

0038124
24.
24.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**EVALUACION GENETICA Y DEMOGRAFICA DE
Agave victoriue-reginae T. MOORE Y APLICACION
DEL CULTIVO DE TEJIDOS PARA SU
CONSERVACION.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
(B I O L O G I A)
P R E S E N T A :
ALEJANDRO MARTINEZ PALACIOS**

DIRECTOR DE TESIS: DR. VICTOR MANUEL CHAVEZ AVILA.
CO-DIRECTOR DE TESIS: DR. ROBERT ARTHUR BYE BOETTLER.

MEXICO, D. F.

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

263716



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

PAGINACIÓN
DISCONTINUA

LA PRESENTE INVESTIGACIÓN FUE REALIZADA EN:

**- EL LABORATORIO DE CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES DEL
JARDIN BOTANICO, INSTITUTO DE BIOLOGIA DE LA U.N.A.M.
BAJO LA DIRECCION DEL DR. VICTOR M. CHAVEZ AVILA.**

**- EL LABORATORIO DE GENETICA Y EVOLUCIÓN MOLECULAR
Y EXPERIMENTAL, INSTITUTO DE ECOLOGIA DE LA U.N.A.M.
BAJO LA DIRECCION DEL DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS.**

INDICE

	Página
RESUMEN	i
SUMMARY	ii
CAPITULO UNO. Evaluación genética y demográfica de <i>Agave victoriae-reginae</i> T. Moore y aplicación del cultivo de tejidos para su conservación.	1
1.I. Introducción General	2
1.II. Objetivos generales	13
1.III. Literatura citada	14
CAPITULO DOS. Conservation Genetics of the Endangered Endemic <i>Agave victoriae-reginae</i> (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert.	1
2.I. Abstract	4
2.II. Introduction	5
2.III. Objective	5
2.IV. Materials and Methods	6
2.V. Results	7
2.VI. Discussion	9
2.VII. Literature Cited	11
CAPITULO TRES. Estructura poblacional y conservación de semillas de <i>Agave victoriae-reginae</i> T. Moore, endémica y en peligro de extinción.	1
3.I. Introducción	2
3.II. Objetivos	8
3.III. Materiales y Métodos	8
3.IV. Resultados	12
3.V. Discusión	24
3.VI. Conclusiones	31
3.VII. Literatura citada	33
CAPITULO CUATRO. Micropropagación de <i>Agave victoriae-reginae</i> T. Moore (Agavaceae), a partir del cultivo de embriones cigóticos y tallos de plántulas de semillas germinadas <i>in vitro</i> .	1
4.I. Introducción	2
4.II. Antecedentes	8
4.III. Objetivos	8
4.IV. Materiales y Métodos	10
4.V. Resultados	12

4.VI. Discusión	22
4.VII. Conclusiones	31
4.VIII. Literatura citada	32
CAPITULO CINCO.	
5.I. Discusión general	2
5.II. Conclusiones generales	15
5.III. Perspectivas a futuro	16
5.IV. Literatura citada	17
APENDICES.	
I (Sistema electroforético y recetas de los "buffers")	1
II (Técnicas de anatomía)	4
III (Abreviaturas)	5
IV (Agradecimientos)	6

Resumen

La región sur de los desiertos de Norte América, se caracterizan por su gran diversidad de especies y endemismos de las plantas perennes, las cuales incluyen a la Familia Agavaceae. Estas representan un componente ecológicamente importante de estos ecosistemas. El 75% (198) de las especies de *Agave* se encuentran en México, el 55% son endémicas y muchas de ellas se encuentran en peligro de extinción.

Agave victoriae-reginae T. Moore, endémica de los estados de Coahuila, Durango y Nuevo León (25-27° N, 100-104° O), se presenta una distribución discontinua de pequeñas poblaciones en "islas", estableciéndose en formaciones de carbonato de calcio sobre paredes verticales. La especie tiene una alta demanda ornamental en varios países y está amenazada por colectas para un comercio ilegal. Esto, combinado con la destrucción del hábitat debido a la extracción de material del subsuelo, por ende es uno de los pocos agaves enlistados en peligro de extinción por las autoridades mexicanas y CITES. El desarrollo de sistemas de propagación y preservación artificial serian una alternativa viable en programas de conservación.

Se usaron isoenzimas para analizar la estructura genética de diez poblaciones de *A. victoriae-reginae*. Se analizaron los niveles de variación dentro de las poblaciones y diferenciación entre poblaciones, esta información fue usada en conjunto con datos ecológicos y de fisiología de semillas para proponer estrategias de conservación más efectiva para la especie. Se colectaron hojas de 40 plantas por población y se analizaron 7 enzimas, representación de 10 loci (ACP-1, DIA-1,2, EST-1,2, GOT-1, LAP-1, ME-1, PGI-2,3), por electroforesis en geles de almidón. Adicionalmente, se estimó la estructura de tamaños, la densidad de población y el tamaño de la población usando cuadrantes de 120m². Se evaluó la producción de semillas por planta en campo y el porcentaje de germinación en invernadero, el resto de semillas se conservaron bajo condiciones de refrigeración. Se valoró la genética e histológicamente la utilización de dos vías de regeneración *in vitro* de plantas a partir del cultivo de embriones (de semillas) y tallos provenientes de plántulas generadas de semillas.

Agave victoriae-reginae muestra altos niveles de variación ($H_e = 0.335$) y diferenciación entre poblaciones ($F_{ST} = 0.236$). Lo primero sugiere que la deriva génica no ha jugado un papel importante (ya que al parecer no se ha perdido variación genética) en la evolución de la especie y lo segundo muestra que el flujo genético entre las poblaciones es bastante limitado. Los índices de fijación indican una reducida endogamia, posiblemente dada por la eficiencia de los polinizadores locales.

Se encontró una relación entre las distancias genéticas y geográficas en las poblaciones. El análisis de distancias genéticas, revela que de los tres grupos de poblaciones del este, centro y oeste. Los del este y oeste están más relacionados. La razón de este patrón no es completamente clara, pero puede ser debida a que estas poblaciones son más grandes que los grupos del centro. Los tres grupos de poblaciones presentan un nivel de diferenciación similar a aquellos reportados entre especies de otros géneros de plantas, sugiriendo la necesidad de realizar otros estudios que puedan conducir a la revisión taxonómica de la especie.

Los altos niveles de variación y diferenciación genética en *A. victoriae-reginae* representan un real desafío en la conservación, sin embargo, se propone la necesidad de conservar cada población, contemplando 5000 individuos por población para los casos donde el número los supere.

A partir de plántulas germinadas asépticamente se establecieron cultivos de tallos en presencia de reguladores del crecimiento, lográndose plántulas con mediación de callos organogénicos y embriogénicos. Así mismo, a partir de embriones, en ausencia de fitohormonas, se logró un (clon) cultivo altamente regenerativo vía indirecta de embriogénesis somática y directa e indirecta de organogénesis; en forma notable estas respuestas se han mantenido durante más de 8 años.

El análisis de isoenzimas de los regenerantes indicó que eran estables genéticamente. Sin embargo la mediación de callo en la formación de plántulas puede conducir a una inestabilidad genética a través de poliploidías u otras aberraciones genéticas, sobre todo, cuando la histología mostró la participación de un gran número de células en la formación de los regenerantes. Las evaluaciones sobre la producción de semillas por planta, porcentaje de germinación (antes y después de dos años de refrigeración) y variación genética de las plantas en campo resultaron ser altos, lo que demuestra que son las semillas el material biológico idóneo que puede ser usado en el rescate de poblaciones y conservación de germoplasma.

Summary

The southern region of the North American deserts has a large number of endemic species. Perennial plants, including those of the family Agavaceae, represent an ecologically important component of these ecosystems. About (75% (198)) of the species of the genus *Agave* are found in Mexico. Approximately 55% of these are endemic and many are endangered.

Agave victoriae-reginae T. Moore is endemic in the states of Coahuila, Durango y Nuevo León (25-27° N, 100-104° W), where it has a discontinuous geographic distribution of small island-like populations distributed in calcium carbonate formations on vertical walls. The species is in high demand as an ornamental plant in many countries and is threatened by illegal commercial collection. This, commercial collection combined with habitat destruction due to mining has resulted in this taxon being one of the few *Agave* species listed as endangered by the Mexican government and CITES. The development of artificial propagation and preservation systems could be a viable alternative in conservation programs for this species.

Isozymes were used to analyze the genetic structure of ten populations of *A. victoriae-reginae*. Knowledge of the levels of variation within populations and differentiation among populations could be used in conjunction with ecological data and seed physiology to propose more effective conservation strategies for the species. Leaves were collected from 40 plants per population and analyzed by starch gel electrophoresis for seven enzymes, representing ten loci (ACP-1, DIA-1,2, EST-1,2, GOT-1, LAP-1, ME-1, PGI-2,3). Data was collected on size structure, population density, and population size using 120m² plots. We also evaluated seed production per plant in the wild and germination percentage in greenhouse, the remaining seeds were maintained in refrigeration. We also evaluated genetically and histologically the application of different morphogenetic pathways in order to regenerate *in vitro* plants from seedlings stems.

Agave victoriae-reginae showed high levels of variation ($H_e = 0.335$) and differentiation among populations ($F_{ST} = 0.236$). The former suggests that genetic drift has not recently played a prominent role in the evolution of the species and the latter suggests that gene flow among populations is quite limited. Fixation indices suggest little endogamy, possibly due to the efficiency of local pollinators.

We found a positive correlation between genetic and geographic distances of these populations. Cluster analyses revealed Eastern, Central, and Western groups of populations, with the Eastern and Western being most closely related. The reason for this pattern is not entirely clear, but may be related to these populations being much larger than the central populations. The three groups of populations display a level of differentiation similar to that reported between species in other plant genera, suggesting the need for further studies that may lead to a taxonomic revision of the species.

The high levels of genetic variation and differentiation in *A. victoriae-reginae* represent a real conservation challenge. It is urgent to try to conserve every single population or at least 5000 individuals/population in the regions where the number could be higher. *In vitro* stem cultures were established from aseptically germinated seedlings in the presence of plant growth regulators, resulting in numerous plantlets from organogenic and embryogenic calli. We also obtained and cloned highly regenerative cultures following the (indirect) somatic embryogenesis pathway and also the (direct and indirect) organogenic one, from zygotic embryo cultures without exogenous auxins or cytokinins. These growth responses were still active after more than 8 years.

The histologic analysis of these plants revealed the participation of numerous cells in the origin of structures which can be a risk for the genetic stability of this species due to the formation of chimeras and/or genetic changes in the callus. Nevertheless, the clone regenerates and their embryogenic or organogenic origins are genetically stable according to the isozyme analysis. This morphogenetic competence is considered a high genetic response, since no plant growth regulators were required to induce it. The seed production evaluations per plant, the percentage of germination (before and at the end of two years in refrigeration) and the genetic variation of the wild plants were high, suggesting that the seeds are the ideal biological material that could be used for the population rescue and germoplasm conservation of this species.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL:

EVALUACION GENETICA Y DEMOGRAFICA DE *Agave victoriae-reginae* T. MOORE Y APLICACION DEL CULTIVO DE TEJIDOS PARA SU CONSERVACION.

Evaluación genética y demográfica de *Agave victoriae-reginae* T. Moore y aplicación del cultivo de tejidos para su conservación.

Introducción general

La diversidad biológica del planeta esta siendo reducida de una forma acelerada como consecuencia directa o indirecta de las diferentes acciones humanas (Frankham 1995). Un gran número de especies ya están extintas y muchas otras están siendo erosionadas genéticamente, a tal grado que para sobrevivir requieren de la intervención de los humanos para optimizar su manejo y asegurar su sobrevivencia (Frankham 1995). Programas de biología de la conservación requieren de la intervención de diversas disciplinas (ej. genética, ecología, horticultura, etc.) para entender la problemática de una especie amenazada de extinción y proponer alternativas para su conservación (Ecker 1989; Huenneke 1991; Pavlik *et al.* 1993; Caro y Laurenson 1994; Frankham 1995). Como introducción general de la presente investigación sobre biología de la conservación de una especie en peligro de extinción, se propuso abordando de forma general los tres incisos siguientes: a) variación genética y extinción, b) conservación de la diversidad biológica, y c) *Agave victoriae-reginae* (antecedentes de la especie en extinción).

a) Variación genética y extinción. La alteración de los ecosistemas por acción antropogénica tiene un impacto directo con la disminución de individuos, ocasionan pérdida de la variación genética por endogamia y deriva génica (Barrett y Kohn 1991; Eguiarte 1990; Eguiarte *et al.* 1992), y hace a las especies vulnerables a la extinción. Estos cambios están ocasionando una reducción en el proceso evolutivo de las especies (Frankham 1995). Raven (1976) ha estimado que la desaparición de cada especie vegetal puede arrastrar consigo de 10 a 30 especies dependientes (ej. polinizadores, herbívoros, simbioses, vertebrados, parásitos, etc.). Por lo tanto, la diversidad vegetal es un factor fundamental que controla la diversidad de otros organismos y la estabilidad de los ecosistemas del planeta (Raven 1976).

La destrucción acelerada de la naturaleza está ocasionando una erosión genética desenfrenada dentro de cada especie, reduciendo continuamente el tamaño de las poblaciones, por lo que parece inminente para muchas especies se dificulte su conservación

in situ. Dicho de otra manera, no podrán mantener su evolución natural porque en la mayoría de los casos las actividades humanas no permitirán su permanencia en el hábitat (Caldecott *et al.* 1996).

Ante la acelerada destrucción de los ecosistemas, resulta necesario evaluar el tamaño mínimo de una población, que permita mantener la diversidad genética y por ende su permanencia y evolución en el ecosistema reducido (Lande 1988). Se puede esperar que especies con baja variación genética manifiesten su reducida capacidad para hacer frente a los cambios ambientales tendiendo con ello a la extinción, pues las poblaciones cada vez menores tendrán una más limitada variación genética con un estrecho margen para adaptarse ante los cambios (Frankham 1995). Estudios detallados en demografía y genética de poblaciones pueden permitir conocer el tamaño mínimo de una población, el cual podrá ser diferente cada una de las especies, para tratar de mantener un equilibrio con su entorno y sostener la capacidad de adaptarse y evolucionar (Lande 1988; Barrett y Kohn 1991; Eguiarte 1990; Eguiarte *et al.* 1992; Caro y Laurenson 1994; Frankham 1995).

En la actualidad, las diversas actividades humanas son los factores que amenazan y generan una extinción masiva de especies (Bye 1993; Caldecott *et al.* 1996). Las extinciones masivas son eventos que se han presentado en el transcurso de la historia de la vida del planeta. Paralelo a ello, existen evidencias paleontológicas de que estos fenómenos han dado paso a nuevas formas de vida (Wilson 1989). Entre las extinciones de mayor impacto se registran la de los dinosaurios (65 millones de años, fin del Cretácico) y la extinción de más del 75% de los animales marinos (240 millones de años, en el Pérmico) (Raup y Septkoski 1982; Wolf 1988). Aunque todas las extinciones del pasado, incluyendo el proceso actual donde el hombre es el agente que acelera la extinción de especies silvestres, se consideran catástrofes naturales, sin embargo, en la actualidad el hombre en su afán de modificar el ambiente silvestre a condiciones artificiales, destruye hábitats y erosiona a las especies de una manera acelerada, aún sabiendo que este cambio podrá repercutir en su propia existencia. Esta acción desenfundada de destrucción de la naturaleza por el hombre se le ha llegado a denominar extinción antropogénica (Martin y Klein 1984).

México es considerado entre los cuatro países con mayor diversidad biológica (Caldecott *et al.* 1996); basta citar que de plantas vasculares se calcula que es el hábitat de unas 30 mil especies que representan alrededor del 12% de toda la flora del planeta (Toledo y Ordóñez 1993; Rzedowski 1993). Esta diversidad está siendo destruida a tasas alarmantes; para el caso de los bosques tropicales la deforestación se ha estimado a razón de una hectárea por minuto (Vovides 1989). Proceso que se repite fuera de nuestro país en diversas regiones geográficas y de continuar con esta acción destructiva, para el año 2100 habrán desaparecido los bosques tropicales del planeta (Soulé 1991).

(b) Conservación de la diversidad biológica. Para la conservación de la biodiversidad todas las estrategias pueden ser válidas y deben ser exploradas, siempre que se apliquen para proteger y conservar a las especies y no atenten con los procesos naturales de evolución (Frankel y Soulé 1981; Vázquez y Orozco 1989). Los sistemas de conservación pueden ser agrupados en dos formas: *in situ* y *ex situ*.

(1) Conservación *in situ*. La conservación de plantas en peligro de extinción en su hábitat natural en forma de reservas naturales es la vía más adecuada para mantener a una especie, hecho que permite una interacción estrecha con su entorno y que continúe evolucionando en el ecosistema (Barrett y Kohn 1991). Sin embargo, esta aseveración en muchos casos puede ser una paradoja, debido a que en la actualidad la deforestación y destrucción de los ambientes naturales es devastadora, para el caso de bosques tropicales los hemos disminuido en más de un cincuenta por ciento de su extensión original (Wilson 1989). En regiones donde existen asentamientos humanos que viven de una agricultura o ganadería poco productiva y explotan ocasionalmente parte del recurso, el uso sustentable de los recursos naturales se plantea como otro sistema de conservación *in situ*, habitantes marginados que por desconocimiento de la potencialidad del recurso natural, lo destruyen o contribuyen en su extracción, panorama que es común observar en Latino América (Peters 1994; Caldecott *et al.* 1996). El establecer programas de desarrollo a través de análisis de ecología sustentable, que incluye necesariamente la participación de la comunidad rural en la protección del ecosistema por los habitantes de escasos recursos de la región, bajo concesiones del uso sostenible de la biodiversidad puede frenar, especialmente si se hace con la estricta participación y supervisión de instituciones de

investigación y/o gubernamentales (Peters 1994; Caldecott *et al.* 1996; Sayer *et al.* 1997). Bajo este esquema se pueden utilizar los recursos naturales para la alimentación, explotación forestales, farmacéutica, agrícola y sus derivados. En muchas especies en peligro de extinción, el uso ornamental que se les ha asignado a nivel internacional, acelera su desaparición, por lo que se debe tener cuidado en el planteamiento a seguir y el que se respete y vigile su cumplimiento, estos programas de uso sustentable vinculados con sistemas de horticultura, podrían tener un impacto en el beneficio de la naturaleza y en la calidad de vida de sus habitantes. Se ha demostrado en varios casos que, entre más se limite el uso del recurso, existe un incremento del saqueo de especies y alteración del ecosistema (Caldecott *et al.* 1996).

La reintroducción de especies nativas en su hábitat ha sido aplicada recientemente, iniciándose desde la década de los cincuenta, estableciéndose con especies animales (aves y mamíferos (Ashton 1988). Para el caso de plantas podría contemplarse desde la década de los ochenta, en gran medida este retraso está fundamentado por los igualmente recientes líneas de investigación en ecología de poblaciones de especies amenazadas. Entre los pocos ejemplos existentes de reintroducción de plantas amenazadas se encuentran: para zonas tropicales, la reintroducción de especies de orquídeas mexicanas propagadas a partir de la germinación asimbiótica de semillas (Martínez-Palacios 1991); en zonas templadas se realizó con *Amsinckia grandiflora* a partir de semillas (Pavlik *et al.* 1993); para *Cercocarpus traskiae* a través de liberar clones (Mistreta 1994); en zonas áridas, desierto de Arizona, se reintrodujeron plantas (de semillas) de *Mammillaria thornberi* (Ecker 1989).

(2) Conservación *ex situ*. Tal y como se mencionó anteriormente, la vía más adecuada para la conservación de la flora es en su ambiente natural (Elias 1986; Barrett y Kohn 1991), sin embargo, debido la alteración continua de los ecosistemas naturales, acompañado por el saqueo de plantas, la introducción de especies agresivas y de pestes entre otros factores, que afectan negativamente la existencia de las especies con su entorno, es necesario proponer alternativas de conservación *ex situ*.

En programas de conservación *ex situ* de la biodiversidad vegetal, los métodos pueden ser muy diversos en cuanto a la forma y a la efectividad, sin embargo, es necesario

utilizar todos los sistemas que permitan conservar la mayor diversidad genética de las especies (Frankel y Soulé 1981).

Se ha sugerido que sistemas artificiales de conservación como jardines botánicos y arboreta, aplicando programas eficientes de horticultura para mantener sus colecciones podrían llegar a participar en la conservación de especies en peligro de extinción (Elias 1986).

Los jardines botánicos durante muchos años han sido los mayores centros científicos y de educación de la riqueza florística (IUCN 1987). Han constituido islas artificiales de la diversidad de especies para la conservación de la variabilidad genética (Villa-Lobos 1988). Con más de 1400 jardines botánicos en el mundo, pueden convertirse en un futuro en las vitrinas del mundo, cubriendo parte de la diversidad de plantas (Villa-Lobos 1988).

Entre los sistemas de conservación *ex situ* se encuentran los bancos de esporas y semillas, aplicable a especies con semillas ortodoxas (que permiten ser almacenadas sin que se active la germinación). Representan sistemas eficientes para conservar por un período largo una gran cantidad de variabilidad genética, sin sufrir cambios y ocupando un espacio reducido (Roberts 1975; Ford-Lloyd y Jackson 1986), pueden establecerse en instituciones como jardines botánicos. Sistema de conservación que actualmente se aplica eficientemente en especies agrícolas como el maíz por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) en México, entre otras especies en diversos países en desarrollo (Williams 1989). Los embriones de semillas se almacenan a temperaturas bajas (de hasta -20°C) y bajos contenidos de humedad (5-8%) dentro de frascos sellados herméticamente donde pueden mantener su viabilidad por periodos largos (Roberts 1975). Harrington (1972) reporta bajo estas condiciones, sobrevivencia récord de 158 años en semillas de *Cassia* y de 100 años en *Trifolium*. Este proceso requiere de un mantenimiento continuo de las condiciones de conservación, por lo general resulta costoso, sin embargo, este método se utiliza en instituciones de investigaciones agrícolas y forestales.

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales son una herramienta aplicada en la conservación de especies hortícolas que pueden acoplarse a especies en peligro de

extinción (Ford-Lloyd y Jackson 1986; George 1993). Estas técnicas se han aplicado eficientemente en la propagación de un gran número de especies, utilizando diferentes explantes (fragmento de tejido u órgano de una planta), como los meristemos, tallos, cotiledones, tejidos haploides, etc., y así lograr diversas respuestas morfogénicas. Dependiendo del explante y la vía morfogénica de los cultivos, es posible mantener la estabilidad o inducir variabilidad genética (Ford-Lloyd y Jackson 1986; George 1993). Los métodos usados en la conservación de plantas *in vitro*, inducen el mínimo crecimiento, involucrando tres factores (Ford-Lloyd y Jackson 1986): (1) la alteración de las condiciones físicas del medio, generalmente relacionado con el uso de temperaturas más bajas a las requeridas en su desarrollo normal. Por ejemplo, la papa, fresa y manzana pueden ser almacenadas a 0-6°C y otras como la yuca (*Manihot esculenta*) y el plátano (*Musa spp.*), requieren de temperaturas en un intervalo de 15-20°C; (2) alteración del medio basal, al omitir o reducir un elemento importante en el desarrollo normal de la planta; (3) uso de inhibidores o retardadores del crecimiento, como el ácido abscísico, o compuestos con efectos osmóticos, como al sustituir el azúcar por manitol o sorbitol. La utilización de estas técnicas *in vitro* en programas de conservación podrían llegar a evitar pérdidas de germoplasma por posibles catástrofes ambientales (Frankel y Soulé 1981). Aunque los sitios o cámaras de conservación los descuidos pueden llevar a presentarse siniestros como incendios, que en el mejor de los casos no manifieste una pérdida total, pero si una reducción de la variación genética.

La criopreservación podría llegar a ser uno de los sistemas más eficientes para conservar germoplasma por tiempo indefinido, almacenando tan solo células de potencial embriogénico o tejidos como meristemos. Estos sistemas que permitirían que una gran cantidad de individuos ocuparan un espacio muy pequeño durante su conservación y en el momento que se requiriera se regenerarían individuos con genotipo idéntico al donador (Kartha 1981, 1982). Sin embargo esta técnica de criopreservación a temperatura del Nitrógeno líquido (-196°C) dista aún de ser aplicada para la preservación por un periodo considerable de tiempo, pues la viabilidad de las células y tejidos disminuyen considerablemente; en promedio el almacenaje ha sido registrado por periodos de meses hasta de dos años (Bajaj 1981; Yamada *et al.* 1991). Se requiere de más investigación para

llegar a aprovechar su verdadero potencial en la criopreservación de germoplasma vegetal como ciertamente es posible en algunos tejidos animales, particularmente con esperma (Ford-Lloyd y Jackson 1986; George 1993).

El almacenamiento criogénico de semillas *in vitro*, en un futuro podría ser otra alternativa para preservar por periodos largos patrones de variación genética natural dentro de muestras de poblaciones (Ashton 1988). Integrando sistemas de bibliotecas de ADN, los cuales son probablemente las formas más estables para almacenar información genética (Ashton 1988), aunque por el momento este sistema no permite la regeneración de un individuo a partir de únicamente el ADN. Sin embargo, ya se practica la criopreservación de gametos y células de animales exóticos (en peligro de extinción), para en unas décadas intentar implantar el genoma en animales domésticos (Dresser 1991; Kumamoto *et al.* 1991).

Otro sistema de conservación *ex situ* puede ser posible utilizando diferentes programas, como los aplicados para la conservación de germoplasma con potencial y uso agrícola, donde se han establecido parcelas o viveros por lo general en el país que se presenta la mayor diversidad y/o uso del recurso, utilizando cultivos intensivos aplicables a las especies recalcitrantes, donde se carece de semilla biológica o su estado fisiológico de desarrollo de semilla a plántula es inmediato y no permite ser almacenada, siendo el caso de muchas especies tropicales. En el Centro Internacional de la Papa (CIP) en Lima Perú entre muchos otros centros internacionales que la Organización de la Agricultura y Alimentación (Food and Agriculture Organization, FAO) conservan regionalmente especie(s) silvestre(s), así como variedades agrícolas mejoradas genéticamente para la alimentación y desarrollos regionales (Ford-Lloyd y Jackson 1986; Williams 1989). Sistema que al igual que las semillas podrían ser parte de programas de conservación de jardines botánicos.

El conocimiento teórico práctico hasta el momento establecido para la conservación de germoplasma bajo condiciones *in situ* y *ex situ*, podría ser de fundamental importancia para evitar la extinción de especies silvestres amenazadas. En México casi cualquier especie resulta "terreno virgen", para ello, *Agave victoriae-reginae* es un ejemplo.

c) *Agave victoriae-reginae* T. Moore, Agavaceae. El clima de diversas regiones áridas de Norte América ha estado sujeto a continuas fluctuaciones durante el ciclo glacial-interglacial del Pleistoceno, lo que sugiere que pudo haber dado las condiciones para establecerse un escenario de evoluciones aceleradas, flujo e intercambio de genes y aislamientos geográficos generando pequeñas y dispersas poblaciones, regiones ricas en especies y endemismos (Burgess 1985). Sin embargo, estudios pioneros muestran que ésta riqueza se gestó desde el Terciario Medio o antes (Rzedowski 1962). Particularmente, las zonas áridas de México son las que ejemplifican estos cambios evolutivos, dando origen a una gran diversidad de especies, fenómeno que se puede constatar en dos de las Familias con mayor representación: Cactaceae y Agavaceae. En esta última se ejemplifica este fenómeno de evolución, señalando a México como centro de origen y variación (Gómez-Pompa 1963; Rzedowski 1993). Aunque existen pocos estudios sobre genética y ecología en estas especies, estudios a nivel cromosómico sugieren que la variación en agaves es debida, principalmente a cuatro factores: (a) elevado número cromosómico, (b) fenómeno de poliploidía, (c) introgresiones o hibridación con otras especies e inclusive con híbridos, y (d) a la apomixis o variación por reproducción vegetativa (por hijuelos y/o propágulos de la inflorescencia) en especies carentes o con una limitada reproducción vía sexual (Gómez Pompa 1963; Gentry 1982).

El género *Agave*, se cree que se originó en los desiertos de México y es aquí donde se diversificó taxonómica y morfológicamente (Rzedowski 1991a, 1993). El 75% (198) de las especies de este género se encuentran en México, de las cuales el 55% son endémicas (García-Mendoza 1995).

Agave victoriae-reginae T. Moore es una especie de Agavaceae del subgénero *Littaea*, endémica de México, con una distribución limitada a zonas de los estados de Coahuila, Durango y Nuevo León, entre los 100°-104° longitud oeste y 25°-27° latitud norte. Se encuentra restringida a afloramientos de carbonato de calcio, usualmente sobre paredes verticales, lo cual le confiere una distribución discontinua o en "islas" (Gentry 1982).

Los factores antropogénicos que alteran a las poblaciones silvestres de *A. victoriae-reginae* son principalmente de dos tipos: (a) la colecta de plantas y semillas para

su comercialización como ornamental, alcanzando un alto valor comercial en el mercado internacional; y (b) la destrucción del hábitat natural (paredes), del cual se extrae mineral por compañías cementeras y mármol en roca. Por su endemismo y su crítica situación ha sido catalogada en peligro de extinción por autoridades del país (Anónimo, 1994) e internacionales (CITES, 1995). CITES inscribe a esta especie como el agave más amenazado en México, incluido en el Apéndice II (CITES, 1995).

Posición taxonómica de *Agave victoriae-reginae* T. Moore (Dahlgren *et al.* 1985 desde supra género y Gentry 1982 desde género).

División:	Angiospermae
Clase:	Liliopsida
Subclase:	Liliidae
Orden:	Asparagales
Familia:	Agavaceae
Subfamilia:	Agavoideae
Género:	<i>Agave</i>
Subgénero:	<i>Littaea</i>
Grupo:	Marginatae
Especie:	<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore (1875)
Sinonimias:	<i>Agave consideranti</i> Carr. (1875) <i>Agave fernandi-regis</i> Berger (1915) <i>Agave nickelsii</i> R. Grosselin (1895).

Descripción taxonómica (tomado de Gentry 1982). Plantas variables, pequeñas, compactas, solas a cespitosas, tallos cortos sin ramificaciones. Hojas cortas, verdes con líneas blancas, conspicuas, generalmente estrechamente imbricadas, de 15-20 cm de largo (menos de 25 cm) x 4-6 cm de ancho, línea ovalada, redondeada en el ápice, rígido, grueso, plana a cóncava en la parte alta, redondeada a afilada en la parte inferior de la quilla; margen blanco, endurecido, sin dientes, 2-5 mm de ancho, continuo hasta la base; espinas terminales 1-3, 1.5-3 cm de longitud, triangular-cónica, subuladas, muy anchas en

la base, con una ranura ancha en la parte superior, quilla negra, redondeada en la parte inferior. Inflorescencia espigada, 3-5 m de alto, erecta. Flores de manera densa de la mitad hacia el ápice, el pedúnculo con brácteas cartáceas, flores en pares o triadas, sobre pedicelos cortos de 40-46 mm de longitud, con diversos colores, los tépalos y estambres frecuentemente matizados de rojo o púrpura. Tépalos de 18-20 x 5-6 mm, lineares, apicalmente redondeados, extendidos, los filamentos cerrados al término de la antesis y erectos, el interior fuertemente aquillado. Estambres con filamentos de 45-50 mm de longitud, insertados sobre un tubo circular; anteras 18-21 mm de longitud, amarillas o bronceadas, céntricas o excéntricas. Ovario 18-24 mm de longitud, fusiforme, con cuello corto, tubo poco profundo, extendido, 3 x 8-10 mm; Frutos ovoides a oblongas, de 17-20 x 10-13 mm, redondeadas en la base, apiculadas. Semillas 3-5 x 2.5-3.5 mm, hemisféricas a lacrimiformes, venoso sobre las caras, el margen alado.

Aunque dentro de los objetivos de la presente investigación no se contempló la posible diferenciación taxonómica entre las poblaciones, se observaron algunas características taxonómicas que difieren a la población del Neotipo (20-27 km NE de Saltillo Coah.) descrito por Gentry (1982). Esta población difiere de las dos poblaciones vecinas de los alrededores de la Ciudad de Monterrey, N. L. En las plantas de la población ubicada al N del estado de Nuevo León, presenta una sola espina terminal, con forma acicular, carácter que se observó en las plantas de las localidades colectadas, las hojas presentan una concavidad marcada, tendiendo a la intersección de las puntas en el ápice de la planta. En las poblaciones al Norte de Coahuila, la espina terminal y la línea blanca tienden a desaparecer, presentándose en la mayoría de los casos en forma reminiscente, a diferencia de la población 3 donde las hojas tienden a ser radiales al tallo, la línea blanca muy marcada. Lo anterior, sugiere la necesidad de revisar la taxonomía para las diferentes poblaciones.

Usos de los agaves. Los agaves representan para las zonas áridas y semiáridas un recurso cuyo uso, en algunos casos se remonta a 7000 años a.C. Entre los usos más importantes que han trascendido su aplicación local, podemos describir su empleo en: (a) La alimentación, contempla diversas formas de preparación, desde el cocimiento de tallos, en hornos en los cuales se introducen los tallos con rocas incandescentes, sellándolos para

evitar la pérdida de humedad, una vez cocida la “piña” es cortada en trozos para ser consumida o almacenada (Granados 1993; Nobel 1994); otro uso alimenticio es la extracción de aguamiel directamente de la secreción de savia del tallo o su fermentación por almacenaje (Gentry 1982; Granados 1993). En otros casos, la fermentación alcohólica se desarrolla directamente del uso de tallos para la producción de mezcal, el cual ha llegado a tal magnitud de industrialización que actualmente se distribuye a nivel mundial (Gentry 1982; Granados 1993; Nobel 1994); (b) La fabricación de textil: es otro uso importante de diversas especies en zonas áridas; donde se aprovechan las fibras de las hojas para generaran hilos, cordeles y tejidos con diversas aplicaciones (Gentry 1982; Granados 1993; Nobel 1994); y (c) Diversas aplicaciones locales: como fuente de medicinas, de papel, para preparación de alimentos, adornos, etc. (Gentry 1982; Granados 1993; Nobel 1994). El uso adecuado que se les da a un gran número de especies silvestres nativas, le ha permitido al humano adaptarse y sobrevivir en un ambiente hostil aprovechando al máximo sus recursos (Gentry 1982; Granados 1993).

Uso del *Agave victoriae-reginae* (llamada regionalmente Noa). La información fue obtenida de habitantes de las diferentes regiones donde se distribuye la planta, a través de encuestas locales realizadas durante el recorrido de las dos salidas al campo. Los pastores ocasionalmente consumen el quiote, masticándolo y extrayéndole los azúcares. En los alrededores de la Ciudad de Saltillo, que presentan un ambiente de loma, se observaron las plantas de Noa más robustas de la especie, con pencas grandes y vigorosas, se encontraron plantas con los diámetros mayores (más de 70 cm); de estas plantas se tomaron muestras de hojas para el estudio isoenzimático. El Sr. Roberto Landeros, ganadero de la región SE de Saltillo, relató que en su niñez y adolescencia fue pastor y recorría continuamente todas las lomas. Nos informó sobre las localidades de distribución de la Noa, de su abundancia y que hace más de 40 años se les extraía fibra para producir cuerdas o reatas para los “caballerangos” (jinetes que empleaban la cuerda para lazar ganado vacuno y caballar), indicando que eran de mejor calidad que la generada de *Agave lechuguilla*. En los alrededores de la Comarca Lagunera, procesan plantas de Noa a nivel doméstico para obtener dulce horneado (Eduardo Blanco, comunicación personal), posiblemente ante la falta del dulce de mezcal importado del estado de Jalisco. El uso

ornamental de la Noa alcanzó un nivel internacional (Martínez-Palacios, 1991), su prohibición y la falta de sistemas de propagación presentan que actualmente el mercado internacional ofrezca 200 dólares por planta (S. Franco, com. pers.). En la demanda existente, se cuentan con documentos de carácter oficial con fecha 1985 y 1986 sobre permisos de exportación de hasta 100 mil plantas de Noa, la cual se exportaba a los Estados Unidos por el estado fronterizo de Texas (Martínez-Palacios 1991). Y de manera extraoficial, se ha sabido de ofrecimientos de compra por viveristas Australianos de plantas de Noa adultas hasta por un costo de 200 dólares por planta.

En este trabajo se estudiaron diferentes aspectos de biología de la conservación de *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae), especie endémica del desierto Chihuahuense y en peligro de extinción. Se abordaron entre otras áreas, genética y ecología de poblaciones, germinación y conservación de semillas y propagación por cultivo de tejidos. Aspectos que en forma integrativa permitieran aportar información para proponer alternativas para su conservación, por lo cual se plantearon los siguientes objetivos generales:

- (1) Aportar información y determinar la estructura genética de las poblaciones de la Noa (*A. victoriae-reginae*) a partir del análisis electroforético de isoenzimas en plantas silvestres, con la finalidad de conocer el estado de variación genética dentro y entre las poblaciones estudiadas.
- (2) Evaluar algunos parámetros ecológicos estáticos en 10 poblaciones silvestres de la Noa, para determinar el estado de alteración y algunos aspectos de reproducción de la especie, que permitan en forma integral con los factores genéticos proponer alternativas para su conservación *in situ*.
- (3) Iniciar la conservación de semillas *ex situ* con la finalidad de investigar factores involucrados en su conservación.
- (4) Desarrollar un método de propagación por cultivo de tejidos vegetales que demuestre que es viable para la estabilidad genética en el rescate de genotipos erosionados y para lograr una producción masiva de plantas de esta especie, abasteciendo la demanda del mercado para reducir la colecta ilegal con fines comerciales de semillas y plantas silvestres.
- (5) Hacer disponible esta información como elementos de la biología de la conservación de *Agave victoriae-reginae*, para establecer su conservación y aprovechamiento sustentable.

Literatura citada

- Anónimo. 1994. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994, que determina las especies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección. Diario Oficial, Lunes 16 de mayo de 1994.
- Ashton P.S. 1988. Conservation of biological diversity in botanical gardens. Páginas 269-278, en: E.O. Wilson and F. Peter (eds.), Biodiversity. National Academy Press, Washington, D.C.
- Bajaj Y.P.S. 1981. Regeneration of plants from potato meristems, freeze-preserved for 24 months. *Euphytica* 30:141-145.
- Barrett S.C.H. y J.R. Kohn. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. Páginas 3-30, en: Donald A. Falk y K.E. Holsinger (eds.), Genetics and Conservation of Rare Plants. Oxford Univ. Press, New York.
- Burgess T.L. 1985. Agave adaptation to aridity. *Desert Plants* 72:39-50.
- Bye R. 1993. The role of humans in the diversification of plants in Mexico. Páginas 707-731, en: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, y J.Fa (eds.). Biological diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford Univ. Press, New York.
- Cade T.J. 1988. Using science and technology to reestablish species lost in nature. Páginas 279-288, en: E.O. Wilson and F. Peter (eds.), Biodiversity. National Academy Press, Washington, D.C.
- Caldecott J.O., M.D. Jenkins, T.H. Johnson y B. Groombridge. 1996. Priorities for conserving global species richness and endemism. *Biodiversity and Conservation* 5:699-727.
- Caro T.M. y M.K. Laurenson. 1994. Ecological and genetic factors in conservation: a cautionary tale. *Science* 263:485-486.
- CITES. 1995. Appendices I, II, and III to the convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. US Fish & Wildlife Service, Washington, DC
- Dahlgren R.N.T., H.T. Clifford y P.F. Yeó. 1985. The families of the monocotyledons. Structure, evolution and taxonomy. Springer-Verlag, Berlin.
- Dresser B.L. 1991. Tissue culture applications for exotic animal propagation. pp 77, en: G.H. Sato (ed.), *In Vitro* Cellular and Developmental Biology. W. Alton Jones Cell Sci. Center, Inc. New York.

- Ecker L. 1989. Long term maintenance of desert diversity: rare plant reintroductions. *Agave* 3:6-8.
- Eguiarte L.E. 1990. Genética de Poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. en Los Tuxtlas, Veracruz. Tesis doctoral. Centro de Ecología/UACPYP, UNAM.
- _____, N. Pérez-Nasser y D. Piñero. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm); implications for evolution and conservation. *Heredity* 68:217-228.
- Elias T.S. 1986. Can threatened and endangered species be maintained in botanic gardens?. Páginas 5-8, en: T.S. Elias (ed.), Conservation and Management of Rare and Endangered Plants. Proceeding from a conference of the California Native Plant Society, Claremont, CA.
- Ford-Lloyd B. y M. Jackson. 1986. Plant Genetic Resources: an introduction to their conservation and use. Edward Arnold, Baltimore. USA.
- Frankel O.H. y M.E. Soulé. 1981. Conservation and Evolution. Cambridge Univ. Press, London. 327 pp.
- Frankham R. 1995. Conservation Genetics. *Ann. Rev. Genetics* 29:305-327.
- García-Mendoza A. 1995. Riqueza y endemismo de la familia Agavaceae en México. Páginas 51-75, en: E. Linares, P. Dávila, F. Chiang, R. Bye, y T. Elias (eds.), Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Gentry S.H. 1982. Agaves of Continental North America. Univ. of Arizona Press, Tucson. 670 pp.
- George E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. 1. The technology. Exegetics Limited, 574 pp.
- Gómez-Pompa A. 1963. El género *Agave*. *Cact. Suculent. Méx.* 8:3-28.
- Granados S.D. 1993. Los agaves en México. Universidad Autónoma de Chapingo. 252 p.
- Harrington J.F. 1972. Seed storage and longevity. Páginas en: T.T. Kozlowski (ed.), Seed Biology. Academic Press, New York.
- Huenneke L.F. 1991. Ecological implications of genetic variation in plant populations. Páginas 31-44, en: D.A. Falk y K.E. Holsinger (eds.), Genetics and Conservation of Rare Plants. Oxford Univ. Press, New York.

IUCN. 1987. Secretaría para la conservación en jardines botánicos, presentación. Centro de Monitoreo para la conservación, Kew, U.K.

Kartha K.K.. 1981. Meristem culture and cryopreservation methods and applications. Páginas 181-211, en T.A. Thorpe (ed.), Plant tissue culture, methods and applications in agriculture. Academic Press, New York.

_____. 1982. Cryopreservation of germplasm using meristem and tissue culture. Páginas 139-161, en: D.T. Tomes, B.E. Ellis, P.M. Harney, K.J. Kasha y R.L. Peterson (eds.), Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture & Industry. University of Guelph, Ontario.

Kumamoto A., O. Ryder y M. Houck. 1991. Endangered species cell culture repository. pp 77, en: G.H. Sato (ed.), *In Vitro* Cellular and Developmental Biology. W. Alton Jones Cell Sci. Center, Inc. New York.

Lande R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* **241**:1455-1460.

Martínez-Palacios A. 1991. Propagación masiva *in vitro* y recuperación de poblaciones de orquídeas en peligro de extinción. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM, México. 100 p.

Martin P.S. y R.G. Klein. 1984. Quaternary Extinctions. Tucson: Univ. Ariz. Press. 892 pp.

Nobel P.S. 1994. Remarkable Agaves and Cacti. Oxford Univ. Press, New York.

Pavlik B.M., DL. Nickrent y A.M. Howald. 1993. The recovery of an endangered plant. I. Creating a new population of *Amsinckia grandiflora*. *Conservation Biology* **7**:510-526.

Peters Ch.M. 1994. Sustainable Harvest of non-timber plant resources in tropical moist forest: an ecological primer. Biodiversity Support Program. Corporate Press Inc., Landover, MD.

Raup D.M. y J.J. Sepkoski. 1982. Mass extinctions in the marine fossil. *Science* **215**:1501-1503.

Raven P.H. 1976. Ethics and attitudes in conservation of threatened plants. Nato Conference Series, 1. *Ecology* **1**:155-180. Plenum Press, New York.

Roberts E.H. 1975. Problems of long-term storage of seed and pollen for genetic resources conservation. Páginas 269-295, en: O.H. Frankel y J.G. Hawkes (eds.), *Crop*

Genetic Resources for Today and Tomorrow. International Biological Programme 2. Cambridge Univ. Press.

Rzedowski J. 1962. Contribuciones a la fitogeografía florística e historia de México I. Algunas consideraciones acerca del elemento endémico en la flora mexicana. Bol. Soc. Bot. Méx. 27:52-65.

_____. 1991. Diversidad y origen de la flora fanerogámica de México. Act. Bot. Mexicana. 14:3-21.

_____. 1993. Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico. Páginas 129-144, en: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, y J. Fa (eds). Biological Diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford Univ. Press, New York.

Sayer J.A., J.K. Vanclay y N. Byron. 1987. Technologies for sustainable forest management: challenges for the 21st century. CIFOR, No. 12

Soulé M.E. 1991. Conservation: tactics for a constant crisis. Science 253:744-750.

Toledo V.M. y M. J. Ordóñez. 1993. The biodiversity scenario of Mexico: a review of terrestrial habitats. Páginas 757-777, en: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, y J. Fa (eds). Biological Diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford Univ. Press, New York.

Vázquez Y.C. y A.S. Orozco. 1989. La Destrucción de la Naturaleza. Fondo de Cultura Económica, Colección La Ciencia desde México, No. 83, México.

Villa-Lobos, J. 1988. Threatened Plant List of Middle America. IUCN, U. K.

Vovides A.P. 1989. Problems of endangered species conservation in Mexico: cycads an example. Encephalartos 29:29-35.

Williams J.T. 1989. Plant germplasm preservation: a global perspective. Páginas 81-96, en: L.Knutson y A.K. Stoner (eds.), Biotic Diversity and Germplasm Preservation, global imperatives. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Wilson E.O. 1989. Threats to biodiversity. Scient. Amer. 261:60-66.

Wolf C.E. 1988. Avoiding a mass extinction of species. State of the World, USA. 101-117.

Yamada T., A. Sakai, T. Matsumara y S. Higuchi. 1991. Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.). Plant Science 73:111-116.

CAPITULO II

CONSERVATION GENETICS OF THE ENDANGERED ENDEMIC *Agave victoriae-reginae* (AGAVACEAE) IN THE CHIHUAHUAN DESERT.

**CONSERVATION GENETICS OF THE ENDANGERED ENDEMIC *AGAVE*
VICTORIAE-REGINAE (AGAVACEAE) IN THE CHIHUAHUAN DESERT**

ALEJANDRO MARTINEZ-PALACIOS¹, LUIS E. EGUIARTE², AND GLENN R. FURNIER³

¹Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-614, México, D. F., 04510, México; ²Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, México, D. F., 04510, México;

³Departments of Plant Biology and Forest Resources, University of Minnesota, 220 Biological Sciences Center, 1445 Gortner Avenue, St. Paul, Minnesota 55108-1095, U.S.A.

Acknowledgments

This research was supported by CONABIO project B147, PADEP-UNAM project 003327, PAPIIT-DGAPA project IN-205894 to L.E.E., and a Bush sabbatical fellowship to G.R.F. The authors thank Víctor Chávez Avila, Robert Bye B., Jordan Golubov, Valeria Souza and Juan Nuñez-Farfán for their comments and suggestions; Nidia Pérez-Nasser for expert technical assistance in the lab; Patricia Delgado and Pilar Ortega assisted with the electrophoresis; America Castañeda S. and Liz Y. Izquierdo assisted with the BIOSYS-1 and Weir and Cockerham analysis; Mario Monroy, Martin Mata R. and Eduardo Blanco C. provided untiring assistance in the field. This paper forms part of the doctoral thesis of the first author.

⁵Author for correspondence (furnier@tc.umn.edu, 612-624-3720 [phone], 612-625-5212 [fax]).

ABSTRACT

Long-lived perennials are a species-rich, ecologically important component of the North American deserts, yet we know little about their genetic structure, information important for their conservation. *Agave victoriae-reginae* is an endemic of the Chihuahuan Desert of northern Mexico that is endangered by collection for the ornamental trade. We examined levels and patterns of variation at ten polymorphic isozyme loci in ten populations representing the range of the species. Levels of genetic variation (mean $H_e = 0.335$) and differentiation (mean $F_{ST} = 0.236$) were high. Phenetic clustering suggested the existence of at least three distinct groups of populations that may represent separate species or subspecies. If this pattern of variation is representative of other long-lived desert perennials it may explain the species richness of this group and will pose a real challenge to gene conservation efforts.

Key words: *Agave*, isozyme, conservation.

Long-lived perennials are a species-rich, ecologically important component of deserts, particularly in Mexico, where they display high levels of endemism (Gentry, 1982; Rzedowski, 1993; García-Mendoza, 1995; Hernández and Bárcenas, 1995, 1996). They are also very susceptible to human-caused disturbances and, consequently, the rate of loss of these communities is very high in Mexico (Bye, 1993). Knowledge of the genetic structure of desert plants is central to understanding their evolutionary dynamics and to conservation strategies (Eguiarte et al., 1992), but we know relatively little about the population genetics of long-lived desert perennials.

In the deserts of North America, Agavaceae are a dominant family with very high species diversity and endemism, and many endangered species. For example, 75% (198 species) of all *Agave* species are found in Mexico, 55% of which are endemic (García-Mendoza, 1995). Virtually nothing, however, is known about their genetic structure. The only reported study of the population genetic structure of an *Agave* focused on testing the optimal outcrossing hypothesis and provided no information on broad scale patterns of genetic variation (Trame et al., 1995).

Agave victoriae-reginae T. Moore is an endemic species of subgenus *Littaea* found only on limestone outcrops, usually on vertical walls, in very localized populations in the northern Mexican states of Coahuila, Durango, and Nuevo Leon (Gentry, 1982; Fig. 1). The species is diploid ($2n = 60$; Bhattacharyya, 1968) with low levels of clonality (Gentry, 1982). It is one of the most popular ornamental *Agave* species and large plants command high demand in many countries (Martínez-Palacios, 1991). Hence, the rate of illegal and uncontrolled collection for commercial trade has been very high, leading it to be one of the few *Agave* listed as endangered by the Mexican government (Anonymous, 1994) and CITES (CITES, 1995).

We used isozymes to examine genetic structure of *A. victoriae-reginae* throughout its known distribution. We were particularly interested in levels of variation within populations and differentiation among populations, information that will be used in conjunction with ecological and demographic data to propose an integral conservation strategy for the species.

MATERIALS AND METHODS

We collected an intermediate green leaf from each of approximately 40 adult individuals in each of ten populations, representing the full geographic range of *A. victoriae-reginae* (Figure 1, Table 1). We tried to sample the entire area of each population, choosing the larger non-reproductive (as the plants are monocarpic) healthy individuals. This sampling procedure apparently does not affect survival or reproduction of the individuals (Martínez-Palacios, 1998). A 2 × 2 cm piece of the base of each leaf was stored in liquid nitrogen and transported to Mexico City, where the samples were then stored at -80°C.

Standard methods of starch gel electrophoresis were followed (Soltis et al., 1983). Leaves were macerated with an electric drill, using 10-15 drops of an extraction buffer composed of a 3:1 mixture of the Veg II buffer of Pitel and Chelak (1984) and the buffer of Yeh and O'Malley (1980). The extract was adsorbed on 12 × 1.5 mm chromatographic paper wicks and stored at -80°C until electrophoresis.

Isozymes were separated by electrophoresis at 60 mA for 6-7 h on 12% starch gels (450 ml). We used the LiOH buffer 8 of Soltis et al. (1983), with gel buffers of two different pHs. We analyzed diaphorase (E.C. 1.6.4.3, DIA, two loci), esterase (E.C. 3.1.1.1, EST, two loci), leucine aminopeptidase (E.C. 3.4.11.1, LAP, one locus), and phosphoglucose isomerase (E.C. 5.3.1.9, PGI, two loci) at pH 7.6 and glutamate oxaloacetate transaminase (E.C. 2.6.1.1, GOT, one locus), malic enzyme (E.C. 1.1.1.40, ME, one locus), and acid phosphatase (E.C. 3.1.3.2, ACP, one locus) at pH 8.0. Enzyme stain recipes were those of Soltis et al. (1983).

The fastest migrating loci and alleles were designated 1, followed by 2, 3, etc. For each population, we estimated the proportion of polymorphic loci (P), expected heterozygosity (H_e), the mean (A) and effective (A_e ; Hedrick, 1983) numbers of alleles per locus, and the average fixation index (F). We used X^2 tests to test for deviations from genotypic frequencies expected under Hardy-Weinberg equilibrium (Snedecor and Cochran, 1967) and for heterogeneity of allelic frequencies among populations (Workman and Niswander, 1970). When the expected number of individuals in a class was less than 1, we bulked the least common alleles until all classes had an expected number of at least 1. When

bulking of alleles did not meet this goal, we did not perform the test because it was considered unreliable (Snedecor and Cochran, 1967). We used Bonferroni's method to achieve an experiment-wide α of 0.05 (Weir, 1990).

Wright's (1965) F statistics were estimated using Weir and Cockerham (1984), using a modified version of Weir's (1990) program (Alvarez-Buylla et al., 1996). From the F_{ST} values, we estimated Nm $[(1/F_{ST})-1]/4(n/n-1)^2$, where n is the number of populations; Crow and Aoki, 1984) and an indirect estimate of the neighborhood effective population size in a stepping stone migration model ($N_b = 2\pi Nm$; Slatkin and Barton, 1989; Eguiarte et al., 1993). We tested the hypothesis of an isolation by distance pattern of genetic differentiation (Slatkin, 1993) by estimating the Nm value for each pair of populations from their pairwise estimate of F_{ST} , defined as M ($=(1/F_{ST})-1$)/4; Slatkin, 1993), and plotting the logarithm of M against the logarithm of the geographic distance (Slatkin, 1993, 1994). If the population follows an isolation by distance migration model, the slope of the graph should be -1.0 for linearly distributed populations and of -0.5 for the case of gene flow in two dimensions (Slatkin, 1993, 1994). Phenetic clustering of the populations was performed using Nei's (1978) unbiased genetic distances and the UPGMA algorithm (Sneath and Sokal, 1973).

We estimated population sizes to examine whether they were related to measures of genetic variability. In population 1-3 and 5-8 we counted the number of plants in one to five 120 m² plots. The density figures obtained from these plots were then multiplied by the total area of the population to estimate population size. We were unable to sample plots in populations 4, 9, and 10; for those populations we used the mean density of the other populations to estimate population sizes.

RESULTS

The ten assayed loci were polymorphic, with an average of 2.2 alleles per locus and a mean effective number of alleles per locus of 1.5 (Tables 1, 2). On average, 83% of the loci were polymorphic in each population and mean expected heterozygosity was 0.335 (Table 1). Levels of heterozygosity were not correlated with the number of individuals in the populations nor with other ecological characteristics (Table 1). Fixation indices varied

widely among populations (Table 1). Of the 58 valid tests for deviation from genotypic frequencies expected under Hardy-Weinberg equilibrium, 16 indicated a significant deficiency of heterozygotes and 7 indicated a significant excess ($\alpha' = 0.0009$ to maintain an experiment-wide α of 0.05; Tables 1, 3).

Average F_{IS} estimates varied widely among loci, but the average was not significantly different from zero (Table 3). Allelic frequencies differed significantly ($p < 0.0001$) among populations at all loci, except *Pgi2* ($p = 0.009$, $\alpha' = 0.005$ to maintain an experiment-wide α of 0.05; Table 2) and the mean F_{ST} estimate was high (0.236) and significantly different from zero (Table 3), indicating a high level of differentiation among populations.

Estimates of Nm (1.82) and Nb (11.44), obtained from F_{ST} , were both relatively low (Table 3). There was a negative relationship between geographic distance and the pairwise estimated gene flow (Fig. 2), with a slope of -0.469, very close to the theoretical value of -0.5 for the two dimensional gene flow isolation by distance predictions (Slatkin, 1993, 1994). The r^2 was relatively high, 0.213, indicating that there a significant relationship between genetic and geographic distances between populations, but the significance is difficult to estimate, due to the non-independence of the data. Hellberg (1996) has suggested the use of the number of populations as the degrees of freedom. If we use the total number of data points $p < 0.0014$, while if we use the number of populations, $p > 0.05$. In general, estimated gene flow (M) was higher than 1 between populations separated by less than 100 km, indicating little genetic differentiation, whereas populations separated by more than 100 km were genetically quite different.

Genetic distance was relatively high between all pairs of populations (mean $D = 0.182$) and the phenogram showed striking differences among groups of populations, with at least three clusters of clearly differentiated populations (Fig. 3) The central populations (4, 5, 8, 9, 10) formed a clear cluster (average $D = 0.091$) that was very different from the other cluster, which included two groups, one with the eastern populations (1, 2, 3; average $D = 0.097$) and the other with the western populations (6, 7; $D = 0.025$). The average genetic distances between the central and eastern populations was 0.211, between the central and western populations 0.250, and between the eastern and western populations 0.189.

DISCUSSION

Agave victoriae-reginae displays high levels of genetic diversity, both at the population and species levels, and high levels of differentiation among populations. The fixation indices indicate that there is relatively little inbreeding in the populations, possibly due in part to pollinator efficiency, presumably bees, hummingbirds, bats, and moths (Gentry, 1982). The high levels of genetic variation are consistent with the relatively large population sizes (Martínez-Palacios, 1998) and suggest that the populations have not experienced a recent bottleneck. They are also consistent with findings for other long lived plants (Hamrick and Godt, 1989; Eguiarte, Pérez-Nasser, and Piñero, 1992). In contrast, the high levels of interpopulation differentiation are not consistent with results from most other studied long lived perennial plants, which usually have very low levels of genetic differentiation, as measured by isozymes (Eguiarte, Pérez-Nasser, and Piñero, 1992; Hamrick et al., 1992).

The few studies of population genetic structure of long-lived desert perennials have yielded varying results. In the Cactaceae, one of the other major family of the North American deserts, the tetraploid *Echinocereus engelmannii* var. *munzii* of southern California, displays high levels of genetic variation within populations, but low differentiation among populations (Neel, Clegg, and Ellstrand, 1996). The columnar cactus *Lophocereus schottii* of southern Arizona also displays high levels of genetic variation both at the species ($H = 0.145$) and population (average $H = 0.126$) levels, with substantial differentiation among subpopulations ($G_{ST} = 0.130$) and an excess of heterozygous individuals ($F_{IS} = -0.187$) (Parker and Hamrick, 1992). In contrast, *Washingtonia filifera* (Arecaceae), a long-lived desert monocotyledon of southern California, displays very low levels of genetic variation ($H = 0.008$) and very little differentiation among populations ($G_{ST} = 0.023$; McClenaghan and Beauchamp, 1986). Keys and Smith (1994) found little differentiation ($F_{ST} = 0.07$) among three populations of the pioneer dicotyledon tree *Prosopis velutina* (Fabaceae) in southeastern Arizona.

The relatively high levels of differentiation observed among populations of *A. victoriae-reginae* could have arisen by high levels of genetic drift, mutations occurring over

a very long period since the populations were separated, and/or local selection on the isozyme loci or linked loci. The relatively high levels of variation observed in all populations and their relatively large total estimated population sizes (Martínez-Palacios, 1998) suggest that drift has not played a strong role recently, although it could have led to differentiation in the distant past, followed by a recovery of variation. Our data do not permit us to make inferences about selection on the isozyme loci nor linked loci, but the outcrossing breeding system makes genetic linkage less of a factor and there are relatively few well-documented examples of selection on isozyme loci (Mitton, 1994). Despite a lack of detailed information on pollen and seed dispersal in *A. victoriae-reginae*, preliminary data suggest that it is predominantly pollinated by bees, which would be unlikely to fly the relatively long distances that separate the populations. This lack of gene flow would reinforce interpopulation differentiation.

In general terms, *Agave victoriae-reginae* displays a pattern of isolation by distance in two dimensions (Slatkin, 1993, 1994). Nevertheless the fit is not perfect, as the eastern and western populations are more similar to each other than to the central populations. The reason for this pattern of genetic differentiation is not clear and a more complete understanding of the geological and paleoclimatic conditions of the central Chihuahuan desert will be needed to understand the evolution of *A. victoriae-reginae*. Although isolation by distance was demonstrated in seagulls (Slatkin, 1993), it was not detected in the tropical tree *Cecropia obtusifolia* (Alvarez-Buylla and Garay, 1994) nor the temperate perennial herb *Aquilegia* sp. (Strand, Milligan, and Pruitt, 1996).

We found at least ten populations of *A. victoriae-reginae*, most with high numbers of individuals (Martínez-Palacios, 1998), but the taxon remains endangered. Populations growing on flat limestone outcrops have almost all been eradicated by collection for trade and the only healthy populations are now found on almost inaccessible sites on limestone walls of canyons (Martínez-Palacios, 1998). In the few remaining easily accessible populations (mainly growing on hills), commercial collection has decreased drastically in recent years because of stricter enforcement of collecting regulations and because the plants are now so rare as to make collection economically impractical. Their infructescences, however, are almost always removed to propagate the plants from seeds. Given the low

frequency of clonal recruitment in the species, this practice is potentially dangerous because each plant flowers only once after many years of life (e.g., *Agave horrida*, another member of subgenus *Littaea*, takes 30-70 years to attain reproductive size; L. E. E., unpublished data) and complete removal of the infructescence eliminates recruitment.

The high levels of differentiation among populations of *Agave victoriae-reginae* represents a real conservation challenge. In addition, we must consider the fact that isozymes often underestimate the levels of interpopulation differentiation for adaptive traits critical to the survival and reproduction of plants (Furnier et al., 1991). *Ex situ* conservation would be very difficult due to the need to maintain many large independent breeding populations to represent adequately the high amounts of diversity present in each of the very different natural populations. The long reproductive cycle could also be a complicating factor.

The levels of differentiation between populations of *A. victoriae-reginae* are comparable to those observed among different subspecies or even species in many plant genera (Crawford, 1983). Thus, the three distinct groups of populations shown by the phenogram may actually represent distinct species or subspecies and this potential taxonomic structure should be taken into account in the design of conservation strategies. The genetic distances between populations indicate significant differentiation among populations even within these groups. Although we do not have detailed information on the pollinators of this species, the geographic distances between populations suggest that gene flow between them is unlikely and that each population is likely an evolutionarily independent unit meriting conservation efforts. If levels of genetic differentiation as high as those found in *A. victoriae-reginae* are common in desert plants, it would help explain the high species diversity of desert plant families, such as the Agavaceae and Cactaceae, and would suggest that conservation of the genetic diversity of desert plant species will be a very difficult endeavor.

LITERATURE CITED

ALVAREZ-BUYLLA, E., AND A.A. GARAY. 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer tree species. Evolution 48: 437-453.

- _____, A. CHAOS, D. PIÑERO, AND A.A. GARAY. 1996. Demographic genetics of a pioneer tropical tree species: patch dynamics, seed dispersal, and seed banks. Evolution 50: 1155-1166.
- ANONYMOUS. 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994, que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestre terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y sujetas a protección especial y que establece especificaciones para su protección. SEDESOL, Diario Oficial de la Federación 488: 2-59.
- BHATTACHARYYA, G. N. 1968. Chromosomes in different species of *Agave*. Journal of Cytology and Genetics 3: 1-6.
- BYE, R. 1993. The role of humans in the diversification of plants in Mexico. In T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa [eds.], Biological diversity of Mexico: origins and distribution, 707-731. Oxford University Press, New York.
- CITES. 1995. Appendices I, II, and III to the convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. United States Fish and Wildlife Service, Washington, D.C.
- CRAWFORD, D.J. 1983. Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. In S.D. Tanksley and T.J. Orton [eds.], Isozyme in plant genetics and breeding, part A, 237-287. Elsevier, Amsterdam.
- CROW, J.F. AND K. AOKI. 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 6073-6077.
- EGUIARTE, L. E., N. PÉREZ-NASSER, AND D. PIÑERO. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. Heredity 68: 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.
- FURNIER G. R., M. STINE, C. A. MOHN, AND M. A. CLYDE. 1991. Geographic patterns of variation in allozymes and height growth in white spruce. Canadian Journal of Forest Research 21: 707-712.

- GARCÍA-MENDOZA, A. 1995. Riqueza y endemismo de la familia Agavaceae en México. In E. Linares, P. Dávila, F. Chiang, R. Bye, y T. Elias [eds.], Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques, 51-75. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- GENTRY, H. S. 1982. Agaves of continental North America. University of Arizona Press, New York.
- HAMRICK, J. L., AND M. J. W. GODT. 1989. Allozyme diversity in plant species. In A. H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler, and B. S. Weir [eds.], Plant population genetics, breeding, and genetic resources, 43-63. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- _____, _____, AND S. L. SHERMAN-BROYLES. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New Forest 6: 95-124
- HEDRICK, P.W. 1983. Genetics of populations. Science Books International, Boston. Massachusetts.
- HELLBERG, M.E. 1996. Dependence of gene flow on geographic distance in two solitary corals with different larval dispersal capabilities. Evolution 50: 1167-1175.
- HERNÁNDEZ, H. M., AND R. T. BÁRCENAS. 1995. Endangered cacti in the Chihuahuan Desert: I. Distribution patterns. Conservation Biology 9: 1176-1190.
- _____, AND _____. 1996. Endangered cacti in the Chihuahuan Desert: II. Biogeography and conservation. Conservation Biology 10: 1200-1209.
- KEYS, R. N., AND S. E. SMITH. 1994. Mating system parameters and population genetic structure in pioneer populations of *Prosopis velutina* (Leguminosae). American Journal of Botany 81: 1013-1020.
- MARTÍNEZ-PALACIOS, A. 1991. Propagación masiva *in vitro* y recuperación de poblaciones de orquídeas en peligro de extinción. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- _____. 1998. Evaluación genética y demográfica de *Agave victoriae-reginae* T. Moore y aplicación del cultivo de tejidos para su conservación. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

- MCCLLENAGHAN, L. R., AND A. C. BEAUCHAMP. 1986. Low genic differentiation among isolated populations of the California fan palm (*Washingtonia filifera*). Evolution 40: 315-322.
- MITTON, J.B. 1994. Molecular approaches to population biology. Annual Review of Ecology and Systematics 25: 45-69.
- NEEL, M. C., J. CLEGG, AND N. C. 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.
- PARKER, K. C., AND J. L. HAMRICK. 1992. Genetic diversity and clonal structure in a columnar cactus, *Lophocereus schottii*. American Journal Botany 79: 86-96.
- PITEL, J. A., AND W. H. CHELIAK. 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.
- RZEDOWSKI, J. 1993. Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico. In T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa [eds.], *Biological diversity of Mexico: origins and distribution*, 129-144. Oxford University Press, New York.
- SLATKIN, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. Evolution 47: 264-279.
- _____. 1994. Gene flow and population structure. In L.A. Real [ed.], *Ecological genetics*, 4-17. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- _____, AND N.H. BARTON. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. Evolution 43: 1349-1368.
- SNEATH, P.H.A., AND R.R. SOKAL. 1973. *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman, San Francisco, California.
- SNEDECOR, G. W., AND W. G. COCHRAN. 1967. *Statistical methods*, 6th edition. The Iowa State University Press, Ames, Iowa.

- SOLTIS, D. E., C. H. HAUFLER, D. C. DARROW, AND G. J. GASTRONY. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation of grinding buffers, and staining schedules. American Fern Journal 73: 9-27.
- STRAND, A.E., B.G. MILLIGAN, AND C.M. PRUITT. 1996. Are populations islands? analysis of chloroplast DNA variation in *Aquilegia*. Evolution 50: 1822-1829.
- TRAME, A. M., A. J. CODDINGTON, AND K. N. PAIGE. 1995. Field and genetic studies testing optimal outcrossing in *Agave schottii*, a long-lived clonal plant. Oecologia 104: 93-100.
- WEIR, B. S. 1990. Genetic data analysis. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- _____, AND C. C. COCKERHAM. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38: 1358-1370.
- WORKMAN, P.L., AND J.D. NISWANDER. 1970. Population studies on Southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. American Journal of Human Genetics 22: 24-49.
- WRIGHT, S. 1965. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating. Evolution 19: 395-420.
- YEH, F. C., AND D. M. O'MALLEY. 1980. Enzyme variation in natural populations of Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco, from British Columbia. I. Genetic variation patterns in coastal populations. Silvae Genetica 29: 83-92.

Table 1. Elevation (m above sea level), environment, estimated total number of individual (N), estimated density (N/m^2), and mean plant diameters (cm), mean number of plants assayed for isozyme genotype (n), mean number of alleles per locus (A , with standard deviations in parentheses), effective number of alleles per locus (A_e), percent loci polymorphic (P , locus considered polymorphic if the frequency of the most common allele does not exceed 0.95), mean expected heterozygosity (H_e , Nei's [1978] unbiased estimate with standard deviations in parentheses), mean fixation index (F), and results of tests for deviations from Hardy-Weinberg equilibrium genotypic frequencies (tests = number of loci for which tests could be performed, - = number of loci with a significant deficiency of heterozygotes, + = number of loci with a significant excess of heterozygotes) for 10 sampled populations of *Agave victoriae-reginae*.

Population	Elevation	Environment	N	N/m^2	Diameter	n	A (SD)	A_e	P	H_e (SD)	F	H-W deviations		
												tests	-	+
1	738	wall	574000	0.70	22.93	37.8	2.2 (0.2)	1.5	0.70	0.31 (0.08)	0.20	5	3	0
2	655	wall	11400	0.38	26.35	33.9	2.2 (0.1)	1.3	0.70	0.25 (0.06)	0.03	4	2	1
3	1530	hill	864	0.54	18.53	38.1	2.1 (0.1)	1.5	1.00	0.32 (0.04)	-0.19	5	0	1
4	1140	wall	2350 ^a			36.7	2.2 (0.1)	1.5	0.90	0.35 (0.06)	0.33	6	3	0
5	1230	wall	20000	0.20	13.89	33.8	2.2 (0.2)	1.7	0.90	0.41 (0.05)	0.03	8	2	1
6	1320	wall	15000	0.50	14.73	42.1	2.3 (0.2)	1.8	0.90	0.43 (0.06)	-0.04	8	1	3
7	1253	wall	240000	0.75	11.76	41.7	2.3 (0.2)	1.6	0.80	0.38 (0.06)	0.06	7	2	0
8	990	wall	13800	0.23	15.68	28.4	2.1 (0.2)	1.6	0.90	0.36 (0.06)	-0.19	7	0	1
9	860	wall	1880 ^a			40.1	2.4 (0.2)	1.5	0.90	0.32 (0.06)	0.24	6	2	0
10	960	wall	7050 ^a			22.7	1.8 (0.2)	1.3	0.60	0.21 (0.06)	0.16	2	1	0
Mean						35.5	2.2 (0.2)	1.5	0.83	0.33 (0.06)				

^a In these sites transects were not done, so N was estimated using the average density from the other populations (0.47 ind/m²).

Table 2. Allele frequencies of 10 polymorphic loci for 10 populations of *Agave victoriae-reginae* and χ^2 test for heterogeneity in allelic frequencies among populations (Workman & Niswander 1970).

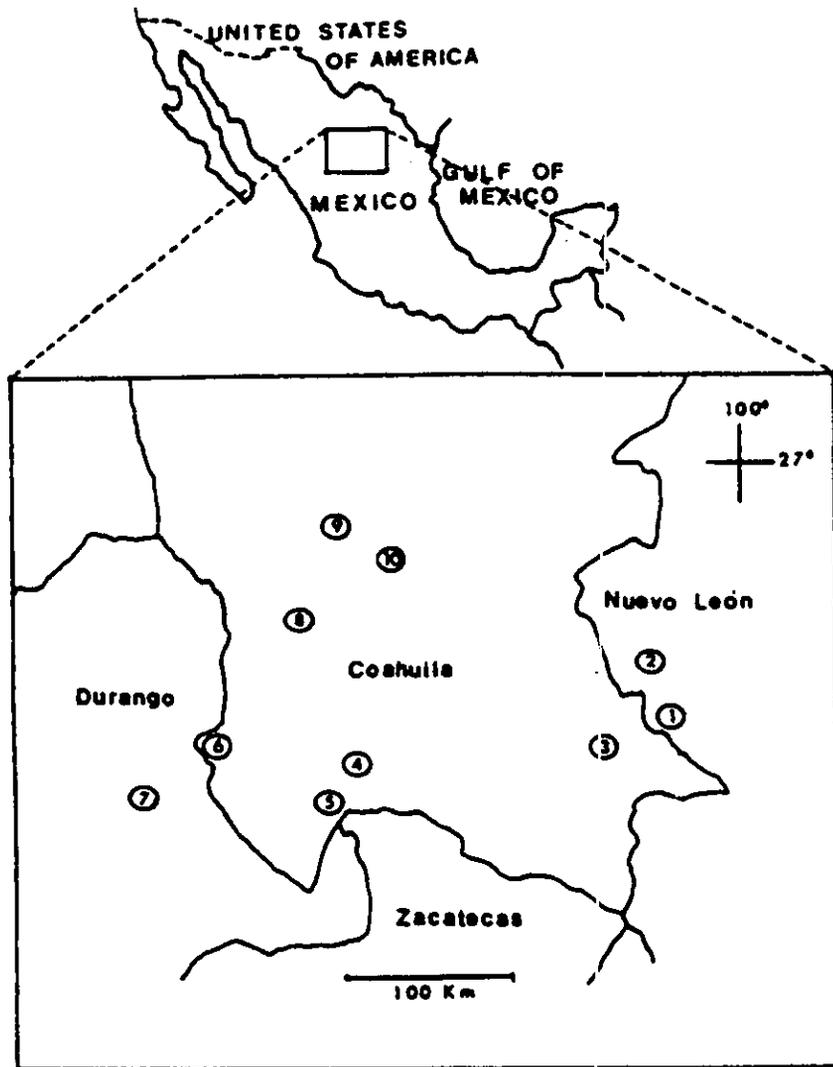
Locus/ Allele	Population									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Lap1</i>										
1	0.044	0.026	0.128	0.047	0.042	0.036	0.116	0.194	0.179	
2	0.489	0.974	0.872	0.953	0.222	0.274	0.221	0.806	0.411	1.000
3	0.467				0.736	0.690	0.663		0.411	
<i>Got1</i>										
1	0.144	0.197	0.220	0.143	0.208	0.337	0.128	0.086	0.093	
2	0.411	0.724	0.780	0.381	0.264	0.489	0.500	0.914	0.198	1.000
3	0.444	0.079		0.476	0.528	0.174	0.372		0.709	
<i>Dia1</i>										
1		0.052	0.167	0.290	0.286	0.614	0.616	0.375	0.202	0.148
2	1.000	0.948	0.833	0.710	0.714	0.386	0.384	0.625	0.798	0.852
<i>Dia2</i>										
1		0.017	0.564	0.581	0.543	0.487	0.581	0.479	0.798	0.638
2	1.000	0.983	0.436	0.419	0.457	0.513	0.419	0.521	0.202	0.362
<i>Acp2</i>										
1	0.176	0.128	0.159	0.886	0.846		0.024	0.859	0.875	0.959
2	0.824	0.872	0.841	0.114	0.154	1.000	0.976	0.141	0.125	0.041

Tabla 2. continued

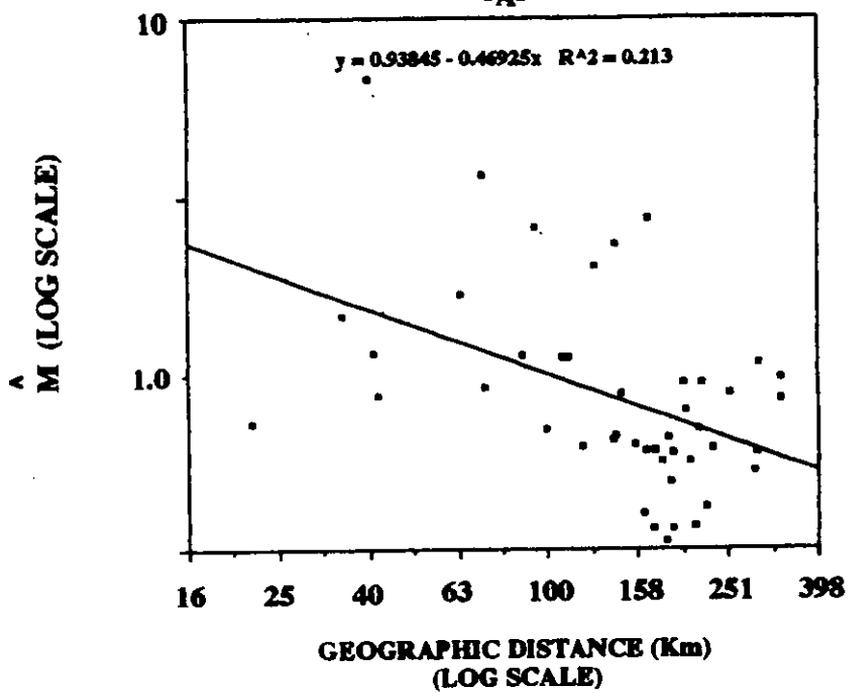
Locus/ Allele	Population									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Est1</i>										
1						0.012				
2	0.957	0.987	0.872	0.946	1.000	0.860	1.000	1.000	1.000	1.000
3	0.043	0.013	0.128	0.054		0.128				
<i>Est2</i>										
1	0.367	0.133	0.083	0.100	0.423	0.464	0.171	0.354	0.083	0.071
2	0.633	0.867	0.917	0.900	0.577	0.536	0.829	0.646	0.917	0.929
<i>Pgi2</i>										
1	0.024							0.031	0.024	
2	0.369	0.286	0.500	0.314	0.458	0.489	0.488	0.281	0.310	0.200
3	0.607	0.714	0.500	0.686	0.542	0.511	0.512	0.688	0.667	0.800
<i>Pgi3</i>										
1	0.932	0.614	0.890	0.698	0.764	0.648	0.695	0.578	0.650	0.700
2	0.068	0.343	0.110	0.302	0.236	0.352	0.293	0.422	0.313	0.300
3		0.043					0.012		0.038	
<i>Mel</i>										
1	0.267	0.673	0.622	0.163	0.069	0.100	0.093	0.250	0.035	0.162
2	0.678	0.327	0.268	0.640	0.681	0.550	0.744	0.656	0.919	0.811
3	0.056		0.110	0.198	0.250	0.350	0.163	0.094	0.047	0.027

Table 3. F_{IS} , F_{IT} , F_{ST} , Nm , N_b , and results of tests for deviations from Hardy-Weinberg equilibrium genotypic frequencies (tests = number of populations for which tests could be performed, - = number of populations with a significant deficiency of heterozygotes, + = number of populations with a significant excess of heterozygotes) at ten polymorphic loci ten populations of *Agave victoriae-reginae*. Standard deviations (jackknife for F statistic) are in parentheses and 95% confidence intervals (95% CI) for means of F statistics are based on 100 bootstrap samples.

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	Nm	N_b	H-W deviations		
						tests	-	+
<i>Acp2</i>	0.061 (0.121)	0.697 (0.091)	0.673 (0.070)	0.098	0.616	0	0	0
<i>Dia1</i>	0.177 (0.115)	0.335 (0.066)	0.199 (0.071)	0.815	5.121	7	1	0
<i>Dia2</i>	0.059 (0.124)	0.245 (0.166)	0.193 (0.119)	0.847	5.322	8	1	0
<i>Est1</i>	0.431 (0.390)	0.462 (0.366)	0.057 (0.018)	3.350	21.049	0	0	0
<i>Est2</i>	-0.262 (0.138)	-0.112 (0.104)	0.121 (0.036)	1.471	9.243	5	0	1
<i>Got1</i>	0.820 (0.072)	0.853 (0.052)	0.202 (0.070)	0.800	5.027	8	7	0
<i>Lap1</i>	0.036 (0.162)	0.399 (0.081)	0.384 (0.077)	0.325	2.042	6	1	0
<i>Me1</i>	0.502 (0.119)	0.582 (0.092)	0.168 (0.070)	1.003	6.302	9	6	0
<i>Pgi2</i>	-0.678 (0.092)	-0.626 (0.085)	0.031 (0.007)	6.330	39.773	8	0	3
<i>Pgi3</i>	-0.445 (0.049)	-0.358 (0.078)	0.060 (0.035)	3.172	19.930	7	0	3
mean	0.055 (0.185)	0.281 (0.164)	0.236 (0.067)	1.821 (1.929)	11.443 (12.121)			
95% CI	-0.255, 0.378	-0.050, 0.549	0.121, 0.350					



-A-



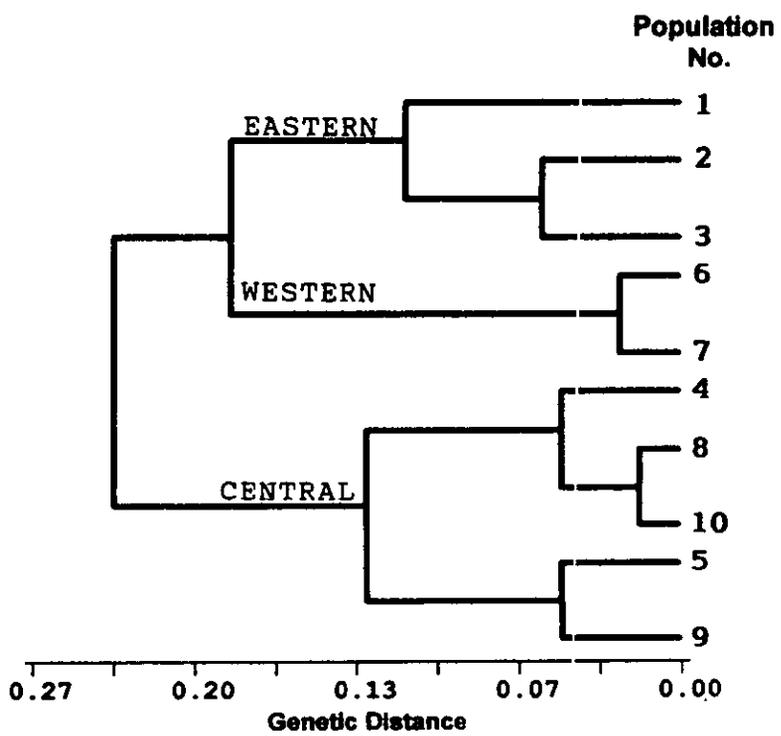


Figure 1. Location of ten sampled populations of *Agave victoriae-reginae* in the Chihuahuan desert of northern Mexico.

Figure 2. Least-squares regression of inferred gene flow (M , individuals/generation) on geographical distance (km) between all pairwise comparisons of ten populations of *Agave victoriae-reginae*.

Figure 3. UPGMA phenogram based on Nei's unbiased genetic distances between ten populations of *Agave victoriae-reginae* estimated from ten polymorphic allozyme loci

American Journal of Botany

Section of Plant Biology, Cornell University, Ithaca NY 14853 Phone 607-254-4708 Fax 607-254-4695

This transmission consists of one page

April 30, 1998

Dr. Glenn R. Furnier
Department of Plant Biology
University of Minnesota
1445 Gortner Ave. - 220 Biological Sciences
St. Paul, MN 55108
Fax 612-625-5212

Dear Dr. Furnier:

The third review of your manuscript No. 97-170,
Title: Conservation genetics of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert
Author(s): Alejandro Martínez-Palacios, Luis E. Eguiarte and Glenn R. Furnier.

has been returned, and I am pleased to say the manuscript has been tentatively accepted for publication in the *American Journal of Botany*. Final acceptance is contingent upon your response to the reviewer's criticisms and requests, which I have judged to be relatively minor.

After your manuscript has been copyedited, it will be returned to you along with the review. You will receive the manuscript and the reviewer's comments in due course.

Sincerely,

Karl Niklas
Karl Niklas
Editor-in-Chief

CAPITULO III

ESTRUCTURA POBLACIONAL Y CONSERVACION DE SEMILLAS DE *Agave victoriae-reginae* T. MOORE (AGAVACEAE), ENDEMICA Y EN PELIGRO DE EXTINCION.

Estructura poblacional y conservación de semillas de *Agave victoriae-reginae* T. Moore (Agavaceae), endémica y en peligro de extinción.

Introducción

Ecología de poblaciones. La ecología de poblaciones es el estudio de los tamaños de las poblaciones de plantas y animales y de los procesos particularmente biológicos, cuando éstos determinan los tamaños (Begon y Mortimer 1986). Una población está constituida por un cúmulo de individuos con alta probabilidad de aparearse entre sí en comparación con la probabilidad de aparearse con un miembro de alguna otra población (Pianka 1982). Los individuos dentro de una población recurren a la reproducción sexual, mezclando sus genes en cierto grado y formando poblaciones mendelianas verdaderas (Pianka 1982).

En biología de la conservación, los aspectos ecológicos de importancia inmediata para la conservación de especies en peligro de extinción podrían enmarcarse en factores estáticos poblacionales: ej. la densidad, la estructura de edades, el tamaño de la población, la variación genética, y la reproducción. Estos factores pueden proporcionar información sobre el estado de alteración de las poblaciones y permitir proponer alternativas para su conservación.

La densidad, que describe a los individuos por unidad de área o de volumen, es usada en conjunto con el área de distribución para definir el tamaño de la población (Ricklefs 1984). La estructura de edades (o en su defecto la estructura de tamaños) indica las proporciones de sus miembros que pertenecen a cada clase de edades (o de tamaños) (Pianka 1982).

La reproducción en plantas puede ser de dos tipos: sexual (genet) y asexual (ramet). La proporción de estos pueden jugar un papel importante en la evolución o extinción de la población, (Harper y White 1974; Pianka 1982). Las formas genets son la fuente de variación genética que se expresa en un favorecimiento evolutivo (Harper y White 1974; Pianka 1982). Aunque una población tiende a presentar cambios de variación genética en el tiempo, sin embargo, una sobreproducción de ramets seguida de una elevada endogamia puede inducir a una población a su extinción (Cook 1979).

Las poblaciones también se caracterizan por presentar tasa de nacimiento, crecimiento y mortalidad, tipos de crecimiento, inmigración y emigración, y fecundidad, entre otros (Pianka 1982). Estos caracteres permiten entender la dinámica de las poblaciones y poder analizar a la especie desde un punto de vista evolutivo (Pianka 1982; Ricklefs 1984).

Aspectos de la reproducción. Los mecanismos de reproducción de una especie son regulados en gran medida por los factores abióticos de su entorno, fenómeno que puede agudizarse en comunidades áridas donde la presencia de agua puede darse en ciclos después de varios años de sequías (Nobel 1992; Mandujano 1995). Los sistemas de reclutamiento sexual denominados genet (individuos genéticamente diferentes, resultado de la recombinación), en ambientes de zonas áridas este tipo de reclutamiento puede estar limitado y agudizarse cuando la sequía es extrema. La propagación vegetativa o ramet (propagación clonal que permite la permanencia de los individuos de genotipos probados) puede presentarse como alternativa para continuar con el sistema de reclutamiento de una población (Frego y Staniforth 1986; Stearns 1987; Mandujano 1995; Nobel 1992). Las formas genets (en estado reproductivo) permiten la recombinación genética entre individuos, participando en el incremento de la variación genética y la posibilidad de migración de individuos en estadio de semillas, seguida de la colonización de nuevos ambientes (Stearns 1987). Por el contrario, la reproducción de tipo ramet permite perpetuar genotipos probados para el ambiente en que fueron generados, se reducen los mecanismos de colonización de nuevos ambientes mediante estas formas de reproducción y la posibilidad de poderse adaptar a nuevos ambientes (Cook 1985). Los sistemas de reproducción clonal puede ser el único sistema de sobrevivencia y una especie puede estar representada por un clon. Un ejemplo se presenta con el helecho *Pteridium* que puede alcanzar una edad de 1400 años y presentar una distribución de aproximadamente 14 ha (Caswell 1985). Este proceso puede reducir la migración a nuevos ambientes y su evolución, además, de incrementar su susceptibilidad a presiones por plagas y enfermedades (Barrett y Kohn 1991).

La reproducción a través de semillas (genets) por las plantas presenta una gran plasticidad en su producción, lo cual dificulta su interpretación (Harper y White 1974), la

amapola (*Papaver rhoeas*) es un ejemplo claro; bajo condiciones naturales una planta puede producir 0-4 semillas, pero creciendo bajo condiciones de alta fertilización la misma planta puede producir más de 300 mil semillas, con lo cual se comprueba las diferencias de respuesta de una planta en dos ambientes diferentes (Harper 1966, citado Harper y White 1974). En plantas perennes creciendo en su ambiente natural, puede presentar una sobreproducción de ramets y ocasionar un incremento de producción de semillas, en muchos de los casos pueden ser el resultado de polinizaciones entre ramets idénticos y establecer una endogamia extrema (Harper y White 1974). Las semillas liberadas pueden permanecer latentes en el suelo por un tiempo que dependerá de diversos factores, entre ellos podemos citar el que las semillas sean ortodoxas, el tiempo de longevidad que presenten, y en el suelo donde se depositen será importante la cantidad de humedad, el oxígeno presente y entre otros factores la ausencia de depredadores y de infecciones por hongos (Harper y White 1974).

En especies de zonas áridas, en particular en la familia Agavaceae existen diversos reportes de ecología de poblaciones con enfoque a los aspectos de la biología reproductiva (Freeman *et al.* 1983; Freeman y Reid 1985; Eguiarte y Búrquez 1987; Arizaga y Ezcurra 1995) y estudios de polinizadores en agaves (Schaffer y Schaffer 1979; Gentry 1982; Howell y Schropfer-Roth 1981; Martínez del Río y Eguiarte 1987; Slauson 1995). Nobel (1985, 1992) realizó observaciones por 20 años para *Agave deserti* y reportó el reclutamiento de plantas tipo genet y ramet. Aguero (1994), en *Agave victoriae-reginae*, realizó un estudio fenológico de la inflorescencia en una localidad que se sitúa entre los límites de Coahuila y Durango; en el mismo sitio, Blanco (1955) analizó la densidad de población por medio de puntos en cuadrante.

Otras investigaciones sobre *Agave* han sido realizadas sobre germinación en laboratorio o invernadero para analizar el potencial de germinación de las semillas colectadas en campo, como una manera de medir el estado de reproducción sexual de una especie (Freeman 1973; Freeman *et al.* 1977; Aguero 1994; Pritchard y Miller 1995; Szarek y Holmesley 1996). Una de las investigaciones que se pueden considerar pioneras en el uso de ADN para entender los procesos de flujo genético en las poblaciones es el reportado por Trame *et al.* (1995), en *Agave schottii* evaluaron la distancia óptima de

entrecruzamiento, con estudios de genética molecular, usando RAPD's (random amplified polymorphic DNA).

Conservación de semillas. Un gran número de especies vegetales tienen la capacidad de producir semillas que permanecen en latencia en el suelo durante varios años (Darlington y Steinbauer 1961; Kalisz 1991). Esta acumulación de semillas en el suelo constituyen bancos de semillas y son considerados importantes desde el punto de vista ecológico, así como evolutivamente en la dinámica de las poblaciones vegetales, pueden funcionar como bancos de genes (Kalisz 1991). Estos bancos de semillas *in situ* pueden ser reservorios para la recuperación de poblaciones y la preservación de una especie dentro de una comunidad (Kalisz 1991). Los bancos de semillas, debido al contenido de alta variación genética, presentan genes e individuos de importancia en la población, y el conjunto de éstos pueden dar un potencial de regeneración de la población (Epling *et al.* 1960). Basándose en estas premisas, la formación de bancos de semillas *ex situ* pueden llegar a ser de suma consideración en comunidades que están siendo erosionadas genéticamente en forma acelerada.

La conservación *ex situ* de semillas, bajo condiciones controladas puede incrementar en mucho, el periodo de viabilidad en comparación a la permanencia *in situ* o en el subsuelo. En especies que producen semillas ortodoxas (pequeñas, de respiración inhibida, con bajo contenido de humedad y la posibilidad de reducirla) generalmente se pueden almacenar en frío (Roberts 1975). Almacenarlas representa un sistema de conservación estática de las poblaciones y puede ser una alternativa viable para ser utilizada por largos periodos de tiempo. Este sistema de conservación evita entre otros factores los procesos naturales de selección natural, deriva génica en pequeñas poblaciones, hibridación natural, destrucción por parásitos y climas rigurosos (Frankel y Soulé 1981). La conservación de muchas semillas ortodoxas por periodos largos puede ser posible estableciendo un contenido de baja humedad ($5 \pm 1\%$), y bajas temperaturas (-18°C ó menos) (Roberts 1975). Para especies silvestres, Thompson (1975) sugiere que en los casos en que se dificulta la preservación de una representación adecuada de plantas vivas de las especies, especialmente las grandes y de larga vida, y que producen semillas

ortodoxas, el sistema de banco de semillas *ex situ* puede ser aplicado a programas de conservación.

Riqueza florística en zonas áridas y semiáridas de los desiertos mexicanos. Stebbins (1952) señala tres razones que permiten que en las zonas áridas pueda desarrollarse en forma acelerada la evolución de las plantas. La primera razón la atribuye, a que en regiones donde la humedad es limitada y hay una alta diversidad de hábitats, de topografía, suelos y otros factores, la sequía puede tener grandes efectos en la evolución de las plantas, a diferencia de las regiones donde la humedad no es una limitante, reduciéndose o anulándose los límites de separaciones, generando una continuidad. La segunda razón: en climas semiáridos con una diversidad de regiones (hábitats), se promueve la división de las poblaciones en pequeñas unidades, generándose un aislamiento entre cada una, aunque por migración ocasional pueden intercambiar genes y establecer poblaciones que puedan generar nuevos taxa. Y la tercera razón: la adaptación a condiciones áridas y semiáridas se presenta un gran número de diferentes estructuras vegetativas especializadas (ej. reducción de la superficie de las hojas, formación de tricomas, almacenaje en raíces, sistema radicular profundo) pueden evolucionar por adaptación a condiciones secas. Esta evolución acelerada se ha atribuido a épocas recientes del Plioceno-Pleistoceno (Axelrod 1950). Rzedowski (1962) concuerda en la existencia de una correlación entre el endemismo y el incremento de la aridez, basándose en estudios fitogeográficos a nivel de género, los sistemas de una evolución acelerada en zonas áridas, parecen cumplirse para las familias Cactaceae y Compositae. Sin embargo no es así para la mayoría de las plantas como *Acanthothamnus*, *Orthosphenia*, *Pachycormus*, *Sericodes*, *Simmondsia*, etc., las cuales corresponden a reliquias de una antigua flora desértica, atribuyendo que la abundancia (el origen y diversificación) del endemismo de la flora xerófila mexicana, data de épocas muy antiguas, Terciario Medio o anteriores.

La riqueza de endemismo en zonas áridas y semiáridas del norte de México es el resultado de una evolución profunda, dando como consecuencia una flora con características propias y formas biológicas especializadas, que para el caso global de matorrales xerófilos y pastizales, México presenta alrededor de un 60% de especies endémicas (Rzedowski 1991a,b, 1993). Esta riqueza es atribuible a que un gran número de

regiones funcionan como verdaderas islas y penínsulas ecológicas aunado a los eventos y condiciones ambientales del pasado geológico (Rzedowski 1991b). Un caso son las cactáceas, aunque la familia se considera originaria de Sudamérica, presentan en nuestro país su máxima diversidad, con aproximadamente 900 especies, de las cuales el 70% son endémicas (Rzedowski 1991a, 1993). Otro ejemplo es la familia Fouquieriaceae y Agavaceae (*Agave*, *Yucca*, *Manfreda*, *Polianthes*, etc), Nolinaceae (*Dasylyrion*, *Nolina*, *Beaucarnea*), originadas muy probablemente en México, y donde se ha manifestado su diversificación taxonómica y morfológica (Rzedowski, 1991a, 1993; García-Mendoza y Galván 1995).

Factores que participan en la erosión genética, extinción de especies y hábitats en zonas áridas. La riqueza florística de zonas áridas del norte de México se consideran con alto riesgo de extinción, sobresaliendo las especies endémicas, agudizándose para los casos de distribución reducida; un factor perturbante de la acelerada reducción de las poblaciones que conlleva a una erosión genética, está relacionado con las diversas actividades humanas (Bye 1993). Para el caso de las especies endémicas y de formas exóticas o caprichosas, la sobrecolecta del recurso parece ser el principal factor de disminución de las poblaciones, efecto que se agudizó desde la década de los cuarenta, por una demanda internacional, principalmente por diversos países europeos, Japón y los Estados Unidos (Arias 1993). Un segundo factor que afecta la sobrevivencia de las especies de zonas áridas, es atribuido a la destrucción y modificación del hábitat, como los desmontes para agricultura, pastoreo y entre otros, la inundación de zonas por embalses (Arias 1993).

Martínez-Palacios (1991) incluyó en su trabajo copias de permisos supuestamente legales que autorizaban la exportación de hasta 1 ton. de semillas y 300 mil plantas de cactus, 100 mil plantas de *Agave victoriae-reginae*, así como de otros grupos de plantas como Fouquieriaceae, Euphorbiaceae, Zamiaceae y Orchidaceae. El destino de estas exportaciones eran los Estados Unidos, principalmente por el estado fronterizo de Texas. Sánchez-Mejorada (1979) reportó el saqueo de cactáceas y otros grupos de plantas mexicanas aprovechando excursiones de turistas europeos. Las agencias de viajes generaban paquetes turísticos para realizar recorridos a lo largo del desierto mexicano. Actualmente, existen normas gubernamentales para proteger a las especies endémicas y en

peligro de extinción, además de haber firmado los tratados internacionales de CITES desde 1991. Sin embargo, es necesario señalar que si bien el saqueo intencional de plantas del país se ha reducido enormemente, a nivel nacional ha aumentado tanto para colecciones científicas de herbario y para mantener colecciones de jardines botánicos y viveros nacionales, estos últimos con fines comerciales colectando semillas y plantas silvestres y actuando sin permisos de las autoridades correspondientes (Osborne y van Staden 1987).

Objetivo general. Evaluación de algunos parámetros ecológicos estáticos en 10 poblaciones silvestres de *Agave victoriae-reginae* T. Moore, para determinar el estado de alteración y algunos aspectos de la reproducción de la especie, que permitan entender el estado actual en que se encuentran las poblaciones.

Objetivos particulares:

- (1) Establecer la estructura de tamaños y densidad de las poblaciones silvestres visitadas de *Agave victoriae-reginae*.
- (2) Analizar diferencias en el tipo de reclutamiento de plantas genet (originada por semillas) y ramet (propagación vegetativa) de la especie y relacionarlo al tipo de hábitat (pared y loma) en donde originalmente se establecen.
- (3) Evaluar el potencial reproductivo sexual de la especie con evaluaciones en campo sobre la producción de semillas y la germinación *ex situ* de semillas de las diferentes poblaciones.
- (4) Iniciar la conservación *ex situ* de semillas (con la colecta y almacenamiento bajo condiciones controladas) de la especie.

Materiales y Métodos

Localización de las poblaciones. Por razones obvias en la conservación de la especie se omite la ubicación exacta y nombres de las localidades de las poblaciones reportadas en esta tesis. Cuatro poblaciones (la 1, 3, 5 y 7) corresponden a localidades de colecta citadas por Gentry (1982). Las otras 6 poblaciones fueron localizadas por exploraciones realizadas en las dos salidas al campo en los meses de enero-febrero y septiembre de 1995 y por indicaciones de botánicos conocedores de la flora de la región.

Evaluación ecológica. En las dos salidas al campo, enero-febrero y septiembre de 1995, se evaluaron: (A) la densidad y tamaño de la población, (B) la estructura de tamaños y presencia de reproductores, (C) potencial reproductivo, y (D) otros parámetros.

(A) Densidad y tamaño de la población. Se estableció a partir de los transectos de 4 X 30 m (120 m²) en 7 de las 10 poblaciones, en ambiente de pared y/o loma. El número de transectos por población y por tipo de ambiente fue de 1 a 5. Los transectos se desarrollaron con el apoyo de cuerdas de cuatro y de treinta metros con marca cada metro. Se evaluó el número de individuos por cada metro cuadrado. En el ambiente de loma, donde su distribución es en pequeños agrupamientos de plantas dentro de un matorral rosetófilo de *Agave lechuguilla*. En 4 de los 5 sitios, se estableció un cuadrante (4X30 m) por sitio y se registró el tamaño del área de distribución para obtener el total de individuos por sitio, el quinto sitio se contó el total de individuos. El tamaño de la población para los ambientes de pared se estimó utilizando los kilómetros recorridos con el vehículo y caminando, este valor fue multiplicado por la estimación del ancho en metros de la distribución de plantas sobre la pared. Existía una heterogeneidad de distribución sobre la pared, en algunos sitios se presentaban hasta en 20 metros o más de anchura de distribución de plantas sobre la pared, hasta sitios donde era escasa su distribución, por tal motivo, se hicieron dos tipos de estimaciones, una máxima constituida por un promedio de 10 metros (para todas las poblaciones) y una mínima que correspondió a 4 metros para las poblaciones 1, 2, 5, 6, 7 y 8 y de 5 metros para las poblaciones 4, 9 y 10, lo cual dependió de las observaciones hechas en cada población durante su recorrido. El resultado de la multiplicación anterior se volvió a multiplicar por la densidad de plantas obtenida por metro cuadrado para los casos en que se establecieron cuadrantes (120 m²) y para las poblaciones donde no fue posible establecer cuadrantes, el valor de la densidad de plantas por m² se tomó del promedio general (0.47 inds/m²) obtenido de las 7 poblaciones (1, 2, 3, 5, 6, 7 y 8) con establecimiento de cuadrantes. Los cuadrantes (4 x 30 m) se establecieron en regiones donde se podía escalar y establecer el conteo, generalmente orientando la longitud del cuadrantes de abajo hacia arriba de la pared. Por lo retirado de las vías de comunicación, las dificultades y el riesgo que implica establecer los transectos en las paredes de las poblaciones 4, 9 y 10, no se les establecieron cuadrantes. Por tal motivo, en

dichas poblaciones se omiten los valores reales de densidad, estructura de tamaños y tipo de reclutamiento (genets y ramets).

(B) Estructura de tamaños y presencia de reproductores. En los mismos transectos se registró el diámetro mayor de cada planta y se distinguió si correspondían a un genet (origen de semilla) o a un ramet (origen de brote ó estolón de la planta original o genet) en cada metro cuadrado. La presencia de reproductores se registró por cuadrante y en su conjunto por tipo de ambiente, en pared y en loma. Las plantas solitarias se consideraron genet; al igual que el individuo con diámetro mayor y generador del eje de la colonia, los brotes laterales secundarios se consideraron ramets. Para el ambiente de loma donde además de presentarse ramets por yemas laterales se presentó por desarrollo de estolón, se usó el mismo patrón de tamaño para diferenciar al genet de los ramets.

(C) Potencial reproductivo. Fue evaluado analizando: (a) el número de frutos por infrutescencia, (b) el número de semillas por fruto y (c) el porcentaje de germinación en condiciones de invernadero:

(a) El número de frutos por infrutescencia. Se registró un promedio de 192 frutos por cada fragmento de 20 cm de infrutescencia. El promedio se obtuvo de 8 mediciones hechas en diferentes individuos.

(b) Número de semillas por fruto. Se colectaron un promedio de 12 a 15 frutos por infrutescencia y se evaluó el número de semillas por fruto, el promedio se utilizó para calcular el número de semillas por infrutescencia (planta).

(c) Porcentaje de germinación en invernadero. (1) Se evaluó la germinación por fructificación, utilizando 50, 100 y 150 semillas por planta, con substrato de bentonita cálcica; (2) fueron sembradas en invernadero en charolas (germinadores) con tapa para mantener alta humedad relativa y saturación de humedad en el substrato, alta humedad del substrato e intervalos de temperaturas de aproximadamente 12-33°C. El porcentaje de la germinación por fruto se evaluó a los 15-20 días posteriores a la siembra.

(D) Presencia o ausencia de semillas germinadas. En las dos salidas realizadas al campo, se registró la presencia de plántulas formadas a partir de la germinación de semillas, tomando en cuenta que correspondieran a la temporada de colecta (juveniles menores de 3 meses).

Análisis estadístico. Los valores de densidad y estructura de tamaños obtenidos de los 20 cuadrantes establecidos en 7 de las 10 poblaciones, un análisis previo indicó la falta de homocedasticidad (SAS, 1990), por lo que se transformaron los valores de los diámetros (cm) a logaritmos naturales (ln). Con los datos transformados se realizaron los análisis de varianza general para las 7 poblaciones, otro para analizar por: (1) Ambiente (pared y suelo o loma), (2) Población(ambiente pared), y (3) Reclutamiento (genets y ramets). A los datos de población de les aplicó un análisis de mínima diferencia significativa (LSD, basado en Tukey-Kramer).

Para comparar dos parámetros como genets y ramets, los datos de diámetro (cm) transformados (ln) se analizaron por medio de una prueba de t: (1) un análisis general de genets sobre ramets para las 7 poblaciones, y (2) para diferenciar genets de ramets por cada una de las 7 poblaciones. Otra prueba de t se aplicó para diferenciar la respuesta entre los dos ambientes: pared (pobs. 1, 2, 5, 6, 7 y 8) y loma (pob. 3). En todos los casos la probabilidad se estableció con 0.05 nivel de significancia. Utilizando una computadora con el programa estadístico Jmp versión 3.1.4 del sistema SAS (SAS, 1990).

Colección de semillas. En ambas salidas al campo, se colectaron semillas de 3 o más plantas por población en nueve de las 10 poblaciones estudiadas en las dos salidas al campo. Se colectaron frutos de la temporada, caracterizada la infrutescencia por encontrarse en buen estado, con los frutos aun cerrados. En los frutos de 1 o más años de haber sido generados, (estimación hecha por el estado de deterioro de la infrutescencia en general) más del 95% de los frutos se encontraban en estado dehiscente y pocos presentaban aun semillas, a los cuales por medio de la agitación de la infrutescencia se les extrajeron las pocas semillas que aun permanecían dentro de las cápsulas. Las semillas se depositaron en sobres debidamente etiquetados, se deshidrataron durante 2 meses en frascos con cloruro de calcio anhidro a temperatura ambiente, posteriormente en nuevos frascos ámbar con la sal desecante se almacenaron a temperatura de un refrigerador doméstico (8 a 10°C). La evaluación del porcentaje de germinación en el momento de almacenaje en refrigeración, se tomó de los ensayos de germinación reportada para el análisis de potencial reproductivo. Dos años posteriores a su almacenamiento, se evaluó el porcentaje de germinación de semillas de 6 frutos que antes de entrar a refrigeración

presentaron porcentajes de germinación superiores al 90%, se utilizó el mismo procedimiento y sistema al establecido en un principio para la germinación de semillas.

Resultados

Densidad de población. La densidad de individuos (inds) por metro cuadrado se presentó en un intervalo de 0.20-0.75 inds/m², registrándose un promedio general de 0.47 inds/m² (Tablas 1 y 2). Las poblaciones 1 y 7 registraron las mayores densidades con 0.70 y 0.75 inds/m² respectivamente; las poblaciones de baja densidad, 5 y 3 con 0.20 y 0.23 inds/m² respectivamente (Tablas 1 y 2). En tres poblaciones no fue posible establecerse cuadrantes, se procedió a utilizar el promedio de 0.47 inds/m² y los dos valores del intervalo (0.20 y 0.75 inds/m²) para ser aplicado en la valoración del tamaño probable de la población (Tabla 2).

Tamaños de las poblaciones. Las poblaciones de mayor tamaño se localizaron en los extremos E-O: la población 1 situada al E, corresponde a la de mayor superficie de distribución y mayor número de individuos por población (estimación máx. = 574,000 y mín. = 229,600), segunda en mayor densidad de plantas (0.70 inds/m²) (Tabla 2). La población 7 situada al O, es la segunda con mayor número de individuos (estimaciones máx. = 240,000 y mín. = 96,000) y la segunda en superficie de distribución y la que tenía la mayor densidad de plantas (0.75 inds/m²) (Tabla 2). En relación a estas dos poblaciones, el resto son relativamente pequeñas, presentándose en un intervalo para la estimación máx. de 20,000 inds en la población 6 y de tan sólo 864 inds en la población 3 (tabla 2). La población 3 se diferenció por presenta un ambiente de loma lo que facilitó la estimación de su distribución dentro de una área de 1600 m², a diferencia de las otras 9 poblaciones que se presentan en un ambiente de pared de carbonato de calcio (Tabla 2).

Análisis de estructura de tamaños (diám. cm) en genets + ramets, para genets y para ramets de 7 poblaciones evaluadas.

La proporción mayor de juveniles (<10 cm) de genets+ramets se presentó en la poblaciones 3, 5, 6 y 7 (Fig. 1). Los genets presentaron abundancia en las mismas

Tabla 1. Densidad, estructura de tamaños, tipo de reclutamiento y evaluación de reproductores en 20 cuadrantes de 7 poblaciones de *Agave victoriae-reginae* T. Moore (Agavaceae).

Area (m2)	No. de Población*																	SUM (M)								
	1					2			3					5				6	7					8	7	
No. cuadrante**	480					240			480					360				120	600					120	2400	
	1	2	3	4	T	1	2	T	1	2	3	4	T	1	2	3	T	1	1	2	3	4	5	T	1	20
Genets + ramets																										
Ambiente	Pared					Pared			Loma					Pared				Pared	Pared					Pared		
n	66	17	133	120	336	39	52	91	182	38	27	12	259	18	27	27	72	60	101	101	106	44	99	451	28	1297
Media (diám. cm)	21	32.8	16.2	21.7	19.96	24.2	28.5	26.69	6.4	20.7	25.6	21.4	11.2	18.8	13.3	9.56	13.26	14.73	9.5	13.4	8.6	15.6	11.7	11.24	15.68	
D.S.	12.6	15.1	9	6.9	10.3	10.2	11.8	11.31	5.9	19.6	16.7	13	13.07	8.6	8.7	9.9	9.69	9.47	7.9	8.9	6.9	8.9	9	8.54	7.53	
Individuos/m2	0.7					0.38			0.54					0.2				0.5	0.75					0.23	(0,47)	
Genets																										
n	64	17	88	82	251	36	48	84	36	17	12	8	73	10	14	6	39	29	61	67	88	37	81	334	23	833
Media (diám. cm)	20.5	32.8	18.4	23.3	21.51	24.1	28.9	26.83	13.5	35.2	37.8	29	24.25	25.3	15.4	24	16.36	21.45	10.6	15.3	8.8	16.8	12	12.14	17.7	
D.S.	12.4	15.1	8.5	7.3	10.43	10.6	12	11.57	9.6	20.5	14.7	8.2	17.22	4.8	9.3	10.1	11.11	8.3	8.8	9.5	7.3	8.8	9.3	9.1	6.46	
Intervalo (diám. cm)	(3-68)					(5-53)			(3-59)					(2-33)				(4-35)	(2-34)					(7-33)		
Ramets																										
n	2	0	45	38	85	3	4	7	146	21	15	4	186	8	13	21	33	31	40	34	18	7	18	117	5	464
Media (diám. cm)	35.5	0	11.9	18.4	15.38	25.3	24.8	25	4.7	9	15.9	6.3	6.09	10.8	10.9	5.4	9.61	8.45	7.7	9.8	7.8	9	10.5	8.75	6.4	
D.S.	12	0	8.5	4.9	8.42	6.1	10	7.94	2.4	7.1	10.9	1.9	5.43	3.9	7.6	4.6	6.04	5.26	6.1	6.2	4.8	5.8	7.3	6.12	4.72	
Intervalo (diám. cm)	(2-44)					(12-36)			(2-37)					(3-29)				(3-23)	(2-27)					(3-14)		
Reproductores																										
n ; (M (inds/m2))***	1 (0,0021)								1 (0,0021)										1 1 (0,005)						(0,00131)	
D.S.																									0,0019	
Media (diám. cm)	68								50										28 20 25						(38,2)	

*En las poblaciones 4, 9 y 10 no fue posible establecer cuadrantes por lo inaccesible de las paredes y localidades; **Cada cuadrante correspondió a una área de 4x30 m (120 m2); (D.S.): desviación estándar; (n): No. de individuos; SUM: sumatoria; (M): media; T: valor total en poblaciones con más de un cuadrante, obtenidos del análisis general de los cuadrantes y no del promedio de cuadrantes; ***La falta de reproductores en algunas poblaciones no es indicativo de la ausencia de estos; Inds/m2: individuos por metro cuadrado.

Tabla 2. Evaluaciones de campo en 10 poblaciones de *Agave victoriae-reginae*.

Pobl. No.	Area muestreada (m ²)	No. cuadrantes	\bar{x} plantas/m ² (D.S.)	Estimación mín: No. indivs/Pobl ^c	Estimación máx: No. indivs/Pobl ^c	Estimación reprod/pobl ^b mín. - máx. ^c	\bar{x} ^f diámetro (cm)	Reprods/m ²	Ambiente	Altitud m.s.n.m.
1	480	4	0.70 (0.44)	229,600	574,000	429-1,073	19.96	0.00208	Pared	738
2	240	2	0.38 (0.08)	4,560	11,400	16-39	26.69	0.0	Pared	655
3	480	4	0.54 (0.66)	864	864	2.1 ^d	11.20	0.00208	Loma	1530
4	---- ^a	---- ^a	---- ^a	1,175 ^a (500-1,875 ^b)	2,350 ^a (1,000-3,750 ^b)	3.3-6.5	---- ^a	---- ^a	Pared	1140
5	360	3	0.20 (0.04)	8,000	20,000	52-131	13.26	0.0	Pared	1230
6	120	1	0.50	6,000	15,000	16-39	14.73	0.0	Pared	1320
7	600	5	0.75 (0.22)	96,000	240,000	168-419	11.24	0.00500	Pared	1253
8	120	1	0.23	5,520	13,800	31-79	15.68	0.0	Pared	990
9	---- ^a	---- ^a	---- ^a	940 ^a (400-1,500 ^b)	1,880 ^a (800-3,000 ^b)	2.6-5.2	---- ^a	---- ^a	Pared	860
10	---- ^a	---- ^a	---- ^a	3,525 ^a (1,500-5,625 ^b)	7,050 ^a (3,000-11,250 ^b)	10-20	---- ^a	---- ^a	Pared	960
\bar{x} (D.S.)	342.9 (188.8)	2.86 (1.57)	0.47 (0.21)	35,618 ^c (74,096)	88,634 ^c (185,449)	73-181 (135) - (337)	16.11 (5.55)	0.00131 (0.0019)		1068 (275.5)

^a En estos sitios (paredes) no se hicieron los transecto debido a la dificultad para ello, el total de individuos fue aproximado usando el promedio de densidad de las otras poblaciones (0.47 ind/m²);

^b Intervalo de estimación utilizando la densidad de individuos a 0.20 ind/m² (Pob. 5) y 0.75 ind/m² (Pob. 7); ^c Estimación a 0.47 ind/m²; ^d en 1995 se registró un reproductor y 5 en 1996, y el estimado fue 2.1; ^e Ver texto para diferenciación entre la estimación mínima y máxima (relacionada con el área estimada); ^f promedio general de los cuadrantes, difiere de Tabla 1 Cap. II donde se calculó a partir del promedio de los promedios de los cuadrantes; ^g área estimada multiplicada por el promedio general de reprod/m²; (D.S): Desviación estándar.

Tabla 3. Análisis de varianza de los diámetros (cm) transformados (ln) de las plantas para 7 poblaciones de *A.e victoriae-reginae*.

Parámetro	G.L.	S.C.	C.M.	F	P ¹
Poblaciones	6	209.75	34.96	59.30	<0.0001
Error	1290	760.45	0.59		
Total	1296	970.21	0.75		

¹Nivel de significancia al 0.05; G.L.: grados de libertad; S.C.: suma de cuadrados; C.M.: cuadrados medios; P = probabilidad con 0.05 nivel de significancia.

Tabla 4. Análisis de varianza de ambiente; población[ambiente] y tipo de reclutamiento, con los diámetros (cm) transformados (ln) de las plantas para 7 poblaciones de *A. victoriae-reginae*.

Parámetros estimados	G.L.	S.C.	C.M.	F	P
Ambiente ^a	1	20.721	20.721	39.403	<0.0001
Población[Pared]	5	135.299	27.060	51.458	<0.0001
Reclutamiento ^b	1	82.614	82.614	157.101	<0.0001
Error	1283	674.730	0.526		

(^a): pared y loma o suelo; (^b): genets y ramets; G.L.: grados de libertad; S.C.: suma de cuadrados; C.M.: cuadrados medios; P = probabilidad con 0.05 nivel de significancia.

Tabla 5. Diferenciación entre plantas genets y ramets en 7 poblaciones de *A. victoriae-reginae*. Prueba de t (ln de diámetros (cm)).

Reclutamiento	\bar{X}^1 (diám. cm)	e.e. ¹	G.L. ²	t ²	P ²
Genets	18.16	0.41	1295	15.12	<0.0001
Ramets	9.17	0.34			

e.e.: error estándar; t: prueba de t; G.L.: grados de libertad; P: probabilidad con 0.05 nivel de significancia; ¹datos sin transformar; ²datos transformados ln.

Tabla 6. Comparación entre genets y ramets en 7 poblaciones de *A. victoriae-reginae* (Prueba de t con los diámetros (cm) transformados (ln)).

Pob. No.	\bar{X}^1 genets (diám. cm)	e.e. ¹	\bar{X}^1 ramets (diám. cm)	e.e. ¹	t ²	G.L. ²	P ²
1	21.51	0.66	15.38	0.91	5.654	334	<0.0001
2	26.83	1.26	25.00	3.00	0.009	89	0.9930
3	24.25	2.02	6.09	0.40	13.869	257	<0.0001
5	16.36	1.78	9.61	1.05	1.587	70	0.1170
6	21.45	1.54	8.45	0.94	7.276	58	<0.0001
7	12.09	0.50	8.82	0.57	2.774	449	0.0058
8	17.70	1.35	6.40	2.11	5.406	26	<0.0001

e.e.: error estándar; t: prueba de t; G.L.: grados de libertad; P: probabilidad con 0.05 nivel de significancia; ¹datos sin transformar; ²datos transformados logaritmo natural (ln).

Tabla 7. Diferenciación entre plantas de dos ambientes en 7 poblaciones de *A. victoriae-reginae*. Prueba de t (ln de diámetros (cm)).

Ambiente	\bar{X}^1 (diám. cm)	e.e. ¹	G.L. ²	t ²	P ²
Pared	15.88	0.33	1295	9.154	<0.0001
Loma	11.20	0.81			

e.e.: error estándar; t: prueba de t; G.L.: grados de libertad; P: probabilidad con 0.05 nivel de significancia; ¹datos sin transformar; ²datos transformados ln.

Tabla 8. Estimación de producción de semillas colectadas en campo en 1995 y su análisis de germinación de la temporada (menores de un año de edad) (Tabla 8a) y semillas con 1 o más años después de su maduración (Tabla 8b)^d en *A. victoriae-reginae*.

(Tabla 8a)

No. evaluación	Población	Frutos/planta ^a	Semillas/fruto ^b	<i>n</i>	Semillas germinadas	Germinación ^c (%)
1	1	1485	51	100	94	94
2	1	--- ^c	--- ^c	50	46	92
3	1	--- ^c	110	50	43	86
4	1	1055	83	50	44	88
5	1	--- ^c	--- ^c	150	138	91
\bar{X} (DS)		1270 304.1	81.3 29.5			90.2 3.2
6	2	--- ^c	--- ^c	50	43	86
7	2	--- ^c	--- ^c	50	46	92
8	2	1497	58	50	48	96
9	2	--- ^c	--- ^c	50	49	98
10	2	--- ^c	--- ^c	50	49	98
11	2	--- ^c	--- ^c	50	47	94
12	2	--- ^c	--- ^c	50	48	96
\bar{X} (DS)					47.1 2.1	94.3 4.2
13	4	298	75	100	98	98
14	5	985	58	50	46	92
15	5	--- ^c	--- ^c	150	138	92
16	5	1356	79	50	48	96
17	5	--- ^c	--- ^c	50	46	92
18	5	--- ^c	--- ^c	50	44	88
\bar{X} (DS)		1170.5 262.3	68.5 14.9			92 2.8

continúa

.....continuación de la tabla 8.

No. evaluación	Población	Frutos/planta ^a	Semillas/fruto ^b	<i>n</i>	Semillas germinadas	Germinación ^c (%)
19	7	1895	88	50	40	80
20	7	--- ^c	--- ^c	50	44	88
\bar{X}					42	84
<i>(DS)</i>					2.8	5.7
21	8	1445	58	50	44	88
22	8	--- ^c	--- ^c	150	141	94
23	8	--- ^c	--- ^c	50	45	90
\bar{X}					90.7	
<i>(DS)</i>					3.1	
24	9	--- ^c	--- ^c	50	48	96
25	10	1320	51	50	47	94

(Tabla 8b)^d

1	1	--- ^c	--- ^c	50	19	38
2	1	--- ^c	--- ^c	50	34	68
3	1	--- ^c	--- ^c	50	38	76
4	1	--- ^c	--- ^c	50	22	44
5	1	--- ^c	--- ^c	50	39	78
6	1	--- ^c	--- ^c	150	38	25
\bar{X}					54.8	
<i>(DS)</i>					22.1	
7	2	--- ^c	--- ^c	50	13	26
8	6	--- ^c	--- ^c	100	79	79
9	8	--- ^c	--- ^c	50	40	80
10	10	--- ^c	--- ^c	50	33	66

(^a): se midió la longitud de distribución de los frutos y se multiplicó por un estimado de 192 frutos, por cada 20 cm de infrutescencia con frutos; (^b): evaluación de 12 frutos por planta; (^c): no se evaluó; (^d): semillas que aun permanecían dentro de los frutos dehiscentes y que correspondían a la producción del año 1994 o anteriores; ^e La germinación se evaluó a los 15-20 días de sembradas; (*D.S.*): desviación estándar.

Tabla 9. Estimación del porcentaje de germinación^c de semillas de *A. victoriae-reginae*, antes y después de dos años de ser almacenadas^b.

No. ^a evaluación	Población	<i>n</i>	Semillas germinadas (Nov.1995) ^a	Germinación (%) (Nov. 1995) ^a	Semillas germinadas (Nov.1997)	Germinación (%) (Nov. 1997)
8	2	50	48	96	45	90
9	2	50	49	98	49	98
11	2	50	47	94	44	88
\bar{X} (<i>DS</i>)			48 1	96 2	46 2.6	92 5.3
14	5	50	46	92	45	90
17	5	50	46	92	47	94
\bar{X} (<i>DS</i>)			46	92	46 1.4	92 2.8
25	10	50	47	94	35	70

^a resultados obtenidos de la Tabla 8; ^b ver texto para condiciones de conservación; ^c la germinación se evaluó después de 15-20 días de la siembra.

Fig. 1. Estructura de tamaños (genets + ramets) en 7 poblaciones de *Agave victoriae-reginae* T. Moore (Agavaceae).

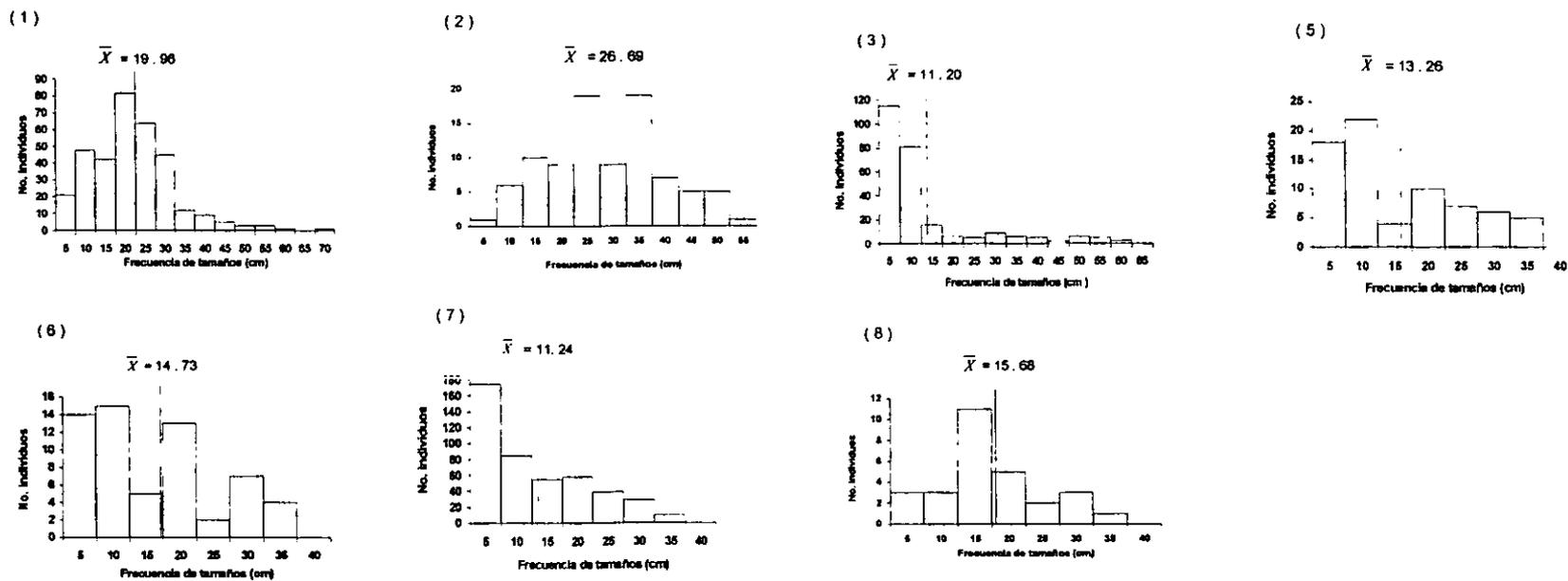


Fig. 2. Estructura de tamaños del tipo genets en 7 poblaciones de *Agave victoriae-reginae* T. Moore (Agavaceae).

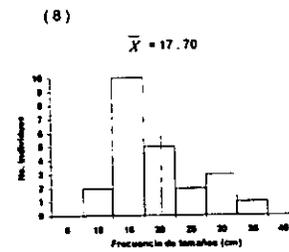
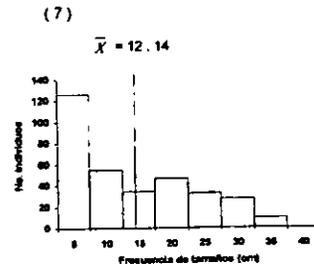
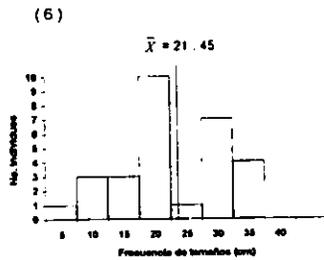
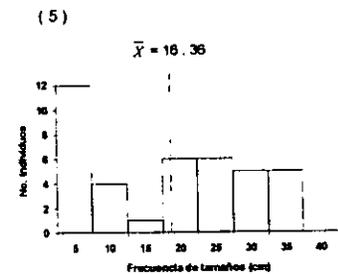
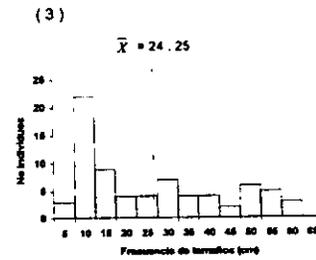
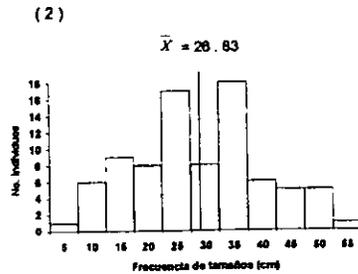
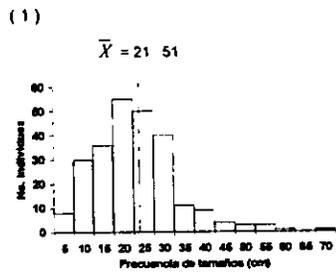
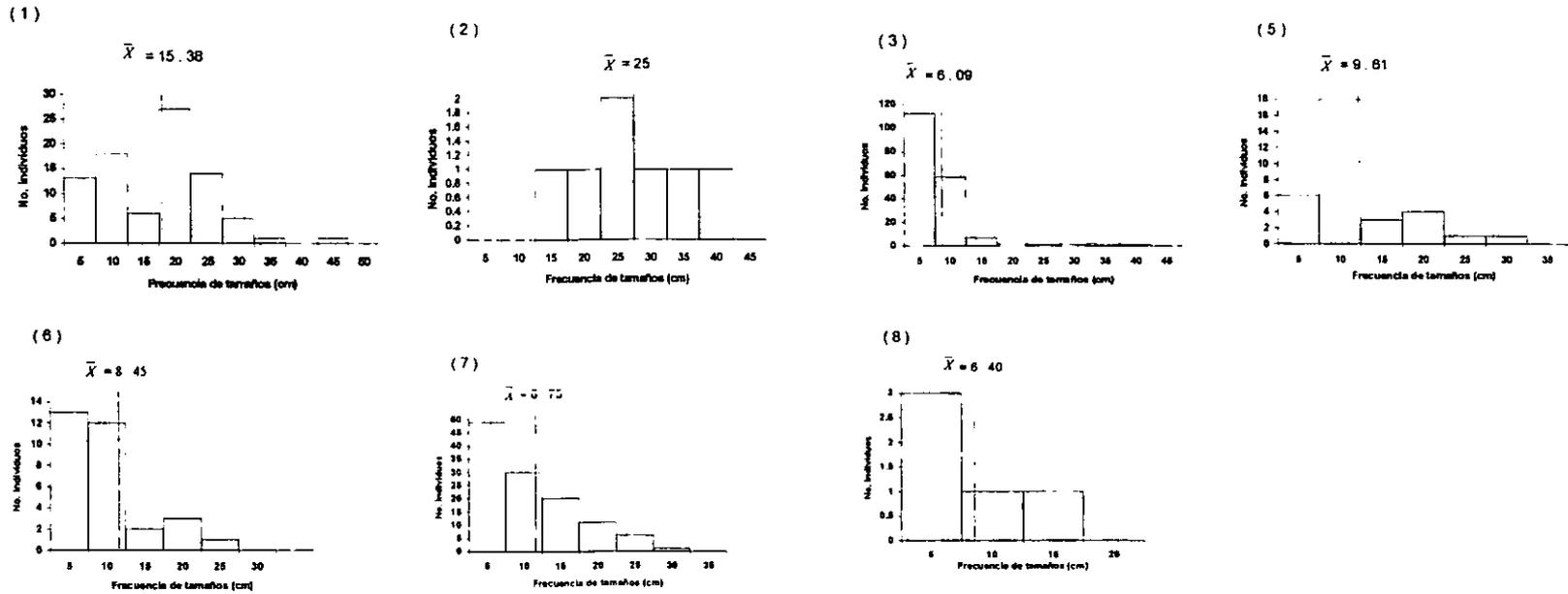


Fig. 3. Estructura de tamaños del tipo ramets en 7 poblaciones de *Agave victoriae-reginae* T. Moore (Agavaceae).



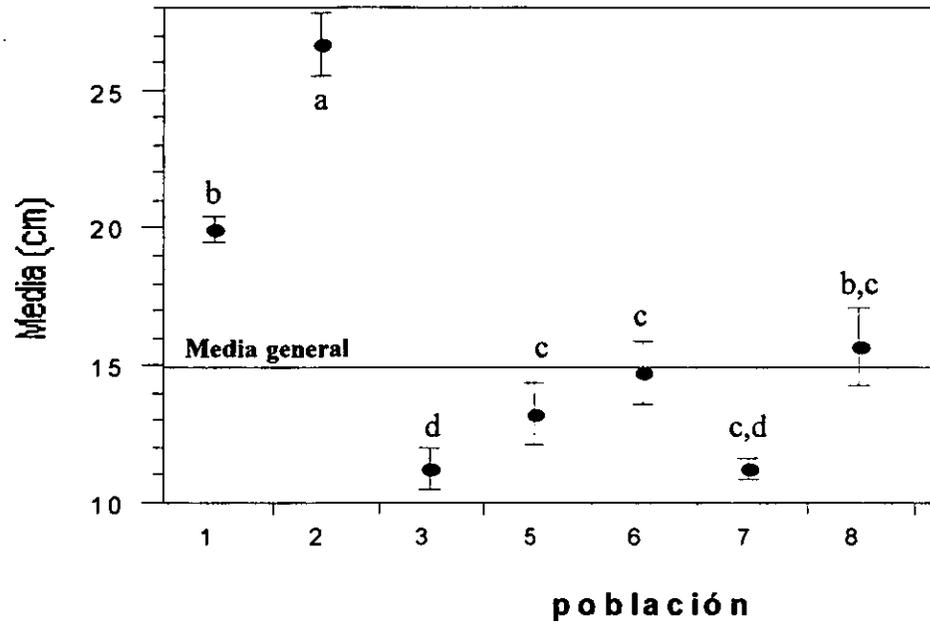


Fig. 4. Media de diámetros (cm) de plantas de 7 poblaciones de *Agave victoriae-reginae*. Los valores medios con la misma letra no son significativamente diferentes en base a un análisis de mínima diferencia significativa (LSD, basado en Tukey-Kramer).

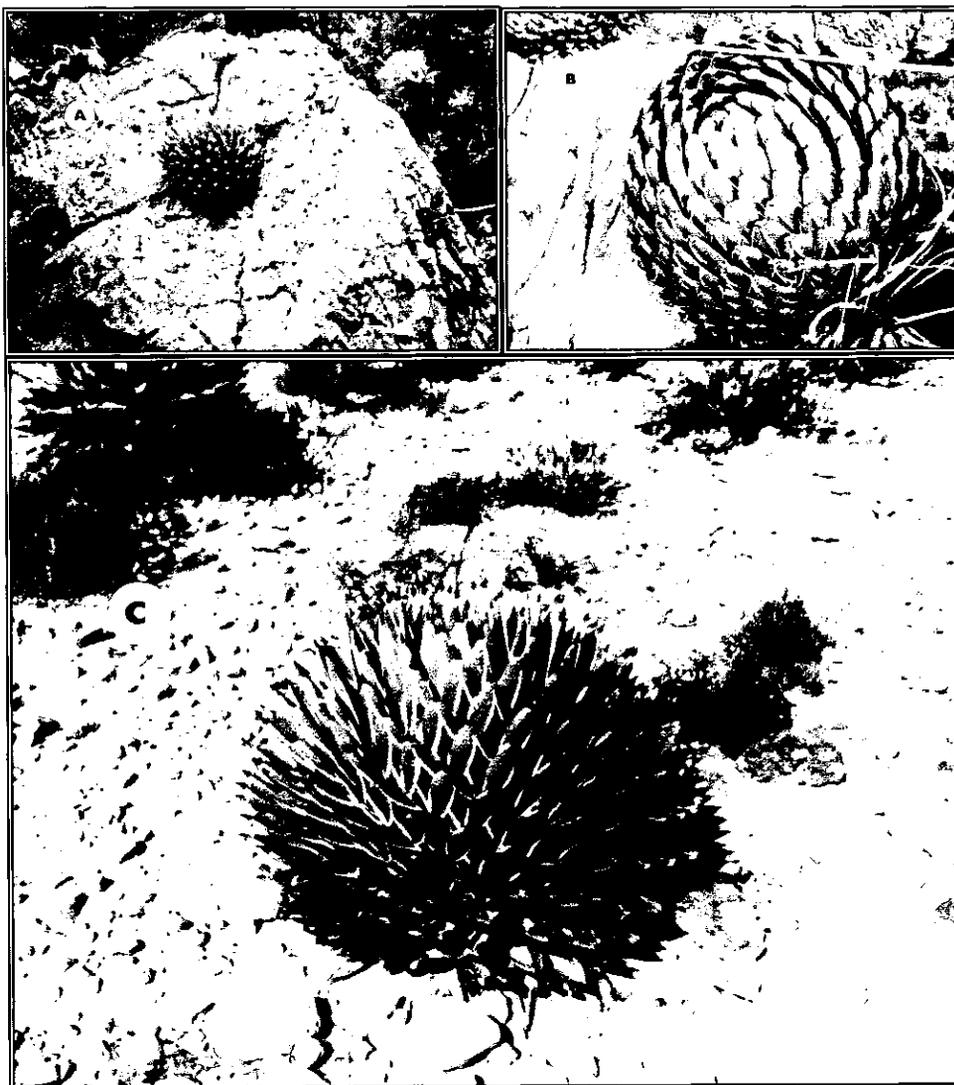


Fig. 5. Plantas de *A. victoriae-reginae* con crecimiento solitario en el hábitat natural. (A) ambiente de pared (pob. 10) y roca firme (planta diám. = 19 cm); (B) ambiente de pared (pob. 8), roca con alto grado de erosión (planta diám. = 34 cm); (C) ambiente de loma (pob. 3), suelo de arrastre con rocas canto rodado (planta diám. = 73 cm). Es notable observar entre poblaciones, plantas potencialmente adultas (Fig. B y C) con diferencias morfológicas.

poblaciones excepto en la población 6 (Fig. 2). Los ramets juveniles existieron en mayor número en las poblaciones 3, 6, 7 y 8 (Fig. 3).

Las poblaciones con mayor índice de tallas intermedias (15-30 cm o 35 cm (pob 2)) se presentó para la poblaciones 1, 2 y 8 en genets+ramets (Fig. 1). Las formas genets, se expresó para las mismas poblaciones de registro de genets+ramets, además de la población 6 (Fig. 2). En cuanto a los ramets, este incremento se presentó en la población 1 y 2 (Fig. 3).

En relación a la proporción de mayor número de individuos potencialmente adultos (<30 cm), no se registró en ninguna de las poblaciones ni en ninguna de las formas de reclutamiento, sin embargo, las poblaciones 1, 2 y 3 fueron las únicas en que se registraron individuos con tallas superiores a 35 cm, llegando incluso a registrar diámetros cercanos a los 70 cm (Fig. 1). En las formas genets se registró una respuesta similar en tallas mayores a la de genets+ramets (Fig. 2). En cuanto a los ramets, con excepción de la población 1, que presentó un individuo 44 cm, para las poblaciones 2 y 3 las tallas mayores fueron inferiores a los 40 cm; el resto de las poblaciones presentaron tallas de ramets inferiores a los 30 cm de diámetro, e incluso en la población 8 el cuadrante no registró ramets superiores a los 15 cm (Fig. 3).

En forma general (genets+ramets), los diámetros promedios mayores (< 19 cm) se registraron en las poblaciones 1 y 2, las otras 6 poblaciones donde se establecieron cuadrantes, presentaron tallas en un intervalo de 11-16 cm en promedio (Fig. 1). En las formas genets los diámetros promedios mayores se presentaron en las poblaciones 1, 2, 3, y 6 (Fig. 2); los diámetros promedios menores (12-18 cm) se registraron en las otras tres poblaciones (5, 7 y 8) (Fig. 2). Respecto a los ramets, únicamente la población 2 presentó diámetro mayor (25 cm) (Fig. 3), la población 1 registró 15.4 cm y el resto de las poblaciones no superaron los 10 cm (Fig. 3).

Análisis de varianza general (7 poblaciones). Un análisis de varianza general entre la estructura de tamaños (diám. cm) transformados (ln) de las 7 poblaciones estudiadas (sin diferenciarlas por ambiente), registró una diferencia altamente significativa ($P < 0.0001$) (Tabla 3). Lo anterior permitió evaluar a las poblaciones en relación a su ambiente (pared y

loma), al tipo de reclutamiento (genets y ramets) y entre poblaciones de las que se establecen en pared, y se describen en el siguiente párrafo.

Análisis de varianza para: (1) Ambiente; (2) Población (ambiente de pared); y (3) Reclutamiento (genets-ramets), a partir de diámetros (cm) transformados (ln) de las plantas de 7 poblaciones de *Agave victoriae-reginae*. El análisis de varianza para los diámetros transformados (ln) registró para cada uno de los tres análisis una diferenciación altamente significativa ($P < 0.0001$) (Tabla 4). El análisis de mínima diferencia significativa (LSD, basado en Tukey-Kramer) mostró que la población 2 es diferente al resto de las poblaciones (Fig. 4); la población 1 no difiere con la población 8, sin embargo, si difiere con las poblaciones 5, 6 y 7 que son similares a la población 8 (Fig. 4). La población 3 solamente es similar a la población 7 (Fig. 4).

Prueba de t para evaluar genets vs ramets en forma general para toda la distribución de *A. victoriae-reginae*. Los diámetros (cm) transformados (ln) de genets vs ramets se analizaron en forma general y se observó que existe una diferencia altamente significativa ($P < 0.0001$) entre estas dos formas de reclutamiento, mostrando que son mayores los diámetros de genets en relación a los ramets (Tabla 5). Este resultado nos mostró la necesidad de ver la respuesta por población que se expresa a continuación.

Comparación entre genets y ramets por población a partir de una prueba de t con los diámetros (cm) transformados (ln), para cada una de las 7 poblaciones de *A. victoriae-reginae*. La prueba de t para comparar los diámetros promedios transformados (ln) entre genets y ramets dentro de cada población, mostró que como podría esperar el promedio de los diámetros es mayor en los genets, registrando una diferencia altamente significativa ($P \leq 0.0058$) con excepción de las poblaciones 2 y la 5 donde no se registró diferencia (Tabla 6). El ambiente de pared, muestra un mayor reclutamiento de genets, a diferencia del ambiente de loma donde se incrementa el número de ramets. Este último representado por la población 3 que registró una relación de 2.55 individuos por cada genet, a diferencia del promedio general de las 6 poblaciones en ambiente de pared, registraron 0.37 individuos ramets por cada individuo genet.

Prueba de t para evaluar la respuesta de dos ambientes (pared vs loma). Con los diámetros (cm) transformados (ln) se valoró la respuesta de tamaños entre los dos

ambientes: pared (pobs. 1, 2, 5, 6, 7 y 8) vs loma (pob. 3), registrando una diferencia altamente significativa ($P < 0.0001$), siendo mayor en promedio el diámetro de pared (tabla 7). Aunque hasta el momento no se ha evaluado diferencias morfológicas, sin embargo es notorio estas diferencias a nivel de plantas entre poblaciones (Fig. 5b y c).

Reproductores por área. La presencia de reproductores por cuadrantes es escasa, únicamente algunos cuadrantes de las poblaciones 1, 3 y 7 presentaron 1, 1 y 3 reproductores, respectivamente (Tablas 1 y 2). La densidad estimada en forma general para los 20 cuadrantes fue de 0.00131 reprod/m² (Tabla 2). Como no fue representativo la presencia de reproductores por cuadrante, con el valor general estimado de reproductores por metro cuadrado, se multiplicó por el área máxima y mínima de cada población para obtener una estimación máxima y mínima de reproductores por población (Tabla 2). Para la población 3 que resulto la más pequeña y se logró cuantificar los reproductores en el año de 1995 y 1996 encontrando 1 y 5 reproductores respectivamente, al multiplicar el área estimada por los reproductores estimados por m², el resultado fue de 2.1 reprod/año. Las poblaciones 4 y 9 fueron las siguientes que presentaron menor número de individuos reproductores (intervalo de 3.3-6.5 y 2.6-5.2 respectivamente) (Tabla 2) y las poblaciones 1 y 7 resultaron con la estimación alta de reprod/población (intervalos de 429-1073 y 168-419 respectivamente) (Tabla 2).

Potencial reproductivo. La presencia de semillas por fruto presentó un intervalo de 51-110 (Tabla 8). En forma individual entre las diferentes poblaciones mostró un intervalo de frutos por planta de 298-1,895 y los promedios por población fue de 985-1,895 frutos por planta (Tabla 8). En un principio se evaluó la germinación de semillas de frutos provenientes de la parte distal, media y proximal de la infrutescencia y los resultados registraron porcentajes similares de germinación entre las semillas obtenidas de las tres regiones, por lo que para los posteriores ensayos se procedió a tomar una muestra de semillas de forma representativa de toda la infrutescencia. Los porcentajes de germinación para las semillas colectadas y puestas a germinar con edades de 4-8 meses (menor de 1 año), presentaron un promedio de 92% de germinación, en un intervalo de 80-98% (Tabla 8). Las semillas con más de un año de edad después de la maduración (inicio de la dehiscencia), y que aun permanecían en el campo dentro de los frutos, planta e

infrutescencia seca y erecta, el promedio de germinación fue de 58% con un intervalo de 25-80% de germinación (Tabla 8). La edad de las semillas de un año, se estimó considerando que las cápsulas se encontraron abiertas, con cierto grado de deterioro y color oscuro de toda la infrutescencia, aunado a que sólo unos cuantos frutos mantenían pocas semillas, a diferencia de los frutos de la temporada, que aun se encontraban por iniciar la dehiscencia o en plena dehiscencia con presencia de cápsulas aun cerradas y con una coloración café claro.

Plántulas de semillas germinadas *in situ*. La presencia de plántulas en campo, generadas de la germinación de semillas con edades calculadas no mayores a 20 días, fue observada sólo en la población uno en el mes de septiembre de 1995 y en cierta forma estuvo relacionada con el tiempo lluvioso que prevalecía hasta esos días en la costa NE de México y la península de Florida (USA). La lluvias continuas acompañadas con nublados prolongados en toda la región de las poblaciones 1, 2 y 3.

Conservación de semillas. Se almacenaron semillas de un promedio de 3-4 plantas por población, en 9 de las 10 poblaciones. No se colectaron de la población 3 por registrarse saqueo de semillas de la única planta que fructificó ese año. Este reproductor presentaba un corte, 30 cm por arriba de la base del ráquis, indicativo del estado reproductivo y saqueo de semillas. Se evaluó el porcentaje de germinación de las semillas de cada planta dentro de un lapso de 4 meses después de su colecta y antes de ser almacenadas. El resto de las semillas se almacenaron (junio y noviembre de 1995) bajo las condiciones de refrigeración (8-10°C y baja humedad).

Por medio de la germinación se evaluó la conservación de semillas después de dos años de almacenamiento, bajo las condiciones aplicadas y citadas anteriormente. Se analizó su porcentaje de germinación para 6 plantas, de las cuales 3 lotes de semillas correspondían a la población 2 y otros 2 lotes a la población 5, ambas presentaron un promedio de 92% (Tabla 9). El sexto lote de semillas pertenecían a la población 10, la cual registró una disminución de 94% a 70% de germinación después de dos años de almacenaje (Tabla 9).

Discusión

Densidad de población. El mayor número de plantas por metro cuadrado y de superficie de distribución se registró para las poblaciones 1 y 7, además, otro factor común que se observó fue que las paredes de carbonato de calcio en estas poblaciones se mostraban menos intemperizadas, la roca es firme y con protuberancias y esquinas afiladas (Fig. 5). El caso contrario se registró en las poblaciones 5 y 8, donde la intemperización de la roca es avanzada, de una coloración rojiza a gris y es casi generalizada la falta de protuberancias y esquinas afiladas, con fragmentación casi generalizada en pequeñas y grandes rocas a lo largo de la pared (Fig. 5). La población 3 con hábitat en loma y suelo pedregoso, correspondió a la tercera en presentar densidad alta de plantas por metro cuadrado. Sin embargo, es necesario denotar que también es la población donde el reclutamiento vía ramets es mayor en relación a las otras poblaciones. En *A. lechuguilla*, *A. deserti* y *A. macroacantha* que se distribuyen en lomeríos y en suelos profundos, presentan mayor número de reclutamiento de tipo ramets en relación a los genets (Gentry 1982; Nobel 1985, 1992; Arizaga comunicación personal).

Tamaño de la población. Las poblaciones de los extremos, la Población 1 al E y la Población 7 al O, se presentaron como las más numerosas y grandes en extensión. Es probable que esta condición tenga como uno de los principales factores a los grandes afloramientos de roca de carbonato de calcio con las características que permiten el establecimiento de plantas de *A. victoriae-reginae*. Las otras poblaciones se relacionan de igual forma con afloramientos aislados dentro de las sierras que se distribuyen a través de parte del desierto Chihuahuense, tal y como fue reportado por Gentry (1982). Lo anterior parece no cumplirse para la población 3, la cual se distribuye en zonas de lomeríos (Fig. 5c) en los alrededores de Saltillo, Coah, representada por pequeñas agrupaciones de plantas formando parte del matorral rosetófilo constituido por lechuguilla, en donde el substrato se caracteriza por un suelo de arrastre con alto grado de intemperización como lo denota la presencia de rocas con canto rodado y en algunos sitios la presencia de fragmentos de roca de carbonato de calcio (Fig. 5c). La manera en que *A. victoriae-reginae* se distribuye en un ambiente donde predomina *A. lechuguilla*, parece ser debido a que nuestra especie en estudio prefiere las áreas de poca radiación (laderas orientadas al N, NE, E), a diferencia de

la especie dominante cuya mayor densidad se presenta en las zonas superiores de la loma, caracterizada por una mayor radiación solar.

Estructura de tamaños. Los promedios de diámetro mayor de las plantas se registraron en el grupo del E, integrado por las poblaciones 1 y 2. Para la población 3, si se analiza el promedio de los valores medios de los 4 sitios, resulta ser la población con la tercera dimensión más grande (18.53 cm) (Cap. II: Tabla 1), aunque el promedio general muestre un valor inferior (11.20 cm: Tabla 1, Cap. III) . Población que se presenta como la más perturbada por colecta de plantas y se agudiza en el sitio donde se estableció el cuadrante uno, siendo de los 5 sitios visitados el más accesible de localizar, presenta una mayor superficie con plantas de *A. victoriae-reginae*. Adicionalmente, es el sitio que presenta una gran densidad de individuos juveniles, pocos de tallas intermedias y mayores (tabla 1), que presentan la peculiaridad de mostrar las formas vistosas de las plantas potencialmente adultas (Fig. 5c). Estas tallas potencialmente adultas son usadas en exhibiciones de colecciones científicas de jardines botánicos. El sitio 1 de la población 3 fue inicialmente localizado por sugerencias de botánicos de colecciones científicas de dos jardines botánicos nacionales. También se ha observado en jardines de casas particulares, resultado de su colecta ilegal. Se encontraron orificios en el suelo y plantas arrancadas, además de existir evidencias del saqueo de semillas que se discuten más adelante. Aunque el análisis expresado en el histograma (Fig. 1) no registró para esta población tallas superiores a los 60 cm de diámetro, los diámetros tomados en las colecta de fragmentos de hojas de las plantas de mayor talla para el estudio de isoenzimas, registraron individuos que alcanzaron tallas superiores a los 70 cm (Fig. 5c) y sólo las poblaciones 1 y 2 registraron tallas cercanas a estas dimensiones (Fig. 1). Lo anterior es atribuible a que la población 3 ha estado sujeta a colecta de plantas y semillas, y los cuadrantes reflejan en cierta forma esta perturbación humana.

La población 7 situada en la parte más occidental del área de distribución de las 10 poblaciones visitadas de *A. victoriae-reginae* presentó el diámetro promedio menor de las poblaciones evaluadas, no tomando en cuenta los valores de la población 3 por sus características de alta perturbación. Esta población se caracteriza por ser la segunda con mayor superficie de distribución y por el número de individuos totales, y primera en

densidad de individuos por metro cuadrado. Además, los promedios de diámetro entre cuadrantes son similares, así como el número de individuos totales. Las tallas mayores no superaron los 35 cm de diámetro. Las poblaciones del grupo centro (C) (Pobs. 4, 5, 8, 9 y 10) según el Zimograma (Cap. II: Fig. 4) de distancias genéticas, los diámetros promedios de las plantas de las dos poblaciones (5 y 8) donde se establecieron cuadrantes, los promedios de diámetros son intermedios (Fig. 1) entre los otros dos grupos (E y O). Lo anterior, podría indicar que existe una disminución de tamaños promedios y tallas mayores de E a O. La altura sobre el nivel del mar es mayor en las 2 poblaciones del O, aunque un análisis preliminar de correlación no mostró diferencia significativa, será necesario correlacionarla en conjunto con otros factores de selección que puedan estar interactuando en el comportamiento de los tamaños entre poblaciones en relación a su ubicación geográfica.

Estructura de tamaños de genets y ramets. La prueba de t para diferenciar los tamaños de genets y ramets en forma general registró una alta diferencia significativa en la presencia de mayor talla de las formas genets. Lo anterior puede deberse a que los ramets en pared salen directamente de yemas laterales, en loma presentan las dos formas (brotes laterales y estolón). Al respecto la nutrición para el caso de brotes laterales, los ramets están unidos al eje de la planta madre (genet), por lo que están dependiendo exclusivamente de las raíces de su progenitor, y con ello es posible que pueda estar expresándose el fenómeno de dominancia apical común en un sinnúmero de especies vegetales (Taylor y Sussex 1990; Sachs 1991). Esta dominancia es probable que se desactive al fructificar y morir la planta que inicialmente les dio origen (genet). Otro factor que debe regir esta respuesta, podría estar relacionado con la escasez de nutrientes y agua de ambos ambientes, limitando el desarrollo de los clones o ramets. La respuesta contraria se ha registrado en otros agaves como *A. macroacantha*, donde la clonación se establece principalmente por rizoma y se le atribuye a una nutrición paternal (Arizaga, datos no publicados), y muy probablemente favorecida por presentar además un sistema de enraizamiento independiente desde los primeros estadios de desarrollo del ramet. Para *A. victoriae-reginae*, la presencia de suelo parece estar relacionado a la generación de ramets por rizoma.

Para *A. victoriae-reginae* en el ambiente de pared, se vio favorecido el establecimiento de genets (0.35 ramets/genet) a diferencia de lo registrado en el ambiente de loma (2.55 ramets/genet). Al igual que en las tallas mayores de genets en relación a los ramets, el ambiente de pared y la falta de un suelo profundo, aunado a la escasez de nutrimentos, limita la propagación clonal. Este tipo de ambiente es probable que disminuya la depredación y el número de depredadores de semillas y plantas juveniles, ya que se depositan y establecen dentro de grietas, constituyendo un microhábitat favorable en relación a las áreas expuestas a mayor desecación por elevada radiación solar y temperatura. El ambiente puede ser un factor importante en el tipo de reproducción para algunas especies (Mandujano *et al.* 1996). Tomando en cuenta que más del 95% de la distribución de *A. victoriae-reginae* es en ambiente de pared y que en su mayoría son genets, difiere con el comportamiento de otras especies de zonas áridas donde reportaron que el reclutamiento de genets en relación a los ramets es un evento de baja probabilidad (p. ej. *Opuntia rastrera* (Mandujano *et al.* 1996), *Agave deserti* (Nobel 1992) y diversas especies de plantas perennes de zonas áridas (Frego y Staniforth 1986)).

La población 3 de *A. victoriae-reginae* dentro de un ambiente de loma, esta limitada a pequeñas agrupaciones de plantas predominantemente orientadas hacia la ladera N, NE y E, establecidas en pequeños claros (poco densos) de un matorral rosetófilo de *A. lechuguilla*. Además, las poblaciones de pared se encuentran a más de 10 km de distancia, lo que sugiere que la especie ocupa un nuevo nicho.

Reproductores por área. Debido a la poca densidad de reproductores por área y a los valores que detectamos, no sería exacto generalizar el número de éstos por población, pues aunque en los cuadrantes establecidos dentro de las poblaciones 2, 5, 6 y 8 no se registraron reproductores. Esto no fue un indicativo de la falta de individuos reproductores en esas poblaciones. La existencia de reproductores (en las poblaciones donde sus cuadrantes no los registraron) fue evidente con la colecta de semillas de tres o más plantas por población en zonas aledañas al área de estudio de cada población (zona de cuadrantes y colecta de hojas). El valor de 0.00131 reprod/m² refleja su presencia de forma espaciada, y la estimación hecha para la población 3 que resultó en 2.1 reprod para la población, se encuentra dentro del intervalo de 1-5 censados en 1995-1996. En las 9 poblaciones

ubicadas sobre paredes, aunque la presencia de reproductores se da en baja densidad, fue posible coleccionar semillas de diferentes plantas, y a la distancia observar la presencia de otros individuos con frutos en estado de dehiscencia. La presencia de reproductores se hizo a partir de la estimación de reproductores/m² multiplicado por la estimación del área de cada población. Las poblaciones 4 y 9 fueron después de la población 3 las que presentan también problemas con el bajo número de reproductores por población, a diferencia de las poblaciones 1 y 7 que registraron una estimación superior a los 160 reproductores/población. La densidad de reproductores por área es muy factible que fluctúe entre un año y otro, relacionado a la presencia de lluvias en el año o años anteriores en que se desarrolle la inflorescencia. Polis (1991) a este respecto indica que en plantas perennes de zonas áridas el comportamiento demográfico es variable, influido por las temperaturas extremas y lo impredecible de los eventos de precipitación.

Para el ambiente de pared, inicialmente se había contemplado el determinar la densidad de reproductores a partir de observaciones con binoculares en áreas de 2500 o 5000 m² para dar una estimación por población, sin embargo, la presencia de infrutescencias de años anteriores eran difíciles de diferenciar con las de menos de un año.

Potencial reproductivo. Al considerar la alta producción de semillas por planta, aunada a los elevados porcentajes de germinación de las semillas, parece que la especie muestra estar estable en cuanto a sistema de reproducción sexual, al parecer el reclutamiento de genets depende principalmente de factores ambientales adecuados. Nobel (1985, 1992) estableció un seguimiento por 20 años en *A. deserti*, de los cuales en sólo uno de los años se presentó el reclutamiento de genets, evento que estuvo relacionado con la presencia de intensas lluvias por un periodo largo. En la población 3, donde únicamente se encontró un reproductor, difícilmente hubo aporte de semillas al suelo ese año como posiblemente ocurrió en los años anteriores, ya que en ningún caso se observaron restos de la infrutescencia y si las plantas secas con solo un fragmento de la base de la infrutescencia, dejando ver el corte 30 cm arriba que evidenciaba el saqueo total de semillas. En esta población, es predecible que de seguir reduciéndose los índices de reproducción sexual, por saqueo de las semillas y de plantas potencialmente adultas, las nuevas generaciones podrían llegar a ser el resultado de una endogamia, presentar baja variación genética o simplemente

la falta de producción de semillas por no existir más de un individuo para permitir el entrecruzamiento. Además, si para esta especie su comportamiento de reclutamiento se da por pulsos como el reportado en *A. deserti* (Nobel 1985, 1992), la falta de semillas en el suelo en el año que las condiciones ambientales permitan el reclutamiento, podría ser una limitante del reclutamiento de genets y a largo plazo repercutiría en la variación genética de la población. Para *Opuntia rastrera* (Mandujano 1995; Mandujano *et al.* 1996) se ha reportado que la presencia de mayor número de flores y frutos está directamente relacionado con una abundante precipitación de agua del año anterior. A plantas perennes del desierto Sonorense se les han registrado cambios muy marcados en su desarrollo y en su demografía cuando se presentan condiciones extremas de humedad o de sequía (Goldberg y Turner 1986).

La permanencia de semillas por más de un año dentro de las cápsulas dehiscentes, se hace posible porque entre otros factores el ráquis puede mantenerse erecto por la presencia de esclerénquima, registrando poco deterioro aun cuando la planta esté muerta desde el inicio de la dehiscencia. La presencia de semillas en estas infrutescencias es baja y su germinación bajo condiciones de invernadero registró promedios de porcentajes superiores al 20% (Tabla 8). Por lo anterior podría llegar a considerarse que el banco de semillas *in situ* de *A. victoriae-reginae* no sólo está constituido por las almacenadas en el suelo, sino también podría extrapolarse al conjunto de frutos en el ráquis mientras éstos permanezcan erectos. Durante los periodos que permanecen las semillas en condiciones naturales, dentro de cápsulas dehiscentes, están sujetas a los cambios climáticos que prevalecen en regiones áridas y al ataque por insectos parásitos y hongos que deben influir en la viabilidad y sobrevivencia de las semillas (Harper y White 1974); ésto para *A. victoriae-reginae* debió repercutir en la disminución de la germinación de semillas en el invernadero. En *Collinsia verna*, planta anual de invierno del bosque del E medio de los Estados Unidos, Kalisz (1991) reportó que en el banco de semillas *in situ* pierden viabilidad las semillas conforme pasa el tiempo, presentándose un 16% al final del primer año y disminuyendo a 6% a los tres años. Aguero (1994) para *A. victoriae-reginae* de la población 6, estableció la germinación de semillas recién liberadas y seleccionadas por su menor desplazamiento al separarlas por una corriente de aire en el laboratorio y reportó un

promedio de 93%, el cual fue similar al porcentaje de germinación de semillas con menos de un año de edad colectadas en las diferentes poblaciones del presente estudio.

Conservación de semillas. Las semillas de *A. victoriae-reginae* después de su maduración, bajo condiciones *in situ*, están sujetas a amplios cambios de temperatura y humedad en periodos de 24 h, lo cual puede influir en la pérdida de viabilidad con el transcurso de los meses, aun en aquellas que permanecen atrapadas dentro de la cápsula. Esta pérdida de viabilidad fue observable en las semillas colectadas y almacenadas, las cuales presentaban una edad de 1-2, 6-8 y 14 o más meses de maduración. La reducción en el porcentaje de germinación se presentó en las semillas que permanecieron más tiempo en el campo dentro del fruto bajo condiciones naturales. A este respecto, en *A. americana*, se ha reportado que la probabilidad de germinación en semillas decrece linealmente con el tiempo de almacenaje a 60°C (Pritchard 1994; Pritchard y Miller 1995). Las condiciones de almacenamiento aplicadas para las semillas colectadas en este estudio, fueron utilizadas no por ser las más idóneas (pues existe un gran desconocimiento de la especie), sino por ser un sistema económico de almacenamiento y por existir un antecedente de semillas de un fruto colectado, las semillas las almacenamos en 1988 en un refrigerador (8-12°C) dentro de un frasco con cloruro de calcio anhidro, ocho años después se registró un 70% de germinación.

Las semillas almacenadas por 2 años después de su colecta en campo, registraron porcentajes similares de germinación en frutos correspondiente a dos poblaciones (2 y 5), sólo en el caso de una planta registró una disminución considerable, de 94 a 70%.

Germinación de semillas bajo condiciones naturales en las poblaciones visitadas. El éxito del reclutamiento de genets, debe de estar relacionado con periodos de lluvias prolongados que debieron presentarse dentro de la historia de vida de las poblaciones. Este fenómeno ha sido registrado para *Agave deserti* después de 20 años de observación en campo, de los cuales se reportó que el reclutamiento de genets se presentó en un sólo año, asociado a periodos prolongados de lluvias (Nobel 1992). En la población uno se observaron altos niveles de germinación, relacionados con un periodo largo de lluvia, ocasionado por la presencia de un ciclón en el Golfo de México, las plantas se presentaban en tallas uniformes (presencia de una sola hoja), característico de una talla menor a un mes

de edad (estimado en invernadero). En *Sedum smallii* y *Minuartia uniflora* son pocos los individuos que sobreviven después de alcanzar el estadio de plántula generados de la germinación de semillas (Harper y White 1974). Fenómenos meteorológicos similares y con repeticiones en 1 o más años pueden ser factores que permitan el reclutamiento de genets de esta especie.

Propagación bajo condiciones controladas. Los altos porcentajes de germinación en suelo diferente al natural y en presencia de alta humedad bajo condiciones de invernadero y libre de herbívoros, muestran que el agua puede ser una de las limitantes más importantes para un mayor establecimiento de plántulas.

Las plántulas clon de *A. victoriae-reginae* originadas *in vitro* y establecidas en suelo en 1994, han presentado un desarrollo normal, actualmente los diámetros mayores son de 20 cm. Las plantas han desarrollado brotes laterales, en forma notable, esta respuesta también es común observarla en plantas generadas de semillas al sujetarlas a cultivo en invernadero.

Conclusiones

- * Se estableció la estructura de tamaños, densidad y tamaño de la mayoría de las poblaciones, lo cual permitió entender ecológicamente el estado en que se encuentran las poblaciones.
- * Se establecieron diferencias de la forma de reclutamiento (genet y ramet) en dos ambientes, determinando que a diferencia de otros agaves, la especie estudiada presenta una mayor incidencia a las formas genets.
- * El reclutamiento de genet (sexual) en relación a los ramets (asexual) es superior en ambiente de pared (0.35 ramets/genets), invirtiéndose la respuesta para el ambiente de loma (2.55 ramets/genets), lo cual parece estar relacionado la abundancia de ramets a la presencia o abundancia de suelo.
- * El potencial reproductivo sexual es alto y muy probablemente estable, reflejado por la alta producción de semillas por planta reproductiva (promedios superiores de 50,000 semillas por planta) y los altos porcentajes de germinación (>90% después de 6 meses de colecta y de aproximadamente 25% después de 2 años de permanecer dentro del fruto bajo

las condiciones extremas del desierto). Sin embargo su reclutamiento parece depender de las condiciones del medio ambiente, principalmente de la humedad y del hábitat de pared que reduce la depredación de semilla y facilita su establecimiento.

* Las semillas tienen alto porcentaje de germinación inmediatamente después de su colecta (superior al 90%) y disminuye si no se almacenan adecuadamente, la metodología utilizada (8-10°C, obscuridad y baja humedad relativa) es adecuada para la conservación a mediano plazo 10-15 años, periodos más largos podrían garantizarse a temperaturas más bajas (-20°C) utilizando sistemas aplicables a especies hortícolas y forestales.

* La rigidez de estructuras de las plantas aun después de muertas, en las que se mantienen los frutos dehiscentes por más de dos años, constituyen parte del banco de semillas *in situ* por almacenar semillas que se conservan viables (semillas con 25% o más de germinación después de dos años en campo) y por la dehiscencia que aun se presenta en la frutescencia.

* Se estableció el principio de un sistema de conservación *ex situ* de semillas de *A. victoriae-reginae*. Las condiciones de almacenamiento en refrigeración aquí reportadas y empleadas ya durante dos años, aunque probablemente no son las más idóneas, se presenta como una alternativa de bajo costo viable para el almacenamiento de germoplasma.

* Por la alta diferenciación estadística en la estructura de tamaños y las diferencias morfológicas apreciadas en las plantas entre las poblaciones durante el recorrido en campo, demuestra la necesidad de profundizar en ellos y desarrollar estudios de taxonomía, citogenética, anatomía, aspectos de la biología reproductiva, para evaluar el nivel de diferenciación entre las poblaciones. Aunque no se cuantificó, fue posible observar diferencias morfológicas de las plantas entre las poblaciones.

* Para la población 3 (hábitat de loma) se recomienda desarrollar y aplicar un programa de conservación *in situ* en forma de jardín botánico regional donde se puedan proteger al mayor número de sitios, y agrupar los distantes. Lo anterior debido a que está sujeta a un saqueo exhaustivo de semillas y plantas, por colectores con interés comercial ornamental, así como por aficionados y jardines botánicos para mantener sus colecciones. De continuar con esta actividad, en un lapso corto la población manifestará una aguda erosión genética, sobre todo si se toma en cuenta que la población está representada por un estimado de 864 indivs, de los cuales menos de 6 llegan al estado reproductivo por año.

* Se recomienda suspender la demolición de dos pequeñas sierras, hábitats de distribución de dos poblaciones, la 2 y la 6, de las cuales se explota el mineral. De no detener el deterioro de estas dos poblaciones, seguirán el mismo camino en que se encuentra la población 3.

Literatura citada

Aguero, M.A. 1994. Potencial de reproducción sexual de la Noa (*Agave victoriae-reginae* T. Moore). Tesis de Licenciatura, Escuela Superior de Biología, Universidad Juárez del Estado de Durango, México.

Arias S. 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México. Rev. Soc. Méx. Hist. Nat. **44**:109-115.

Arizaga S. y E. Ezcurra. 1995. Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks. *Oecologia* **101**:329-334.

Axelrod D.I. 1950. Evolution of desert vegetation in western North America. *Carn. Inst. Wash. Publ.* **590**:215-306.

Blanco C.E. 1995. Propuesta sistemática para el aprovechamiento y conservación de la noa (*Agave victoriae-reginae* T. Moore). Tesis de Maestría, Facultad de Agricultura y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango, México.

Barrett S.C.H. y J.R. Kohn. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. Páginas 3-30, en: Donald A. Falk y K.E. Holsinger (eds.), *Genetics and Conservation of rare plants*. Oxford Univ. Press, New York.

Begon M. y M. Mortimer. 1986. *Population Ecology: A unified study of animals and plants*. Blackwell Sci. Publ. Mass. USA. 220 p.

Bye R. 1993. The role of humans in the diversification of plants in Mexico. Páginas 707-731, en: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, y J.Fa (eds.), *Biological diversity of Mexico: origins and distribution*. Oxford Univ. Press, New York.

Caswell H. 1985. The evolutionary demography of clonal reproduction. Páginas 187-224, en: J.B.C. Jackson, L.W. Buss y R.E. Cook (eds.), *Population biology and evolution of clonal organisms*. Yale Univ. Press, New Haven, Connecticut, USA.

Cook R.E. 1979. Asexual reproduction: a further consideration. *American Naturalist* **113**:769-772.

- _____. 1985. Growth and development in clonal plant populations. Páginas 259-296, en: J.B.C. Jackson, L.W. Buss, y R.E. Cook (eds.), Population biology and evolution of clonal organisms. Yale University Press, Connecticut, USA.
- Darlington H.T. y G.P. Steinbauer. 1961. The eighty-year period for Dr. Beals' seed viability experiment. Amer. J. Bot. **48**:321-325.
- Eguiarte L. y A. Búrquez. 1987. Reproductive ecology of *Manfreda brachystachya*, an iteroparous species of Agavaceae. The Southwestern Naturalist **32**:169-178.
- Epling C., H. Lewis y F.M. Ball. 1960. The breeding group and seed storage: a study in population dynamics. Evolution **14**:238-255.
- Frankel O.H. y M.E. Soulé. 1981. Conservation and evolution. Cambridge Univ. Press, London. 327 p.
- Frankham R. 1995. Conservation genetics. Ann. Rev. Genetics. **29**:305-327.
- Freeman C.E. 1973. Some germination responses of lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.). Southwestern Naturalist **18**:125-134.
- _____, R.S. Tiffany y W.H. Reid. 1977. Germination responses of *Agave lechuguilla*, *A. parri*, and *Fouquieria splendens*. Southwestern Naturalist **22**:195-204.
- _____, W.H. Reid y J.E. Becvar. 1983. Nectar sugar composition in some species of *Agave* (Agavaceae). Madroño **30**:153-158.
- _____. 1985. Aspects of the reproductive biology of *Agave lechuguilla* Torr. Desert Plants **7**:74-80.
- Frego K.A. y R.J. Staniforth. 1986. The Brittle Prickly-pear cactus, *Opuntia fragilis*, in the boreal forest of southeastern Manitoba. Canadian Field Naturalist **100**:229-236.
- García-Mendoza A. y R.V. Galván. 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. Bol. Soc. Bot. Méx. **56**:7-24.
- Gentry S.H. 1982. Agaves of Continental North America. Univ. of Arizona Press, Tucson. 670 p.
- Goldberg E.D. y R.M. Turner. 1986. Vegetation change and plant demography in permanent plots in the Sonoran desert. Ecology **67**:695-712.
- Harper J.L. y J. White. 1974. The demography of plants. Ann. Rev. Ecol. Syst. **5**:419-463.

Howell D.J. y B. Schropfer Roth. 1981. Sexual reproduction in agaves: the benefits of bats; the cost of semelparous advertising. *Ecology* **62**:1-7.

Kalisz S. 1991. Experimental determination of seed bank age structure in the winter annual *Collinsia verna*. *Ecology* **72**:575-585.

Krebs Ch.J. 1985. Ecología, estudio de la distribución y la abundancia. Harper & Row Latinoamericana, México. 753 p.

Mandujano M.C.S. 1995. Establecimiento por semillas y propagación vegetativa de *Opuntia rastrera* en dos ambientes contrastantes en la reserva de la biosfera de Mapimi, Durango. Tesis de Doctorado en Ecología, Unidad de los Ciclos Profesionales y de Posgrado del C.C.H. Centro de Ecología. U.N.A.M., México. 82pp.

_____, C. Montaña y L.E. Eguiarte. 1996. Reproductive ecology and inbreeding depression in *Opuntia rastrera* (Cactaceae) in the Chihuahuan desert: Why are sexually derived recruitments so rare? *Amer. J. Bot.* **83**:63-70.

Martínez-Palacios A. 1991. Propagación masiva *in vitro* y recuperación de poblaciones de orquídeas en peligro de extinción. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM, México. 100 pp.

Martínez Del Río C. y L.E. Eguiarte. 1986. Bird visitation to *Agave salmiana*: comparisons among hummingbirds and perching birds. *Condor* **89**:357-363.

Nobel P.S. 1985. Environmental Responses of Agaves a case study with *Agave deserti*. Páginas 55-66, en: C. Cruz, L. Del Castillo, M. Robert y R.N. Ondarza (eds.), *Biología y Aprovechamiento integral del Henequén y otros Agaves*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

_____. 1992. Annual variations in flowering percentage, seedling establishment and rainnet production flora desert perennial. *Int. J. Plant Sci.* **153**:102-107.

_____. 1994. Remarkable Agaves and Cacti. Oxford University Press, New York.

Osborne R. y J. van Staden. 1987. *In vitro* regeneration of *Stangeria eriopus*. *HortScience* **22**: 1326.

Pianka E.R. 1982. Ecología Evolutiva. Omega, S.A. Barcelona, España. 365 p.

Polis G.A. 1991. I. Desert communities: an overview of patterns and processes, en: G.A. Polis (ed.), *The Ecology of Desert Communities*. The University of Arizona Press, Tucson.

- Pritchard H.W. 1994. Seed conservation in Agavaceae: Observations on the germination and longevity of *Agave americana* seeds. I Simposio Internacional sobre Agaváceas, 9-11 de nov. 1994, Jardín Botánico, IB-UNAM, México.
- _____. y A.P. Miller. 1995. The effects of constant temperatures, light and seed quality on the germination characteristics of *Agave americana*. Bol. Soc. Bot. México 57:11-14.
- Ricklefs R.E. 1984. Ecology. Chiron Press. New York.
- Roberts E.H. 1975. Problems of long-term storage of seed and pollen for genetic resources conservation. Páginas: 269-295, en: Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow, O.H. Frankel y J.G. Hawkes (eds.). International Biological Programme 2. Cambridge Univ. Press.
- Rzedowski J. 1962. Contribuciones a la fitogeografía florística e historia de México I. Algunas consideraciones acerca del elemento endémico en la flora mexicana. Bol. Soc. Bot. Méx. 27:52-65.
- _____. 1991a. Diversidad y origen de la flora fanerogámica de México. Act. Bot. Mexicana. 14:3-21.
- _____. 1991b. El endemismo en la flora fanerogámica mexicana: una apreciación analítica preliminar. Acta Bot. Mexic. 15:47-64.
- _____. 1993. Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico. Páginas 129-144 en: T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa (eds.), Biological diversity of Mexico: origins and distribution. Oxford Univ. Press, New York.
- Sanchez-Mejorada H.R. 1979. Saqueo de cactáceas mexicanas: aprovechando las excursiones de turistas. Cact. Suc. Mex. 24:75-77.
- SAS (1990). SAS/STAT User's Guide, Versión 6, 4ª ed. SAS Institute, Inc., Cary, NC.
- Schaffer W.M. y M.V. Schaffer. 1979. The adaptative significance of variations in reproductive habitat in the Agavaceae II: pollinator foraging behavior and selection for increased reproductive expenditure. Ecology 60:1051-1069.
- Slauson L. 1995. Factors affecting the distribution, pollination ecology, and evolution of *Agave chrysantha* Peebles and *A. palmeri* Engelm. (Agavaceae). Páginas 194-205, en: L.F. DeBano, G.J. Gottfried, R.H. Hamre, C.B. Edminster, P.F. Ffolliot y A. Ortega-Rubio (eds.), Biodiversity and Management of the Madrean Archipelago: The Sky Islands of Southwestern United States and Northwestern Mexico. USDA Forest Service, General Technical Report RM-GTR-264.

Stearns S.C. 1987. The evolution of sex and its consequences. Birkhauser Verlag, Boston.

Stebbins, G.L. 1952. Aridity as a stimulus to plant evolution. Amer. Nat. **86**:33-44.

Szarek S.R. y G.E. Holmesley. 1996. Physiological activity in persistent bulbils of *Agave vilmoriniana* (Agavaceae). Amer. J. Bot. **83**:903-909.

Thompson, P.A. 1975. The collection, maintenance and environmental importance of the genetic resources of wild plants. Environ. Conserv. **2**:223-228.

Trame A.-M., A.J. Coddington y K.N. Paige. 1995. Field and genetic studies testing optimal outcrossing in *Agave schottii*, a long-lived clonal plant. Oecologia **104**:93-100.

CAPITULO IV

**MICROPROPAGACION DE *Agave victoriae-reginae* T. MOORE (AGAVACEAE),
A PARTIR DEL CULTIVO DE EMBRIONES CIGOTICOS Y TALLOS DE
PLANTULAS DE SEMILLAS GERMINADAS *IN VITRO*.**

Micropropagación de *Agave victoriae-reginae* T. Moore (Agavaceae), a partir del cultivo de embriones cigóticos y tallos de plántulas de semillas germinadas *in vitro*.

Introducción

Los procedimientos de cultivo de tejidos vegetales son metodologías que a partir de células, tejidos y órganos han permitido la propagación en forma masiva de plantas de numerosas especies (Tisserat 1985). La regeneración de plantas es la piedra angular en estas técnicas, aún para otras aplicaciones que tienen gran trascendencia como el establecimiento de nuevas y mejores alternativas de mejoramiento genético como la hibridación por protoplastos, cultivo de tejidos haploides (anteras y óvulos), generación de variabilidad genética, estudios de crecimiento y diferenciación, clonación en propósitos de rápida multiplicación en especies con interés comercial o de difícil propagación, obtención de plantas libres de patógenos a través del cultivo de meristemas, estudios de reguladores del crecimiento, producción de metabolitos secundarios para uso industrial, conservación de germoplasma, rescate de embriones, estudios básicos, etc. (George y Sherrington 1984; George 1993). La aplicación de estas técnicas ha llegado a tener un gran impacto sobre todo en la agricultura desde la década de los setenta, generando plantas por hibridación de protoplastos, estudios de crecimiento y diferenciación, generación de plantas variables genéticamente, cultivo de anteras, eliminación de enfermedades a partir del cultivo de meristemas, multiplicación rápida y clonal de especies deseables o de difícil propagación por métodos tradicionales, y muchos estudios con reguladores del crecimiento (Murashige 1974, 1978; Tisserat 1985). El uso de estas técnicas es una poderosa herramienta en la agricultura y horticultura, incorporando a estas dos disciplinas un gran número de híbridos y variedades (George 1993).

El cultivo de tejidos se fundamenta en la totipotencialidad celular (Dodds y Roberts 1982), por lo que teóricamente de cualquier parte de la planta se pueden regenerar nuevas plantas. Sin embargo, el tipo y el estado fisiológico del fragmento de planta (explante) serán factores importantes en el estudio de regeneración y estabilidad genética (George 1993). Tejidos y órganos inmaduros son generalmente los de mayor plasticidad morfogénica *in vitro*, en relación a los tejidos maduros (Gamborg 1982, 1984; Tisserat 1985). Además, los tejidos u órganos meristemáticos, pueden ser seleccionados sobre otras fuentes de tejidos

por sus propiedades para clonación, sobrevivencia al cultivo, tasas de crecimiento y expresión de su totipotencialidad *in vitro* (Tisserat 1985). Los componentes físico-químicos del cultivo de tejidos son también importantes a considerar para el adecuado desarrollo de los cultivos, entre los de mayor importancia en tomar en cuenta, se pueden citar a las sales minerales, la sacarosa como fuente de carbono, las vitaminas, aminoácidos, reguladores del crecimiento, pH, temperatura y la luz en cuanto a la intensidad, calidad y fotoperiodo (Gamborg y Shyluk 1981; Dodds y Roberts 1982; Gamborg 1982, 1984; Tisserat 1985; George 1993). Las investigaciones en diversas especies han permitido la generación de un gran número de medios nutritivos, el más comúnmente usado es la formulación desarrollada por Murashige y Skoog (MS) en 1962 (Murashige 1974; George y Sherrington 1984; Tisserat 1985; George 1993).

El cultivo de tejidos vegetales se puede enmarcar en dos vías de acuerdo al proceso de regeneración de las plantas (Tisserat 1985): (a) embriogénesis somática directa e indirecta, y (b) organogénesis que puede ser de forma directa, indirecta y la formación de plantas a partir de yemas axilares y meristemas apicales.

(a) Embriogénesis somática. La formación de embriones somáticos a partir de células, tejidos y órganos puede llegar a ocurrir de manera directa e indirecta, en gran parte por la acción inductora de auxinas como el 2,4-D y eventualmente citocininas (Tisserat, 1985, George 1993). La forma directa implica el desarrollo a partir de una célula o un grupo de células directamente del tejido somático sin pasar por la fase de callo (masa amorfa de células). Entre los tejidos de más rápida respuesta se pueden citar a las células epidérmicas de tallo, explantes de embriones inmaduros, así como el tejido nucelar, aunque se reporta también de anteras y protoplastos (Tisserat, 1985). La embriogénesis indirecta consiste del establecimiento en cultivo *in vitro* de cualquier explante, la proliferación de callo y la subsecuente iniciación de estructuras proembrionarias donde participan una célula o un grupo de éstas. Prácticamente cualquier parte de la planta, como raíz, hojas tallo, embrión cigótico, peciolo, etc., puede ser utilizada para producir callos embriogénicos (George y Sherrington 1984; Tisserat 1985; George 1993).

Perspectivas del uso de la embriogénesis en la propagación de especies en peligro de extinción. Para la aplicación de este sistema de propagación por cultivo de

tejidos en programas de conservación de especies en peligro de extinción, es fundamental distinguir las vías que permiten mantener una estabilidad genética de las que generan diferentes niveles de inestabilidad. Para lograr cultivos estables genéticamente, es necesario seleccionar el órgano o tejido apropiado, las regiones meristemáticas: yemas axilares y puntas de brotes, son tejidos que se caracterizan por mantener su estabilidad genética, por ser zonas donde las células que lo integran se mantienen en un estado de renovación celular y de forma similar al formado durante el desarrollo del embrión cigótico (Kantha 1981; Hu y Wang 1983; Hussey 1986; Margara 1988). Los tejidos y órganos no meristemáticos derivados de brotes y yemas axilares, como hojas, raíz, tallo, estolón, tubérculo, etc., se caracterizan por presentar alta especialización celular, en muchos casos ésta se ve reflejada en cambios notables a nivel cromosómico, a este respecto, Ramulu y Dijkhuis (1986) por medio de un análisis del ADN nuclear por citómetro de flujo, en diversos tejidos (brote, hoja, tallo, raíz, estolón) de 2 especies de *Solanum*, reportaron una alta inestabilidad en tallos, raíces y estolones en relación a explantes de hojas y brotes.

La vía de respuesta morfogenética, directa e indirecta, es otro factor importante a contemplar para la estabilidad o inestabilidad genética (Hussey 1986; Meins 1986). Los procesos indirectos implican una desdiferenciación de los tejidos, protagonizado por una mitosis acelerada, que conllevan a una desorganización, originando una masa de células, comúnmente denominada callo, inducida principalmente por la presencia exógena de reguladores del crecimiento adicionados al medio. Los cultivos de callo por largos periodos de tiempo, están directamente relacionados con la aparición y presencia de elevados niveles de variación genética, ejemplo: cambios cromosómicos en la estructura y el número cromosómico, en el contenido de ADN y cambios genéticos (Karp y Bright 1985; Hussey 1986). Esta inestabilidad puede presentarse de igual forma en plantas generadas de cultivos celulares en suspensión y a partir de protoplastos (D'Amato 1978; Larkin y Scowcroft 1981; Meins 1986). Sin embargo, existen ejemplos de inestabilidad genética en plantas generadas de ápices de tallo y meristemas, así como ejemplos de estabilidad genética en plantas generadas a partir de callos y cultivos en suspensión (Nehra *et al.* 1994).

Es evidente que la estabilidad genética depende de varios factores, entre los de mayor importancia se mencionan al tipo de explante (meristemas), el sistema de

regeneración (directa), el genotipo, el tipo y la concentración óptima de los reguladores de crecimiento (mínimas) y el menor tiempo en cultivo de los estados inestables (ej. callo) (Kantha 1981; Hussey 1986; Nehra *et al.* 1994).

(b) Organogénesis. La organogénesis es la base fundamental de la multiplicación vegetativa o formación de nuevos meristemas (Margara 1988) y también de la producción mundial de plantas *in vitro* (Vasil 1994). Tisserat (1985) divide al proceso de producción de órganos en tres tipos: (a) producción de órganos adventicios vía callo, a lo cual se le nombra organogénesis indirecta, los tejidos más convenientes para ser utilizados por esta vía son las puntas de tallos, hojas y pétalos; (b) surgimiento de órganos adventicios directamente, sin pasar por la fase de callo, se emplean embriones, hojas, cormos, bulbos, tallos, rizomas y tubérculos; y (c) producción de plantas generadas de la brotación de las yemas axilares o puntas de brotes, para la propagación usualmente se adiciona al medio una citocinina para inhibir la dominancia apical y estimular el desarrollo de las yemas axilares; una más de las ventajas de usar áreas meristematicas es que dependiendo del tamaño del explante usado inicialmente, si se cultivan meristemas (80 μ) pueden obtenerse plantas libres de patógenos (Tisserat 1985; Margara 1988). Estos dos últimos procesos (b y c) se remarcan en una organogénesis directa, en donde las células con la competencia organogenética se encuentran en el explante al tiempo de su disección. La forma indirecta requiere de una desdiferenciación del tejido acompañada de una actividad mitótica para la formación de callo y posteriormente ocurre una redeterminación de las células para adquirir la capacidad morfogenética (Sharp *et al.* 1980). Al igual que en la embriogénesis somática directa, los promotores de la callogénesis son altas concentraciones de auxinas y bajas o ausencia de citocininas (Tisserat 1985; George 1993).

Perspectivas de la aplicación de la organogénesis en la propagación de especies en peligro de extinción. De las tres vías propuestas anteriormente para la producción de órganos, la última, producción de plantas generadas directamente de la brotación de las yemas axilares o puntas de brotes, es el proceso que permite mantener una mayor posibilidad de estabilidad genética (Kantha 1981; Hussey 1986). Para los casos en que se requiere mantener la estabilidad genética y se utiliza la desdiferenciación a callo de los tejidos, es necesario que el cultivo y división del callo no se prolongue, debido a que se

corre el riesgo de generar plantas aberrantes tal y como se indicó anteriormente para la embriogénesis.

Perspectivas de la aplicación del cultivo de tejidos vegetales en la propagación de especies en peligro de extinción. La aplicación de algunas de estas técnicas en el área de la agricultura, se presentan como una alternativa para ser utilizadas en la propagación de plantas y conservación de germoplasma de especies en peligro de extinción (Raven 1976; Rao 1977; Wochok 1981; Snow 1985; Stewart 1989; Iriondo y Pérez 1990; Martínez-Palacios 1991; Rubluo *et al.* 1993), entre las cuales se puede mencionar algunos de los sistemas aplicados en la agricultura (Murashige 1978; George, 1993) como el rescate de embriones, obtención de plantas libres de patógenos, rápida propagación clonal y conservación de germoplasma *in vitro*.

En conservación de germoplasma de interés agrícola las plantas se conservan a temperaturas bajas de 0-12°C y las semillas a -20°C. Sin embargo, aunque los periodos de conservación son relativamente largos para semillas (20-50 años), las plantas *in vitro* requieren de subcultivos por periodos de 2-4 años (Roberts 1975; Frankel y Soulé 1981). Los avances en la criopreservación se presentan como una alternativa viable, en un futuro cercano con el entendimiento sobre el congelamiento en nitrógeno líquido (-196°C) de las células vegetales. Lo anterior tendrá un papel importante en la conservación *ex situ* de la diversidad genética de las especies, los bancos de genes ocuparán espacios muy reducidos, a partir de tan solo unas cuantas células o una punta de brote por individuo (Withers 1986).

Una de las aplicaciones con gran potencialidad para las especies amenazadas se registra en la micropropagación, donde ha alcanzado niveles de alta eficiencia. A este respecto, Martin (1984) reporta la obtención de 200,000 a 400,000 plantas (ej. rosales, perales, manzanos, etc.) en un año a partir de una sola yema, que en comparación con el método tradicional de injerto o estaca, solamente se generan de 30 a 50 descendientes en dos años.

El uso de la micropropagación por vías morfogénica que no aseguren la estabilidad genética, sólo podrá ser aceptada para uso comercial. Sobre todo se aplica en aquellas especies en peligro de extinción con el alto valor ornamental, donde su comercio está promovido por un mercado negro y un continuo saqueo de plantas silvestres. De no

frenarse esta actividad ilegal, ocasionará la extinción acelerada de muchas especies. Si se satura el mercado con plantas cultivadas, se permitiría reducir el saqueo de plantas de las poblaciones silvestres.

En poblaciones donde existe una pérdida de variación genética, al tratar de incrementar o inducir variación genética de manera artificial, se corre el riesgo de generar individuos aberrantes, como la inducción de poliploidía originada por diferentes grados de endoreduplicación nucleica (D'Amato 1977; Ramulu y Dijkhuis 1986) o de plantas con cierto grado de mutación (Karp y Bright 1985; Hussey 1986). Estos cambios pueden acarrear problemas de mayor gravedad que el estado actual de perturbación de una especie, ya que la introducción de genes raros a una población pueden interrumpir genes coadaptados de las poblaciones silvestres y llevar primero a la extinción de pequeñas poblaciones (Ecker 1989).

El uso de las técnicas específicamente las de cultivo *in vitro* son una poderosa herramienta para el caso de especies donde la germinación por métodos tradicionales es casi nula. Un ejemplo notable lo presentan las semillas de orquídeas que hasta el siglo pasado se consideraron en su mayoría estériles, las investigaciones realizadas por Bernard en 1899 (Knudson 1922) y Burgeff en 1909 (Withner 1959) permitieron descubrir el papel de un hongo micorrízico específico en la germinación simbiótica. En base a estas investigaciones, Knudson (1922) logró con éxito hasta en un 100% la germinación asimbiótica de semillas de un híbrido (*LaeliaXCattleya*) al adicionar glucosa y fructosa a un medio nutritivo y establecer el cultivo bajo condiciones asépticas. Estas técnicas han sido utilizadas exitosamente en la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas mexicanas en peligro de extinción, y su desarrollo *in vitro* a planta para su posterior liberación en el hábitat natural (Martínez-Palacios 1991; Rubluo *et al.* 1993). En relación a la aplicación de cultivo de tejidos podría ser de suma importancia cuando los sistemas tradicionales de propagación no funcionan o en aquellas poblaciones donde la erosión genética por efecto antropogénico ha alcanzado niveles alarmantes. Lo anterior es evidente para *Cercocarpus traskiae* Eastw. endémico de la isla de Santa Catarina, California, en la que únicamente se encontraron 7 plantas y un análisis isoenzimático mostró que correspondían a 7 genotipos únicos (Mistretta 1994).

Antecedentes

En cultivo de tejidos, las investigaciones del género *Agave* se han realizado con pocas especies (Tabla 1). Los estudios se han orientado principalmente a especies de uso hortícola e industrial, con la finalidad de propagar masivamente clones de plantas seleccionadas en campo, que permitan establecer homogeneidad en los cultivos, resaltando las características de interés comercial, de las cuales, podemos citar la calidad y cantidad de fibra, desarrollo acelerado de las plantas entre otras características (Tabla 1). En el caso de las especies en peligro de extinción, las técnicas de cultivo *in vitro* se presentan como una alternativa importante en la conservación de germoplasma y propagación de plantas y son una herramienta fundamental cuando los sistemas tradicionales no funcionan (Rao 1977; Frankel y Soulé 1981; Wochok 1981; Martínez-Palacios 1991). Debido a las formas de crecimiento de las plantas del género *Agave*, las estructuras que han sido utilizadas para fines de micropropagación son hoja, tallo, yema lateral, rizoma o estolón; también existen algunos reportes del uso de estructuras reproductivas (semilla) (Tabla 1). La mayoría de las respuestas se han reportado orientadas a la formación de brotes vía organogénesis directa e indirecta, y sólo se encontraron tres reportes con respuesta de embriogénesis somática, y en uno de ellos no hubo evidencias claras del proceso (Tabla 1). El uso de reguladores del crecimiento, auxinas y citocininas, ha sido necesario en la promoción de respuestas morfológicas (Tabla 1). El medio de cultivo con mayor aplicación en micropropagación de agaves es el MS (Murashige y Skoog), como se expresa en los diferentes trabajos citados (Tabla 1).

Objetivo general. Aplicar el cultivo de tejidos para estudiar y establecer sistemas de propagación masiva de *Agave victoriae-reginae* T. Moore, que pueda ser utilizado en: (a) el rescate de genotipos erosionados, manteniendo su identidad genética, e incorporarlo a programas de conservación; (b) la propagación masiva para uso en la industria de planta ornamental que permita reducir indirectamente el saqueo de semillas y plantas silvestres al surtir el mercado demandante.

Objetivos particulares.

1. Establecer condiciones para la regeneración *in vitro* de plantas *Agave victoriae-reginae* a partir de embriones cigóticos y secciones de tallo de plántulas.

Tabla 1. ANTECEDENTES DEL CULTIVO DE TEJIDOS EN EL GENERO *Agave*

Especie	Explante	Medio de cultivo	Combinación de reguladores del crecimiento mg/l	Morfogénesis	Literatura consultada
<i>Agave</i> spp	Hojas			Callo	Hunault 1974.*
	Segmentos de semillas	LS	2,4-D 0.2 + K 1.0	Brotes (OI)	Groenewald <i>et al.</i> 1977.
	Segmentos de semillas	LS	2,4-D 1.0 + K 5.0	Nódulos embriogénicos, vía directa. Plántulas	
<i>A. atrovirens</i> Karw.	Brote lateral			Brotes (OD)	Madrigal <i>et al.</i> 1981.*
<i>A. fourcroydes</i> Lem.	Tallo, rizoma y hoja joven			Brotes (OI)	
	Rizoma	SH	2,4-D 0.025 + BA 10.0	Brotes (OI)	Robert <i>et al.</i> 1987.
	Rizoma	MS	2,4-D 0.025 + BA 10.0	Brotes (OD)	
<i>A. arizonica</i> Gentry & Weber	Base de hoja	MS	NAA 0.1 ó 1.0 + BA 10.0	Brotes (OI)	Powers & Backhaus 1989.
<i>A. cantala</i> Robx.	Segmentos de nodo de estolón	MS	NAA 0.075 + IBA 0.1 + K 0.5	Brotes (OD)	Binh <i>et al.</i> 1990.
<i>A. fourcroydes</i> , <i>A. tequilana</i> , Weber <i>A. atrovirens</i>	Brote, tallo y segmentos de semilla	MS	IAA 0.3 K 1.0	Brotes (OI)	Madrigal <i>et al.</i> 1990.
<i>A. atrovirens</i> Karw. ex Salm.	Yemas laterales	MS	IAA 2.0 + K 1.0 + BA 1.0	Brotación (OD)	Villalobos <i>et al.</i> 1991.
	Cambium vascular	MS	IAA 1.0 + K 1.0	Brotación (OI)	
<i>A. sisalana</i> Perr. Syn.	Rizoma	SH	BA 5.0 o 10.0	Nódulos (embriones?) vía directa. Plántulas	Das 1992.
	Hojas inmaduras	MS	BA 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 o 10.0	Sin respuesta	
<i>A. victoriae-reginae</i> T. Moore	Lámina foliar	MS	2,4-D 0.31	Embriogénesis directa	Rodríguez-Garay <i>et al.</i> 1996.

Medios LS: Linsmaier & Skoog; SH: Schenk & Hildebrandt; y MS: Murashige & Skoog; BA: 6-benzylaminopurine; K: Kinetin; IBA: Indole-3-butyric acid; 2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; NAA: α -Naphthalenacetic acid; IAA: Indole-3-acetic acid; OD: Organogénesis directa; OI: Organogénesis indirecta; (*): citado por Madrigal *et al.* 1990.

2. Evaluar la estabilidad genética de los regenerantes de diversas vías morfogénicas utilizando análisis electroforéticos de isoenzimas.
3. Evaluar anatómicamente la estructura de los regenerantes.
4. Establecer las bases de la aplicación de diferentes vías morfogénicas *in vitro*, para su aplicación en la conservación de especies de zonas áridas con problemas de extinción.

Materiales y Métodos

Material vegetal utilizado. Semillas, tallos con tejido meristemático y fragmentos de hoja de plántulas generadas de la germinación *in vitro* de semillas de *Agave victoriae-reginae*, de dos fuentes: (a) semillas donadas en 1987 por el Sr. Rivas, colectadas en campo, no se cuenta con la ubicación exacta de la colecta; y (b) semillas donadas en 1994 por Andrés Rodríguez Gamez, colectadas al SE de la Ciudad de Saltillo, reportada en esta tesis como población 3.

Germinación de semillas *in vitro*. Las semillas se desinfectaron en etanol 70%, en agitación durante un minuto, posteriormente en blanqueador de uso doméstico (6% de cloro activo), diluido al 30% (v/v) con agua destilada, 2-3 gotas de Tween 80/100 ml y se agitaron durante 20 min. Bajo condiciones asépticas, en una campana de flujo laminar se retiró la solución desinfectante y se enjuagaron las semillas tres veces en agua destilada esterilizada. Un promedio de cinco semillas se sembraron por frasco (20 frascos) de 125 ml con 25 ml de medio basal MS (Murashige y Skoog 1962). Se incubaron durante 45-90 días, para permitir que las plántulas alcanzaran una talla de 3-4 cm con 4-6 hojas.

Condiciones de incubación. Las condiciones de la cámara de incubación de cultivos *in vitro* a las que estuvieron sujetos los cultivos, fueron $27^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo 16 h luz (1000 lux) o en obscuridad.

Desinfección del área de siembra, preparación, composición de medios nutritivos. Se siguieron los sistemas convencionales utilizados en la aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos (Brown y Thorpe 1984; Constabel 1984; Gamborg 1984; Vasil y Vasil 1984; Martínez-Palacios 1991).

Cultivo de fragmentos de hojas. De las plántulas generadas de la germinación de semillas *in vitro*, se fraccionaron las hojas y se generaron 3-5 fragmentos (3-4 mm de longitud) por hoja. Se cultivaron en medio MS con diferentes tratamientos de reguladores del crecimiento, 2,4-D 0.0, 0.1, 0.5 y 1.0 mg/l en combinación con BA 0.0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/l (ver Tabla 2). Generando 16 tratamientos, cada tratamiento con 20 segmentos de hojas. Los cultivos se incubaron en obscuridad.

Cultivo de tallo con ápice de plántulas. A las plántulas *in vitro* se les disecaron las hojas y raíz, dejando como explante al tallo, éste se cultivó en medio basal MS y en MS con 6 tratamientos de dos reguladores del crecimiento aplicados en forma independiente: 2,4-D 0.1, 0.5 y 1.0 mg/l; y BA 0.5, 1.0 y 2.0 mg/l (ver Tabla 3). Se utilizaron 10 tallos por tratamiento.

Regenerantes a partir de un embrión cigótico. En 1988, semillas de *A. victoriae-reginae* de localidad desconocida, se sembraron bajo condiciones *in vitro*, en medio MS. Una de las semillas desde el inicio de la germinación derivó a la formación de callo morfogénico y generó plántulas por diferentes vías, el tejido morfogénico se subcultivó durante 8 años en medio basal MS sin la aplicación de reguladores del crecimiento. Se exploraron las respuestas de los cultivos de fragmentos de hojas y del cultivo de tallos de individuos generados de esta respuesta clonal, se les aplicó un barrido de reguladores del crecimiento utilizado en tallos y segmentos de hojas de plántulas de semillas descrito anteriormente. Para hoja se utilizaron 20 explantes por tratamiento y para tallo un promedio de 12 tallos por tratamiento.

Efecto de los macronutrientes del MS y la sacarosa en la brotación múltiple en tallos de plántulas de semillas. Tallos de plántulas fueron cultivados en medio MS y MS al 50 % de los macronutrientes, ambos medios modificados con 20, 30, 45 y 60 g/l de sacarosa, en todos los casos en presencia de BA a 0.5 mg/l. Se utilizaron, en promedio, 12 tallos de plántulas por tratamiento.

Análisis electroforético de plántulas clon. Se evaluaron 10 loci de 7 enzimas: ACPH-1, EST-1, EST-2, GOT-1, LAP-1, ME-1, PGI-2, PGI-3, PGM-1, PGM-2 (Apéndice Ib). Se utilizó el sistema No. 8 (Soltis *et al.* 1983; y capítulo II de esta tesis) (Apéndice Ia). A partir de los regenerantes (clon) de un embrión cigótico (plántulas *in vitro* de 3-4 cm de altura),

mantenidos durante 8 años con más de diez subcultivos en medio MS basal. Se maceraron en un mortero, 30 de estas plántulas, siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo II de esta tesis, se analizó la estabilidad o variación isoenzimática de las plántulas provenientes de diferentes frascos. Aunque se realizó la electroforésis para la enzima DIA-1 y 2 aplicada en las plantas silvestres (Cap. II), en las plántulas clon en condiciones *in vitro* la lectura de las bandas fue nula por tal razón fue descartada. Para completar las 7 enzimas con 10 loci se utilizó la PGM-1 y 2 donde las bandas definieron favorablemente.

Anatomía de las respuestas morfogénicas *in vitro*. Para fijar e incluir los explantes en parafina se utilizó la técnica de Curtis (1986) modificada por Mauseth (Apéndice II). Cortes de 18 micras se hicieron en un microtomo de rotación. La tinción se hizo con verde rápido, por un periodo de 30-60 minutos, el tiempo dependió de la absorción de colorante por cada corte histológico.

Enraizamiento *in vitro* de brotes y desarrollo de embriones somáticos y obtención plántulas completas. Los brotes individualizados derivados de brotaciones múltiples y embriones en proceso de desarrollo se subcultivaron a medio MS basal para la obtención de plantas completas con tallo, raíces y hojas.

Desarrollo de plantas bajo condiciones de invernadero. Las plántulas clonadas obtenidas por cultivo de tejidos se retiraron de los frascos y se lavaron con agua corriente, posteriormente se plantaron en una charola (25x35x10 cm) con una mezcla de suelo esterilizado en una proporción 1:1:1 de arena-suelo orgánico de encinos-vermiculita. A los 4 meses se trasplantaron a macetas individuales para su desarrollo individual. En todos los pasos se siguieron sistemas preestablecidos de adaptación para diversas especies hortícolas (Dunstan y Turner 1984).

Resultados

Cultivo de tejidos a partir de segmentos de hoja de plántulas. En ausencia de reguladores del crecimiento o con sólo BA fue evidente la falta de respuesta morfogénica, más aún, los explantes no perdieron organización y únicamente presentaron una ligera elongación del fragmento de la hoja en presencia de BA (Tab'a 2b). El desarrollo de callo y de estructuras organizadas inicialmente en forma de nódulos, estuvieron asociados a la

presencia de 2,4-D, que fue un factor importante en la desdiferenciación de los tejidos. A partir de la segunda o tercera semanas inició la formación de callo estableciéndose esta respuesta en un 70-100% de los explantes entre los diferentes tratamientos (Tabla 2a; Fig. 1). Los resultados a las 6 semanas revelaron que a bajas concentraciones de 2,4-D y altas de BA favorecieron la proliferación de callo friable (laxo) (Tabla 2a). Con la más alta concentración (2 mg/l) de BA en presencia de auxina, en cualquiera de las concentraciones empleadas, sólo se generó callo (Tabla 2a). Una respuesta secundaria a la formación de callo se presentó en los cultivos en presencia de 2,4-D sin BA con excepción a la concentración de BA 0.5 mg/l en presencia de 2,4-D a 0.5 mg/l, se observó en la superficie del callo la formación de estructuras nodulares (Fig. 1), éstas no sufrieron mayor diferenciación, pero presentaban una apariencia semejante a los que dieron origen a embriones somáticos durante el cultivo de tallos, descrito en el siguiente párrafo.

Cultivo de tejidos a partir de tallos de plántulas (de semillas germinadas). Por falta de tallos de plántulas, únicamente se hicieron siete tratamientos, considerando los resultados en los cultivos de segmentos de hojas, no se aplicaron los tratamientos de combinación BA y 2,4-D. En ausencia de fitoreguladores cada tallo regeneró una planta completa (Tabla 3a,b). La presencia de BA en el medio resultó en la formación de 1-3 brotes, la formación de callo (10%) únicamente ocurrió cuando el medio incluyó BA 2.0 mg/l (Tabla 3a). Durante el desarrollo de los tallos a brotes, se presentó simultáneamente la formación de raíz, con mayor incidencia cuando se reducía la concentración de BA, siendo hasta de un 50% en el medio basal (Tabla 3a). Los tallos sujetos a las tres distintas concentraciones de 2,4-D se desorganizaron por completo en callo, excepto en el tratamiento con 1.0 mg/l en donde primero se presentó un 40 % de necrosis (Tabla 3b). A las seis semanas, sobre la superficie del callo se observó la formación de nódulos en un 40-100%, a las 8-10 semanas un gran número de nódulos, 10-50% se diferenciaron en embriones somáticos (Fig. 3a, d) como se pudo confirmar al realizar cortes histológicos de éstos (Tabla 3b, Fig. 3b, c). El mejor tratamiento en la formación de embriones a partir de las estructuras nodulares se presentó en el medio con 2,4-D 0.5 mg/l (Tabla 3b, Fig. 3a). En este mismo tratamiento existió muy baja expresión de organogénesis somática indirecta (Fig. 2).

Tabla 2. Morfogénesis *in vitro* de segmentos de hojas de plántulas^a de *Agave victoriae-reginae*. Medio MS con fitohormonas; incubación: 27 ± 3°C, obscuridad, 6 semanas de cultivo.

Regulador del crecimiento					
BA mg/l	2,4-D mg/l	<i>n</i>	Explantos con callo	Abundancia de callo	Callos con nódulos
Tabla 2a					
0.0	0.0	20	---	---	---
0.0	0.1	20	20	++	1
0.0	0.5	20	16	+++	12
0.0	1.0	20	16	+	9
0.5	0.1	20	14	+++	---
0.5	0.5	20	20	+++	7
0.5	1.0	20	17	++	4
1.0	0.1	20	19	++	---
1.0	0.5	20	20	++	---
1.0	1.0	20	17	++	3
2.0	0.1	20	19	+	---
2.0	0.5	16	16	+++	---
2.0	1.0	20	18	++	---
\bar{x}		19.69	16.31		2.77
(D.S.)		(1.1)	(5.3)		(4.1)
Tabla 2b					
0.0	0.0	20	---	---	---
0.5	0.0	16	---	---	---
1.0	0.0	16	---	---	---
2.0	0.0	20	---	---	---
\bar{x}		18			
(D.S.)		(2.31)			

(+): poco; (++) regular; (+++): abundante; (---): sin respuesta; \bar{x} : media; (D.S.): desviación estándar; *n*: número de explantes; ^a plántulas obtenidas de la germinación *in vitro* de semillas.

Tabla 3. Morfogénesis *in vitro* a partir de tallos de plántulas de *Agave victoriae-reginae*. Medio MS con BA o 2,4-D, 1000 lux (16 h luz), 27 ± 3°C, 6 semanas de cultivo.

Regulador del crecimiento									
BA mg/l	2,4-D mg/l	<i>n</i>	Organogé- nesis directa	brotos / tallo	Raíz	Explantos con callo	Abundancia de callo	Callos con nódulos	Tejido nodular con embriones somáticos
Tabla 3a									
0.0	0.0	10	10	1.1	5 (+)	----	----	----	----
0.5	0.0	10	10	2.1	4 (+)	----	----	----	----
1.0	0.0	10	10	2.2	2 (+)	----	----	----	----
2.0	0.0	10	9	1.9	1 (+)	1	+	----	----
\bar{x} (D.S.)		10 (0)	9.75 (0.5)	1.825 (0.5)	3 (1.8)	0.25 (0.5)			

Tabla 3b									
0.0	0.0	10	10	1.1	5 (+)	----	----	----	----
0.0	0.1	9	----	----	----	9	+	4	1
0.0	0.5	10	----	----	----	10	++	10	5
0.0	1.0	10*	----	----	----	6	+	3	2
\bar{x} (D.S.)		9.75 (0.5)	2.25 (4.5)	0.48 (0.95)	0.25 (0.5)	6.5 (4.0)		4.25 (4.2)	2 (2.2)

(* necrosis del 40%; (+): poco; (++) regular; (—): sin respuesta; \bar{x} : media; (D.S.): desviación estándar; *n*: número de explantss.

Tabla 4. Efecto de la concentración de sacarosa y macronutrientes del medio MS en la organogénesis de tallos de plántulas de *A. victoriae-reginae*, en presencia BA a 0.5 mg. Condiciones de incubación: 1000 lux (16 h luz), 27 ± 3°C, 12 semanas de cultivo.

Sacarosa (g/l)	Macronutrientes MS (%)	<i>n</i>	\bar{x} brotes/ explante	Brotos por tratamiento
20	50	12	1.3	16
20	100	12	1.4	17
30	50	10	2.0	20
30	100	12	1.5	18
45	50	12	2.8	34
45	100	12	2.4	29
60	50	12	2.7	32
60	100	12	2.4	29
\bar{x} (D.S.)		11.8 (0.7)	2.06 (0.6)	24.4 (7.4)

\bar{x} : media; (D.S.): desviación estándar; *n*: número de explantes.

Tabla 5. Morfogénesis *in vitro* en segmentos de hojas de plántulas clonadas de *Agave victoriae-reginae*. Medio MS con BA y 2,4-D, 27 ± 3°C, obscuridad, 6 semanas de cultivo.

BA (mg/l)	2,4-D (mg/l)	<i>n</i>	Necrosis	Explantos con callo	Callos con nódulos
Tabla 5a					
0.0	0.0	20	20	----	----
0.0	0.1	20	20	----	----
0.5	0.1	20	18	2	1
1.0	0.1	20	11	9	9
2.0	0.1	20	12	----	----
0.0	0.5	20	20	----	----
0.5	0.5	20	18	2	2
1.0	0.5	16	15	1	----
2.0	0.5	20	17	3	----
0.0	1.0	20	20	----	----
0.5	1.0	20	19	1	1
1.0	1.0	20	20	----	----
2.0	1.0	20	20	----	----
\bar{x}		19.69	17.69	1.38	1
(D.S.)		(1.1)	(3.1)	(2.5)	(2.5)
Tabla 5b					
0.0	0.0	20	20	----	----
0.5	0.0	16	16	----	----
1.0	0.0	20	20	----	----
2.0	0.0	20	20	----	----
\bar{x}		19	19		
(D.S.)		(2)	(2)		

(—): no se presentó o sin respuesta; \bar{x} : media; (D.S.): desviación estándar; *n*: número de explantes.

Tabla 6. Estructura genética del clon de *Agave victoriae-reginae*. Aislado en 1988 y evaluado después de más de 15 subcultivos *in vitro* (9 años) a partir de 10 loci isoenzimáticos^a.

Locus	Alelo	Locus	Alelo
PGI-2	33	LAP-1	22
PGI-3	12	PGM-1	11
ME-1	22	PGM-2	22
GOT-1	22	EST-1	33
ACP-1	22	EST-2	12

^a la interpretación de lectura se comparó con los análisis y resultados obtenidos para las poblaciones silvestres, ver texto y apéndice 1.

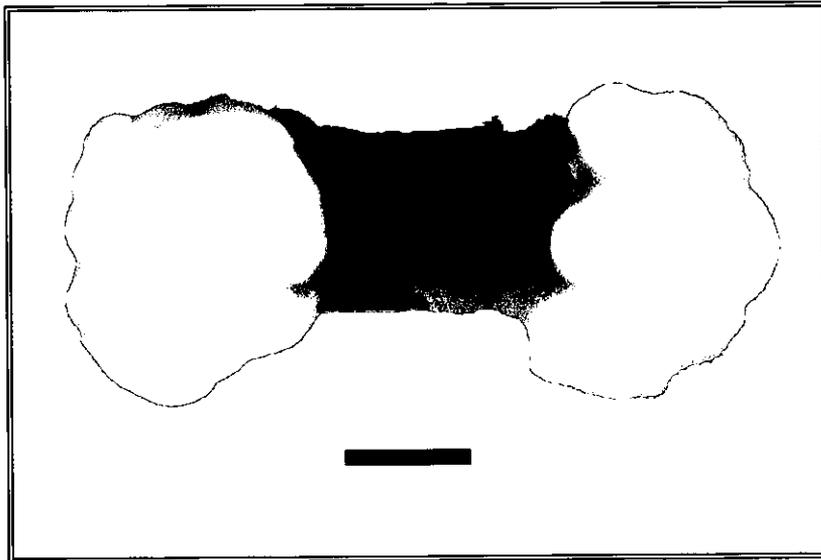


Fig. 1 Fragmento de hoja de plántulas *in vitro* de *Agave victoriae-reginae*, con estructuras nodulares, medio MS + 2,4-D a 0.5 mg/l, 6 semanas de cultivo (barra = 1.5 mm)



Fig. 2. Organogénesis indirecta, derivado de tallo de plántulas generadas de la germinación *in vitro* de semillas, MS+ 2,4-D a 0.5 mg/l (barra = 500 μ). Abrev.: ph-primordio de hoja, c-callo.

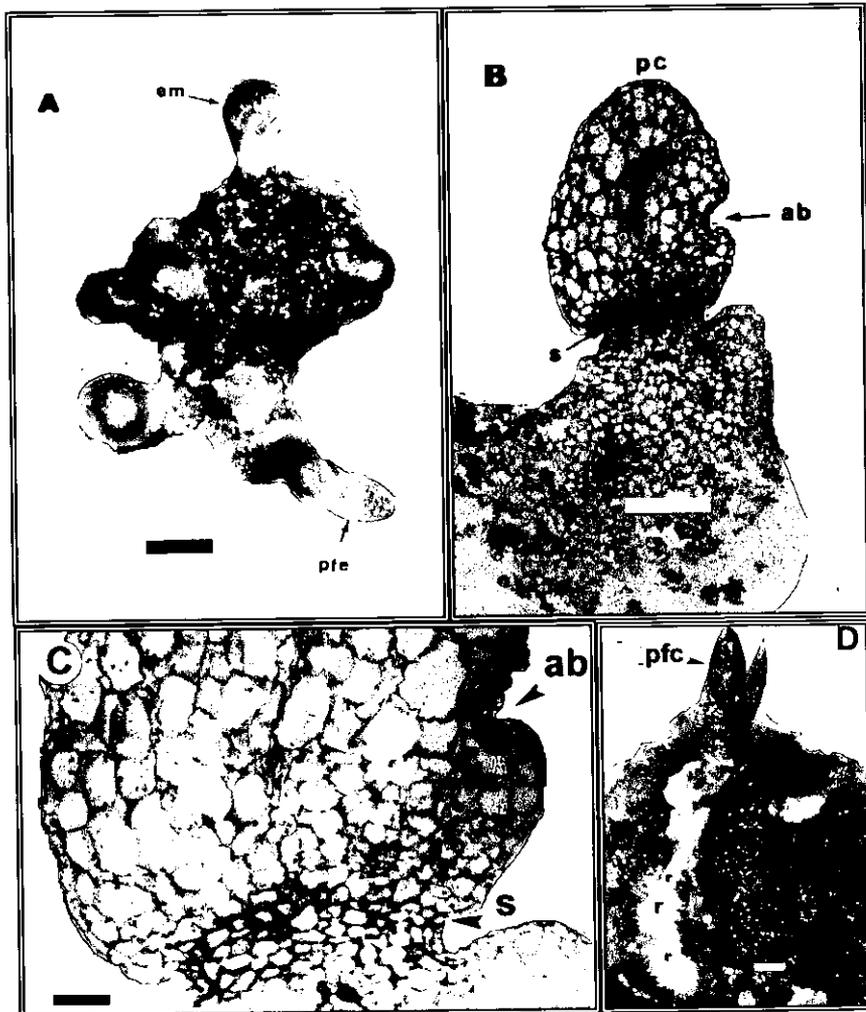


Fig. 3. Embriogénesis somática indirecta derivada de tallos de plántulas generadas de la germinación *in vitro* de semillas. (A) masa de callo con formación y desarrollo de embriones (barra = 2 mm); (B) anatomía del embrión (barra = 500 μ); (C) anatomía del suspensor (barra = 150 μ); (D) germinación del embrión somático que muestra el desarrollo de hojas y raíz (barra = 2 mm). Abrev.: r-raíz, em-embrión, ab-ápice del brote, s-suspensor, pfe-primordio foliar del embrión, pc-primordio del cotiledón.

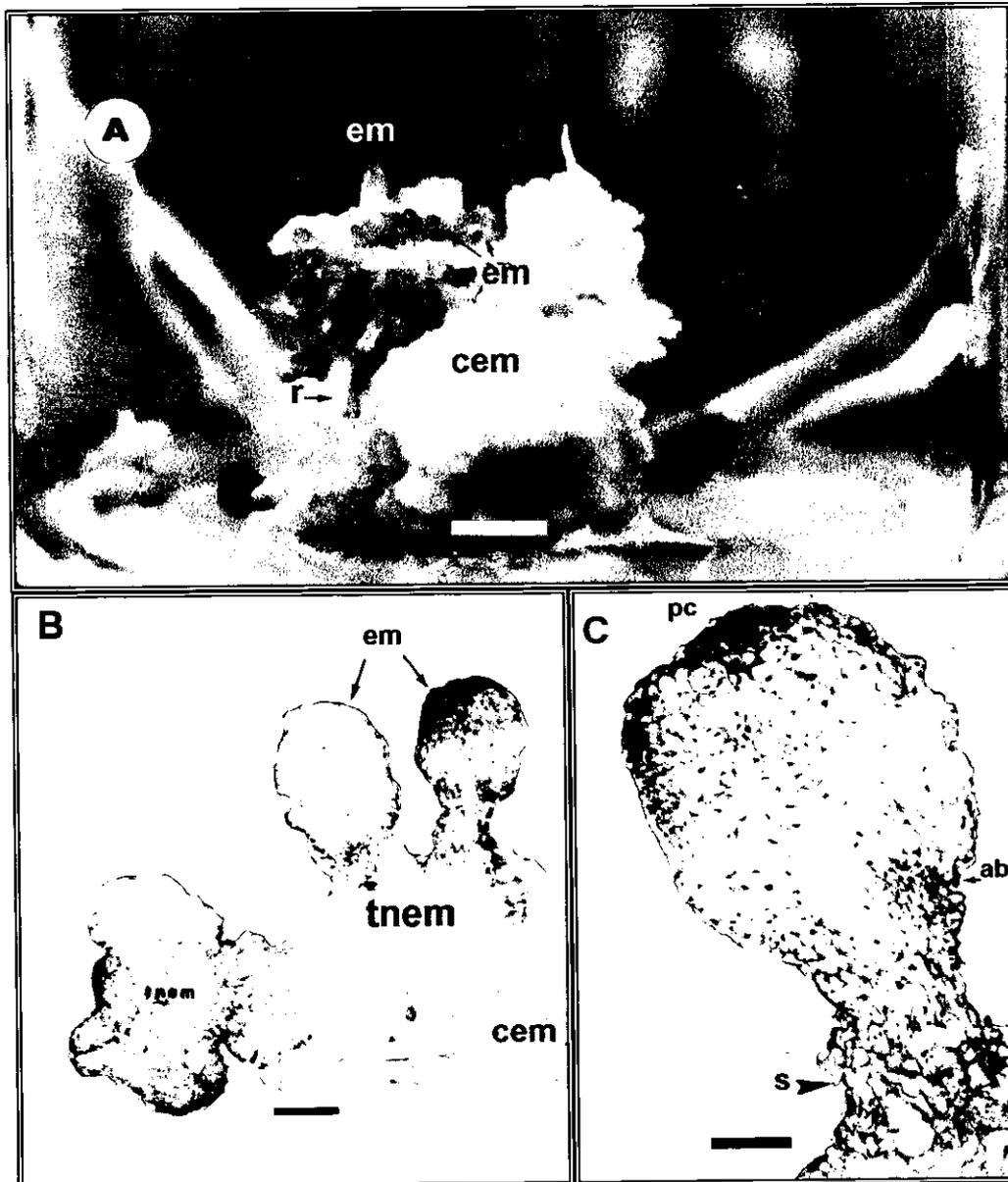


Fig. 4. Embriogénesis somática del clon, de tejido altamente embriogénico. (A) origen del clon a partir del cultivo de un embrión cigótico, cultivado en medio MS basal en 1988 (barra = 500 μ); (B) anatomía de embriones somáticos y tejido nodular embriogénico; (barra = 500 μ); (C) embrión somático con cotiledón, ápice del brote y suspensor pluricelular (barra = 250 μ); Abrev.: em-embrión, r-raíz, tnem-tejido nodular embriogénico; pc-primordio del cotiledón; s-suspensor; cem-callo embriogénico.

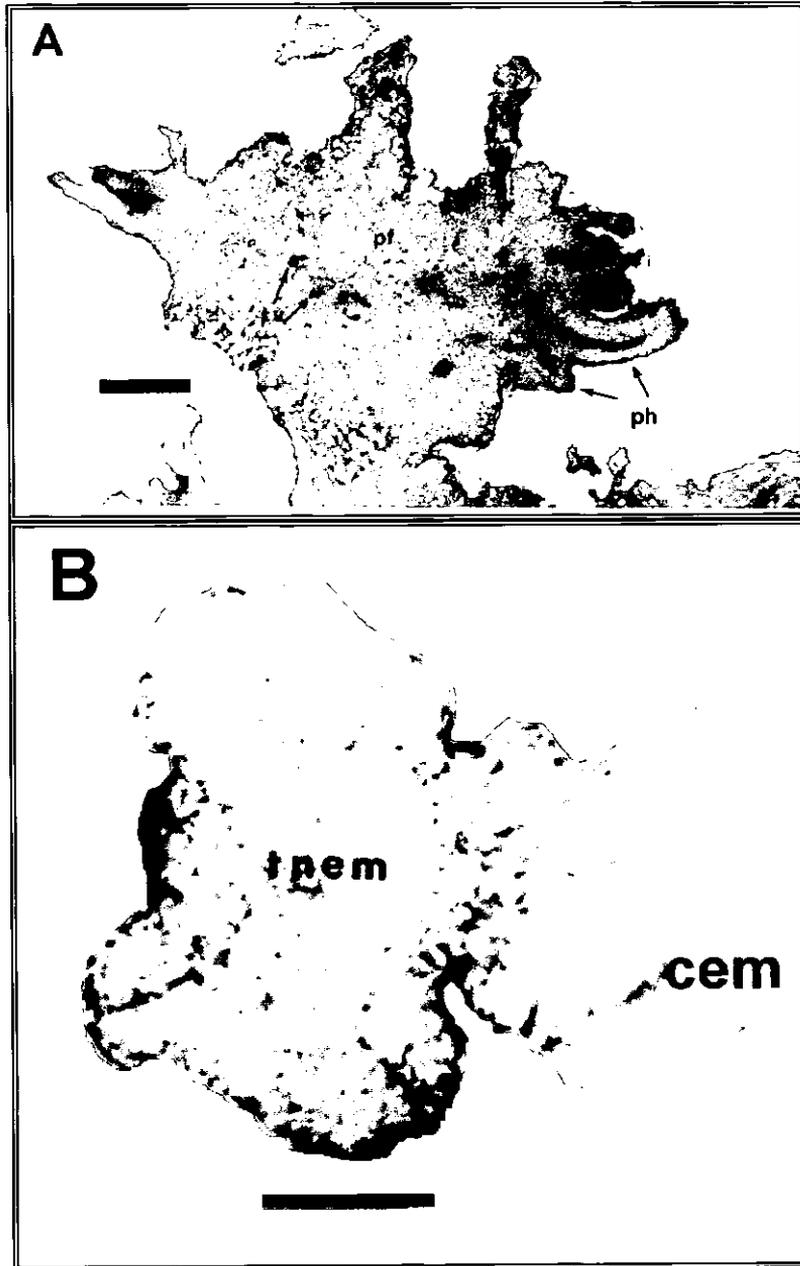


Fig. 5. Anatomía de dos diferentes tejidos nodulares de clon. (A) organogén-
tico con desarrollo de meristemas orientados a primordio de hoja, MS basal etapa avanzada de cultivo
(barra = 500 μ); (B) embriogénico, nodulaciones (ampliación foto 4, barra = 500 μ); pf-parénquima
fundamental, ph-primordio de hoja, cm-centro meristemático, tv-trazas vasculares, tmem-tejido
nodular embriogénico.

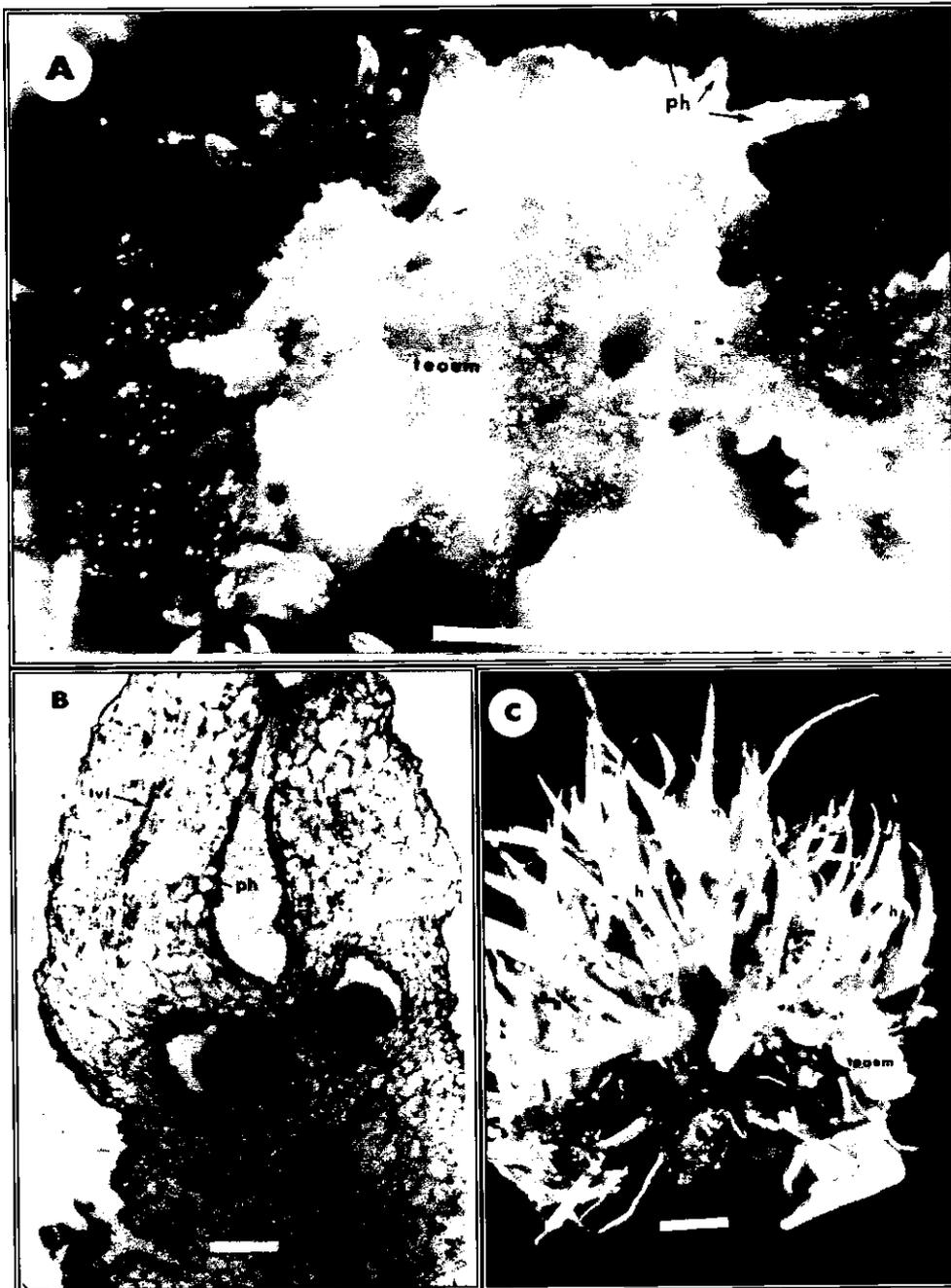


Fig. 6. Organogénesis somática del clon. (A) tejido organogénético y baja incidencia embriogénica (ver texto) (barra = 300 μ); (B) anatomía de primordios de hoja con regiones meristemáticas; (C) conglomerado de plántulas de origen dominante organogénesis directa e indirecta. Abrev.: tvf-trazas vasculares foliares; rm-región meristemática; ph-primordio de hoja; h-hoja; r-raíz; teom-tejido organogénético-embriogénico.

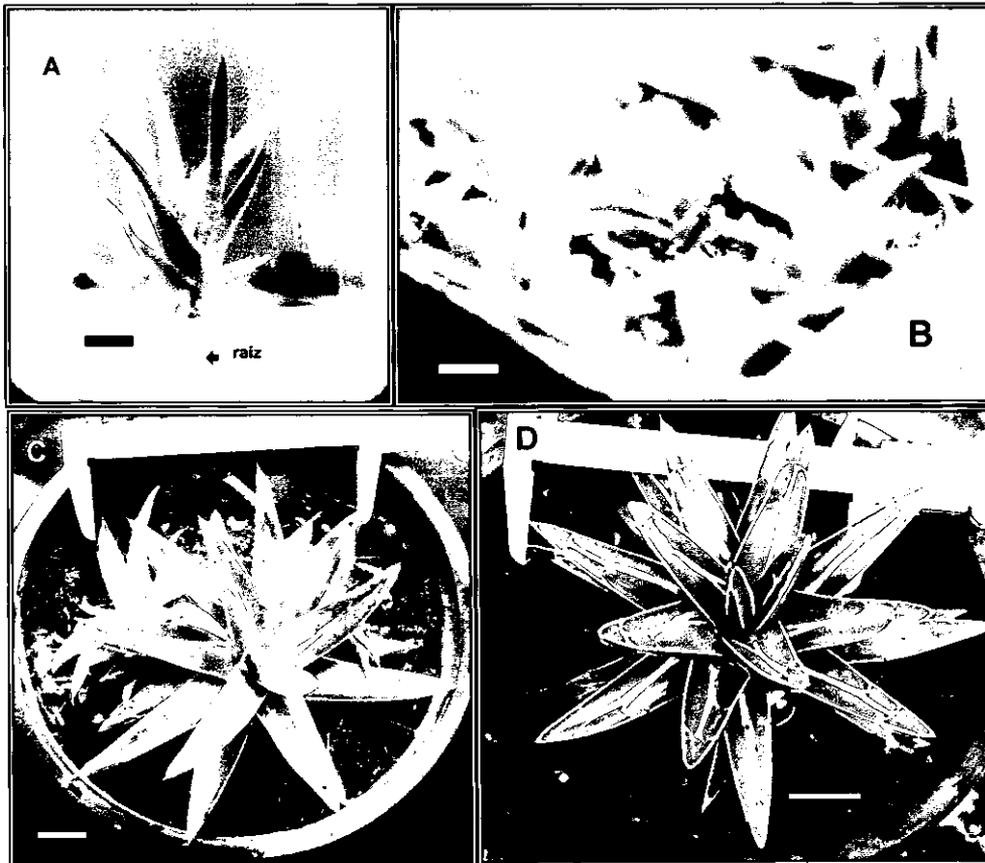


Fig. 7. Establecimiento y desarrollo de plantas clon en invernadero. (A) brote individualizado y desarrollado *in vitro* a planta con formación de raíz (barra = 500 μ); (B) plántulas establecidas en charolas (5-8 meses de edad; barra = 1 cm); (C) Planta clon con propagación vegetativa (barra = 2 cm); (D) individualizada y en desarrollo con forma morfológicamente normal (similar a las desarrolladas de semillas; barra = 2 cm) y con alto potencial de uso ornamental (3-4 años de edad sin fertilización del suelo).

Regenerantes a partir de un embrión cigótico, denominados Clon. En 1988 semillas de *A. victoriae-reginae* de localidad desconocida, fueron sembradas *in vitro* sobre medio basal MS. Se utilizaron 50 semillas de las cuales 39 (78%) germinaron, las cuales cada una generó una plántula, excepto una de ellas, pues durante la germinación derivó a la formación de callo con alto grado de diferenciación y de respuesta embriogénica-organogénica como se pudo constatar al realizar cortes anatómicos de diferentes regenerantes (Fig. 4a, b y c). A las seis semanas se fraccionó en 10 partes y se subcultivó en medio MS basal, operación que se repitió cada 8-12 semanas, durante ocho años. Existió tanto la proliferación continua de tejido (“callo”) organogénico-embriogénico, así como la formación de plántulas que en la base de ellas se manifestó la potencialidad de formación del callo con alta diferenciación similar a las características de la respuesta inicial (Fig. 4a, 5a, 6a, c). A los explantes y plantas derivadas de un sólo embrión cigótico se les denominó clon, para establecer su identidad respecto a los otros cultivos de semillas, hojas, y tallos, por lo que en adelante se describirá como tal.

Cultivo de segmentos de hojas de plántulas Clon. Se caracterizó por altos porcentajes de oxidación en todos los tratamientos, hasta del 100% de necrosis en varios de ellos, por ejemplo en el medio basal y con sólo presencia de BA (Tabla 5b). El desarrollo de callo y de nódulos se presentó entre los tratamientos de 0.1-1.0 mg/l de 2,4-D con BA 0.5-1.0 mg/l. La respuesta nodular fue sólo en cinco de los tratamientos, de un total de 16 (Tabla 5a). Al término de 6 semanas de observaciones, no existió evolución de los nódulos hacia embriones o brotes, no se hicieron subcultivos a medios frescos.

Cultivo de tejidos a partir de tallos de plántulas clon. Los tallos de plántulas clon cultivados en medio basal con fitohormonas se desdiferenciaron a callo y no ocurrió la diferenciación a organogénesis-embriogénesis que era característico del clon sin reguladores del crecimiento. Al subcultivar el callo desarrollado en los diferentes tratamientos con hormonas a medio basal MS, esto permitió que se iniciara nuevamente la respuesta (organogénesis-embriogénesis) natural del clon. Es particularmente interesante que las primeras respuestas hayan sido hacia la embriogénesis, con lo que fue posible registrar los estadios tempranos de desarrollo embrionario y posteriormente estos eventos fueron desplazados por una respuesta de organogénesis indirecta y ésta por la organogénesis

directa (Fig. 6a, c). La etapa diferenciada del clon correspondió a la presencia de cúmulos de plántulas en cuyas bases se manifestó en forma repetida el proceso de multiplicación, predominantemente por organogénesis directa. Difícilmente se lograron observar estadios embriogénicos, con excepción de algunos frascos donde los cúmulos de plantas podían eventualmente generar callo (Fig. 6c).

Anormalidades de plántulas durante la brotación múltiple en tallos, en presencia de BA. Las plántulas generadas por organogénesis a partir de tallos (plántulas de semillas y del clon) en presencia de BA (1-2 mg/l) y bajo condiciones *in vitro* el desarrollo de los brotes (tallo y hojas) se presentó en alto índice con la forma de roseta muy marcada, hojas con una amplia superficie, perpendiculares al eje de crecimiento y sin la punta terminal de la hoja, en comparación a las plántulas *in vitro* generadas de la germinación de semillas, de embriones somáticos y por organogénesis del clon, que eran plántulas muy similares entre sí, con las hojas cilíndricas y orientadas en el mismo sentido del eje de crecimiento. Plántulas con desarrollo anormal en el medio de inducción, una vez subcultivadas a medio basal, llegaron a regenerar por organogénesis formas de brotes y hojas normales, similares a las plántulas originales.

Brotación múltiple en tallos de plántulas de semillas. La reducción de los macronutrientes del medio MS al 50 % en combinación con el incremento de la sacarosa a 45 g/l resultó ser para estos tratamientos el que favoreció la respuesta de organogénesis directa, resultando en 2.8 brotes por explante (Tabla 4). La reducción de la sacarosa a 20 g/l en ambos tratamientos de macronutrientes (MS y MS/2), propició una baja respuesta (Tabla 4).

Evaluación isoenzimática en 30 plántulas clon desarrolladas después de 8 años de cultivo. Se analizaron 10 loci de un total de siete isoenzimas, de este análisis isoenzimático no se observó ninguna diferencia entre las bandas analizadas entre plantas derivadas de diferentes subcultivos (Tabla 6), lo anterior indica que no ha existido variación genética, entre plantas derivadas de subcultivos que provienen de diversas respuestas morfogénicas (organogénesis directa e indirecta y embriogénesis somática indirecta). Sin embargo, se desconoce el patrón isoenzimático del embrión cigótico que dió origen en un principio al clon analizado 8 años después, aunque analizando la falta de variación este podría haber

sido de características similares a las plantas derivadas y que presentan respuesta clonal. Los patrones de bandedo fueron comparados con el patrón de las plantas silvestres. Con excepción de la PGI-3 y la EST-2 (heterocigas), el resto de las isoenzimas (8) fueron homocigas.

De los cultivos originados de semillas no se analizaron las isoenzimas debido a que es un proceso más largo y que no fue posible controlar el material inicial del que se partió (en la mayoría de los casos se derivó a callo), para su posterior comparación con las derivadas de las diferentes respuestas morfogénicas *in vitro*. En otros casos no existió un número representativo de repeticiones para su evaluación.

Anatomía de respuestas morfogénicas *in vitro*. Mediante cortes histológicos de estructuras regenerantes se comprobó su origen: vía organogénesis y/o embriogénesis indirecta y directa en explantes de tallos de plántulas de semillas y de estructuras generadas del clon (Figs. 3a, b y c, 4b y c, 5a, 6b). Los embriones somáticos registraron la presencia de primordio del cotiledón, ápice del brote y un suspensor muy amplio constituido por un gran número de células (Figs. 3a y b, 4b y c). Con los cortes histológicos se determinó la anatomía del tejido nodular embriogénico (Fig. 4b y 5b), constituido por zonas de alta división celular en la periferia derivando en protuberancias, las cuales, en regiones con etapas más avanzadas derivaron a embriones con un amplio suspensor (Fig. 4b). También se analizó la anatomía de un tejido organogénico, determinado como tejido nodular organogénico (Fig. 5a), por estar constituido por la presencia de trazas vasculares, parénquima fundamental, centro meristemático, primordios foliares y zonas de meristemas (Fig. 5a).

Enraizamiento *in vitro* de brotes y desarrollo de embriones somáticos a plántulas. El medio MS basal resultó ser suficiente para la formación y el desarrollo de raíz en el 100% de los brotes ensayados. Esto hizo posible su desarrollo y de los embriones somáticos a plántulas lográndose tallas de 3-5 cm de altura en 4-6 semanas.

Desarrollo de plantas bajo condiciones de invernadero. Las plantas clon de *A. victoriae-reginae* generadas por cultivo de tejidos, se individualizaron y subcultivaron en medio MS basal para su enraizamiento y desarrollo (Fig. 7a), se establecieron en suelo (Fig. 7b) y desarrollaron individualmente en maceta por 4 años (Fig. 7c y d). Las observaciones

muestran un desarrollo aparentemente normal, de forma similar a las generadas de la germinación de semillas. Los clones manifiestan la formación de brotes laterales (Fig. 7c), sin embargo, también en algunas plantas de semillas fue observable este mismo sistema de propagación bajo las mismas condiciones de invernadero y presentaban diámetros superiores a los 12 cm. El porcentaje de sobrevivencia a llegado a ser superior al 90% cuando se siguen los pasos establecidos de adaptación.

Discusión

Cultivo de tejidos a partir de segmentos de hojas de plántulas clon y/o las derivadas de semillas. Los fragmentos de hojas cultivados en medio basal o en presencia de BA, no presentaron ninguna respuesta morfogénica. A este respecto Das (1992) reportó un resultado similar en *Agave sisalana* con fragmentos de hojas en presencia de BA. El 2,4-D empleado en cultivo de tejidos de diversas plantas se reporta como una potente auxina que estimula la formación de callo, pero es un fuerte antagonista en la organización del desarrollo (Murashige 1974; George 1993). Sin embargo, la decreciente concentración de 2,4-D en el medio puede permitir el desarrollo de órganos (Groenewald *et al.* 1977). La formación de nódulos en callo o directamente del explante por influencia de 2,4-D, ha sido reportado para otras especies de agaves (Groenewald *et al.* 1977; Das 1992; Rodríguez-Garay *et al.* 1996).

La formación de nódulos en fragmentos de hojas, estuvo relacionada con una baja concentración o ausencia de BA y la presencia de la auxina 2,4-D, resultando el mejor tratamiento en 2,4-D a 0.5 mg/l, sin embargo, estas estructuras no mostraron una posterior diferenciación. Aunque no existen reportes de nódulos en hojas para *A. victoriae-reginae*, Rodríguez-Garay *et al.* (1996) reportaron embriogénesis somática directa a partir de lámina foliar y su posterior desarrollo a plantas. Es posible que estos autores no hayan notado la fase de nódulos o la hayan omitido en sus descripciones.

Cultivo de tallos de plántulas de semillas germinadas *in vitro*. Los tallos sujetos a BA resultaron en una organogénesis sin pasar por callo, como una respuesta de desarrollo directa del meristemo apical y yemas axilares que están presentes en el tallo de las plántulas. En otras especies del género *Agave* se reporta la misma respuesta utilizando yemas

laterales, nudo de estolón y rizoma sujetos a altas concentraciones de citocininas en combinación o ausencia de auxinas (Robert *et al.* 1987; Binh *et al.* 1990; Villalobos *et al.* 1991). En explantes con estructuras meristemáticas de otros géneros, sujetos a cultivo con altas concentraciones de citocininas, la regeneración de brotes es una respuesta común (Dodds y Roberts 1982); en Solanaceae para obtener altas tasas de multiplicación a partir de yemas axilares, se reporta el uso de BA a 0.5 mg/l en medio MS (Binding y Krumbiegel-Schroeren 1984). Debergh y Read (1991) reportan que altas tasas de propagación a partir de yemas adventicias o axilares se favorecen con el uso de diversas citocininas o la alta concentración que se aplique de una de ellas.

Los tallos de plántulas de *A. victoriae-reginae* cultivados en presencia de 2,4-D generaron callo, nódulos, formación de embriones somáticos y su germinación. Groenewald *et al.* (1977) reportaron la formación de nódulos en fragmentos de semillas de *Agave* spp, sujetos a 2,4-D 0.2 mg/l y Kinetina 1 mg/l en los que encontraron semejanza con proembriones adventicios. Das (1992) reportó estructuras semejantes en el cultivo de segmentos de rizoma pero en presencia de altas concentraciones de BA. El efecto del 2,4-D en la formación de callo embriogénico y su posterior diferenciación en embriones somáticos está ampliamente fundamentada (George y Sherrington 1984; Vasil y Vasil 1984; George 1993).

La diferencia de respuestas entre hoja y tallo hace evidente que el tipo de explante a utilizar puede jugar un papel importante en la obtención de una respuesta morfogénica deseada (Constabel 1984). Antes de descartar la respuesta embriogénica de los nódulos en callo de hojas, sería necesario utilizar otras condiciones de cultivo, como tipo de medio, hormonas o la realización de subcultivos que permitan la evolución de los nódulos. Existe un mayor índice de respuestas hacia la organogénesis y embriogénesis a partir de zonas meristemáticas, además, de una mayor estabilidad genética de los regenerantes (Debergh y Read 1991).

Respuesta Clonal de un embrión cigótico. La regeneración de brotes y embriones somáticos se logró de forma masiva sin la utilización de reguladores del crecimiento. La necesidad de los reguladores debe ser cubierta por las fitohormonas producidas endógenamente como una respuesta genética que mantiene y expresa esa potencialidad al

estar el genotipo sujeto a particulares condiciones de cultivo *in vitro*. Esta respuesta clonal ha mantenido su capacidad de respuesta embriogénica-organogénica durante 8 años. En relación a la alta respuesta morfogénica *in vitro*, diversos reportes han descrito su presencia en híbridos y líneas hortícolas, en la gran mayoría de los casos cuando a las plantas se les sujetó a un mejoramiento genético o fueron tecnológicamente transformadas y en otros casos al realizar una evaluación de respuesta en diferentes genotipos. Los procesos de alta frecuencia a la embriogénesis somática en todos los casos se reporta en presencia de reguladores del crecimiento. Por ejemplo, en embriones cigóticos de maíz (*Zea mays* L.) irradiados con rayos gama, se generaron callos altamente embriogénicos (Novak *et al.* 1988); en *Cucumis sativus* L. se generó a partir callo derivado de hipocótilo y cotiledón (Chee 1990); en *Brassica carinata* se generaron órganos directamente del cultivo de explantes de hipocótilo (Yang *et al.* 1991); en *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. a partir de callo generado del cultivo de hojas jóvenes (Kumar 1992); para *Allium* spp se presentó en callo derivado de embrión cigótico (Van der Valk *et al.* 1992); en cultivares de melón (*Cucumis melo* L.) registraron líneas con alta producción de embriones somáticos a partir del cultivo de semillas, respuesta que decreció en la F2 (Cridate *et al.* 1992); en *Carica papaya* L., a partir de callo de hipocótilo (Fitch 1993); en alfalfa (*Medicago sativa* L.) a partir de callo generado de hoja, peciolo y entrenudo, aproximadamente el 2% de los genotipos evaluados produjeron alta respuesta a embriogénesis somática (Parrott y Bailey 1993); en *Oryza sativa* L. se desarrollaron a partir de callo generado de embriones maduros (Rueb *et al.* 1994); en el híbrido generado de *Oriza sativa* X *O. latifolia*, se estableció a partir de callos en medios líquidos derivados de frutos inmaduros (Ozawa *et al.* 1996); en *Brassica campestris* L. se generó en forma directa a partir del cultivo de microesporas (Guo y Pulli 1996). Los procesos de ambas respuestas simultáneas, organogénesis-embriogénesis somática, se reportan para *Eleusine coracana* Gaertn. a partir de callos generados de segmentos de frutos inmaduros, en presencia de reguladores del crecimiento se regeneraron plantas vía desarrollo directo de brotes y la embriogénesis somática (George y Eapen 1990). Ambas respuestas también se reportaron para *Brassica napus* L. a partir de protoplastos de hipocótilo de plántulas, generando microcallos (Parihar *et al.* 1995). Respuestas altamente organogénicas, se reportaron para híbridos interespecíficos de *Hordeum vulgare* L. la

regeneración de plantas se obtuvo a partir de callo derivado del cultivo de espigas inmaduras (Jorgensen *et al.* 1986); en arroz (*Oriza sativa*) a partir de callo generado de raíces de plántulas (Abe y Futsuhara 1989); en manzano (*Malus pumila* Mill.) a partir de hojas irradiadas con rayos gama, se presentó una respuesta directa (Predieri y Valavasi 1989); en *Prosopis tamarugo* Phil, fue obtenida de callo generado de hipocótilo y cotiledón de plántulas (Nandwani y Ramawat 1992); en diversos genotipos del género *Avena*, a partir de callo originado del cultivo de embriones inmaduros (Gana *et al.* 1995); en *Pinus radiata* Engelm. se analizó el efecto del genotipo sobre la formación de brotes a partir del cultivo de cotiledones (Bergmann y Stomp 1994a) y el enraizamiento en hipocótilos en ausencia de auxinas en *P. radiata* (Bergmann y Stomp 1994b).

En el presente estudio, los segmentos de hojas de plántulas clonadas sujetos a un barrido de reguladores del crecimiento, semejante al aplicado a los segmentos de hojas de plántulas de semillas, la respuesta fue menos favorable ya que pocos formaron callo y por lo general fue escaso, presentandose en únicamente 4 tratamientos. En algunas porciones de callo se observaron nódulos sin que se presentará una diferenciación a estructuras regenerantes. Lo anterior se puede interpretar como una ruptura en el equilibrio natural del clon, y la expresión más notable fue la necrosis. También pareció dejar claro que dos diferentes individuos, pueden dar respuestas muy distintas cuando se les sujeta a condiciones similares de cultivo, lo mismo pasa cuando se utilizan diferentes estadios fisiológicos, diferentes tejidos u órganos, diferentes variedades o especies, generalmente respondiendo de diferente manera (Constabel 1984; George 1993).

Efecto de la sacarosa y la concentración de macronutrientes del MS en la brotación múltiple en tallos de plántulas de semillas germinadas *in vitro*. La presencia de concentraciones mayores de sacarosa a la reportada para el medio MS y la reducción de los macronutrientes del MS favoreció la respuesta organogenética directa. Existen reportes donde la sola presencia de BA en el medio o con bajas concentraciones de una auxina, se estimula la organogénesis directa en tejidos meristemáticos (Tisserat 1985; George 1993), el efecto de esta hormona en tallos de agaves ya se discutió anteriormente a este párrafo.

El incremento de la concentración de sacarosa en el medio, como fuente energética y de carbono en la formación de brotes adventicios, se ha reportado favorablemente para

Opuntia spp. (Escobar *et al.* 1986) y para variedades de *Chrysanthemum* (George y Sherrington 1984; George 1993).

Al parecer, el beneficio de la reducción de algunas de las sales minerales, fundamentalmente las fuentes de nitrógeno, favorece la proliferación de brotes a partir del cultivo de ápices en algunas especies (George 1993). Sería importante en futuros tratamientos de cultivo de tallo de *A. victoriae-reginae* para mejorar la respuesta directa de organogénesis, explorar con el MS a la mitad de la fuente de macronutrientes o de la fuente de nitrógeno, además, modificando la sacarosa a 45g/l y aplicando un barrido de reguladores del crecimiento en el que se incluya BA sola o con bajas concentraciones de una auxina.

Las plantas observadas en los cultivos con anomalías morfológicas generadas *in vitro* a partir de callo y por organogénesis directa en presencia de BA 1-2 mg/l, parecieron ser cambios epigenéticos promovidos tal vez por las concentraciones de la citocinina. Cuando las plántulas fueron subcultivadas al medio basal MS, las hojas nuevas tendieron a desarrollarse de forma normal, al igual que los brotes que se derivaron de estas plántulas surgieron normales, con apariencia similar a las generadas de la germinación de semillas en medio basal MS. Existen evidencias de que la presencia de BA en el medio de cultivo puede promover anomalías en las plantas, sin embargo, algunas de las evidencias que se reportan sobre el efecto de ésta y otros reguladores del crecimiento sobre la morfogénesis anormal resultan contradictorias (Ziv, 1991); Debergh y Read (1991) reportan que una dosis excesiva de una citocinina o la elección de una inapropiada citocinina puede ser responsable para que se presenten tipos epigenéticos.

Utilidad de las técnicas de cultivo de tejidos en la obtención de plantas para su liberación en campo. Se ha recomendado la embriogénesis somática preferentemente vía directa para tratar de conservar la estabilidad genética de los nuevos regenerantes, debido a que, proliferaciones celulares indiferenciadas por periodos largos registran altos índices de malformaciones cromosómicas y la presencia de ploidías (D'Amato 1977; Pijnacker *et al.* 1986; Ramulu y Dijkhuis 1986; Dolezél 1991; Dolezél *et al.* 1992).

Evidencias histológicas han mostrado que una sola célula da origen a embriones somáticos en *Pennisetum americanum* L., en *Saccharum* sp. y en *Daucus* sp. (Karp 1986;

Peschke y Phillips 1992), en el desarrollo de embriones somáticos de maíz han mostrado un origen pluricelular (Vasil *et al.* 1985; Peschke y Phillips 1992). El origen unicelular o multicelular de la embriogénesis somática directa ha sido descrito en detalle (Maheswaran y Williams 1985; Williams y Maheswaran 1986). En esta investigación, las observaciones anatómicas de los regenerantes vía embriogénesis somática, mostró que el suspensor está conformado por un gran número de células, lo cual puede ser un indicador de que difícilmente el origen de estos embriones sea unicelular. Es posible que estudios anatómicos en etapas iniciales de la formación de los embriones pueda confirmar el origen pluricelular de los embriones obtenidos. Sin embargo, en el caso particular del clon que mantiene su respuesta de organogénesis-embriogénesis somática desde hace 8 años, el tejido madre está constituido por tejido organogenico-embriogénico (Fig. 5). Los cortes histológicos realizados muestran un agrupamiento meristemático nodular, similar al reportado para *Nerine* sp. (Amaryllidaceae) (Lilien-Kipnis *et al.* 1994), lo cual podría ser comparable a las respuestas de tejidos meristemáticos en una respuesta directa de formación de brotes y embriones. También son reportados como masas de células organogenéticas o embriogenéticas o nódulos de callo (Maheswaran y Williams 1985; Williams y Maheswaran 1986). Para los casos en que no es posible evitar la desdiferenciación de los tejidos o formación de callo, se sugiere que el tiempo y división celular en esta etapa de desdiferenciación sea lo más corto posible, ya que de no ser así, la división mitótica acelerada puede resultar en la presencia de alteraciones cromosómicas, efecto ampliamente conocido cuando se prolongan en cultivo los callos y están sujetos a altas concentraciones de reguladores del crecimiento (Ziauddin y Kasha 1990). Pese al riesgo de obtener malformaciones genéticas vía morfogénesis indirecta, el clon presentó una estabilidad isoenzimática, se discute con mayor profundidad más adelante.

Para casos, del origen pluricelular de los embriones, se corre el riesgo de que en los regenerantes presenten mosaicos celulares de diferente nivel de ploidías. Sobre la situación del suspensor constituido por varias capas de células en relación al embrión cigótico en que está constituido por una sola célula, Krishnamurthy (1994) señala que en la embriogénesis somática no ocurre la diferenciación de la hipófisis y la epífisis y presenta una carencia de

desarrollo polarizado, sin diferenciación de las primeras etapas de formación del embrión, por lo que les da la terminología de embrioides.

La respuesta de organogénesis directa a partir de ápices meristemáticos o de yemas axilares, pueden llegar a ser la opción que proporcionen mayor estabilidad genética en la formación de plantas bajo condiciones *in vitro* (Kantha 1981, 1982; Peschke y Phillips 1992).

Los procesos inductores de variabilidad genética por cultivo de tejidos o por agentes mutágenos, deberían ser evitados, ya que al liberar plantas modificadas (consciente o inconscientemente) pueden ocasionar problemas graves a las poblaciones silvestres, Ecker (1989) menciona que interrumpiría los genes coadaptados en la naturaleza por cientos de miles de años, y provocaría la extinción de las nuevas generaciones. Acciones de rescate sin bases en el estudio de las poblaciones silvestres pueden acelerar la extinción de la población o de los pocos genotipos que aun permanezcan en la naturaleza.

Nobel (1992) reportó para *Agave deserti* que el reclutamiento fue de tipo ramet (cerca de 95%) de las plantas en las poblaciones silvestres durante un periodo de 20 años. Mistretta (1994) realizó un trabajo de rescate de la especie *Cercocarpus traskiae* Eastw. donde más que generar variabilidad genética, llevó a cabo estudios de isoenzimas que mostraron que en forma silvestre existían únicamente 7 plantas que correspondían a 7 genotipos únicos. Propagó clonalmente cada genotipo en un múltiplo de 10, y liberó un total de 70 plantas, para no alterar la proporción genética en que encontró a la especie en el ambiente natural. Lo anterior conlleva, a la necesidad de no afectar en la proporción genética que exista en la naturaleza y si tratar de evitar erosión de cualquier genotipo que aun esté presente dentro de las poblaciones que han sido perturbadas antropogénicamente. El incrementar proporcionalmente los genotipos, utilizando sistemas de clonación a baja escala, podría permitir que el ambiente natural regule los cambios en su evolución.

La aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos con cualquier vía morfogénica, pueden ser una buena opción para propagar masivamente plantas que permitan abastecer la demanda en el mercado comercial. En el caso por ejemplo de las plantas con valor ornamental, las recolectas exhaustivas en las poblaciones silvestres podrían disminuir y evitarse su extinción.

La estabilidad isoenzimática del clon de *A. victoriae-reginae* no corresponde a los patrones de variación genética que generalmente se reportan en cultivos de callos y en regenerantes logrados por morfogénesis indirecta de especies hortícolas, donde las mutaciones y los índices de ploidías son una expresión común dentro de los cultivos *in vitro*. Sin embargo es necesario denotar que tales trabajos reportan el uso de reguladores del crecimiento como inductores exógenos de respuestas morfogénicas, y en el presente estudio no se emplearon para inducir el clon.

La formación de callo inducido por la presencia de 2,4-D en el medio puede ser acompañado por la fragmentación de núcleos endopoliploides con intensa poliploidización, la frecuencia depende de la duración del cultivo sobre el medio con este regulador del crecimiento (Novák *et al.* 1986).

La estabilidad genética del clon de *A. victoriae-reginae* puede deberse a que la inducción de los sistemas morfogénicos expresados son en ausencia de reguladores del crecimiento exógenos, por lo que es posible pensar que es debido a una expresión natural en el cual el clon regula el desarrollo *per se* de los tejidos y de las respuestas morfogénicas, organogénesis y/o embriogénesis somática directa y/o indirecta.

Ortega (1996) con un clon de *Cosmos atrosanguineus* (Hook.) A. Voss (Asteraceae), micropropagó plantas vía organogénesis directa e indirecta a partir de secciones de tallos de plántulas, utilizó medio MS modificado con BA (2 mg/l) y NAA (0.1 mg/l), durante un periodo de aproximadamente 2 años de subcultivos. En el análisis electroforético de 30 plántulas, utilizó el mismo sistema aplicado en las poblaciones silvestres de *A. victoriae-reginae* al igual que las mismas isoenzimas y la APX (Peroxidasa anódica), el clon registró una variación genética de un 27.7% de loci polimórficos de 18 loci cuantificados.

La aplicación de técnicas como la electroforesis para análisis isoenzimático y de citogenética han sido utilizados para comprobar la variación en plantas, propagadas por cultivo de callos (Orton 1983).

No obstante la estabilidad isoenzimática observada en el clon de *A. victoriae-reginae*, sería de interés confirmar este resultado con estudios de citometría de flujo para evaluar la estabilidad a nivel cromosómico. Si bien, la presencia de poliploidías en estudios

electroforéticos de isoenzimas ya han sido detectadas en plantas de agaves, éstas son evidentes porque se expresan duplicaciones de bandas (Colunga-GarcíaMarín 1996), pero éste no fue el caso de las isoenzimas analizadas de las 30 plántulas clon de *A. victoriae-reginae*.

Por otro lado, la presencia de altos índices de ploidías en las células de los tejidos puede estar correlacionado con la reducción de respuesta morfogénica (Ziauddin y Kasha 1990), para el caso del clon de *A. victoriae-reginae*, la respuesta se ha mantenido en los diferentes subcultivos en los 8 años transcurridos de respuesta organogénesis-embriogénesis somática.

Un análisis del contenido endógeno de las hormonas podría revelar el balance en que se presentan y que hacen posible la respuesta espontánea que permite lograr continuamente regenerantes. Estos posibles niveles hormonales podrían ser reconocidos como marcadores bioquímicos para poder predecir estados de competencia morfogénica.

Cambios isoenzimáticos en la esterasa (EST) y la superoxidasa dismutasa (SOD) han sido evaluados en diferentes estadios morfogénicos *in vitro* de *Plantago ovata* Snarkis, sugiriendo que pueden ser debidos a la inactivación de genes relacionados con la síntesis de estas proteínas (Pramanik *et al.* 1996). Lo anterior puede servir de base para desarrollar estudios ontogénicos en el clon de *A. victoriae-reginae* en relación a las diferentes etapas de desarrollo de los regenerantes y los cambios isoenzimáticos que se puedan presentar. De igual manera sería recomendable evaluar las diferencias a nivel de ADN que puedan encontrarse entre plántulas clon y plántulas de semillas germinadas y valorar la posible diferencia en la respuesta altamente organogénica-embriogénica del clon. Sistemas que han sido aplicados en especies agrícolas, particularmente en maíz para evaluar variación somaclonal y mutaciones en regenerantes *in vitro*, utilizando como indicador a la isoenzima alcohol deshidrogenasa (Scowcroft *et al.* 1987).

Desarrollo de plantas clon bajo condiciones de invernadero. Las plantas clon de *A. victoriae-reginae* durante su adaptación y desarrollo bajo condiciones de invernadero se comportaron de forma similar a las reportadas para otras especies propagadas por cultivo de tejidos (Dunstan y Turner 1984). Los porcentajes de adaptación y sobrevivencia se

presentó de igual forma dentro de los intervalos reportados para otras especies (Dunstan y Turner 1984).

Conclusiones

- * Se logró la micropropagación de *Agave victoriae-reginae* vía organogénesis y embriogénesis somática. A partir de un embrión cigótico en ausencia de fitohormonas a generado embriogénesis y organogénesis somática por 8 años. También se estableció a partir de tallos de plántulas sujetos a reguladores del crecimiento: embriogénesis somática vía callo en presencia de 2,4-D y organogénesis directa en presencia de BA.
- * Se establecieron metodologías de organogénesis directa (en BA 0.5-1 mg/l) a partir de ápices de tallo, que podrían ser utilizadas en el rescate de genotipos erosionados.
- * Las técnicas de cultivo de tejidos en *A. victoriae-reginae* se presentan como una alternativa, con un alto potencial para llegar a propagarla comercialmente y cubrir su demanda por su valor ornamental y tratar de disminuir el saqueo de plantas y semillas de las poblaciones silvestres.
- * Las técnicas de cultivo de tejidos deben de ser utilizadas, con el conocimiento previo de que algunas vías morfogénicas pueden derivar en la regeneración de individuos aberrantes, los cuales pueden llegar a ser de alto riesgo para las nuevas generaciones si se liberan en los ambientes naturales. Tal es el caso de los embriones somáticos de *A. victoriae-reginae* derivados via callo que tiene un origen multicelular, como lo muestra la presencia de un suspensor muy ancho formado por un gran número de células.
- * Se analizaron anatómicamente a los embriones somáticos generados, caracterizados por su origen multicelular.
- * Por germinación de semillas se aisló un clon altamente embriogenético-organogenético bajo condiciones *in vitro*, con una continuidad de su respuesta durante 8 años y sin el uso de reguladores del crecimiento, el análisis de 7 isoenzimas con un total de 10 loci no reveló variación entre las bandas de las plántulas analizadas que provenían de diferentes subcultivos generados por 8 años.

* Se considera una respuesta altamente organogenética-embriogenética del clon, pues se manifestó sin el uso de reguladores del crecimiento, y esta respuesta no se alteró durante los 8 años de subcultivos a que ha estado sujeto.

* Los análisis de electroforesis de 7 isoenzimas revelaron que los regenerantes mostraron ser idénticos en los 10 loci analizados, lo que refleja la presencia de estabilidad genética, no obstante que el genotipo inicial se estableció en cultivo *in vitro* hace 8 años.

Literatura citada

Abe T. y Y. Futsuhara. 1989. Selection of higher regenerative callus and change in isozyme pattern in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 78:648-652.

Bergmann B.A. y A.M. Stomp. 1994a. Effect of genotype on *in vitro* adventitious shoot formation in *Pinus radiata* and correlations between pairs of phenotypic traits during *in vitro* shoot development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39:185-194.

Bergmann B.A. y A.M. Stomp. 1994b. Effect of genotype on rooting of hypocotyls and *in vitro*-produced shoots of *Pinus radiata*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39:195-202.

Binding H. y G. Krumbiegel-Schroeren. 1984. Clonal propagation: shoot cultures. Páginas 43-48, en: Indra K. Vasil (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. I. Academic Press, Inc. Orlando, Florida.

Binh L.T., L.T. Muoi, H.T.K. Oanh, T.D. Thang y D.T.Phong. 1990. Rapid propagation of *Agave* by *in vitro* tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 23:67-70.

Brown D.C.W., y T.A. Thorpe. 1984. Organization of a plant culture laboratory. Páginas 1-12, en: Indra K. Vasil (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. I. Academic Press, Inc. Orlando, Florida.

Chee P.P. 1990. High frequency of somatic embryogenesis and recovery of fertile Cucumber plants. *Hort Science* 25:792-793.

Colunga-GarcíaMarín P. 1996. Origen, variación y tendencias evolutivas de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Tesis de Doctorado en Ecología, Centro de Ecología-UACPyP/CCH, UNAM, México.

Constabel F. 1984. Callus culture: induction and maintenance. Páginas 27-35, en: Indra K. Vasil (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. I. Academic Press, Inc. Orlando, Florida.

Curtis J. 1986. Microtecnia vegetal. Editorial Trillas, México. 105 p.

D'Amato F. 1977. Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures. Páginas 343-357, en: J. Reinert y Y.P.S. Bajaj (eds.), Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer, Berlin.

D'Amato F. 1978. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. Páginas 287-295, en: T.A. Thorpe (ed.), Frontiers of Plant Tissue Culture. Intern. Assoc. Plant Tissue Cultur. Calgary, Canadá.

Das T. 1992. Micropropagation of *Agave sisalana*. Plant Cell Tissue and Organ Culture **31**:253-255.

Debergh P.C. y P.E. Read. 1991. Micropropagation. Páginas 1-13, en: P.C. Debergh y R.H. Zimmerman (eds.), Micropropagation: technology and application. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

Dodds J.H. y L.W. Roberts. 1982. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge University Press. Cambridge 178 p.

Doležel, J. 1991. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. Phytochemical Analysis **2**: 143-154.

_____, S. Sgorbati, y Y S. Lucretti. 1992. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. Physiologia Plantarum **85**: 625-631.

Dunstan D. Y. y K.E. Turner. 1984. The acclimatization of micropropagated plants. Páginas: 123-129, en: I.K. Vasil (ed.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, vol. I, Academic Press, Inc. Orlando, Florida

Ecker L. 1989. Long term maintenance of desert diversity: rare plant reintroductions. *Agave* **3**:6-8.

Escobar A.H.A., V.M.A. Villalobos y A.M. Villegas. 1986. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **7**:269-277.

Fitch M.M.. 1993. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from papaya hypocotyl callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **32**:205-212.

Frankel O.H. y M.E. Soulé. 1981. Conservation and Evolution. Cambridge Univ. Press, London. 327 p.

Gamborg O.L. y J.P. Shyluk. 1981. Nutrition Media and Characteristics of Plant Cell and Tissue Culture. Páginas 21-42, en: T.A. Thorpe (ed.), Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. Academic Press Inc., New York.

Gamborg O.L. 1982. Callus and Cell Culture. En: Plant Tissue Culture Methods, 1:1-9, L.R. Wetter y F. Constabel (eds.). National Research Council, Saskatoon, Canada.

_____. 1984. Plant cell culture: Nutrition and media. Páginas 19-35, en: Indra K. Vasil (ed.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. I. Academic Press Inc., Orlando, Florida.

Gana J.A., G.C. Sharma, A. Zipf, S. Saha, J. Roberts y D.M. Wesenberg. 1995. Genotype effects on plant regeneration in callus and suspension culture of *Avena*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **40**:217-224.

García-Mendoza, A. 1995. Riqueza y endemismo de la familia Agavaceae en México. Páginas 51-75, en: E. Linares, P. Dávila, F. Chiang, R. Bye, y T. Elias (eds.), Conservación de Plantas en Peligro de Extinción: diferentes enfoques. Universidad Nacional Autónoma de México, México.

George L. y S. Eapen. 1990. High frequency plant-regeneration through direct shoot development and somatic embryogenesis from immature inflorescence cultures of finger millet (*Eleusine coracana* Gaertn.). Euphytica **48**:269-274.

George E.F. y P.D. Sherrington. 1984. Plant Propagation by Tissue Culture, Handbook and Directory of Commercial Laboratories. Exegetics Ltd., Basingstone, England.

George E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. 1. The Technology. Exegetics Ltd. England.

Granados S.D. 1993. Los Agaves en México. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 252 p.

Groenewald E.G., D.C.J. Wessels, y A. Koelman. 1977. Callus formation and subsequently plant regeneration from seed tissue of an *Agave* species (Agavaceae). Z. Pflanzen Physiol. **81**:369-373.

Guo Y.D. y S. Pulli. 1996. High-frequency embryogenesis in *Brassica campestris* microspore culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **46**:219-225.

Hu, C.Y. y P.J. Wang. 1983. Meristem, Shoot, y Bud Culture. Páginas 177-227, en: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato y Y. Yamada (eds.), Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1. New York.

Hunault G. 1974. Obtention de souches de tissu a partir de diverses especies de monocotylédones. Comp. Rend. Acad. Sci. Paris, Sér. D278: 2509-2512.

Hussey G. 1986. Vegetative propagation of Plants by Tissue Culture. Páginas 29-66, en: M.M. Yeoman (ed.), Plant Cell Culture Technology. Blackwell Sci. Publ., Oxford.

- Iriondo J.M. y C. Pérez. 1990. Application of *in vitro* culture techniques to the conservation of Iberian endemic plant species. Bot. Gdn. Microprop. News. **1**:4-6.
- Jorgensen R.B., C.J. Jensen, B. Andersen y R. Von Bothmer. 1986. High capacity of plant regeneration from callus of interspecific hybrids with cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture **6**:199-207.
- Karp A. y S.W.J. Bright. 1985. On the causes and origins of somaclonal variation. Oxford Surveys of Plant Molecular & Cell Biology **2**: 199-234.
- Karp A. 1986. Chromosome variation in regenerated plants. Páginas 547-554, en: Genetic Manipulation in Plant Breeding. Walter de Gruyter & Co. Berlin.
- Kartha K. 1981. Meristem culture and cryopreservation methods and applications. Páginas 181-211, en: T.A. Thorpe (ed.), Plant Tissue Culture: methods and applications in agriculture. Academic Press, New York.
- _____. 1982. Cryopreservation of germplasm using meristem and tissue culture. Páginas 139-161, en: D.T. Tomes, B.E. Ellis, P.M. Harney, K.J. Kasha y R.L. Peterson (eds.), Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture & Industry. University of Guelph, Ontario, Canada.
- Knudson L. 1922. Nonsymbiotic germination of orchid seeds. Bot. Gaz. **73**:1-25.
- Kumar A. 1992. Somatic embryogenesis and high frequency plantlet regeneration in callus cultures of *Thevetia peruviana*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **31**:47-50.
- Larkin P.J. y W.R. Scowcroft. 1981. Somaclonal variation, a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theor. Appl. Genet. **60**:197-214.
- Lilien-Kipnis H., N. Azizbekova y M. Ziv. 1994. Scaled-up proliferation and regeneration of Nerina in liquid cultures Part II. Ontogeny of somatic embryos and bulblet regeneration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture **39**:117-123.
- Madrigal L.R., G.M.R. Dorantes y J.L. Rodríguez de la O. 1981. Propagación *in vitro* de henequén (*Agave fourcroydes* Lemaire). pp 11, en: Primer Simposio del *Agave*. Cordemex, S.A. de C.V. Mérida Yucatán, México.
- Madrigal L.R., F. Pineda-Estrada y J.L. Rodríguez de la O. 1990. *Agave*. Páginas 206-227, en: P.V. Ammirato, D.R. Evans, W.R. Sharp, y Y.P.S. Bajaj (eds.), Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 5: Ornamental species. Mc Graw-Hill Publ. Co. New York.
- Maheswaran G. y E. Williams. 1985. Origin and development of somatic embryoids formed directly on immature embryos of *Trifolium repens in vitro*. Ann. Bot. **56**:619-630.

- Margara J. 1988. Multiplicación Vegetativa y Cultivo *in vitro*, los meristemos y la organogénesis. Editorial Mundi-Prensa, Madrid. 232 p.
- Martin C. 1984. Cultivo de plantas en probeta. Mundo Científico 5:160-169.
- Martínez-Palacios A. 1991. Propagación masiva *in vitro* y recuperación de poblaciones de orquídeas en peligro de extinción. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM, México. 100 p.
- Meins F. 1986. Determination and morphogenetic competence in plant tissue culture. Páginas 7-25, en: M.M. Yeoman (ed.), Plant Cell Culture Technology. Blackwell Sci. Publ., Oxford.
- Mistretta, O. 1994. Genetics of species re-introductions: applications of genetic analysis. Biodiversity and Conservation 3: 184-190.
- Murashige T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15:473-494.
- Murashige T. 1974. Plant Propagation Through Tissue Culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:135-166.
- Murashige T. 1978. The Impact of Plant Tissue Culture on Agriculture. Páginas 15-26, en: T.A. Thorpe (ed.), Frontiers of Plant Tissue culture. IAPTC, Calgary.
- Nandwani D. y K.G. Ramawat. 1992. High frequency plants regeneration from seedling explants of *Prosopis tamarugo*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 29:173-178.
- Nehra N.S., K.K. Kartha, C. Stushnoff y K.L. Giles. 1994. Effect of *in vitro* propagation methods on field performance of two strawberry cultivars. Euphytica 76:107-115.
- Ninkovic S., J. Miljus-Djukic y M. Neskovic. 1995. Genetic transformation of alfalfa somatic embryos and their clonal propagation through repetitive somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 42:255-260.
- Nobel P.S. 1992. Annual variation in flowering percentage, seedling establishment and ramet production flora desert perennial. Int. J. Plant Sci. 153:102-107.
- Novák, F.J., L. Havel, Y J. Dolezel. 1986. Onion, Garlic y Leek (*Allium* Species). Páginas 387-404, en: Y.B.S. Bajaj (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 2: Crops I. Springer-Verlag, Berlin.
- _____, S. Daskalov, H. Brunner, M. Nesticky, R. Afza, M. Dolezelova, S. Lucretti, A. Herichova y T. Hermelin. 1988. Somatic embryogenesis in maize and comparison of

genetic variability induced by gamma radiation and tissue culture techniques. *Plant Breeding* **101**:66-79.

Oridate T., H. Atsumi, S. Ito y H. Araki. 1992. Genetic difference in somatic embryogenesis from seeds in melon (*Cucumis melo* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **29**:27-30.

Ortega L.M.P. 1996. Micorrización arbuscular de *Cosmos atrosanguineus* como un mecanismo preadaptativo a su establecimiento en suelo. Tesis de Maestría en Ciencias (Edafología), Facultad de Ciencias, UNAM, México. 85p.

Orton T.J. 1983. Spontaneous electrophoretic and chromosomal variability in callus cultures and regenerated plants of celery. *Theor. App. Genet.* **67**:17-24.

Ozawa K., D.H. Ling y A. Komamine. 1996. High-frequency somatic embryogenesis from small suspension-cultured clusters of cells of an interspecific hybrid of *Oryza*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **46**:157-159.

Parihar D.S., S.C. Maheshwari y P. Khurana. 1995. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl protoplast cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **42**:113-115.

Parrot W.A. y M.A. Bailey. 1993. Characterization of recurrent somatic embryogenesis of alfalfa on auxin-free medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **32**:69-76.

Peschke, V.M. Y R.L. Phillips. 1992. Genetic implications of somaclonal variation in plants. Páginas 41-75, en: J.G. Scandalios y T.R.F. Wright (eds.), *Advances in Genetics*. vol. 30 Academic Press, Inc., London.

Pijnacker L.P., J.H.M. Hermelink, y M.A. Ferwerda. 1986. Variability of DNA content and karyotype in cell cultures of an interdiplod *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Reports* **5**: 43-46.

Power D.E. y R.A. Backhaus. 1989. *In vitro* propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **16**:57-60.

Framanik S., S.S. Raychaudhuri y S. Chakraborty. 1996. Changes in esterase and superoxide dismutase isozymes during *in vitro* morphogenesis in *Plantago ovata* Forssk. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **44**:123-127.

Predieri S. y F.F.F. Malavasi. 1989. High-frequency shoot regeneration from leaves of the apple rootstock M26 (*Malus pumila* Mill.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **17**:133-142.

- Ramulu K.S. y P. Dijkhuis. 1986. Flow cytometric analysis of polysomaty and *in vitro* genetic instability in potato. *Plant Cell Reports* 3:234-237.
- Rao A.N. 1977. Tissue culture in the orchid industry. Páginas 44-69, en: J. Reinert y Y.P.S. Bajaj (eds.), *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer Verlag, Berlin.
- Raven P.H. 1976. Ethics and Attitudes in Conservation of Threatened Plants. Páginas 155-180, en: NATO Conference Series, 1 Ecology 1. Plenum Press, New York.
- Robert M.L., J.L. Herrera, F. Contreras y K.N. Scorer. 1987. *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 8:37-48.
- Rodríguez-Garay B., A. Gutiérrez y B. Acosta-Dueñas. 1996. Somatic embryogenesis of *Agave victoriae-reginae* Moore. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46:85-87.
- Rubluo A., V. Chávez, A. Martínez y O. Martínez-Palacios. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biological Conservation* 63: 163-169.
- Rueb S., M. Leneman, R.A. Schilperoort y L.A.M. Hensgens. 1994. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36:259-264.
- Scowcroft W.R., R.I.S. Brettell, S.A. Ryan, P.A. Davies y M.A. Pallotta. 1987. Somaclonal variation and genomic flux. Páginas 275-286, en: C.E. Green, D.A. Somers, W.P. Hackett y D.D. Biesboer (eds.), *Plant Tissue and Cell Culture*. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Sharp W.R., M.R. Sondahl, L.S. Caldas y S.B. Marafta. 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. Páginas 268-310, en: J. Janick (ed.), *Horticultural Reviews*, Vol. 2, Purdue University, Avi Publishing Co., Westport, CT.
- Snow R. 1985. Improvements in Methods for the Germination of Orchid seed. *Amer. Orchid Soc. Bull.* 54:178-181.
- Soltis, D. E., C. H. Haufler, D. C. Darrow, y G. J. Gastrony. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation of grinding buffers, and staining schedules. *American Fern Journal* 73:9-27.
- Stewart J. 1989. Orchid propagation by Tissue Culture Techniques - past, present and future. Páginas 87-100, en: H.W. Pritchard (ed.), *Modern Methods in Orchid Conservation: The role of physiology, ecology and management*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Sung Z.R., J.M. Smith, J.H. Choi, M. Krauss, C. Borkird y L.-S. Liu. 1988. Gene expression in embryogenesis. *HortScience* 23:513-515.

Tisserat B. 1985. Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. Páginas 79-105, en: R.A. Dixon (ed.), Plant Cell Culture, a Practical Research. IRL Press, Oxford.

Van der Valk P. O.E. Scholten, F. Verstappen, R.C. Jansen y J.J.M. Dons. 1992. High frequency somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryo-derived callus cultures of three *Allium* species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 30:181-191.

Vasil V. y I.K. Vasil. 1984. Induction and maintenance of embryogenetic callus cultures of gramineae. Páginas 36-42, en: Indra K. Vasil (ed.), Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. I. Academic Press, Inc., Orlando, Florida.

_____, C.-Y. Lu y I.K. Vasil. 1985. Histology of embryogenesis in cultured immature embryos of maize (*Zea mays* L.). Protoplasma 127:1-8.

Vasil I. K. 1994. Automation of plant propagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39:105-108.

Villalobos A.V.M., J.M. Mejía-Muñoz y H.A. Escobar Araya. 1991. Micropropagación de opuntias y agaves. Páginas 643-650, en: W.M. Roca y L.A. Mroginski (eds.), Cultivo de Tejidos en la Agricultura: fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.

Williams E.G. y G. Maheswaran. 1986. Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as a embryogenic group. Ann. Bot. 57:443-462.

Withers L.A. 1986. Cryopreservation and Genebanks. Páginas 96-140, en: M.M. Yeoman (ed.), Plant Cell Culture Technology. Blackwell Sci. Publ. Oxford.

Withner C.L. 1959. Orchid physiology. Páginas 315-360, en: Carl L. Withner (ed.), The Orchids: A Scientific Survey. Ronald Press, New York.

Wochok Z.S. 1981. The role of tissue culture in preserving threatened and endangered plant species. Biological Conservation 20:83-89.

Yang M.-Z., S.-R. Jia y E.-C. Pua. 1991. High frequency of plant regeneration from hypocotyl explants of *Brassica carinata* A. Br. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 24:79-82.

Ziauddin A. y K.J. Kasha. 1990. Long-term callus cultures of diploid barley (*Hordeum vulgare*). II. Effect of auxins on chromosomal status of cultures and regeneration of plants. Euphytica 48:279-286.

Ziv M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. Páginas 45-69, en: P.C. Debergh y R.H. Zimmerman (eds.), Micropropagation, technology and application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

CAPITULO V

DISCUSION GENERAL

Discusión general

Las poblaciones silvestres de *Agave victoriae-reginae* presentan una alta diferenciación genética entre poblaciones, valores que reflejan la posibilidad de contemplar una diferenciación a nivel de subespecie e incluso la diferenciación a nivel de los tres grupos: Este (E), Oeste (O) y Centro (C), las distancias genéticas reflejan la probabilidad de diferenciarlas a nivel de especie (Crawford 1983). En cuanto a su alta variación genética dentro de cada población ($He_{(pobs)} = 0.335$), representa el potencial evolutivo de la especie (Frankham 1995b). En relación a los aspectos ecológicos evaluados, aunque la especificidad del hábitat llega a ser una limitante en la distribución y en la mayoría de los casos refleja su endemismo, *A. victoriae-reginae* en el ambiente de pared muestra algunas ventajas que parecen favorecer los valores genéticos arriba mencionados. La presencia de un mayor reclutamiento de individuos genets en relación a ramets posiblemente favorezca el intercambio genético entre diferentes individuos y reduce por lo tanto riesgos de la endogamia. La alta diferenciación entre poblaciones también se ve reflejada en la estructura de tamaños entre sitios (pared y loma), entre poblaciones y entre tipo de reclutamiento (genets y ramets). El aporte de semillas en las poblaciones de pared parece ser estable, debido a que en estos ambientes se dificulta la colecta ilegal de semillas y la depredación de semillas puede ser bajo en comparación a las que se depositan en terrenos horizontales planos. La dehiscencia en pared permite que las semillas se depositan dentro de las grietas y pequeñas oquedades y el microambiente deben de constituir sistemas de almacenamiento y favorecer el desarrollo de las plántulas en los primeros estados de desarrollo. Este hecho puede ser ventajoso, al reducirse el número de depredadores y el proporcionar un microambiente más favorable para la germinación de semillas y reclutamiento de individuos genets. La ausencia o escasez de un suelo que limita la disponibilidad del nutrimento parece reducir la propagación clonal o reclutamiento de ramets. Los altos porcentajes de germinación de las semillas muestran su potencial reproductivo sexual. Por los factores antes discutidos, *A. victoriae-reginae* es un modelo para continuar estudiando y poder entender aun más los factores evolutivos a que ha estado sujeta, estudios que indudablemente permitirán ser utilizados para su conservación y para el entendimiento de los procesos de cambios en otras especies de zonas áridas.

Factores que favorecen la diferenciación de las poblaciones de *A. victoriae-reginae*. La condición que más puede favorecer una acelerada evolución es la fragmentación de una población en pequeñas subunidades, seguida de un aislamiento prolongado entre cada una, aunque ocasionalmente puedan intercambiar genes o exista migración entre colonias (Wright 1940; Stebbins 1952). Esta teoría parece explicar la alta diferenciación genética expresada en *A. victoriae-reginae*, que presenta una distribución geográfica en el sur del desierto Chihuahuense, presentándose en forma de “islas” inmersas en un basto desierto, con separaciones mayores a 20 km entre poblaciones vecinas, situación que entre otros factores es promovida por la especificidad del hábitat, que corresponde en la mayoría de los casos a los afloramientos de paredes de carbonato de calcio. Los altos niveles de variación dentro de las poblaciones parece ser un indicativo de la existencia de polinizadores locales, los cuales deben de participar de manera eficiente en la polinización cruzada dentro de la población, polinizadores locales que ya habían sido reportados de manera general para esta especie (Gentry 1982). La diferenciación entre poblaciones parece indicar una posible limitación en polinizadores migratorios (de amplia distribución), ocasionada por la falta de ellos o la presencia de barreras que bien podrían ser de tipo físicas o biológicas. Para estos grupos de agaves de fructificación espigada, como *A. arizonica*, han observado que la polinización es debida principalmente por insectos (Howell y Roth 1981). Sin embargo, trabajos preliminares al sur de México, Valle de Tehuacán-Cuicatlán, en los límites de los estados de Puebla y Oaxaca, se ha observado que los murciélagos polinizadores visitan agaves paniculados y espigados de manera no selectiva (Alfonso Valiente, comunicación personal), aunque, esta zona geográfica dista mucho de compararse con las regiones áridas del Norte de México. Para el Desierto Chihuahuense, en observaciones de *A. lechuguilla* (infrutescencia espigada) no se registró la presencia de murciélagos polinizadores y si la visita de insectos (con desplazamientos más restringidos) como *Xilocopa* sp. (abejorro) y de *Hyles lineata* (mariposa nocturna) (Arturo Silva, datos no publicados). Esta especie de agave está taxonómicamente emparentada con *A. victoriae-reginae*; además geográficamente *A. victoriae-reginae* se encuentra integrada dentro del área de distribución de *A. lechuguilla* (Gentry 1982). Los niveles altos de variación y diferenciación genética que registró *A. victoriae-reginae* y la mayor semejanza entre los grupos de poblaciones E y O en

relación a las del C (Cap. II), los ambientes específicos en paredes de carbonato de calcio que les caracteriza por presentar una discontinuidad en su distribución (separación >20 km) entre poblaciones, y la ausencia aparente en la actualidad de polinizadores (murciélagos) de amplio desplazamiento (Arturo Silva, comunicación personal), podrían ser un indicativo de que en el pasado estos últimos permitían el flujo génico entre las poblaciones y a la falta de éstos, los grupos y sus poblaciones han evolucionado de manera independiente. La distancia ha pasado a constituir un sistema de barreras geográficas para el flujo génico para los polinizadores locales (o que es raro que recorran la distancia entre dos poblaciones cercanas). Debido a lo anterior, resultaría de gran interés realizar estudios de biología floral que permitan aclarar estas interrogantes que parecen reflejar la alta diferenciación genética ($F_{ST} = 0.236$) entre las 10 poblaciones estudiadas.

Distribución y número de poblaciones de *A. victoriae-reginae*. Las poblaciones visitadas seguramente no son todas las localidades de distribución. No se exploraron todas las sierras ni cada rincón de ellas. El propósito era abarcar el área de distribución de Norte (N) a Sur (S) y de E a O para tener un panorama general de la especie y poder generar información útil para su conservación, de lo que si podemos estar casi seguros es de que tenemos la descripción de las dos poblaciones 1 y 7, de mayores dimensiones que puedan existir de *A. victoriae-reginae*, situadas totalmente en los extremos E y O respectivamente, y una tercera población (No. 5) de menor tamaño situada en el área C-S. El análisis de las muestras de hojas del territorio donde se distribuye la especie reveló que las distancias genéticas entre poblaciones presentaron una relación con la distribución geográfica, integrando a las 10 poblaciones en tres grandes grupos: el grupo E (pobs. No. 1, 2 y 3), el grupo C con distribución de las poblaciones de N a S (pobs. 4, 5, 8, 9 y 10) y el grupo O (6 y 7) (Fig. 2, Cap. II). La mayor similitud de los grupos extremos (E y O) en relación con el del C, parece indicar que la especie en los procesos pasados presentaba una distribución continua, aunque por la especificidad del hábitat (paredes de carbonato de calcio) podría favorecer la teoría de la existencia en el pasado de un polinizador que favorecía el flujo génico entre poblaciones. El tamaño extremadamente grande de las dos poblaciones más distantes de E a O (1 y 7) en relación a las otras 8 poblaciones, favoreció una mayor estabilidad genética. El caso contrario (grupo C) representado por poblaciones pequeñas, sujetas a cambios por deriva

génica. De reportarse nuevas localidades de distribución, es posible que con evaluar sus distancias geográficas en relación a las poblaciones de los tres grupos aquí descritos, se podría encontrar su posible integración a uno de estos. Para los casos de incertidumbre, un análisis electroforético con el mismo sistema y las mismas isoenzimas y loci evaluados sería un buen indicativo para establecer su ubicación dentro de uno de los grupos.

Respuesta de genets y ramets en el ambiente pared y loma. A diferencia de otros agaves, *A. victoriae-reginae*, presenta un bajo índice de propagación clonal o generación de ramets (Gentry 1982). Nuestros resultados registraron en el ambiente de pared un promedio general de 0.37 individuos ramets por cada individuo genet. En ambiente de loma en promedio fue de 2.55 individuos ramets por cada individuo genet. La densidad general de reproductores por área fue de 0.00131 reprod./m² (1 reprod./763 m²) que correspondió a un intervalo de 0.66% a 0.17% de reprod./inds inmaduros, para las densidades (ind/m²) de 0.20 (pob 5) a 0.75 (pob 7), respectivamente. La presencia simultánea de 2 o más reproductores en un mismo clon no se registró y sería un caso poco probable, sobre todo en el ambiente de pared, en virtud del reducido número de individuos por aglomerado o clon, a la diferencia de estructura de tamaños (diámetro en cm) dentro de ellas y al sistema de clonación por yemas laterales que resulta en pocos individuos, sujetos a compartir los nutrimentos entre todos los individuos de la colonia. La floración es más probable que se presente en forma alternada de tiempo, es decir que el aporte de genes del clon es de varios años después de la última floración. En ambiente de pared, existe una alta proporción de plantas solitarias que después de la fructificación se extingue el genotipo o promueve antes de morir la formación de un pequeño brote, permitiendo mantener las características del individuo genet en forma de ramet. También, fue posible observar la extinción de toda una colonia (2 o más individuos clones) después de la reproducción de algunos de ellos, como resultado de los factores de competencia presentes en este tipo de ambiente y al posible agotamiento por el gasto de energía en desarrollo reproductivo de alguno de ellos. En el ambiente de loma (población No. 3, Fig 5c: Cap. III), donde se presenta un suelo con mayor frecuencia en posición horizontal o sobre una pendiente con poca inclinación, se observó que bajo la superficie del suelo éste está constituido en muchos de los casos por material de arrastre (suelo pedregoso y arena) similar al que se presenta en bancos de arrastre en las vegas de arroyos y ríos. Esta

condición permite el desarrollo de rizomas bajo el suelo con un crecimiento radial de la colonia, y reducción de tamaños de los individuos ubicados alrededor de la planta central, que generalmente es de mayor talla. Esta estructura se encontró al remover el suelo entre dos plantas y se observó la presencia de un rizoma, también se observó la formación de ramets directamente de yemas en la base de tallos originando colonias aglomeradas. Las excavaciones con maquinaria que se llevan a cabo en estos sitios dejan ver el subsuelo formado de bancos de arena y grava. El material que se extrae es empleado en construcciones.

Los promedios de los diámetros de las plantas de *A. victoriae-reginae* en las siete poblaciones fueron más altos en las formas genets que en las formas ramets, a diferencia de otros agaves como *A. macroacantha* que registran mayores tallas y mayor número de individuos en las formas ramets (Arizaga, comunicación personal). Las diferencias pueden ser debidas a que *A. victoriae-reginae* presentó para el ambiente de pared la generación de ramets que ocurre preferentemente por generación de brotes de yemas basales. Lo anterior permite a la colonia estar constituida en un aglomerado y en su mayoría los ramets carecen de raíces propias, dependen de la nutrición de la planta madre. Esta forma de organización es similar a la que presentan la mayoría de las plantas, donde la parte apical inhibe a las yemas y brotes laterales mientras mantenga su jerarquía de dominancia apical (Taylor y Sussex 1990; Sachs 1991). También debe influir la limitación de nutrimentos por ser un ambiente carente de suelo, sin embargo, el ambiente de loma caracterizado por ser suelos profundos, el comportamiento sobre el promedio del diámetro se sigue manteniendo de forma similar al de pared, con la excepción de que en este ambiente se presentan las dos formas de formación de ramets: por yemas laterales y por rizoma. En loma se presenta un mayor número de ramets en relación de genets en una proporción de 2.55 a 1 respectivamente (discutido anteriormente). En contraste, *A. macroacantha* muestra un mayor desarrollo y número de las formas ramets y se le atribuye (Arizaga comunicación personal) a que presentan una nutrición paterna por medio del rizoma, el cual proporciona una unión física permanente garantizando la sobrevivencia y su desarrollo precoz. También es conveniente indicar que los ramets vinculados por rizoma, generan un sistema radicular

independiente que les permite desde su formación la posibilidad de capturar parte de su nutrición.

A pesar de que en la población No. 3 se presentó un mayor número de ramets (clones), la variación genética revelada a través del análisis de isoenzimas reportada en el capítulo dos, muestra heterocigosis ($He_{(pob\ 3)} = 0.325$ y $He_{(Total)} = 0.335$) ligeramente inferior al promedio de las diez poblaciones, la variación es alta y se comporta de forma similar al resto de las poblaciones. Lo anterior es un indicativo de que las poblaciones no registran niveles de endogamia. Para evitar problemas de repetición de lecturas por individuos clones las muestras de hojas colectadas correspondieron a individuos distantes y de diferentes colonias en los 5 sitios donde se detectó su establecimiento. Los polinizadores locales deben de jugar un papel importante en el intercambio genético dentro de la población, favorecido con la baja incidencia de clonación que registra esta especie (Gentry 1982). Un análisis isoenzimático de progenie y estudios de autopolinización entre la misma y con flores hermanas podría mostrarnos los niveles de endogamia. La probabilidad de que se recluten plantas con estas características a la población podría ser mínima, la baja variabilidad genética de las plantas puede ser un impedimento para su establecimiento en el ambiente hostil donde se desarrollan.

Situación de las poblaciones de *Agave victoriae-reginae*. Las poblaciones 1 y 7 podrían ser las más estables por ser las que se presentan en una amplia distribución, mayor número de individuos totales, mayor individuos reproductivos por año, la mayor densidad por área, y aparentemente la roca de la pared presenta una erosión no tan avanzada en relación a otras poblaciones.

De forma contraria, la población No. 3 constituida por 5 sitios, está establecida en lugares con una superficie de distribución reducida, principalmente porque se encuentra creciendo en pequeños cúmulos de plantas. Lo accesible del hábitat ha permitido el saqueo de plantas y probablemente una gran cantidad de semillas ya que el número de reproductores es muy bajo, están a la vista y al alcance de los posibles colectores. Se sugiere que es la población que demanda mayor atención para su protección y conservación. Un dato adicional que revela su crítica situación es que el número de individuos potencialmente

adultos está reducido, sólo se presentó 1 individuo reproductor en 1995 para toda la población, y en 1996 se registró la presencia de 5 individuos en estado reproductivo.

Las poblaciones 2 y 6 aunque de mayores dimensiones, presentan similares circunstancias sobre alteración de los hábitats, el factor que perturba en gran medida es la demolición de las sierras para la extracción de la roca que usan la industria cementera y en la fabricación de losetas de mármol. De continuar con esta práctica, es muy factible que desaparezcan las poblaciones en un lapso corto. Aunque en la población No. 1 se practican todas estas actividades, se registró ésta como la población con mayor dimensión y número de individuos, una condición que amortigua la destrucción es que parte de la población pertenece al Parque Nacional "La Huasteca", lo que permite que esta zona de la población esté legalmente protegida. Algunas de las poblaciones pequeñas (ej. Pobs. 9 y 10), se encuentran establecidas en pequeños cañones de una sierra con grandes dimensiones, además, algunas localidades son poco accesibles a vías de comunicación y parecen no haber sido afectadas por colectores hasta el momento.

Alternativas para la conservación *in situ* de poblaciones de *Agave victoriae-reginae*. Se recomienda una rápida acción, particularmente para proteger la población No. 3, se caracteriza por ser la más pequeña en tamaño y la más amenazada por saqueo de plantas y semillas. Para el caso de semillas el saqueo es crítico, como pudimos constatar en nuestra salida al observar reproductores sin la infrutescencia tanto de la única que fructificó el año de la salida, así como las observaciones hechas en plantas secas de años anteriores. Estas presentaban únicamente la base del escapo, con marca de corte a los 10-20 cm, sin observar los restos de la infrutescencia cortada. Una medida para la conservación *in situ* sería el establecimiento de un jardín botánico regional de zonas áridas en los alrededores de la Ciudad de Saltillo (15 -20 Km al Este). Este podría integrarse al desarrollo de un parque recreativo y de museos naturales formando parte de una Ciudad con historia del México revolucionario, minero, con yacimientos de fósiles, etc., enriqueciendo su cultura, educación, recreación y la conservación de especies de plantas y animales, permitiría contemplarse como una zona turística y de conservación para esa región. Esta zona a conservar involucraría a las especies nativas que se encuentran creciendo cerca o comparten el hábitat con *A. victoriae-reginae*, entre las que se encuentran especies amenazadas, dentro

de las cactáceas se puede mencionar al *Turbincarpus (Normanbokea) valdeziana*, *Thelocactus rinconensis* (S. Arias, comunicación personal). Dependiendo del proyecto a desarrollar, para el jardín botánico podría proponerse al menos una superficie de 10 ha., que permitiría abarcar la conservación en el lugar donde se encuentran actualmente 3-4 de los 5 sitios localizados, sitios que para ésta población registran el mayor número de individuos, y dentro de los cuales se podrían reubicar las plantas del sitio alejado. La ubicación resultaría accesible y por encontrarse en una zona escasamente elevada tendría una vista panorámica en el Valle de Saltillo, y el costo del terreno resultaría bajo debido a que no tiene ningún uso agrícola, se presenta un pastoreo abierto por ganado caprino (uso común en el desierto Chihuahuense) y la extracción ocasional de fibra de lechuguilla, cerca de los sitios de distribución se han establecido minas de grava y arena para la construcción.

En cuanto a las 9 poblaciones en ambiente de pared, mucho de ellas, podría conservarse aun con el nivel de saqueo de plantas que se presenta en la base o partes inferiores de las paredes, pues arrancar y bajar las plantas de las paredes requiere de mucho cuidado, además plantas dañadas carecen de valor en el mercado. La extracción de minerales por industrias explotadoras de cemento y cal resulta ser el agente más agresivo y que en pocos años llegará a transformar las localidades demoliendo la sierra o montaña donde se establece la especie. Las compañías están respaldadas por permisos gubernamentales que les concesionan la demolición y explotación de las sierras. Para nuestras colectas, se requirió de un permiso de colecta de la SEMARNAP, y la entrega de un informe a la delegación estatal de cada estado (Coah., Dgo., y N. L.) y a la federal (D.F.), indicando la situación de alteración de las poblaciones silvestres. En dichos informes entregados se denunciaba la destrucción de la localidad de las poblaciones y el nombre de la compañía concesionada. Sin embargo, han transcurrido más de 2 años y el deterioro de algunos de los hábitats aunado a la destrucción de plantas de *A. victoriae-reginae* continúan en forma acelerada.

Una concesión restringida a respetar la parte de pared donde se distribuyen las plantas, permitiría conservar *in situ* a las poblaciones en grave peligro de extinción. Sin embargo esta acción no se ha tomado en consideración por las autoridades que deben regular la protección de los recursos naturales.

La conservación *in situ* de las poblaciones podría establecerse considerando una muestra representativa de cada población y normatizar y hacer respetar el área a conservar por las autoridades pertinentes. Es necesario contemplar la conservación de las diez poblaciones, debido a que los resultados de genética de poblaciones para *A. victoriae-reginae* registraron valores altos de diferenciación genética entre poblaciones ($F_{ST} = 0.236$), valor relativamente bajo en la tasa de migración ($Nm = 1.821$) (Hartl y Clark 1989), el flujo génico ($M = -0.47$) que indica una relación de aislamiento por distancia entre las poblaciones (Slatkin 1993) y los altos valores de distancias genéticas entre poblaciones (Cap. II) que reflejan valores altos comparables a los observados entre diferentes subespecies y de otros grupos de plantas (Crawford 1983). Esta diferenciación es muy probable que esté relacionada a su distribución en forma de “islas” que permiten la presencia de una barrera física dentro del desierto Chihuahuense. Barrera generada muy probablemente por la ausencia de polinizadores de distribución amplia (discutido anteriormente). Diferencias que también fueron observables aunque aun no evaluadas en la morfología de plantas potencialmente adultas entre las diferentes poblaciones (Fig. 5b y c: Cap. III).

Para el tamaño mínimo de una población se pueden tomar como base de investigación los análisis reportados por Lande (1995), indicando que *..... para mantener el potencial adaptativo normal en los caracteres cuantitativos bajo un balance entre mutación y deriva génica al azar (o entre mutación, deriva génica y selección natural estabilizadora), el tamaño poblacional efectivo debe ser de aproximadamente 5000 individuos.....* Lo anterior se podría aplicar a esta especie, si de forma preliminar tomamos los valores altos de variación genética ($He_{(Pobs)} = 0.325$) que se presentaron en la población No. 3, la cual estaba integrada por poco menos de mil individuos. Con tamaños más pequeños a los documentados se corre el riesgo de que las poblaciones pueden estar sujetas a una endogamia e incrementar la tasa de extinción en una población (Frankham 1995a). Sin embargo, dada la complejidad que se manifiesta entre las diferentes especies, será necesario ajustar el tamaño mínimo de la población utilizando los valores genéticos y de ecología de poblaciones aquí obtenidos. Programas sobre conservación de esta especie podrían ser exitosos a un costo muy bajo, con la reglamentación de fragmentos de la población para su conservación *in situ*, además de apoyar estos programas con la conservación de plantas y

semillas en los jardines botánicos. Los altos niveles de variación genética en las 10 poblaciones, indican que aun sería posible en la actualidad asegurar la conservación de las poblaciones y no esperar que éstas reflejen respuestas similares a otras especies donde se cuenta con tan sólo unos pocos (menos de 10) individuos (Rubluo *et al.*, 1993; Mistretta 1994). Una ausencia o reducida variación genética que presentan en relación a la población original, es el punto central de discusión para el establecimiento o recuperación de una especie con estas características, y los esfuerzos de conservación podrían llegar a tener un elevado costo y un final infructuoso.

Para el caso ideal de poder establecer la conservación de las diez poblaciones, se propone tomar en cuenta el zimograma de distancias genéticas (Cap. II), donde se muestra la existencia de tres grandes grupos. Solo en circunstancias extremas se sugiere conservar una población por grupo, ya que las distancias genéticas entre grupos sugieren que podrían representar distintas especies. Sin embargo, en relación a las distancias genéticas entre las poblaciones y a la misma área geográfica donde se encuentran, sugiere que *A. victoriae-reginae* registra un proceso de especiación simpátrica. Lo anterior muestra la importancia de conservar *in situ* de tamaños representativos de cada población.

Conservación *ex situ*. La conservación de semillas en jardines botánicos es una alternativa viable, que permite establecer las bases de un banco de germoplasma y el desarrollo de líneas de investigación con el material conservado, que permitirán conocer más de los aspectos fisiológicos, genéticos de las poblaciones silvestres de *A. victoriae-reginae*. La conservación de semillas bajo las condiciones establecidas resulta ser eficiente para esta especie. Semillas de dos poblaciones después de dos años de almacenaje registraron una germinación superior al 90%, sin embargo, en la medida de las posibilidades sería importante que los jardines botánicos establecieran entre sus sistemas de conservación el de los bancos de semillas con las mejores condiciones, reportadas para diversas especies con semillas ortodoxas, donde se podría garantizar para un gran número de especies, altos porcentajes de viabilidad por 50 o más años de almacenaje (Roberts 1975; Thompson 1975; Frankel y Soulé 1981), donde bien podría estar el caso de *A. victoriae-reginae* y de muchas especies de la familia Agavaceae, así como de otros grupos de plantas de zonas áridas.

En programas de conservación *ex situ* de especies donde las semillas no sean una alternativa viable y se requiera del uso de técnicas de cultivo de tejidos para la propagación de plantas y su posterior reintroducción en las poblaciones naturales. Es fundamental establecer vías que permitan garantizar en gran medida la estabilidad de los genotipos, con el propósito de que se evite la reintroducción de plantas aberrantes con genes raros y ocasionen un caos en las nuevas generaciones resultado de la cruce entre estas plantas y las plantas silvestres caracterizadas por presentar genes coadaptados a su ambiente (Ecker 1989).

El uso de técnicas para análisis de variación genética a través de isoenzimas, ADN, y valoración de poliploidías usando citometría de flujo, se presentan como herramientas fundamentales para determinar si se ha logrado una clonación o inestabilidad genética (mutaciones genéticas o variación cromosómica) de las plantas derivadas vía cultivo de tejidos (Karp 1986; Novák *et al.* 1986; Pijnavker *et al.* 1986; Dolezél 1991; Dolezél *et al.* 1992; Peschke y Phillips 1992; Ortega 1996).

Las vías morfogénicas (organogénesis y embriogénesis somática directa e indirecta) que permitirían una mayor probabilidad de estabilidad genética, serían las de respuesta directa a partir de tejidos estables como los meristemos y ápices de tallo, tal y como se reporta en diversos trabajos (Kantha 1981, 1982; Binding y Krumbiegel-Schroeren 1984; Thorpe y Patel 1984; Hussey 1986; George 1993; Paulet *et al.* 1993). El caso contrario, la inestabilidad de plantas comúnmente se ha generado por vías indirectas, es decir a través de tejidos y órganos desorganizados en un calló por la presencia de fitohormonas en el medio de cultivo, incrementándose la inestabilidad al prolongarse el periodo de calogénesis y/o al utilizar tejidos muy diferenciados, con lo cual existe un alto riesgo de generar plantas aberrantes como individuos poliploides o individuos con tejidos quiméricos con un amplio mosaico cromosómico (D'Amato 1977; Novák *et al.* 1986; Pijnacker *et al.* 1986; Ramulu y Dijkhuis 1986; Dolezél 1991; Dolezél *et al.* 1992).

El uso del material almacenado *ex situ*, como plántulas *in vitro* (provenientes de regiones meristemáticas en respuestas morfogénicas directas) y semillas depositadas a temperaturas bajas, podrán ser parte del material para el rescate de una población con serios problemas de extinción, siempre y cuando pertenezcan a la misma población; los análisis

isoenzimáticos que se presentan en el Cap. II, en conjunto con lo reportado en el Cap. III referente a la estructura poblacional, respuesta clonal, densidad, etc., serán la herramienta para tratar de diseñar un sistema y elegir el material (genotipos) que se podrá liberar y en qué proporción, en caso contrario, la falta de material almacenado o el descubrimiento de una nueva población con serios problemas de extinción, podría llevarnos a repetir sistemas de clonación como el establecido para *Cercocarpus traskiae*, de la cual, en la naturaleza únicamente existían 7 plantas y correspondían a 7 diferentes genotipos (Mistretta 1994).

La aplicación de las técnicas de cultivo de tejidos por cualquier vía morfogénica de propagación se justifica su uso en la industria de plantas de ornato, puede ser una herramienta importante al establecer un sistema de propagación masiva de plantas, ha demostrado que al perfeccionarse a una escala industrial puede proporcionar de 200,000 a 400,000 plantas por año a partir de una sola yema (Martin 1984), abasteciendo la demanda comercial. Este sistema permite de forma indirecta proteger las poblaciones silvestres, participando en la disminución del saqueo de semillas y plantas (práctica que continúa de manera ilegal).

Agentes que amenazan a especies en peligro de extinción con alto valor ornamental.

La amenaza por colecta ilegal está dada principalmente por el valor ornamental que han adquirido muchas especies de plantas mexicanas en el mercado internacional y recientemente en el mercado nacional. En el caso de las endémicas o de distribución restringida se ha ocasionado que un gran número de especies se encuentren al borde de la extinción (Villa-Lobos 1988; Vovides 1989; Martínez-Palacios 1991; Arias 1993; CITES 1995).

Instituciones educativas y Centros de investigación también participan en cierto grado con la extinción de plantas. Un ejemplo claro se observa en los viajes de prácticas escolares y colectas para jardines botánicos, que en la actualidad colaboran a baja o alta escala (dependiendo de la situación de la especie) en la extracción de plantas (Osborne y van Staden 1987). Lo anterior es una práctica común si se observan sus colecciones, por lo general, cada planta en exhibición presenta la etiqueta de colecta de campo, y tales colecciones son mantenidas con reposiciones periódicas, que para el caso de las especies en peligro de extinción con ello cada vez se reduce más el número de individuos en las poblaciones silvestres. La colecta a cualquier nivel influye directamente en la erosión genética y la extinción. Es fundamental que los jardines botánicos desarrollen programas

hortícolas con especies en peligro de extinción, estableciendo técnicas que puedan ser del dominio público para ser aplicado por viveristas. Con tales técnicas se podrían mejorar los programas de rescate de especies en peligro de extinción, además de mantener y reponer sus colecciones (Elias 1986). Una situación grave ocurre en las escuelas con prácticas de campo, pues participan en la difusión de las localidades de plantas, permiten que estudiantes o interesados se inscriban con el interés de conocer localidades y coleccionar plantas y semillas durante la salida en grupo o en futuras salidas individuales. Es necesario que los profesores e investigadores pongan mayor interés en la protección de especies en peligro de extinción, sobre todo aquellas donde la colecta ilegal es el factor que las amenaza. *A. victoriae-reginae* por ser endémica de México (distribuida en algunas regiones de los estados de Durango, Coahuila y Nuevo León) y presentar un alto valor ornamental en el mercado internacional lamentablemente cumple con las expectativas de extinción antes mencionadas, aunado a la destrucción del hábitat donde se establece. Viveristas Australianos vía Comercio Exterior, ofrecen \$200.00 u.s./planta potencialmente adulta (S. Franco, com. pers.). La colecta de semillas en campo para producción de plantas en viveros podría ser una alternativa de uso sustentable, siempre que las colectas se establezcan con fundamentos ecológicos para no poner en riesgo el aporte de semillas en la población. Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales aplicando los sistemas establecidos en esta investigación se presenta como la más idónea, ya que únicamente requiere de unas cuantas semillas en el desarrollo inicial del sistema de micropropagación. La importancia de establecer sistemas de propagación de plantas podría ser una de las soluciones para disminuir el saqueo ilegal de plantas y semillas de las poblaciones, que junto con la demolición de las sierras por compañías explotadoras de cemento, cal y mármol, son los dos factores que amenazan de extinción a las poblaciones.

El presente trabajo desde su inicio se planteó como un proyecto de biología de la conservación de *A. victoriae-reginae* (Agavaceae) especie mexicana endémica y en peligro de extinción, para utilizar diversas disciplinas (genética, ecología, cultivo de tejidos vegetales, anatomía y fisiología de semillas) que permitieran proporcionar alternativas en forma individual e integral para su conservación *in situ* y *ex situ*. Los resultados obtenidos muestran ser satisfactorios ya que se logró determinar la estructura genética y poblacional de las poblaciones, el tamaño y el estado actual de cada población visitada y varios factores

más, que en forma integral permitieron proponer alternativas para su conservación. Además, surgieron nuevas interrogantes como el tratar de entender los factores que han permitido que las poblaciones evolucionen en forma aislada, derivando en la ausencia o reducción de un flujo génico. Las técnicas de cultivo de tejidos pueden ser una herramienta muy útil en la propagación masiva de plantas para uso ornamental y en el rescate de genes erosionados utilizando sistemas de clonación que garanticen una estabilidad genética. El trabajo involucró la asesoría y colaboración de varios especialistas e investigadores y diversos laboratorios, y junto con los apoyos financieros proporcionados por CONABIO, PADEP, PAPIIT y en becas CONACYT. Se logró abordar las diversas líneas de investigación, factores que permitieron en forma integral cumplir con los objetivos inicialmente planteados. Sin embargo, lo que aquí se realizó es el primer paso y la conservación de la naturaleza es un proceso más complejo, que puede no llegar a tener eco si no participan las instancias gubernamentales para su conservación, de igual forma es de suma importancia que participen y/o colaboren otras instituciones relacionadas en la conservación de la naturaleza y concientizar a la sociedad misma de la problemática. El recurso natural, colecta racional de semillas, promete un gran potencial para uso sustentable en regiones marginadas, sobre todo analizando el alto valor ornamental que presenta a nivel internacional.

Conclusiones

- Se estableció el sistema y se realizó el análisis de isoenzimas de 10 poblaciones de *Agave victoriae-reginae* con lo cual se lograron conocer sus niveles de variación y diferenciación genética.
- Con base en el análisis de parámetros estáticos de ecología, se logró conocer el estado en que se encuentran las poblaciones, registrando perturbaciones graves en tres de ellas.
- Resulta urgente establecer mecanismos para la conservación *in situ* y *ex situ* (ej. semillas) como medidas de conservación de la especie.
- Se establecieron vías para la propagación masiva y clonal por cultivo de tejidos. Lo cual hace real la posibilidad de aplicarse de inmediato en el rescate de genotipos erosionados

(para el caso que se requiera) y para abastecer la demanda internacional como una especie ornamental.

- La investigación en las distintas áreas abordadas (ecología y genética de poblaciones, fisiología de semillas y cultivo de tejidos) han permitido en el presente estudio establecer alternativas viables para la conservación de *Agave victoriae-reginae*.

Perspectivas a futuro.

Es necesario continuar con estudios de ecología de poblaciones (biología reproductiva) para entender mejor los procesos evolutivos que han permitido que las poblaciones evolucionen de manera independiente y registren en la actualidad una gran diferenciación genética.

También se recomienda que la presente investigación, de ser posible, se complemente con estudios de citogenética, revisión taxonómica y otros estudios que permitan corroborar el nivel taxonómico en que se encuentran las poblaciones y/o los tres diferentes grupos (Este, Oeste y Centro), agrupados de forma natural de acuerdo al análisis de distancias genéticas.

Debido a que el porcentaje de germinación de semillas y su desarrollo a plantas (>10 cm) bajo condiciones de invernadero es alto y en corto tiempo. Las semillas colectadas en campo podría ser el material base para el aprovechamiento sustentable de la especie, siempre que se establezca un programa de la cantidad de semillas a colectar por infrutescencia. Evitando lo que se presenta en la población 3 donde los individuos reproductores son pocos por año y con la colecta ilegal se extraen todas la semillas, que podría llevar pronto a un agotamiento genético de la población.

La micropropagación se estableció como una alternativa viable para ser utilizada en la propagación masiva de plantas para uso comercial y hasta el momento para esta especie no se justifica su aplicación.

Es necesario que se respete la opinión de las autoridades académicas y que sean ellas y no sólo las gubernamentales quienes normaticen la conservación del tamaño mínimo de cada población. Con lo cual, se lograría evitar la desaparición a corto plazo de cuando menos dos poblaciones (2 y 6) que presentan ambiente de pared, sierras que actualmente se

están demoliendo al extraer cemento, roca molida y mármol. La población (No. 3) en ambiente de loma, se presenta como la población que demanda mayor atención para su conservación por ser la más susceptible a colecta de plantas y semillas y ser la población con menor número de individuos.

Es de fundamental importancia que los jardines botánicos en sus programas de conservación *ex situ* establezcan sistemas de propagación hortícola para reponer sus colecciones y donar a otros jardines botánicos y centros de investigación, evitando de esta forma el que se agudice la erosión genética y extinción de poblaciones. Además de establecer bancos de semillas de las poblaciones como sistemas de conservación de variabilidad genética y de alternativa para el rescate en un futuro cercano de poblaciones erosionadas genéticamente.

La implementación de los programas y el financiamiento de los mismos es por consiguiente materia institucional, de aquella que acepte comprometerse a tomar una acción directa en la conservación de esta especie, representante de la flora mexicana.

Literatura citada

Arias S. 1993. Cactáceas: conservación y diversidad en México. *Rev. Soc. Méx. Hist. Nat.* 44:109-115.

Binding H. y G. Krumbiegel-Schroeren. 1984. Clonal propagation: shoot cultures. Páginas 43-48, en: Indra K. Vasil (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. I. Academic Press, Inc. Orlando, Florida.

CITES. 1995. Appendices I, II, and III to the convention on international trade in endangered species of wild fauna and flora. US Fish & Wildlife Service, Washington, DC

Crawford D.J. 1983. Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies. Páginas 237-287, en: S.D. Tanksley y T.J. Orton (eds.). *Isozyme in Plant Genetics and Breeding*, Part A. Elsevier, Amsterdam.

D'Amato F. 1977. Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures. Páginas 343-357, en: J. Reinert and Y.P.S. Bajaj (eds.), *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Springer, Eerlin.

Dolezél, J. 1991. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis* 2:143-154.

- _____, S. Sgorbati, Y S. Lucretti. 1992. Comparison of three DNA fluorochromes for flow cytometric estimation of nuclear DNA content in plants. *Physiologia Plantarum* **85**: 625-631.
- Ecker L. 1989. Long term maintenance of desert diversity: rare plant reintroductions. *Agave* **3**:6-8.
- Elias T.S. 1986. Can threatened and endangered species be maintained in botanic gardens?. Páginas 5-8, en: Thomas S. Elias (ed.), *Conservation and Management of Rare and Endangered Plants*. Proceeding from a conference of the California Native Plant Society, Claremont, CA.
- Frankel O.H. y M.E. Soulé. 1981. *Conservation and evolution*. Cambridge Univ. Press, London. 327 p.
- Frankham R. 1995a. Inbreeding and Extinction: A Threshold Effect. *Conservation Biology* **9**:792-799.
- _____. 1995b. Conservation genetics. *Ann. Rev. Genetics*. **29**:305-327.
- Gentry S.H. 1982. *Agaves of Continental North America*. Univ. of Arizona Press, Tucson. 670p.
- George E.F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 1. The technology. Exegetics Limited, London.
- Hartl D.L. y A.G. Clark. 1989. *Principles of population genetics*. Sinauer, Sunderland, Massachussets.
- Hickey R.J., M.A. Vincent y S.I. Guttman. 1991. Genetic variation in running Buffalo clover (*Trifolium stoloniferum*, Fabaceae). *Conservation Biology* **5**:309-316.
- Howell D.J. y B.S. Roth. 1981. Sexual reproduction in agaves: the benefits of bats; the cost of semelparous advertising. *Ecology* **62**:1-7.
- Hussey G. 1986. Vegetative propagation of plants by tissue culture. Páginas 29-66, en: M.M. Yeoman (ed.), *Plant Cell Culture Technology*. Blackwell Scientific Publications, London.
- Karp A. 1986. Chromosome variation in regenerated plants. Páginas 547-554, en: W. Horn, C.J. Jensen, W. Odenbach y O. Schieder (eds.), *Genetic Manipulation in Plant Breeding*. Walter de Gruyter & Co. Berlin.

Kartha K. 1981. Meristem culture and cryopreservation methods and applications. Páginas 181-211 en: T.A. Thorpe (ed.), Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. Academic Press, New York.

_____. 1982. Cryopreservation of germplasm using meristem and tissue culture. Páginas 139-161 en: D.T. Tomes, B.E. Ellis, P.M. Harney, K.J. Kasha y R.L. Peterson (eds.), Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture & Industry. University of Guelph, Ontario Canada.

Lande R. 1995. Mutation and conservation. Conservation Biology 9:782-791.

Martin C. 1984. Cultivo de Plantas en Probeta. Mundo Científico 5:160-169.

Martínez-Palacios A. 1991. Propagación masiva *in vitro* y recuperación de poblaciones de orquídeas en peligro de extinción. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología), Facultad de Ciencias, UNAM, México. 100 p.

Mistretta O. 1994. Genetics of species re-introductions: applications of genetic analysis. Biodiversity and Conservation 3:184-190.

Novák, F.J., L. Havel, Y J. Dolezel. 1986. Onion, Garlic and Leek (*Allium* Species). Páginas 387-404, en: Y.P.S. Bajaj (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 2: Cops I. Springer-Verlag, Berlin.

Csborne R. y J. van Staden. 1987. *In vitro* regeneration of *Stangeria eriopus*. HortScience 22:1326.

Paulet F., F. Engelmann y J.C. Glaszmann. 1993. Cryopreservation of apices of *in vitro* plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids) using encapsulation-dehydration. Plant Cell Reports 12:525-529.

Pavlik B.M., DL. Nickrent y A.M. Howald. 1993. The recovery of an endangered plant. I. Creating a new population of *Amsinckia grandiflora*. Conservation Biology 7:510-526.

Peschke, V.M. y R.L. Phillips. 1992. Genetic implications of somaclonal variation in plants. Páginas 41-75, en: J.G. Scandalios y T.R.F. Wright (eds.), Advances in genetics, vol. 30 Academic Press, Inc., London.

Pijnacker L.P., J.H.M. Hermelink, y M.A. Ferwerda. 1986. Variability of DNA content and karyotype in cell cultures of an interdihaploid *Solanum tuberosum*. Plant Cell Reports 5: 43-46.

- Ortega L.M.P. 1996. Micorrización arbuscular de *Cosmos atrosanguineus* como un mecanismo preadaptativo a su establecimiento en suelo. Tesis de Maestría en Ciencias (Edafología), Facultad de Ciencias, UNAM, México. 85p.
- Ramulu K.S. y P. Dijkhuis. 1986. Flow cytometric analysis of polysomaty and *in vitro* genetic instability in potato. *Plant Cell Reports* 3:234-237.
- Roberts E.H. 1975. Problems of long-term storage of seed and pollen for genetic resources conservation. Páginas 269-295, en: O.H. Frankel y J.G. Hawkes (eds.), *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*. International Biological Programme 2. Cambridge Univ. Press.
- Rubluo A., V. Chávez, A. Martínez, y O. Martínez-Vázquez. 1993. Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biological Conservation* 63:163-169.
- Slatkin M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution* 47:264-279.
- Stebbins, G.L. 1952. Aridity as a stimulus to plant evolution. *Amer. Natur.* 86:33-44.
- Thompson, P.A. 1975. The collection, maintenance and environmental importance of the genetic resources of wild plants. *Environ. Conserv.* 2:223-228.
- Thorpe T.A. y K.R. Patel. 1984. Clonal propagation: adventitious buds. Páginas 36-42, en: Indra K. Vasil (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. I, Academic Press, Inc., Orlando, Florida
- Villa-Lobos, J. 1988. Threatened Plant List of Middle America. IUCN, U. K.
- Vovides A.P. 1989. Problems of endangered species conservation in Mexico: cycads an example. *Encephalartos* No. 29:29-35.
- Wright S. 1940. Breeding structure of populations in relation to speciation. *Amer. Natur.* 74:232-248.

APENDICE I.

A) Sistema electroforético No. 8 LiOH (Soltis et al., 1983) utilizado para la evaluación isoenzimática de *Agave victoriae-reginae* T. Moore.

Buffer del gel:

0.042 M Tris (T-1378)	5.04g
0.007 M Acido cítrico (monohidratado)	1.47g
0.004 M LiOH	0.16g
0.025 M Acido bórico	1.56g
H ₂ O destilada (aforar a)	1000ml
(ajustar el pH a 7.6 con 1M de HCl; para GOT, ME y ACPH ajustar a pH 8.0).	

Buffer del electrodo:

0.019 M Hidróxido de Litio (LiOH)	1.64g
0.263 M Acido bórico	16.23g
H ₂ O destilada (aforar a)	1000ml
(ajustar a pH 8.0 con NaOH ó HCl).	

Corriente a 60 mA, desplazamiento por 6 cm, tiempo de corrida 6-7 h..

B) Recetas de los sistemas "buffers" utilizados para el análisis electroforético en *Agave victoriae-reginae* T. Moore.

ACPH (Acid phosphatase; E.C.3.1.3.2 (Hakim-Elahi, 1976))	DIA (Diaphorase; E.C.1.6.4.3)
Pesar: Fast Garnet GBC salt 75mg Añadir: Buffer 1M de acetato de sodio (NaAc) pH5.0 4ml H ₂ O destilada 40ml MgCl ₂ 10% (1M) 1ml α-Naphthyl acid phosphate (sodium salt) 1% 2ml (Incubar en oscuridad a temperatura ambiente)	Pesar por separado: 1) 2,6 diclorofencl indofenol (DPIP) 4mg 2) β-NADH 12mg MTT 8mg 3) Agar 0.36g Añadir por separado: 1) H ₂ O destilada (justo antes de teñir y disolver bien) 4ml 2) 0.025M Tris-HCl pH 8.6 20ml 3) H ₂ O destilada 24ml Calentar hasta que hierva y se disuelva el agar, entonces mezclar 1), 2) y 3). (Incubar en oscuridad a 37°C, aprox. 45 min.)

EST (Esterase; E.C.3.1.1) (Hakim-Elahi, 1976)	GOT (Glutamate oxaloacetate transaminase; E.C.2.6.1.1) (Wyatt, 1989).
Pesar: Fast Blue RR salt 75mg Añadir: α-Naphthyl acetate 1% 3ml H ₂ O destilada 40ml Buffer de fosfatos pH6.0 3ml (Incubar a temperatura ambiente aprox. 60min)	Pesar: Pyridoxal 5-phosphate 4mg Fast Blue BB salt 150mg Añadir: 0.2M Tris-HCl pH 7.0 50ml Substrato GOT pH 7.0 5ml (Incubar en oscuridad a 37°C) (Sistema Mitton PP)

LAP (Leucine aminopeptidase; E.C.3.4.11.1) (Werth, 1985).	ME (Malic enzyme; E.C.1.1.1.40) (Modificado de Soltis et al., 1983)
Pesar: Fast Black K salt 100mg (disolverlo bien en 5ml de H ₂ O destilada justo antes de teñir) Añadir: Buffer 0.2M Tris-maleato pH 5.2 50ml L-leucine β-naftilamida-HCl 2.5% 1ml (Incubar en oscuridad a 37°C durante 30 min, y posteriormente añadir el Fast Black K salt ya disuelto. Dejar incubando en la oscuridad a 37°C).	Mezclar: 0.2M Tris-HCl pH 8.0 40ml 1M DL-Malato pH 7.0 5ml 1M MgCl ₂ (6 10%) 1ml TPN (=NADP) 1% 1ml MTT 1% 1ml PMS 1% 0.2ml (Incubar en oscuridad a 30°C)

Continúa en la siguiente página

APENDICE II.

TECNICAS PARA EL ANALISIS ANATOMICO DE ESTRUCTURAS MORFOGENETICAS GENERADAS *IN VITRO* (Mauseth (datos no publicados), modificado por C. Guzman, Lab. Anatomía, Jardín Botánico, IB-UNAM).

1. Fijador NAVASHIN'S:

Sol. A: - ácido crómico (= trióxido crómico), cristales	1 g
- ácido acético glacial	7 ml
- agua	92 ml

Sol. B: - formaldehído	30 ml
- agua	70 ml

mezclar 1:1 la sol. A y B en el momento de fijar, y mantener los tejidos en el fijador por un periodo no mayor de 24 h, el tiempo dependerá de la consistencia del tejido a fijar.

2. Lavar con agua corriente durante 30 min.

3. Deshidratar gradualmente con mezclas H₂O-Etanol-TBA (ml):

No.	H ₂ O	Etanol (95%)	TBA ^a	Etanol absoluto	Deshidrat. (%)
1	65	30	5	0	30
2	50	40	10	0	50
3	30	50	20	0	70
4	15	50	35	0	85
5	0	45	55	0	95
6	0	0	75	25	100

^a alcohol terbutilico ((CH₃)₃ COH).

4. Tres cambios en TBA absoluto, 2 con 2 h c/u y el tercero por 12 h.

5. Agregar escamas de parafina de forma gradual, de manera que se disuelva continuamente.

6. En la estufa evaporar el total de TBA, para ser sustituido por parafina pura.

7. Mantener en parafina pura durante 24 h.

8. Preparar los bloques para los cortes

9. Realizar cortes en un microtomo de rotación (15-25 μ).

10. Montar los cortes en porta objetos

11. Teñir con safranina y verde rápido por aproximadamente 5 minutos, según lo demande la preparación a teñir.

12. Enjuagar 3 veces con alcohol absoluto durante un minuto cada uno.

13. Agregar aceite de clavo por 8 min.

14. Enjuagar con 3 cambios de Xilol, 1 min. cada uno.

15. Montar en resina sintética, limpiar y etiquetar.

**APENDICE III.
(Abreviaturas)**

EA = 6-Benzylaminopurine (BA; N⁶-Benzyladenine)

2,4-D = 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

K. = Kinetin (6-Furfurylaminopurine)

NAA = Alpha-Naphthylacetic acid

MS = Medio nutritivo Murashige y Skoog (1962)

N = Norte

S = Sur

E = Este

O = Oeste

C = Centro

ACP o ACPH = Acid phosphatase

DIA = Diaphorase

EST = Esterase

GOT = Glutamate oxaloacetate transaminase

LAP = Leucine aminopeptidase

ME = Malic enzyme

PGI = Phosphoglucose isomerase

PGM = Phosphoglucose mutase

A = Media del número de alelos por locus

A_e = Número efectivo de alelos por locus

He o H = Heterocigosis esperada

P = Porcentaje de loci polimórficos

n = Número de muestra

p = Probabilidad al 0.05 %

SD = Desviación estándar

df = Grados de libertad

x = Media

χ² = Prueba de Ji cuadrada

F = Índice de fijación

F_{is} = Proporción de heterócigos dentro de cada subpoblación

F_{it} = Proporción de heterócigos en la población completa

F_{st} = Proporción de heterócigos entre subpoblaciones

N_m = Tasa de migración

N_b = Tamaño efectivo de la población

M = Flujo génico

D = Distancia genética

Hdy-Wbg = equilibrio de Hardy-Weinberg

CITES (siglas en Ingles: Convención sobre el tráfico internacional en especies amenazadas de flora y fauna)

UAAAN (Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro).

ind (s) = individuo (s)

pob (s) = población (es).

reprod (s) = reproductor (es).

APENDICE IV

AGRADECIMIENTOS (Familiares)

Dedicada a mis padres con amor y respeto (Lauro G. Martínez Mijangos y Ma. del Carmen Palacios Lara) por su apoyo y comprensión para continuar con mis estudios.

A mis hermanos Carlos Antonio, José Luis, Lauro, Olivio, Carina y Mercedes con respeto y cariño.

A familiares y amigos.

AGRADECIMIENTOS (Al Jurado y diversas Instituciones):

A los miembros de mi jurado por sus valiosos comentarios y sugerencias en el manuscrito de la tesis: Dr. Víctor Chávez A., Dr. Robert Bye B., Dr. Luis Eguiarte F., Dra. Valeria Souza, Dr. Glenn Furnier, Dra. Teresa Terrazas, Dr. Fabián Vargas. Al Dr. Luis E. Eguiarte por sus sugerencias en la estadística y sus comentarios en la estructuración y el enfoque de biología de la conservación de los diferentes capítulos que integran la tesis, así como por su asesoría y continuo apoyo en el área de ecología y genética de poblaciones.

Al Jardín Botánico del Instituto de Biología y al Instituto de Ecología por permitirme hacer uso de las Instalaciones para realizar la investigación. A mis directores de tesis Dr. Víctor M. Chávez Avila y Dr. Robert Bye B. por su asesoría y dirección continua.

A las Instituciones financieras:

Comisión Nacional de Biodiversidad (CONABIO) Proyecto B147 por el apoyo financiero el cual fue el más importante, y fue de fundamental importancia para el estudio y colecta de material en campo y el trabajo de laboratorio.

Al PADEP-UNAM (Proyecto 003327) por el apoyo económico en la compra de reactivos para el laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales y la participación en un Congreso Internacional.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de Doctorado asignada para realizar mis estudios.

También al Papiit-DGAPA proyecto IN-205894 titulado: Biología evolutiva de las familias Agavaceae y Burseraceae en México: biología reproductiva, estructura genética y filogenia. Dirigido por el Dr. Luis Eguiarte Fruns fue posible la adquisición de reactivos para los análisis electroforéticos de isoenzimas.

AGRADECIMIENTOS (Investigadores, amigos y colaboradores):

Al Dr. Ken Oyama por sus apoyos y recomendaciones en el trámite de la beca y otros apoyos económicos. Al Dr. Daniel Piñero por facilitarme las instalaciones del lab. Genética y Evolución para realizar la primera parte de los análisis de electroforesis.

En la introducción, entrenamiento y apoyo en el trabajo del laboratorio Genética y Evolución en las técnicas de electroforesis a Fabián Vargas, Patricia Delgado y un agradecimiento especial a Nidia Pérez Nasser por su apoyo incondicional y siempre presente en la interpretación logística de las técnicas de isoenzimas. A Patricia Delgado, Pilar Ortega y Martín Mata R. por su apoyo en las maratónicas corridas de electroforesis. América Castañeda y Liz Izquierdo por su asistencia en el programa BIOSYS.

En histología (Lab. Anatomía del J. Botánico) a la amiga Esthela Sandoval Zapotitla por sus comentarios y a la Biól. Concepción Guzmán por su participación en el desarrollo y montaje de los cortes histológicos de las estructuras morfogenéticas obtenidas *in vitro*. Al Biól. Alejandro Vallejo por su enorme apoyo en los programas de cómputo.

Al M. en C. Abisaí García y M. en C. Salvador Arias por sus comentarios relacionados con la biología de la especie y diversos aspectos de zonas áridas.

Al M. en C. Francisco González Medrano, M. en C. Verónica Juárez J., Dr. Rosaura Grether y M. en C. Eduardo Blanco por su colaboración en la identificación de plantas colectadas en los ambientes de *A. victoriae-reginae*, reportadas en proyecto entregado a la CONABIO.

En el trabajo de campo: colecta de hojas, etiquetas, establecimiento de cuadrantes y evaluaciones en general a Mario Monroy de la Rosa, Martín Mata Rosas, Víctor Chávez Avila y Eduardo Blanco C.

Al Dr. Luis Eguiarte y Dra. Valeria Sousa por sus continuas asesorías y por facilitar las instalaciones del laboratorio de Genética y Evolución Molecular y Experimental para desarrollar la etapa final de los análisis de isoenzimas y la conservación del material de campo. A todos mis compañeros del mismo laboratorio por sus comentarios y participación de alguna u otra forma en el desarrollo de esta investigación en genética y ecología: Jordan Golubov, Aldo Valera, Valérie Bouchet, Claudia Silva, Martha Rocha, Erika Aguirre, Lalo Morales, Antonio Cruz, René Cerritos, Ma. del Carmen Mandujano, Arturo Silva y Erika Márquez.

A los compañeros del lab. de Cultivo de Tejidos Vegetales: Martín Mata, Mario Monroy, Patricia Olguín, Ana Laura López, Bárbara Estrada, Mabel Hernández por su apoyo, comentarios y consideraciones.

A Raúl Cuevas por todo su apoyo en los análisis estadísticos, a Iliana Ramírez K. por sus comentarios. Al Ing. Juan José López y al M. en C. Andrés Rodríguez Gámez profesores investigadores de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) Unidad Saltillo, por facilitar información de campo y el material (semillas) proporcionado. A la Biol. Sonia Franco (SEMARNAP) por sus comentarios en el comercio de plantas de la especie estudiada.