí, 1976; E.C.3.1.1.1, 1 gel) Añadir:

a-Naphtylacetate 1%	3ml
H ₂ O destilada	40ml
Buffer de fosfatos pH 6.0	3ml
Incubar a T° ambiente por 60 min.	
pesar: Fast Blue RR Salt	75mg

DIA (Diaforasa; E.C1.6.4.3, 1 gel)

Pesar por separado:	
(1) 2,6 Diclorofenol- indofenol	4mg
(2) b- NADH; MTT	12mg; 8mg
(3) Agar	0.36gr
Añadir por separado:	
(1) H ₂ O destilada (justo antes de teñir y disolver muy bien).	4ml
(2) 0.025 M Tris-HCl pH 8.6	20ml
H ₂ O destilada	24ml
calentar hasta que hierva y se disuelva el agar entonces mezclar 1,2,3	

PGI (Fosfoglucoasa isomerasa; E.C.5.3.1.9

Vallejos, 1983, 1 gel) Añadir:

0.1 M Tris-HCl pH 7.5 50ml

Glucosa-6-Fosfato
deshidrogenasa 10u/ml 3mlMgCl₂ 1M 10% 1ml

TPN (=NADP) 1% 1ml

PMS 1% 0.5ml

MTT 1% 1ml

Incubar en Obsc, a temp.amb.

Pesar: D-Fructosa-6-Fosfato, sal disódica
(F3627) 20mg**PGM** (fosfoglucomutasa; E.C.2.7.5.1

Soltis et al.,1983, 1 gel, Pinos)

Añadir:

1M Tris-HCl pH 8.0 5ml

H₂O destilada 40mlMgCl₂ 1M (10%) 1mlGlucosa 6-fosfato
deshidrogenasa (10u/ml) 6ml

TPN (=NADP) 1% 1ml

PMS 1% 0.3ml

MTT 1% (ó NBT) 1ml

Incubar en Obsc. , a T° amb.

pesar: a-D-glucosa-1-fosfato
(Sigma G-1259) 80mg**APX, CPX** (Peroxidasa anódica, catódica, Hakim-
Elahí, 1976).

Añadir:

Dimetilformamida 7ml

H₂O destilada 90ml

Peróxido de Hidrogeno.3% 1ml

Cloruro de Calcio.1% 2ml

1M Acetato de Sodio pH 5.0..5ml

Incubar a osc, T° Amb., Para la catódica
usar rebanada inferior

Pesar: 3-amino-9-ethylcarbazole 100mg

BUFFER DE EXTRACCION

Buffer YO más Buffer VEGII (3:1)

Buffer VEG II

Ac Bórico 0.31gr

NAD (DPN) 0.02gr

Tergitol 17s9 2ml

Suero alb. Bov. 0.1gr

PEG 8000 2gr

Pyridoxal 5-P 0.005gr

PVP 40 7gr

Sacarosa 0.27gr

PVP 360 1gr

Cysteine-HCl 0.19gr

Ac. ascórbico 0.88gr

2-Mercaptoetanol 0.66ml

Aforar a 100 ml con agua destilada ajustar pH a 7.1 con
NaOH**Buffer YO**

Tris-Ac. Cítrico 10ml

1.57gr. T-B. 0.83g Ac. Cit. aforar a

100 ml ajustar pH: 7.0

NADP (TPN) 0.05gr

NAD (DPN) 0.05gr

Ac. Ascórbico 0.018gr

EDTA 0.034gr

Suero alb. Bov. 0.1gr

2-Mercaptoetanol 0.33ml

Geographical patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. II. Nectar sugars, volumes and concentrations¹

Alejandro Cadaval, Arturo Silva-Montellano and Luis E. Eguiarte

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Apartado postal 70-275, C.U. Universidad Nacional Autónoma de México, CP 04510, D.F. México.

¹ Manuscript received _____; revision accepted _____.

This research was supported by project IN211997, Papiit-DGAPA, UNAM and 27983-N, CONACyT, and by Fundación UNAM and DGAPA scholarships to A.C. and A.S.-M., respectively. The manuscript was written during LEE sabbatical at the University of California at Irvine, with support from DGAPA, UNAM and CONACyT scholarships. R. Linding helped in setting the chemical analyses methods, which were done at Dr. Francisco Espinoza laboratory, with his advice, and support given by Dr. Rodolfo Dirzo, both from the Instituto de Ecología, UNAM. We also acknowledge A. Valera, H. Caballero and S. Gómez for helping us during field work. J. Fornoni, G. Delgado, A. Valera, R. Cueva, M.C. Mandujano and J. Golubov helped with statistical analyses, technical help and/or conceptual discussions. V. Souza and J. Golubov read a previous version of the manuscript.

Key words: Adaptation, Agavaceae, *Agave lechuguilla*, Chihuahuan desert, nectar, population differentiation, pollination, hawkmoths, bees, hummingbirds.

Abstract.- Floral nectar has been interpreted as an adaptation to attract floral visitors. The "pollination syndrome" concept describes nectar attributes in relation to specific pollinator type. Differences among populations in the expression of this character, could demonstrate natural selection and the adaptive value to local conditions. Variation patterns in volume, concentration and sugars composition in nectar of *Agave lechuguilla* are described for 9 populations along a latitudinal gradient representing the range of the species in the Chihuahuan desert. We found a latitudinal pattern in the volume and concentration of nectar, being nectar less abundant but more concentrated toward the northern part of the transect. Using a standard HPLC procedure, we found that the principal nectar sugars glucose, fructose and sucrose, also showed variation with latitude. Both hexoses concentrations increased in a similar way towards north. Sucrose also increased with latitude, being the relation between sucrose and hexoses higher in populations of the north-center part of the gradient. This pattern suggests a change in the expression of these traits related with pollination visitation. We discuss our results in an evolutionary context of Thompson's mosaic concept, which involves the response of adaptational traits to the local conditions for each population.

INTRODUCTION

Plant-pollination systems represent classic textbook examples of mutualism and coevolution (Futuyma, 1998). In this context, nectar is interpreted as an adaptation to attract floral visitors (Percival, 1962, 1965; Faegri and Van der Pijl, 1979; Baker, Cruden and Baker, 1971; Baker and Baker, 1983). Both total nectar volume and sugar concentrations have been described to correspond to certain floral visitors (Percival, 1962; 1965; Cruden, Hermann and Peterson, 1983), for this reason are assumed to have been modeled by the interaction with the most efficient visitor, as stated by Stebbins (1970) "most effective pollinator principle". For instance, it has been shown that flowers pollinated by bats usually have dilute nectar (average 19 % sucrose equivalents; Cruden, Hermann and Peterson, 1983) with large volumes (average 140 μ L) and with little proportion of sucrose (sucrose/glucose + fructose, 0.1 to 0.5; Baker and Baker, 1983). Hawkmoth pollinated flowers have less volume (average 32 μ L), similar concentration of sugars (20.3%) but can present sucrose as their main sugar. In contrast, bee flowers usually have very little nectar (average 2.1 μ L) but more concentrated (32.5%; Cruden, Hermann and Peterson, 1983) and the sucrose can be very variable (s/g + f, 0.1 to 0.5; Baker and Baker, 1983). This "syndrome" view of the nectar has been challenged by several authors (Waser, 1983; Feinsinger, 1983; Herrera, 1996) who consider that these interspecific

patterns are suggestive, but only intraspecific studies can help us understand how the floral traits evolved. Herrera (1996), following Gould and Vbra (1982), makes a clear distinction between true adaptive characteristics modeled by the actual pollinators, and exaptations, characteristics that may enhance fitness, but have not evolved as a consequence of the contemporaneous visitors. Recent studies have focused in understanding the nectar at this intraespecific level (Zimmerman, 1983, 1988; Pyke, Day and Wale, 1988; Pyke, 1991; Mitchell, 1993, Mitchell and Waser, 1992; Boose, 1997; Golubov, *et al.* 1999), but most of these studies were made in only one population. We consider that intraspecific studies including several different populations could offer an excellent opportunity to study the evolutionary patterns, of how nectar characteristics may vary in different environments and how these changes correlate with their visitors. This is relevant particularly in relation to the coevolution geographic mosaic hypothesis of Thomson (1994), which states that interactions between species are very variable, and what happens in one location may not be the same in other populations. This idea highlights the relevance of studying plant-animal interactions over large geographic scales, as a way of attempting to understand the adaptation of the different interacting organisms.

For performing such a multi-population analysis in a gradient we selected *Agave lechuguilla* (Torr.). The *Agave* genus is known for its pollination interaction with several animal groups, ranging from bees to bats, encompassing also birds and hawkmoths (Gentry, 1982; Eguiarte y Búrquez, 1988; Martinez del Rio y Eguiarte, 1987; Slauson, 1994; Eguiarte, Souza and Silva-Montellano, 2000). *A. lechuguilla*, of the *Litsea* subgenus (Gentry, 1982) is characterized by its spiked inflorescences, and within this subgenus is the species with the largest distribution, encompassing all the Chihuahuan desert (Briones, 1994). Distribution data for different pollinator groups suggested an interesting pattern of latitudinal variation in pollinators: bats and hummingbirds species are more abundant in the south (Arita and Santos del Prado, 1999; Johnsgard, 1983), while bees species are predominant in the north (Ayala, 1993). In this latitudinal gradient, the flowers of *A. lechuguilla* change in color and shape and visitors change in number, proportion of different groups and visit rate (Chapter 1). Following the described interespecific patterns, we expected clinal variation in nectar characteristics of the flowers in the latitudinal gradient. Our predictions were to find in the south larger

volumes of less concentrated nectar with a low sucrose proportion, appropriate for bats; and the opposite was expected in the north: less nectar, but more concentrated and more sucrose, adequate for bees. In this paper we analyze these hypotheses on nectar production of this latitudinal gradient for *A. lechuguilla*.

MATERIALS AND METHODS

Study species.-*Agave lechuguilla* (Agavaceae, Littaea, Group Marginatae, according to Gentry, 1982) is a very abundant plant, one of the most abundant and widely distributed in the genus, found from the valley of Mexico to Southwest Texas and southeast New Mexico. It is a dominant component of the Chihuahuan desert, in particular in limestone soils (Gentry, 1982; Freeman and Reid, 1985).

From May to September *A. lechuguilla* produces spiked inflorescences with hundreds of flowers (number varies according to the latitude, Chapter 1), which produce nectar and pollen during the night. The flowers are open four to five days, and produce nectar the first three days (Freeman and Reid, 1985). During the first nights after anthesis the flowers produce pollen, and in the following days the flowers stigmas open and are receptive to pollen (Freeman and Reid, 1985; Chapter 1). The nectar of *A. lechuguilla* is formed by fructose, glucose, sucrose and water as in most angiosperms (Freeman, Ried and Becvar, 1983).

Sampling procedures.- Nine populations of *A. lechuguilla* were sampled, separated by approximately one degree of latitude (Fig. A, Table A, population 8 was lost). Field work was done at middle of the flowering season, beginning in the southernmost population, as species follows a latitudinal pattern in its phenology, starting the flowering first in the south and finishing in the north (Gentry, 1982; Chapter 1 and 2). From each population, in an area of close to 2 ha, we randomly chose 15 reproductive individuals. Late in the afternoon (18:00 h) the inflorescences were covered with soft mesh (mesh diameter approximately 0.5 mm), to avoid nectar removal by floral visitors. We removed and quantified the accumulated volume of nectar for 3 flowers per individual at next early morning (05:30 to 07:00 h), using 1 mL syringes with blunted needles. All flowers sampled correspond to those that had opened during that night. We take air temperature data at same

time of sampling as control of nectar evaporation. The samples were labeled and maintained individually in ice followed by liquid nitrogen to avoid nectar degradation, and finally stored in the laboratory at -70°C until processed.

Nectar analyses.- The sugars were analyzed using High Performance Liquid Chromatography (HPLC), employing a modification of method by Freeman, Ried and Becvar (1983). The analyses were done in a Waters chromatographic system, using a Waters 410 refractive index detector, with a silica column of normal phase (Hypersil APS-2 from Chrompack, $5\mu\text{m}$ particle size), with acetonitrile: water (80:20 v/v) as a solvent, at a flow rate of 2.0 mL/min. The samples were previously filtered in membrane acrodiscs (PVDF, Nylon and GH polypropylene with a pore of $0.45\mu\text{m}$, Waters). Standard curves were previously done in order to calibrate the system ($R^2= 0.99$ for each sugar). Quantities of each sugar in the nectar samples were determined by comparison to the calibrations. Injection volumes were 10 to 30 μL .

Statistical analyses.- Data was ln-transformed and analyzed using nested ANOVAs (JMP; SAS, 1995). The general nested model includes a population factor as a reference of latitude and individual factor to test variation inside populations. Temperature data was used as a covariable over volume and total concentration.

RESULTS

We found that the accumulated nectar volume per flower changed along the latitudinal gradient. The northern populations (Fig. 1, Table 1) from population 6 to 10, had less than 100 μL per flower, while in the south they always had more than 100 μL , being population 4 the one with the highest volume (194 μL). The populations were significantly different, and this factor explained most of the variation (Table 2), but there were also significant differences in the individuals inside each population, explaining a substantial amount of total variation (38%).

Total sugar concentration of nectar (considering the three sugars) is shown in Fig. 2. Its behavior is similar to volume. The first 4 populations had low sugar concentrations (< 0.2 gr/mL), while the northern population (with the exception of the northernmost population, 10, see below) had higher concentrations (> 0.25 gr/mL), populations 6 (0.53) and 9 (0.53) had the highest. The ANOVA (Table 1) shows the same pattern as the volume: most of the variance is explained by the differences among populations (71%), but there were differences among individuals inside each population that explain a substantial amount of total variance (29%). Temperature covariable proved to be not significant for both volume and total concentration of sugars.

Nectar volume and concentration were negatively correlated at the population level ($R = -0.396$, $P < 0.0001$), showing that populations with higher nectar volumes usually had less concentrated nectar. However there were exceptions, in particular population 10, which produce little but very diluted nectar. This population is also an outlier in terms of floral morphology and is genetically distinct (Chapters 1 and 2).

In relation to each of the sugars, fructose (Fig. 3) and glucose (Fig. 4) were always more abundant than sucrose (Fig. 5). Fructose and glucose show very similar patterns (Fig. 3 and 4, respectively), although for a given population there was always more glucose than fructose. The southern populations (1 to 4) had little of both sugars (< 0.1 gr/mL), that increases in the northern populations, particularly in 5, 6 and 9 population (0.27 of glucose, 0.24 of fructose). Again, population 10 is atypical, as glucose and fructose return to the levels of those found in southern populations. The ANOVAs (Table 1) showed the same pattern as those for volume and total concentration: most of the variation is explained by differences among populations.

Sucrose (Fig. 5) was about one order of magnitude lower than other two sugars. Most of the variance is explained by differences between individuals inside populations (76%), even though differences among populations were also significant (Table 2). Again, populations 1 to 4 had the lowest concentration (< 0.03 gr/mL) and the higher concentration were found in populations 6 (0.055 gr/mL) and 7 (0.052 gr/mL). Population 9, which had the highest concentrations of the other sugars, now had an intermediate

concentration (0.03gr/mL) and as for the other two sugars, population 10 had the lowest sucrose concentration (<0.01 gr/mL).

Is important to stress that while fructose and glucose had little variation inside populations, variation was very large for sucrose, which is supposed to be the sugar selected against by bat pollinators. This variation is clearly seen in the ternary diagrams (Figs. 6a and b), following Freeman, Ried and Becvar (1983); these diagrams show the percentage of each sugar, not the concentration, and each point represents one individual as the average of the 3 studied flowers. It is important to note for population 2, Zimapán (Fig. 6b) there is clearly less dispersion on data points, particularly in the sucrose component, than for northern population, 7, Jiménez (Fig. 6b) and similar pattern were found in the rest of populations.

DISCUSSION

Given the known distribution of the potential pollinators to *A. lechuguilla*, we predicted flowers with nocturnal (bat-hawkmoth) pollination syndrome in the south, that gradually change in the north to more bee-pollinated characteristics. These predictions were met partially by our results, but the patterns were more complicated than expected. In general terms we found a suggestive pattern. Flowers in the south had more nectar (between 100 and 200 μ L) which is less concentrated (0.1 to 0.2 gr/mL) than the flowers in the north, that had less nectar (54.3 μ L) but was more concentrated (from 0.25 to 0.5 gr/mL). The exception is population 10, Ciudad Juárez, which is atypical not only in its nectar, but also in its floral morphology. This population is isolated from the rest of the large populations of the species in the central Chihuahuan desert, and population genetics data (Chapter 2) indicate that it had the highest genetic distance among all the other populations in the species.

On the other hand, the behavior of each sugar, in particular sucrose, is more complex. Sucrose is generally a minor component of nectar in *A. lechuguilla*, but in some populations, especially in the north, some individuals had very high proportion of this sugar. Sucrose has been considered a critical component that defines the coevolved species of flower pollinators. It is usually found in small proportions in bat

pollinated species, it increases in hawkmoth and bee pollinated flowers and can be a major component in hummingbird pollinated flowers (Baker and Baker, 1975, 1982, 1983; Freeman, Ried and Becvar, 1983; Martínez del Río, Baker and Baker, 1992). This has been associated to intolerance or lack of specific enzymes to digest this sugar in perching birds and in nectar feeding bats (Martinez del Rio, Baker and Baker 1992; Martínez del Río, pers.com.), but the evidence for the case of bats seems to be inconclusive.

In general terms, the flowers of *A. lechuguilla* are nocturnal, and especially in the south populations adjust very well to the classic bat pollination syndrome: abundant and diluted nectar, with very little sucrose (Cruden, Hermann and Peterson, 1983; Freeman, Ried and Becvar, 1983). It is possible that *A. lechuguilla* was originally adapted to bat pollination, but in northern Mexico now is actively adapting to bee pollinators. In support to this idea, we can point out that while agaves are generically considered to be bat pollinated, several *Agave* species, in particular from northern Sonoran desert, are mainly pollinated by bees, and their nectar can be very concentrated while their volumes can be low (Schaffer and Schaffer, 1977a and b; Slauson, 1994; Eguiarte, Souza and Silva-Montellano, 2000). The *A. lechuguilla* populations that are out of the predicted patterns could be understood in the context of the coevolutionary geographic mosaic hypothesis of Thomson (1994). In some populations the selective pressures are very strong in one direction and the plants are adapting to their specific pollinators, while in some others they may be adapting to different pollinators, or in even some other population may not be adapting to any pollinators, either because the pollinators are very unpredictable among years or the effective population sizes may be too small (Parra, Vargas and Eguiarte, 1993).

In a parallel study (Chapter 1), we have studied the visitors to the same populations reported here. We detected not even a single bat visit to *A. lechuguilla* in all this transect. The flowers were pollinated by a combination of diurnal (hummingbirds and large bees: *Bombus* and *Xylocopa*) and nocturnal (hawkmoths) pollinators. Usually the most important (in numbers) visitors were the bees, but in some population hawkmoths could account for more than 75% of all visits. Additional pollination studies indicate that hawkmoths are the most efficient pollinators for this species (Chapter 3). There were no clear latitudinal

patterns in the differences of proportion of visitors, but the total number of visits decreased toward the north, less than half the visits than for the plants in the 4 southernmost populations. In correspondence with this visitation pattern (more in the south, less in the north), we found that the southern populations have an excess of heterozygotes, in the middle part of the gradient the populations are near Hardy-Weinberg proportions, while in the north the populations are significantly for excess of homozygote (Chapter 2). The fruit set (total mature fruits/ total produced flower) also follows this pattern, high in the south (more than 50%), and lower in the north (ca 30%; Chapter 1).

Even if we found significant differences among populations, and this component accounted for most of the variance, there was a large component of the variance due to differences among individuals inside each population. This component was even largest than the population component in the case of sucrose. In other words, even if natural selection is not responsible for the observed pattern, there may be ample variation where natural selection could act. Although we consider that these differences were modeled mainly by natural selection, we are clearly aware that they could be due just to environmental responses, involving little or no genetic basis or genetic differentiation. In this latitudinal gradient we also have latitudinal physical environmental changes: in general terms the populations in the south are less arid than the populations in the north (Chapter 1). The only way to solve this point would be to use common gardens and grow plants of different origins. This is not feasible to us at this moment, because we lack the facilities to plant the individuals, nor the resources to move and maintain them. On the other hand, the plants take several years to flower (15 years in average, Berlanga, Gonzalez and Franco, 1992).

Nectar as an adaptation, and Thompson's coevolutionary mosaic.- We interpret here that nectar is an adaptation, and that its characteristics have evolved as a response of the pressures exerted by the most efficient pollinators. But we see that several characteristics do not adjust to the actual pollinators. In general terms, the floral behavior and nectar production remains the supposed characteristics of bat flowers. Two different answers can be proposed. One is that the plant evolved in a bat rich area (or that bats were formerly

abundant in the Chihuahuan desert) and that it has not yet adapted to the new conditions. The other is that in practice, bat and hawkmoth pollination syndromes are very similar (Eguiarte, Souza and Silva-Montellano, 2000). Indeed the concept of floral syndromes has been severely criticized, because of its teleological and typological connotation (Waser, 1983, Herrera, 1996). Also it is possible to be efficiently pollinated by an organism in very different ways, with different morphologies, as pointed clearly even within a given genus (Bruneau, 1997; see review in Weller and Sakai, 1999). Returning to Gould and Vbra (1982) definitions, it seems that *A. lechuguilla* nectar characteristics evolved as an adaptation to bat pollinators, but are now exaptations, efficiently used by hawkmoths, bees and hummingbirds, and in some populations undergoing actual adaptations towards them. Nevertheless, bat flowers, as they concentrate huge amounts of resources, are usually visited by a large number of animals that may behave as secondary pollinators or just in different degrees as different floral parasites and robbers (Eguiarte, Martínez del Río and Arita, 1987; Eguiarte and Búrquez, 1987). This large number of floral visitors to *Agave* have been reported several times in the literature (see Gentry, 1982, Martinez del Rio and Eguiarte; 1987; Slauson, 1994; Eguiarte, Souza and Silva-Montellano, 2000). We need more information to solve this point.

On the other hand, the sugars, especially fructose; do not change as strong as could be expected given the interspecific studies of Baker and Baker (1975; 1982; 1983) and of Freeman, Ried and Becvar (1983). This may be due to little genetic variability on this character in *Agave lechuguilla*, or that the selective pressures are not strong enough, or that there has been little time to adapt. We do not know the heritabilities of the nectar characteristics, we do not even know if they have a genetic basis. The differences among individuals were very clear and statistically robust, but may be due to environmental differences. Another possibility is that the nectar may not be very expensive, and thus is a resource under little selection, and that the plants are visited in a more or less efficient way, even if they produce little or bad quality nectar for a given pollinator.

We can conclude then, even if the differences among individuals and populations are genetic, environmental or both, that we have very different nectar characteristics in the latitudinal gradient, changing

in clear clinal patterns of the characters. In these populations, both the floral characteristics, including nectar, and the kind and abundance of visitors change. This pattern is very suggestive of a geographic coevolution mosaic as proposed by Thomson (1997), in this particular case for a pollination mutualism. The final outcome in evolutionary terms would depend on the patterns of extinction and colonization of the populations, not only in the interactions inside a population in a given time.

LITERATURE CITED

- Arita, H. T. and K. Santos Del Prado. 1999. The conservation of nectar-feeding bats in Mexico. *Journal of Mammalogy* 80: 31-41
- Ayala, R., T. L. Grinswold AND S.H. Bullock. 1993. The native bees of Mexico. In T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot and J. Fa. [eds]. *Biological diversity of Mexico: Origins and Distribution*, 179-227. Oxford University press, Oxford, UK.
- Baker, H. G, R Cruden and I. Baker. 1971. Minor parasitism in pollination biology and its community function. *Bioscience* 21: 1127-1130.
- _____, and I. Baker. 1975. Studies of nectar constitution and pollinator plant coevolution. In L. E. Gilbert and P. H. Raven [eds.] *Coevolution of animals and plants*, 100-140. University of Texas press, Austin, TX.
- _____, and _____ 1982. Chemical constituents of nectar in relation to pollination mechanisms and phylogeny. In M. H. Nitecki. [ed.] *Biochemical aspects of evolutionary biology*, 131-171 University of Chicago Press. Chicago, IL.
- _____, and _____ 1983. Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In C. E. Jones and R. J. Little [eds]. *Handbook of experimental pollination biology*. 117-141. Van Nostrand-Reinhold New York, NY.
- Berlanga, C. A., L. A. Gonzalez, and H. Franco. 1992. Metodología para la evaluación y manejo de la lechuguilla en condiciones naturales, Folleto técnico No. 1. SARH-INFA. Centro regional del Noreste, Campo experimental "La Suceda". Saltillo, Coahuila, México.
- Boose, D. L. 1997. Sources of variation in floral nectar production rate in *Epilobium canum* (Onagraceae): implications for natural selection. *Oecologia* 110: 493-500
- Briones, O. 1994. Origen de los desiertos mexicanos. *Ciencia* 45: 263-279.
- Bruneau, A. 1977. Evolution and homology of bird pollination syndromes in *Erythrina* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 84: 54-71.
- Cruden, R. W., S. M. Hermann and S. Peterson. 1983. Patterns of nectar production and plant-pollinator coevolution. In B. Bentley and T. Elias [eds.] *The biology of nectaries*, 80-125 Columbia University Press. New York, NY.
- Eguiarte, L.E. and A. Búrquez. 1987. Reproductive ecology of *Manfreda brachystachya*, an iteroparous species of Agavaceae. *Southwestern Naturalist* 32: 169-178.

- _____, and A. Búrquez. 1988. Reducción en la fecundidad de *Manfreda brachystachya* (Cav.) Rose, una agavácea polinizada por murciélagos: los riesgos de la especialización en la polinización. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 48: 147-149.
- _____, and C. Martínez del Río y H. T. Arita. 1987. El néctar y el polen como recursos: El papel ecológico de los visitantes a las flores de *Pseudobombax ellipticum*. (HBK)Dugand. *Biotropica* 19: 74-82.
- _____, V. Souza, A. Silva-Montellano. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, ecología evolutiva de la reproducción y genética de poblaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 48: 147-149.
- Faegri, K. and L. van der Pijl. 1979. The principles of pollination ecology. Third edition revised. Pergamon Press Ltd. London, UK.
- Feisinger, P. 1983. Coevolution and Pollination. In D.J. Futuyma and M. Stalkin (eds). Coevolution. pp. 282-310, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Freeman, C. E. and W. H. Reid. 1985. Aspects of the reproductive biology of *Agave lechuguilla* Torr. *Desert Plants* 7: 75-80.
- Freeman C. E, W. H. Reid, and J. E. Becvar. 1983. Nectar sugar composition in some species of *Agave* (Agavaceae). *Madroño* 30: 153-158.
- Futuyma, D. J..1998. Evolutionary Biology. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Gentry, H. S. 1982. Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona.
- Golubov, J., L.E. Eguiarte, M.C. Mandujano, J. López-Portillo, and C. Montaña. 1999. Why be a honeyless Honey Mesquite? Reproduction and mating system of nectarful and nectarless individulas. *American Journal of Botany* 86: 955-963.
- Gould, S. J. and E. S.Vbra. 1982. Exaptation- a missing term in the science of form. *Paleobiology* 8: 4-15.
- Herrera, C. M. 1996. Floral traits and plant adaptation to insect pollinators. Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants (eds D. Lloyd and S. Barret), pp 65-87. Chapman and Hall, New York
- Howell, D. J. and B. S. Roth. 1981. Sexual reproduction in agaves: The benefits of bats; the cost of semelparous advertising. *Ecology* 62: 1-7.
- Johnsgard, P. A. 1983. The hummingbirds or North America. Smithsonian Institute: Washington D.C.
- Martínez del Río, C., y L. E. Eguiarte. 1987. Bird visitation to *Agave salmiana*: comparisions among hummingbrids and perching birds. *Condor* 89: 357-363.
- Martínez del Río C., H. G. Baker y I. Baker. 1992. Ecological and evolutionary implications of digestive processes: Bird preferences and the sugar constituents of floral nectar and fruit pulp. *Experientia* 48: 545-551.
- Mitchell, R. J. 1993. Adaptive significance of *Ipomopsis aggregata* nectar production: observation and experiment in the field. *Evolution* 47: 25-35.
- Mitchell, R. J. and N. M. Waser. 1992. Adaptive significance of *Ipomopsis aggregata* nectar production: pollination success of single flowers. *Ecology* 73: 633-638
- Parra, V., F. Vargas and L.E. Eguiarte. 1993. Reproductive biology, pollen and seed dispersal, and neighborhood size in the hummingbird-pollinated *Echeveria gibbiflora*. *American Journal of Botany* 80: 153-159.

- Percival, M. S. 1961. Types of nectar in angiosperms. *New Phytologist* 60: 235-281.
- _____. 1965. *Floral biology*. Pergamon Press, Oxford, UK.
- Pyke, G.H. 1991. What does it cost a plant to produce floral nectar? *Nature* 350: 58-59.
- Pyke, G.H., L.P. Day, and K.A. Wale. 1988. Pollination ecology of Christmas bells (*Blandfordia nobilis* SM.): effects of adding artificial nectar on pollen removal and seed set. *Australian Journal of Ecology* 13: 279-284.
- SAS. 1995. *JMP statistics and graphics guide*. SAS institute, Cary, N.C.
- Schaffer, W. M. and V. Schaffer. 1977 a. The reproductive biology of Agavaceae: Pollen and nectar production in four Arizona Agaves. *Southwestern Naturalist* 22: 157-168.
- _____, and _____. 1997b. The adaptive significance of variation in reproductive habit in Agavaceae *In* B. Stonehouse and C. M. Perrins [eds.] *Evolutionary ecology*, 260-276. Macmillan Co., London, UK.
- Slauson, L. 1994. Factors affecting the distribution, pollination ecology and evolution of *Agave chrysantha* (Peebles) and *Agave palmeri* (Engelm.), (Agavaceae). Biodiversity and Management of the Madrean Archipelago and Sky Island Conference. Sept. 1994. USDA Forest Service Technical Report. Tucson, Arizona.
- Stebbins, G. L. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I. pollination mechanisms. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 1: 307-326.
- Thompson, J. N. 1994. *The Coevolutionary process*. University of Chicago Press, Chicago, IL.
- Thompson, J. N. 1997. Evaluating the dynamics of coevolution among geographically structured populations. *Ecology* 78: 1619-1623.
- Waser, N. M. 1983. The adaptive nature of floral traits: ideas and evidence. *In* L. Real, [ed.] *Pollination biology*. 243-285. Academic Press, Orlando FL.
- Weller, S. G. and, A. K. Sakai. 1999. Using a phylogenetic approaches for the analysis of plant breeding system evolution. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*. 30: 167-199
- Zar, J. H. 1984. *Biostatistical analysis*. Second edition. Englewood cliffs, NJ.
- Zimmerman, M. 1983. Plant reproduction and optimal foraging: experimental nectar manipulation in *Delphinium nelsonii*. *Oikos* 41: 57-63.
- Zimmerman, M. 1988. Nectar production, flowering phenology, and strategies for pollination. *In* J. Lovett-Doust and L. Lovett-Doust [eds]. *Plant reproductive ecology: patterns and strategies*, 157-178. Oxford University Press, New York, NY.

Table 1. Nested analyses of variance of 9 populations of *Agave lechuguilla* from Mexico.

a) Total nectar volume; b) Total sugar concentration. a) Total nectar volume.

	df	SS	Variance component	F	Prob
Populations	8	1.14507	62 %	25.2447	0.0000
Individuals (Population)	126	0.71440	38 %	4.2565	0.0000
Total	134			10.4177	0.0000

b) Total sugar concentration

	df	SS	Variance component	F	Prob.
Populations	8	6.84672	71 %	25.2447	0.0000
Individuals (Population)	126	2.77085	29 %	4.2565	0.0000
Total	134			10.4177	0.0000

Table 2. Nested analyses of variance for concentration of different sugars in the nectar from 9 populations of *Agave lechuguilla* from Mexico. a) Fructose; b) Glucose; c) Sucrose.

a) Fructose

	df	SS	Variance component	F	Prob
Populations	8	1.25282	75 %	47.1707	0.0000
Individuals (Population)	126	0.41862	25 %	3.2541	0.0000
Total	134			12.2235	0.0000

b) Glucose

	df	SS	Variance component	F	Prob
Populations	8	1.75776	73 %	41.7038	0.0000
Individuals (Population)	126	0.66428	27 %	2.6497	0.0000
Total	134			9.0885	0.0000

c) Sucrose

	df	SS	Variance component	F	Prob
Populations	8	0.10807	24 %	4.9292	0.0000
Individuals (Population)	126	0.34555	76 %	2.6315	0.0000
Total	134			3.02330	0.0000

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Population averages for the total nectar volume (\pm SE) in *A. lechuguilla* in Mexico, as a function the latitude (N = 15 individuals per population). The number indicate the population number according to Table 1. Same letters indicate that the populations are not significantly different, $P < 0.05$, according to a contrast test: A-B: $t > 2.5$, $P < 0.011$; A-C: $t > 6.2$, $P < 0.0001$; A-D: $t > 8.5$, $P < 0.00001$; B-C: $t > 2.1$, $P < 0.03$; B-D: $t > 4.2$, $P < 0.0001$; C-D: $t > 2.5$, $P < 0.011$.

Figure 2. Population averages for the total sugar concentration (\pm SE) in *A. lechuguilla* in Mexico, as a function the latitude (N = 15 individuals per population). Different letters indicate that the population are significant different, $P < 0.05$, according to a contrast test: A-B: $t > 2.6$, $P < 0.01$; A-C: $t > 6.3$, $P < 0.0001$; B-C: $t > 3.9$, $P < 0.0001$.

Figure 3. Population averages for fructose concentration (\pm SE) in *A. lechuguilla* in Mexico, as a function the latitude (N= 15 individuals per population). Different letters indicate that the population are significant different, $P < 0.05$, according to a contrast t test : A-B: $t > 2.0$, $P < 0.04$; A-C: $t = 5.7$, $P < 0.0001$; A-D: $t = 10.8$, $P < 0.00001$; A-E: $t = 16.7$, $P < 0.00001$; B-C: $t > 3.3$, $P < 0.001$; B-D: $t > 8.2$, $P < 0.00001$; B-E: $t > 12.3$, $P < 0.00001$; C-D: $t = 4.38$, $P < 0.0001$; C-E: $t = 9.9$, $P < 0.00001$; D-E: $t = 5.9$, $P < 0.0001$.

Figure 4. Population averages for glucose concentration (\pm SE) in *A. lechuguilla* in Mexico, as a function the latitude (N = 15 individuals per population). Different letters indicate that the population are significant different, $P < 0.05$, according to a contrast test: A-B: $t > 2.0$, $P < 0.01$; A-C: $t = 4.5$, $P < 0.001$; A-D: $t = 10.3$, $P < 0.00001$; A-E: $t = 14.7$, $P < 0.00001$; B-C: $t > 2.0$, $P < 0.04$; B-D: $t = 7.6$, $p < 0.0001$; B-E: $t > 11.8$, $P < 0.00001$; C-D: $t = 5.06$, $P < 0.0001$; C-E: $t > 9.16$, $P < 0.00001$; D-E: $t = 4.4$, $P < 0.0001$.

Figure 5. Population averages for sucrose concentration (\pm SE) in *A. lechuguilla* in Mexico, as a function the latitude (N = 15 individuals per population). Different letters indicate that the population are significant different, $P < 0.05$, according to a contrast test: A-B: $t > 2.3$, $P < 0.01$; A-C: $t > 5.1$, $P < 0.0001$; B-C: $t > 2.0$, $P < 0.04$.

Figure 6. Ternary diagrams of average the percentages of each sugar per individual from two populations: a) Population 2, Zimapán, Hidalgo. b) Population 7, Jiménez, Chihuahua. Each point represents an individual plant, the average of its 3 flowers.

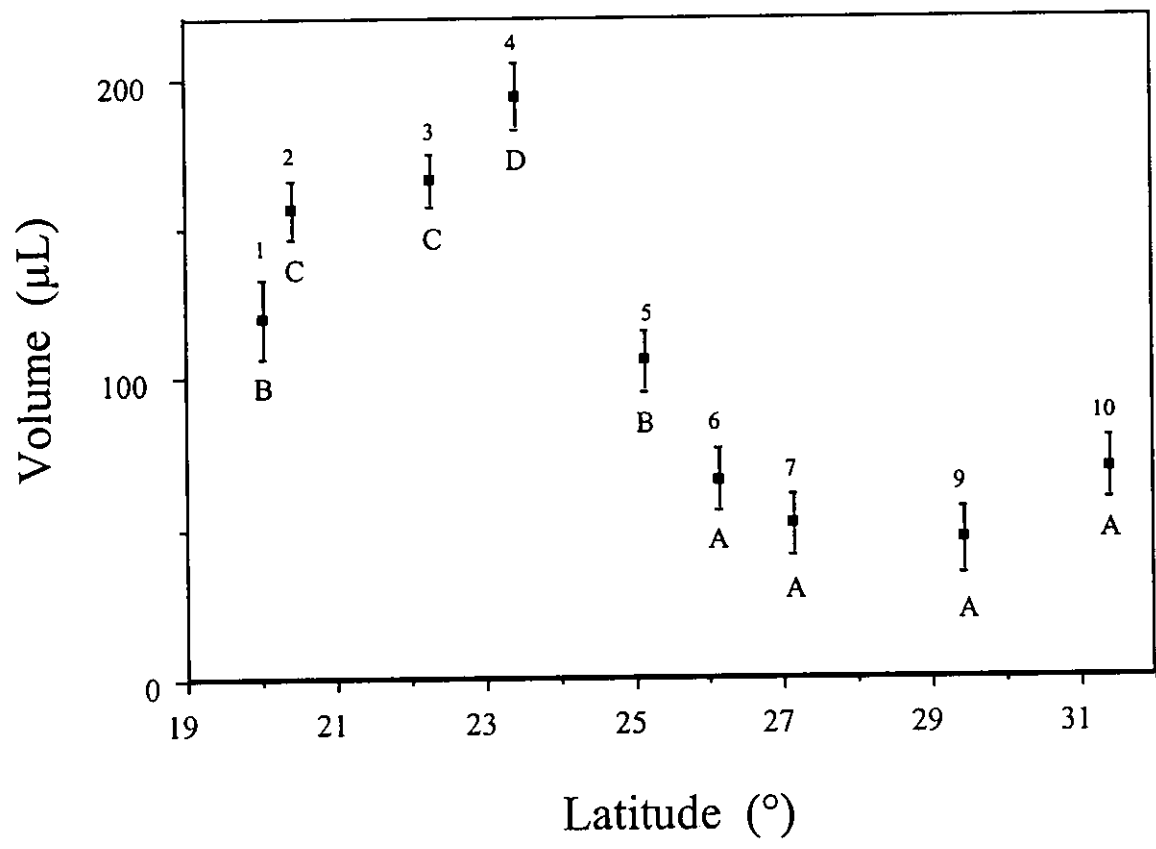


Fig. 1

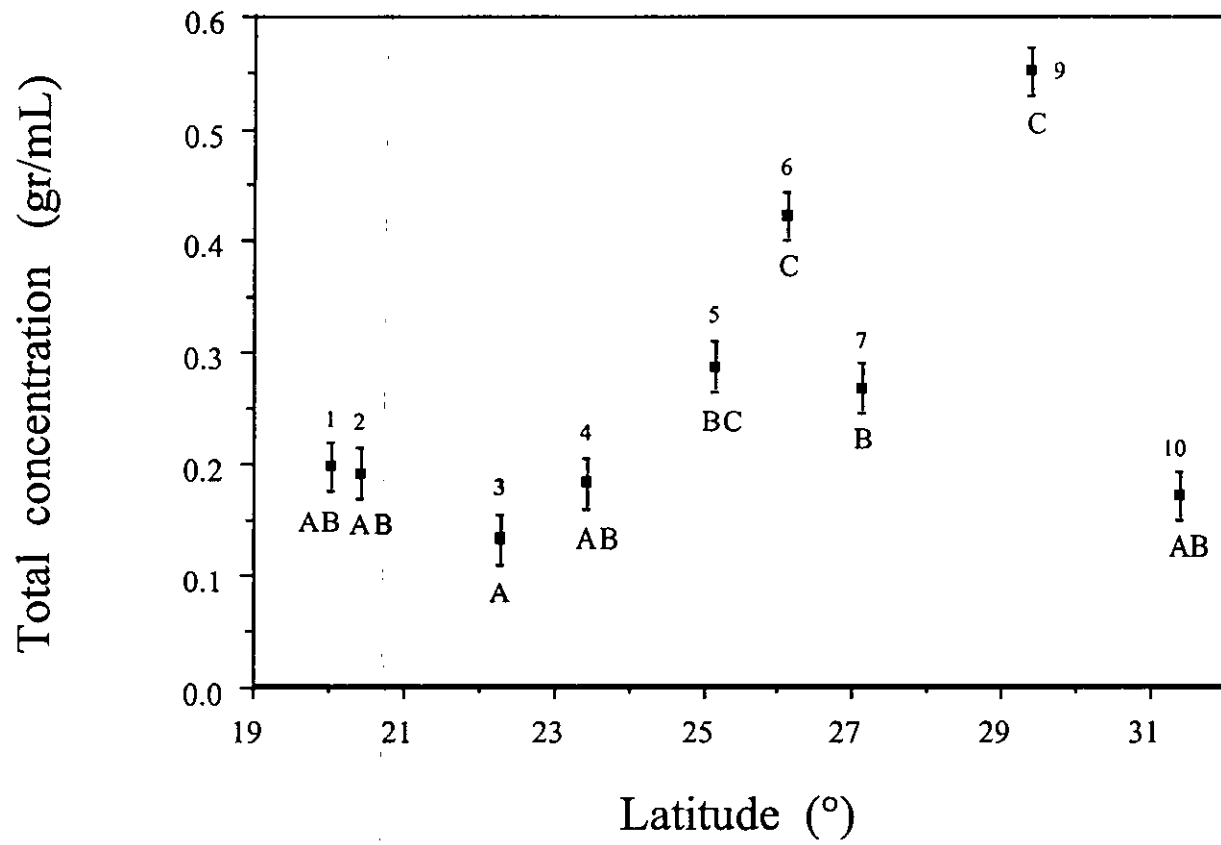


Fig.2

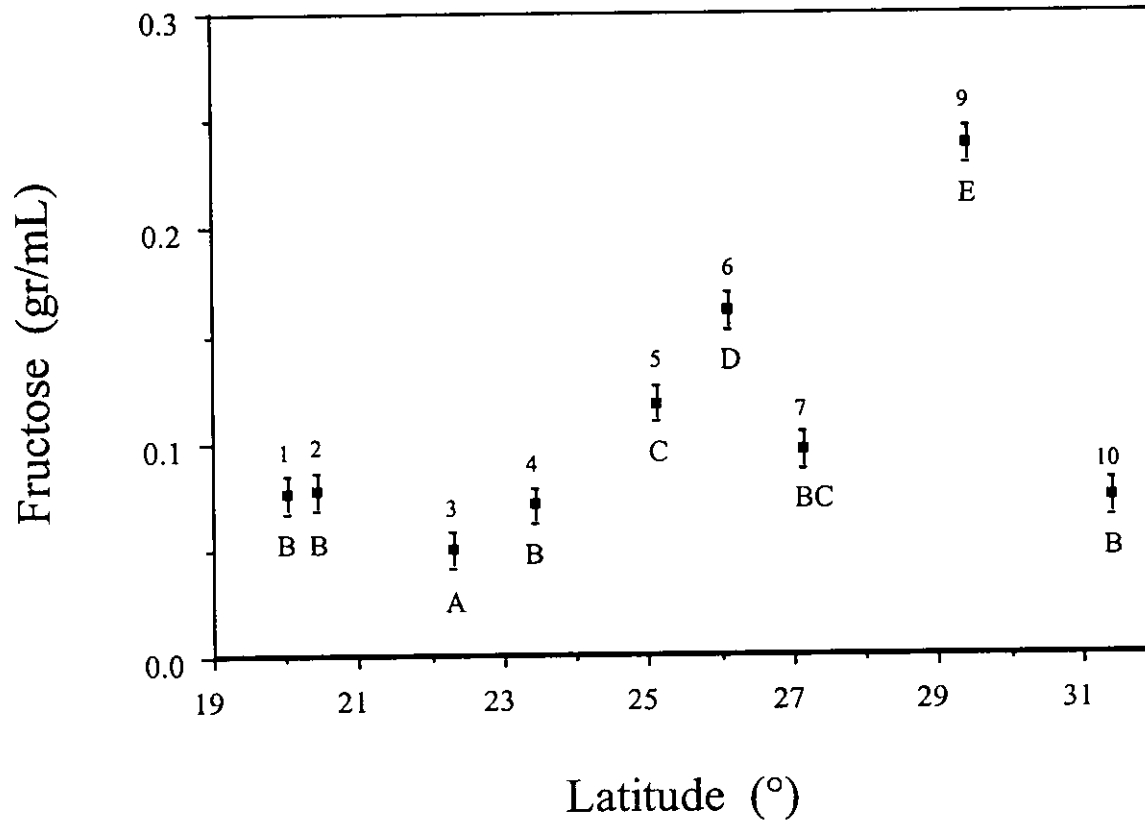


Fig.3

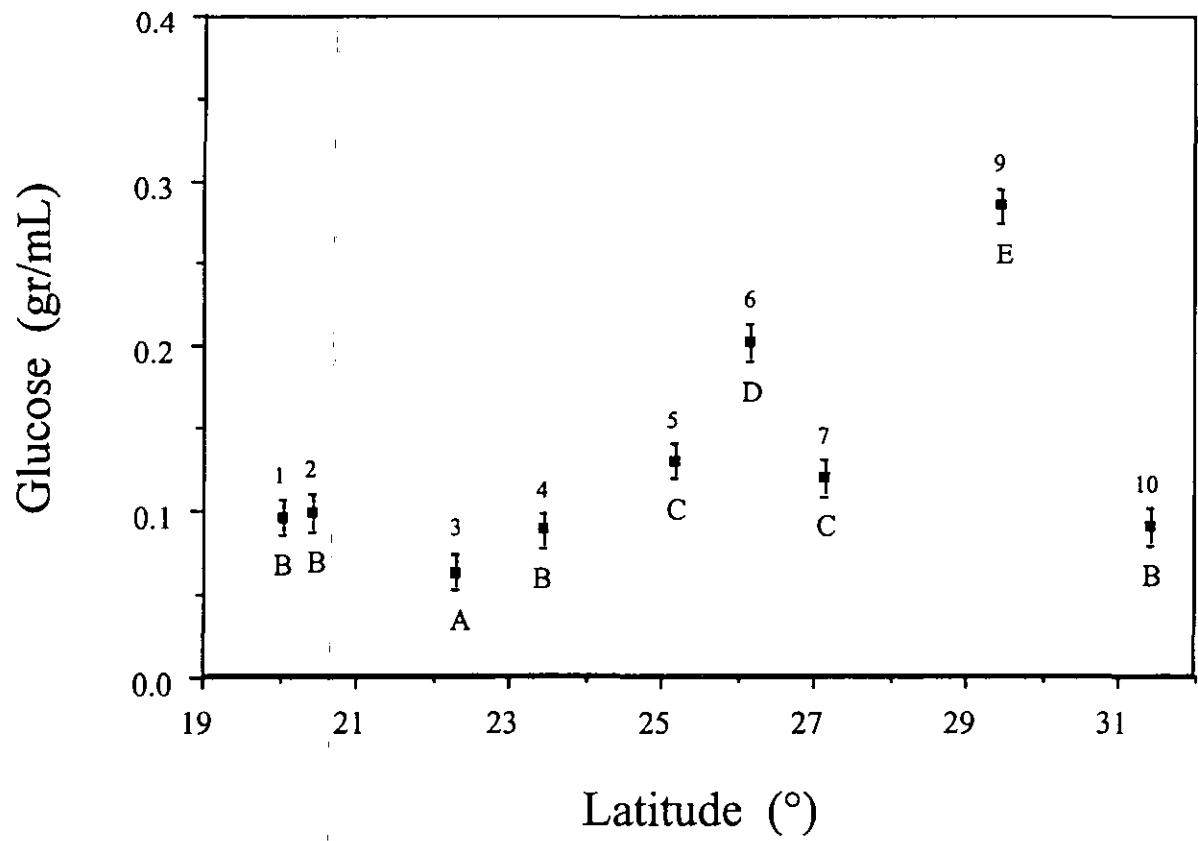


Fig.4

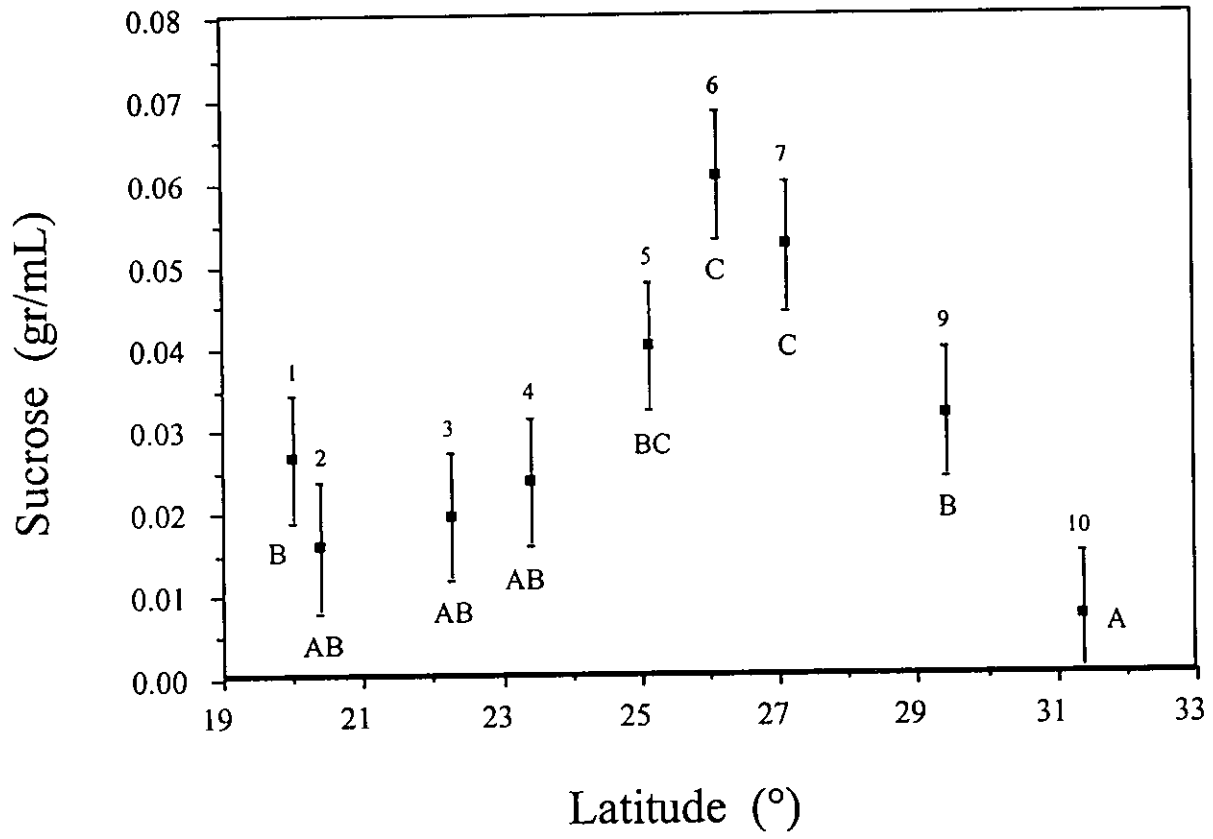
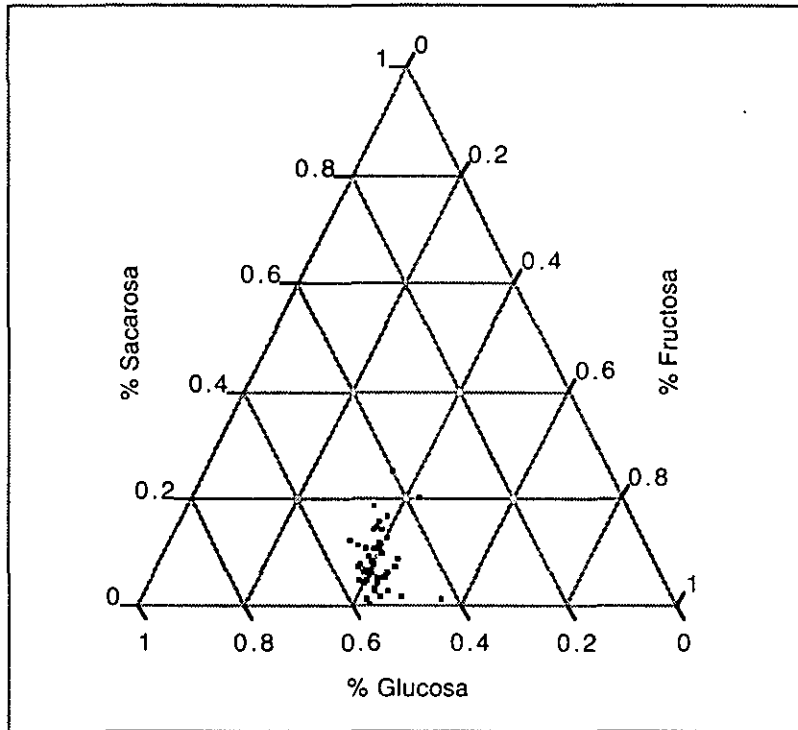


Fig.5

Fig.6

a)



b)

