

**Informe final\* del Proyecto B147**  
**Evaluación genética y demográfica de *Agave victoriae-reginae* T. Moore y aplicación del cultivo de tejidos para su conservación**

**Responsable:** Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila  
**Institución:** Universidad Nacional Autónoma de México  
Instituto de Biología  
Jardín Botánico  
**Dirección:** Av. Universidad # 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, DF, 04510, México  
**Correo electrónico:** [victorm@ibiologia.unam](mailto:victorm@ibiologia.unam)  
**Teléfono/Fax:** Tel: 562-29048, Fax: 562-29046  
**Fecha de inicio:** Enero 6, 1995  
**Fecha de término:** Octubre 31, 1996  
**Principales resultados:** Base de datos, Informe final  
**Forma de citar\*\* el informe final y otros resultados:** Chávez Ávila, V. M. y V. M. Chávez A. 1998. Evaluación genética y demográfica de *Agave victoriae-reginae* T. Moore y aplicación del cultivo de tejidos para su conservación. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. B147.** México D. F.

**Resumen:**

*Agave victoriae-reginae* T Moore es endémica del desierto chihuahuense (25-27° Norte, 100-104° Oeste), con una distribución discontinua, generalmente se establece en paredes de carbonato de calcio. La especie tiene una alta demanda ornamental en varios países y está amenazada por colectas para un comercio ilegal y la destrucción del hábitat por extracción de material del subsuelo. Esta considerada en peligro de extinción por las autoridades mexicanas y CITES.

El objeto general de esta investigación fue realizar un estudio sobre la ecología y genética de poblaciones, cultivo de tejidos, conservación y fisiología de semillas y conocer el potencial reproductivo para proponer, al conjuntar estas disciplinas, una alternativa integral para la conservación in situ y ex situ de 10 poblaciones estudiadas de esta especie.

Se usaron isoenzimas para analizar la estructura genética de diez poblaciones de *A. victoriae-reginae*. Se determinó la densidad, la estructura de tamaños (individuos) y la extensión de cada población. Se generó un método para la micropropagación vía organogénesis-embriogénesis somática. Se analizó el potencial reproductivo y se inició la conservación de semillas.

Las especies presentan altos niveles de variación y diferenciación entre poblaciones. Los niveles de diferenciación. El tejido de cultivos y la conservación de semillas se presentan como alternativas viables para su conservación.

Estos resultados muestran la urgencia de conservar cada una de las poblaciones. Estudios del tamaño mínimo de una población recomiendan conservar un número no menor a 5,000 individuos.

- 
- \* El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)
  - \*\* El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

**Evaluación Genética y Demográfica de *Agave*  
*victoriae-reginae* T. Moore y Aplicación del Cultivo  
de Tejidos para su Conservación**

**Proyecto CONABIO  
Número de Referencia B147**

**Arca de Conocimiento: Ecológico y Genético**

**Responsables: Alejandro Martínez Palacios y Víctor M. Chávez A.**

**Jardín Botánico, IB-UNAM**

**Tel. 622-9048, Fax: 622-9046**

**REPORTE FINAL**

**I° de julio de 1996**

**EVALUACIÓN GENÉTICA Y DEMOGRÁFICA DE *Agave victoriae reginae* T. MOORE Y APLICACIÓN DEL CULTIVO DE TEJIDOS PARA SU CONSERVACIÓN**

**Proyecto CONABIO**

**Número de Referencia B147**

**Arca de Conocimiento: Ecológico y Genético**

**Responsables: Alejandro Martínez-Palacios\* y Víctor M. Chávez Apila\***

**Co-responsables: Luis E. Eguiarte F.\*\* y Robert A. Bye B.\***

**Jardín Botánico, Inst. Biol.\* y Centro de Ecología,\*\* UNAM.**

**\*Tel. 622-9048, Fax: 622-9046**

**REPORTE FINAL**

**julio de 1996**

**ANTECEDENTES.**

*Agave victoriae-reginae* T. Moore (Agavaceae) es una especie endémica de México, en peligro de extinción, con una distribución limitada a zonas de los estados de Coahuila, Durango y Nuevo León, entre los 100° y 104° longitud oeste y 25° y 27° latitud norte, sólo se encuentra en localidades muy específicas pues crece en afloramientos de carbonato de calcio sobre paredes verticales (Gentry, 1982). El factor principal que ha alterado las poblaciones silvestres de *A. victoriae-reginae* es la colecta de plantas con fines ornamentales que alcanzan altos valores en el mercado internacional. Por su endemismo y su crítica situación ha sido catalogada en peligro de extinción por las autoridades del país (SEDESOL, 1994). El CITES inscribe a esta especie entre uno de los agaves más amenazados, incluido en el Apéndice II (Villa-Lobos, 1988), donde se agrupan a todas las especies susceptibles a ser amenazadas de extinción como consecuencia de un comercio

ilegal muy intenso, en el cual se prohíbe la comercialización de plantas silvestres (C.I.T.E.S., 1987). Revisiones bibliográficas muestran que existen pocas investigaciones en relación a *A. victoriaereginae* y no existen estudios sobre su genética y ecología que determinen el estado de alteración de las poblaciones silvestres. Los reportes que sitúan a la especie en cierto peligro de extinción, citan una distribución geográfica restringida, decomisos y registros de colecta que se han hecho hasta la década pasada, enlistando gran cantidad de plantas silvestres mexicanas, exportadas por la frontera norte, entre las cuales se encuentran agaves como *A. victoriae-reginae* y de igual forma se hace con otras especies endémicas mexicanas de las familias Cactaceae, Cycadaceae, Orchidaceae, Euphorbiaceae, etc. que tienen una elevada demanda en el mercado internacional (Martínez-Palacios, 1991). La reducción y fragmentación de la población de una especie causa pérdidas de la variabilidad genética, con la consecuente disminución de la adaptabilidad a los cambios y por lo tanto de su potencialidad para sobrevivir al efecto de las alteraciones del ambiente (Vázquez-Yanes y Orozco, 1989).

La conservación efectiva de germoplasma requiere de la interacción del conocimiento acumulado de varias tecnologías combinadas en estrategias integradas (Falk, 1992 citado por Fay, 1994). Todas las estrategias pueden ser válidas y deben ser exploradas, siempre que estas acciones no pongan en peligro a la propia naturaleza o a la especie (Vázquez-Yanes y Orozco, 1989). En las últimas décadas se han empleado métodos de análisis genéticos y de demografía, los cuales han permitido conocer el estado en que se encuentran las poblaciones vegetales amenazadas. Análisis electroforeticos pueden ayudar a determinar los niveles de variación que se presentan dentro de una especie (Eguiarte y Piñero, 1990), y los estudios demográficos hacen posible conocer la dinámica de la población. Esta información puede ayudar a dirigir programas para la conservación *in situ* y *ex situ* y el futuro aprovechamiento de especies amenazadas (Eguiarte, 1990).

Cada vez es más evidente que aún cuando un hábitat esté protegido, las poblaciones pueden desaparecer debido a su fragmentación o a otros factores que han alterado a tal grado la dinámica del ecosistema que el hábitat ha dejado de ser apropiado para un taxón dado. En tal situación puede ser esencial llevar a cabo repetidas re-introducciones de genotipos conocidos hasta que las condiciones ecológicas adecuadas para su supervivencia sean entendidas y manipuladas. En este caso resulta importante contar con un banco de semillas y más aún si ha sido posible diferenciar los genotipos almacenados (Eguiarte y Piñero, 1990, Vázquez-Yanes, 1990). Asimismo la micropropagación por

cultivo de tejidos puede ofrecer mayores ventajas sobre las técnicas convencionales. En la última década las técnicas *in vitro* se han utilizado para el rescate de especies en peligro de extinción por la posibilidad de lograr una rápida multiplicación de individuos libres de patógenos. Un gran número de regenerantes puede producirse a partir de pequeñas cantidades de material inicial, en algunos casos, tan pequeña como una yema o una semilla y llegar a clonar individuos y/o inducir variaciones genéticas bajo condiciones controladas (Wochok, 1981; Beversdorf, 1990; Fay, 1994). Sin embargo, se sabe que el tipo de respuesta morfogenética *in vitro* puede ser factor de variación genética (Hu y Wang, 1983, Ammirato, 1989).

Este panorama lleva a considerar una estrategia integral en que estudios interdisciplinarios de demografía, genética de poblaciones y de cultivos de tejidos permitirían iniciar colecciones *ex situ* como un primer paso para explorar la recuperación de especies o de determinados genotipos (Fay, 1994; Mistretta, 1994). Especies raras y amenazadas de orquídeas han sido propagadas por cultivo de tejidos (Fay, 1994), pero sólo algunas de ellas han sido reintroducidas a su hábitat y **sin** conocer si ha habido variación genética original, como por *ejemplo* *Bletia urbana*, *Lycaste skinneri*, *L. aromatica*, *Oncidium stramineum* de las que aún después **de** 6 años permanecen en condiciones silvestres (Martínez-Palacios, 1991; Rubluo et al., 1989; 1993). Mistretta (1994) mediante estudios electroforéticos de enzimas identificó los 7 únicos genotipos de la especie en peligro de extinción *Cercocarpus traskiae*, dos de éstos aparentemente híbridos. Este análisis permitió identificar el genotipo "puro" y propagarlo vegetativamente y reintroducirlo a la población *in situ*. Procedimientos similares se han usado con *Mahonia nevinii*, *Claytonia lanceolata* var, *piersonii*, *Fritillaria eastwoodii*. Si bien ninguno de estos estudios se considera lo suficientemente profundo, el manejo y decisiones tomadas se basaron en un diseño experimental para sus programas de reintroducción (Mistretta, 1994).

## **OBJETIVOS**

**Objetivo general:** Conocer el nivel de diferenciación genética, densidad y éxito reproductivo de todas las poblaciones conocidas de *A. victoriae-reginae* especie mexicana endémica en peligro de extinción y evaluar la utilización de las técnicas de cultivo de tejidos, para proponer vías para la conservación *in situ* y *ex situ*, en particular de los genotipos menos abundantes.

### **Objetivos particulares:**

1. Describir la estructura genética poblacional de *Agave victoriae-reginae* T. Moore.
2. Examinar la densidad, tamaños y éxito reproductivo de los individuos en las poblaciones.
3. Establecer un banco de semillas de la especie, para estudios de conservación.
4. Aplicar las técnicas de cultivo *de tejidos* para analizar la variación o estabilidad genética de las plántulas regeneradas vía organogénesis y/o embriogénesis somática.
5. Generar un sistema modelo de estudio genético, ecológico y micropropagación para el rescate y conservación en otras especies mexicanas en peligro de extinción.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **Evaluación genética de las poblaciones.**

1) Colecta de hojas. Se realizaron dos salidas de campo (febrero y septiembre de 1995), se visitaron 10 poblaciones silvestres de *Agave victoriae-reginae* T. Moore (BD, Fig. 1), cuatro de las cuales ya habían sido citadas por Gentry (1982). Para determinar la frecuencia alélica, estadísticamente representativa, se colectó una hoja por planta de un promedio de 40 individuos por población (Weir, 1990), de individuos con un diámetro superior de 15 cm (BD), la hoja correspondía a la parte media de la planta (entre la zona central o punta en crecimiento y las hojas de la base de la planta). Al final de cada colecta por día, de cada hoja se cortaba un fragmento de 2 x 2 cm, perteneciente a la base de la hoja, se etiquetaba y se almacenaba en un tanque criogénico (-196 °C), del cual se retiró al llegar al laboratorio, donde se conservaron las muestras en un ultracongelador (REVCO) a temperatura constante de -80°C.

2) Análisis de isoenzimas. Se realizó un análisis de isoenzimas de los fragmentos de hoja almacenados a baja temperatura (-80 °C). Con este material se determinaron los patrones de variación genética dentro y entre las poblaciones de *Agave victoriae-reginae* T. Moore.

El estudio de isoenzimas se basó en la metodología para ensayos electroforéticos horizontales en geles de almidón (Selander et al., 1986, modificado por Eguiarte 1990). Se siguieron los siguientes pasos.

1. Los fragmentos de hojas se extrajeron del REVCO 10 minutos antes de continuar el proceso.

2. La extracción de proteínas se obtuvo mediante el macerado *de las muestras con un buffer* específico (apéndice 1) y absorción en wicks.
3. Se almacenaron a largo plazo los extractos de tejido absorbidos en papel filtro y guardados en tubos eppendorf en ultracongelador (REVCO) a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
4. En el gel preparado en el laboratorio (sistema No. 8 (LiOH) Soltis et al., 1983) se montaron las muestras y se desarrolló la electroforesis. Corrimiento del gel bajo un amperaje constante (60 miliamperes) y una combinación adecuada de buffer de charola y gel (pH 8 y 7.6 respectivamente).
5. Cada enzima se tiñó con base en protocolos específicos para cada una.
6. Se hizo la lectura de los patrones de bandeo en los geles en fresco, por ser la resolución óptima para algunas enzimas,
7. Los geles se fijaron en alcohol al 50%.
8. Se realizó una segunda lectura de los patrones de bandeo con geles fijados.
9. Se analizaron 10 loci de un total de 7 enzimas por población (anexo 1).

#### **Análisis estadístico de datos de la genética de poblaciones.**

El análisis genético fue realizado usando la computadora con aplicación del BIOSYS-I (Swofford y Selander, 1981). Los cálculos realizados, corresponden a las medidas siguientes: (1) proporción de loci polimórficos (P, con criterio de 99%); (2) la heterocigosis observada y la esperada ( $H_o$  y  $H_s$ ); (3) la *media* efectiva de número de alelas por locus (A); (4) identidad genética ( $I$ ) de Nei (1972), incluyendo la construcción de un dendrograma poblacional, usando un UPGMAM (unweighted pair group method with arithmetic mean). Los valores de F -estadística ( $F_{is}$  y  $F_{st}$ ) (Wright, 1978), los valores fueron analizados para diferenciarlos de cero, utilizando una Chi-cuadrada con el método de Workman y Niswander (1970).

Las aloenzimas analizadas son del tipo anodal, total de 7 enzimas que representan a 10 locus (anexo 1) de 10 poblaciones (Fig. 1; BD: Id Estación). Se consideró locus 1 el que su migración fue mayor, este mismo criterio se utilizó para la lectura de los alelas. La diferenciación entre poblaciones fue investigada usando la F estadística de Wright (1978) y el programa estadístico de diversidad genética según Nei (1973). La F estadística esta relacionada con  $F_{it}$  como el total de desviación de la frecuencia esperada por abajo del equilibrio de Hardy-Weinberg,  $F_{st}$  es la medida de la diferenciación genética entre subpoblaciones, el valor es positivo y se calcula como:  $F_{st} = H_t - H_s/H_t$ .  $F_{is}$  y  $F_{it}$  son

medidas de la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg dentro de las subpoblaciones y en la población total respectivamente. Fis y Fit se obtienen como:  $F_{is} = H_s - H_o / H_s$  y  $F_{it} = H_t - H_o / H_t$ , donde.  $H_o$ = heterocigosis promedio observada sobre todos los loci a nivel subpoblación,  $H_s$ = heterocigosis promedio esperada sobre todos los loci a nivel subpoblación, y  $H_t$ = heterocigosis promedio esperada sobre todos los loci a nivel de toda la población (Hedrick, 1983).

Los estadísticos F de Wright pueden sugerir los posibles procesos evolutivos que están causando la diferenciación genética de las poblaciones. Para observar si las F, Fis y Fit fueron estadísticamente diferentes de cero, se evaluaron bajo un análisis de Chi-cuadrada, donde ésta es igual a  $\chi^2 = 17^2 N (k-1)$ . Para los grados de libertad se calculan de la manera siguiente:  $k(k-1)/2$ . N es el tamaño de la muestra y k es el número de alelos (Eguiarte, 1990). Para el caso de las F totales o F promedio de los 10 loci por población, los valores se calcularon de acuerdo a la formula  $\chi^2 = F^2 N$ , con un grado de libertad.

Para la Fst se evaluó su significancia a partir de la  $\chi^2 = 2N F_{st} (k-1)$ ,  $(k-1)(s-1)$  son los grados de libertad; N es el tamaño de la muestra, k el número de alelos y el número de subpoblaciones (Workman y Niswander, 1970).

Se obtuvo una matriz de distancia e identidad genética, La identidad genética I de Nei se obtiene de la forma siguiente (Hedrick, 1983, Nei, 1987):

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

donde  $J_{xy} = \sum p_i^2(x) p_i(y)$ , que es la probabilidad de escoger un par de alelas idénticos entre dos poblaciones x y y (Eguiarte, 1990)

$J_x = \sum p_i^2(x)$ , y  $J_y = \sum p_i^2(y)$ , son las probabilidades de escoger un par de alelos idénticos dentro de cada población (Hartl y Clark, 1989; Eguiarte, 1990).

La distancia genética D, se obtuvo de la manera siguiente (Hedrick, 1983; Nei, 1987):  $D = -\ln(I)$ ; La distancia D tiene valores de cero cuando las frecuencias alélicas de las poblaciones son idénticas y de infinito cuando las poblaciones no comparten alelos. La I toma valores de cero si dos poblaciones no comparten alelos y de 1 si tienen frecuencias alélicas idénticas (Hedrick, 1983).

Se realizó 1 árbol de distribución o filogenético para ver la relación que existe entre las 10 poblaciones estudiadas. El fenograma se construyó con datos de distancias genéticas entre poblaciones, por el método de UPGMAM (Wright, 1978).

Censo en 7 Poblaciones silvestres.

Censo. Durante el recorrido se establecieron 20 cuadrantes, cada uno de 30 x 4 m (120m<sup>2</sup>), en 7 poblaciones. Se analizaron 2 tipos de ambientes; el ambiente tipo o sobre Pared de roca de carbonato de calcio, donde se distribuye más del 95% de los individuos, en el cual se realizaron 8 cuadrantes; y el ambiente atipo. que por lo erosionado y la horizontalidad del terreno se le denominó Suelo, por lo general se establecen en el aluvión junto a la pared, en la parte superior de la sierra o en la vega del río, pero siempre cerca de las paredes que presentan plantas de *A. victoriae-reginae*, con excepción de la población No. 3 que se distribuye en lomeríos, en este sitio la pared más cercana y con posibilidad de existencia de plantas de la especie en estudio, está a 20 Km de distancia. En el ambiente de Suelo se establecieron 12 cuadrantes. De cada cuadrante, se contaron los individuos y se les midió el diámetro mayor, se cuantificó la presencia de reproductores (Tabla 5). En la población número 1, con la prolongación de las lluvias de verano (presencia de un ciclón en el Golfo de México) se observó la presencia de plántulas originadas de la germinación de semillas en el campo.

Se analizaron las diferencias de respuesta entre Genets (planta originada de semilla) para ambos ambientes (Suelo y Pared) y entre Ramets (planta generada vegetativamente de la planta Genet) para los dos ambientes Bajo un análisis estadístico de muestra no paramétrica, con la U de *Test de Mann-Whitney* y *Test de Kolmogorov-Smirnov*, utilizando la computadora con el paquete de *Statistical*,

### **Potencia; reproductivo de *Agave victoriae-reginae* T. Moore.**

De las plantas en estado de fructificación y que presentaban frutos cerrados, en el laboratorio se evaluó el número de semillas por fruto y el porcentaje de germinación, en el campo se anotó el diámetro de la planta, el tamaño de la fructificación y el número de frutos por fructificación. En los cuadrantes se cuantificaron los reproductores por área. Se observó la presencia de plántulas generadas de la germinación de semillas. Se evaluó el reclutamiento de plantas vía asexual (rizoma y brote) o también denominados Ramet, diferenciándolos de los originados de semillas (sexual) denominados Genet, esto se hizo para cada cuadrante en los dos tipos de ambiente

### **Banco de Semillas de *A. victoriae-reginae*.**

Durante el recorrido de las dos salidas al campo, se hicieron colectas de semillas de frutos recién generados del año en curso, y de años anteriores se colectaron las pocas semillas que aun se encontraban atrapadas en los frutos dehiscentes, en el mejor de los casos hasta completar en promedio 500 semillas. Para el caso de las fructificaciones recientes (aproximadamente 1 mes de maduración), se colectó un promedio de 10 frutos por planta. Los sobres con semillas separadas de impurezas, se etiquetaron con la ubicación exacta, fecha de colecta y si se había generado durante el año de la colecta o en años anteriores. Se evaluó el porcentaje de germinación con la siembra de 50 semillas por planta, sembradas en charolas bajo condiciones de invernadero. Los sobres con semillas se deshidrataron en un desecador con cloruro de calcio anhidro por aproximadamente 2 meses para reducir la presencia de humedad, transcurrido el tiempo se guardaron dentro de frascos color ámbar, de boca ancha, con desecador en el fondo y se sellaron herméticamente, y se almacenaron en un refrigerador a temperatura de 8 a 12°C.

### **Aplicación de las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales.**

Con hojas y tallos de plántulas generadas de la germinación *in vitro* de semillas, se exploró la obtención de plantas generadas por diferentes vías morfogénicas directas e indirectas (organogénesis y/o embriogénesis somática), con la finalidad de obtener regenerantes, los cuales por medio de un análisis de electroforesis en geles de almidón, se procederá a evaluar los niveles de variación o estabilidad genética de los regenerantes.

Procedimientos para establecer la asepsia de las semillas: se desinfectaron en etanol 70% durante un minuto, posteriormente en blanqueador de uso doméstico (marca cloralex) 30% (v/v), en agitación durante 20 minutos. Bajo condiciones asépticas se retiró la solución desinfectante y se enjuagaron la semillas dos veces con agua destilada esterilizada. Las semillas se sembraron en frascos con medio MS (Murashige y Skoog, 1962). Las condiciones de incubación fueron de 27 + 3°C, fotoperíodo de 16h luz (1500 lux).

Para generar diferentes vías de respuesta morfogénica y evaluar la estabilidad o variación genética al utilizar las técnicas de cultivo de tejidos, se siguieron los siguientes pasos:

Paso 1. Se obtuvieron plántulas *in vitro*, generadas de la germinación de semillas en medio de cultivo MS.

Paso 2. De las plántulas del paso 1, se utilizaron fragmentos de hojas y se cultivaron en medio MS con 20 diferentes combinaciones de dos reguladores del crecimiento, Bencilaminopurina (BA) a 0, 0.5, 1 y 2 mg/l y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) a 0, 0.1, 0.5, 1 y 2 mg/l,

Paso 3. Los tallos de las plántulas (paso 1) a las que se les disectaron las hojas, se subcultivaron en medio MS con 0, 0.5 y 1 mg/l de BA, para intentar regenerar directamente plántulas.

Paso 4. El callo que se generó en el paso 2, se subcultivó en medio MS con BA a 0, 0.5, 1 y 2 mg/l en combinación con ácido naftalenacético (ANA) a 0, 0.1 y 0.5 mg/l para la regeneración de plántulas.

Paso 5. Las plántulas obtenidas por morfogénesis directa en los pasos 2 y 3 se subcultivaron en medio MS para su desarrollo.

Los resultados se evaluaron a los 3-4 meses de iniciados los cultivos. Cada cultivo o cada frasco se registró de qué semilla o plántula se tomó el explante, de tal manera que se tenía el origen de cada explante. Lo anterior de suma importancia para el análisis de isoenzimas para evaluar la presencia o ausencia de variaciones en las diferentes respuestas morfogénicas. Para lo anterior, cuando fue factible se analizaron: a) plántulas obtenidas directamente del desarrollo de la base, en medio MS sin BA (paso 3); b) plántulas obtenidas vía callo (paso 4); c) plántulas generadas bajo morfogénesis directa (paso 3) en la cual se utilizó BA para formar más de una plántula por base. Con el análisis de isoenzimas se evaluará la presencia o ausencia de variación genética de las diferentes vías morfogénicas. Se compararan las plántulas obtenidas directamente de bases de plántulas con plántulas en medio MS sin regulador del crecimiento.

Para interpretar el tipo de respuesta morfogénica fue *necesario* auxiliarse de las técnicas de histología, para tal efecto se fijaron las estructuras a analizar en solución de Kraft III durante 5-10 días o Navashin's durante 24 h, posteriormente se lavaron y deshidrataron en alcohol y se incluyeron en parafina (Johansen, 1940).

Se analizaron cortes longitudinales de cada estructura morfogénica, cortes de 8-10 micras de grosor.

#### **Flora asociada a la distribución de *A. victoriae-reginae***

Se colectaron plantas con estructuras reproductivas para su determinación, se almacenaron y transportaron de la misma forma que las colecciones para herbario, se apoyó su determinación con la

ayuda de especialistas en los diferentes grupos taxonómicos. La descripción de la mayoría de las plantas fue hecha por el M- en C. Francisco González Medrano, Dpto- de Botánica, IB-UNAM, se contó con el apoyo adicional de la M, en C. Verónica Juárez Jaimes del mismo departamento, apoyó con el grupo de las Asclepias. El grupo de Mimosas fue revisado por la Dra. Rosaura Grether, Dpto. Botánica UAM-Iztapalapa. El M- en C. Eduardo Blanco Dpto. Botánica, UAAAN, Unidad Torreón, apoyó con algunos pastos y otras plantas. Las especies como *Agave lechuguilla*, *Opuntia rastrera*, *O. microdasys*, *Euphorbia antisiphillytica* (candelilla) etc. que no existe ningún problema en su determinación en campo, no fue necesario realizar colectas (Tabla 8). Es necesario aclarar que de ninguna manera este listado representa toda la flora de la región. El tipo de vegetación predominante en todas las poblaciones es Matorral Rosetófilo, representada por la planta de estudio en el caso de pared y por *A. lechuguilla* en los suelos o terrenos planos .

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Tamaño físico de las poblaciones.

Población No. 1. (Cañón Huasteco, N.L.-Coah.). A lo largo de 35 Km del cañón Huasteco, se observó la distribución de *A. victoriae-reginae*, además se recorrieron cañones secundarios como el de San Pablo del cual se logró recorrer aproximadamente 12 Km., y del Cañón la Escalera, se recorrieron cerca de 6 Km, en ambos casos se observó una distribución continua de la planta en estudio. Estos cañones forman parte de la Sierra San José de los Nuncios que se prolonga por 25-3a Km rumbo a Saltillo, Sierra ubicada a un costado de la carretera Monterrey-Saltillo, sobre la cual se estiman unos 20 Km más de distribución de *A. victoriae-reginae*, establecidas en su parte alta, en los afloramientos de carbonato de calcio. Por tales dimensiones esta población es considerada la más grande. Los datos presentados en la tabla 6, son en cierta forma conservadores, debido a que se tomó una distribución en pared de 10 m de altura por 32 Km de longitud de la pared por dos paredes que forman el cañón.

Población No. 2. (Mina, N.L.). Ubicada en el extremo E, Km 38 en la carretera MonterreyMonclova, junto al poblado de Mina. Es una pequeña Sierra de aproximadamente 4 Km de largo, con afloramiento de roca de carbonato de calcio a lo largo de ésta, lo que permite el establecimiento de la

planta en estudio. Se recorrió toda la Sierra (4 Km de longitud) e igual que en todos los casos se tomó 10 m de distribución continua en toda la pared en ambas caras de la Sierra.

**Población No. 3 (Loma Landeros-Loma Alta, Coah.).** Al E y NE de la ciudad de Saltillo, forma parte del valle con suelo accidentado. Es para este estudio la localidad con distribución de plantas de *A. victoriae-reginae* sobre lomeríos con suelo muy erosionado, constituido por fragmentos de rocas de carbonato de calcio y rocas de canto rodado, vegetación rosetófila constituida principalmente de *Agave lechuguilla*. Se localizaron 5 estaciones de pocos individuos cada una, la mayor de ellas presenta una superficie aproximada de 1,200m<sup>2</sup>, según los comentarios de algunos pastores de la región y conocedores de estas plantas, existen algunas otras localidades cerca de las visitadas y de iguales dimensiones, aunque se exploró, no fue posible localizarlas. En las Sierras aledañas tampoco fue posible localizar plantas en paredes.

**Población No. 4 (Sierra Parras, Coah.).** En la cara orientada hacia el 5 de la Sierra de Parras, se localizó un pequeño Cañón donde se distribuye el agave en estudio, se nos informó que a lo largo de la sierra existen 2-3 localidades como la visitada. El tamaño de esta población es de aproximadamente 500 m., en sólo una cara del cañón con orientación hacia el NE. Esta población presenta una separación física de más de 40 Km con la población No. 5 (Sierra el Mármol), dividida por una gran planicie denominada Bajío Los Llanos.

**Población No. 5 (Ahuichila, Coah.-Zac.). Localizada al S** de Viesca, Coah. rumbo al poblado de Ahuichila, existe la Sierra el Mármol con aproximadamente 5 Km de afloramiento de paredes de carbonato de calcio donde se localizó la planta en estudio, es la población más al S, ubicada entre los límites de los estados de Coah., Dgo y Zac.

**Población No. 6 (Sierra de las Noas, Coah.).** Crece a lo largo de 1.5 Km, sobre afloramiento de paredes de roca de carbonato de calcio en un pequeño cañón. La población más cercana es la No 7 y existe una distancia entre ambas de un poco más de 5 Km

**Población No. 7 (Sierra el Mulato-Cañón de Fndez., Dgo.).** Es la segunda población más grande, la presencia de plantas del agave en estudio se ubica a lo largo de 16 Km, sobre paredes de carbonato de calcio. Es la población más al W de las que aquí se reportan, ubicada en el estado de Dgo. Al igual que las otras poblaciones, se obtuvo un tamaño aproximado de la distribución de las plantas; ej. 16 Km por 2 paredes, por 10 m de distribución (Tabla 6).

**Población No. 8 (S. las Delicias, Coah.).** Crece en paredes de carbonato de calcio, que aflora a lo largo de 4 Km de la Sierra con el nombre Delicias. El tamaño se calculó con los 4 Km de longitud, por los 2 paredes por los 10 metros de distribución (Tabla 6).

**Población No. 9 (Sierra la Fragua, Coah.).** Crece en un pequeño cañón, aproximadamente 200 m de longitud al igual que en los casos anteriores, crece sobre paredes con afloramientos de carbonato de calcio. La distribución se presenta en ambas caras del cañón, por 200 m de longitud por 10 metros de altura (Tabla 6).

**Población No. 10 (Sierra el Granizo, Coah.).** Crecen en un pequeño cañón, en el cual aflora 1 Km de paredes de carbonato de calcio, las paredes de baja altura (10 m de altura). Es la ubicación más al N hasta el momento reportada para esta investigación.

**Otras localidades, Coah.** Por varias fuentes se nos informó la presencia de plantas en una pequeña localidad de la Sierra de la Paila, ya no nos fue posible visitarla por la colecta de muestras. Otro guía, nos indicó que existe una pequeña distribución al S de la Sierra Los Alamos a la altura del Estanque del León. Es posible que la distribución de plantas pueda llegar hasta la Sierra San Julian, Zac, aunque es muy probable que sean distribuciones con poca representatividad. Dentro del triángulo que forman la población No 1 al E, la No. 7 al W y la No. 10 al N, es posible encontrar localidades pequeñas en pequeños cañones de las diferentes Sierras, la característica necesaria es que en ellos se presenten paredes de carbonato de calcio con las características de las visitadas. Gentry (1982), reportó sus zonas de colecta, dos en la población uno, una en la población tres, una en la población cinco y una en la población 7. Las localidades no visitadas y que se sugiere la existencia de pequeñas colonias de *A. victoriae-reginae*, fueron propuestas por los guías que nos llevaron a algunas localidades aquí citadas.

#### **Análisis genético de las 10 poblaciones muestreadas de *A. victoriae-reginae*.**

**Variación genética.** Se estableció la estructura genética de 10 poblaciones (aproximadamente 400 muestras) de *Agave victoriae-reginae* utilizando la lectura de 10 loci de un total de 7 enzimas (**LAP, GOT, DIA, EST, AcPh, PGI, y ME**) (anexo 1), se usó **un** solo sistema, el No. 8 LiOH (Soltis et al., 1983), para el caso de individuos en que no existió la definición del loci en los geles de almidón, se les dio un valor de cera.

De los diez loci analizados, se obtuvo un 83% de loci polimórficos y una media de 2.18 de alelos por locus para las 10 poblaciones (Tabla 1).

El mayor número de alelas por locus se registró en la población No. 9 (2.4). El mayor índice de polimorfismo al 95% (0.100) se presentó en la Población No. 3. La mayor heterocigosis promedio observada (0.457) y esperada (0.435) se dio en la Población No.6 (Tabla 1). El caso contrario, fue la población No. 10 que presentó los valores más bajos en el número *de alelos por locus* (1.8), en el índice de polimorfismo (0.060), y en la heterocigosis promedio observada (0.187) y esperada (0.209) (Tabla 1). La  $H_s$  nivel de especie o de las 10 poblaciones analizadas fue de 0.335, la cual resultó superior a los citados en otras especies de angiospermas, con valores promedios de los polinizados por animales (0.167), al medio-sucesional (0.141), los de distribución regional (0.148) y por los reportados para especies tropicales, los cuales tienen niveles de 0.202 (Hamrick y Goth, 1990).

**Frecuencias alélicas.** En la Tabla 2, se observa el número de alelos en los loci polimórficos. Fue de 3 en LAP-1, GCT-1, EST-1, PGI-2, PGI-3 y ME-1, y de 2 en DIA-1, DIA-2, AcP-2 y EST-2. Las frecuencias de cada alelo por locus por población, presentó una gran heterogeneidad (Tabla 2). Algunos locus registraron ser homocigos por población, tal es el caso de la población 1 en el locus DIA-1 y DIA-2 son monomórficos en ambos casos para el alelo 1; las poblaciones 5, 7, 8 y 9 son monomórficas para la EST-1 para el alelo 2 y la población 10 registró locus monomórficos en la LAP1, GOT-1 y EST-1, en los tres casos para el alelo 2.

**Frecuencias genotípicas.** Se realizó el análisis de Chi-cuadrada a las frecuencias genotípicas de cada locus de cada población, con la finalidad de observar la desviación de lo esperado en el equilibrio de Hardy-Weinberg. Analizar los genotipos más comúnmente observados en relación al esperado.

**índices de fijación F.** Los índices de fijación F por locus por población (Tabla 4), el análisis de Chi-cuadrada mostró una alta significancia de los loci por población, sin embargo esto no permitió establecer una conclusión del estado de las poblaciones. Para lo cual se trabajó con los promedios totales (un valor de F para las 10 enzimas por población) (Tabla 6). Este análisis registró valores que no diferencian de cero. las poblaciones se encuentran en el equilibrio de Hardy-Weinberg, con excepción de la población leo. 4, que junto con la Población 3 son las más pequeñas. La población 4 muestra una endogamia significativa, efecto debido probablemente a que está en un cañón aislado, su

tamaño es pequeño, presenta una barrera geográfica con la población 5 que es la más cercana de las 10 poblaciones reportadas en este estudio, con aproximadamente 40 Km de distancia, separadas por una planicie denominada Bajío Los Llanos. Además la gran diferenciación entre las poblaciones (Tabla 3), como lo ilustra la  $F_{st}$ , para lo cual en todos los casos resultó ser altamente significativo, podría indicar que el flujo génico entre las poblaciones está siendo limitado o nulo, debido probablemente a que los polinizadores pudieran ser de tipo locales (ej. colibríes, abejas, abejorros) y no lo que se esperaría, un flujo génico por polinizadores que recorren grandes distancias (ej. murciélagos). Para lo anterior, en estudios posteriores será de fundamental importancia analizar polinizadores en alguna de las poblaciones para poder descartar la polinización por murciélagos, además de realizar viabilidad del polen en grandes recorridos y en tiempo.

Un dendrograma basado en las distancias de Nei se muestra en la Figura 2, La distancia media fue de 0.244. Los valores individuales entre poblaciones extremas presentan un intervalo de 0.14122 a 0.37601. El dendrograma define tres principales grupos: (1) las poblaciones del E, conformadas por las poblaciones 1, 2 y (2) las poblaciones del W, que lo integran las poblaciones 6 y 7; y un (3) tercer grupo integrado por las poblaciones que se distribuyen en la Zona Centro, de N a S, representada por las poblaciones 4, 5, 8, 9 y 10 (Figura 1). Se presentó mayor similitud entre los grupos extremos o los ubicados al E y al W, en relación a las poblaciones que se distribuyen en la zona centro, es probable que esto sea debido a que la población 1 y 7 son las poblaciones más grandes (Tabla 6), y pueden influenciar a las poblaciones cercanas, lo anterior podría tener más estabilidad a los cambios genéticos dentro de las poblaciones, a diferencia de las poblaciones (4, 5, 8, 9 y 10) que se distribuyen en la zona centro, con excepción de la población 5 que es tercera en tamaño (Tabla 6), las demás son relativamente pequeñas, lo que puede estar influenciando que las poblaciones sean más inestables o que se faciliten cambios genéticos dentro de la población.

Será de fundamental importancia discutir profundamente los resultados obtenidos e investigar otros, ejemplo: (a) los altos niveles de diferenciación genética entre las poblaciones, expresados por un valor promedio de  $J_{st}$  de 0.240 (Tabla 3), puede sugerir que existen límites entre el intercambio de genes entre las diferentes poblaciones: (b) esto podría ser explicado si se comprueba que los polinizadores son de tipo local (ej, abejas, abejorros y colibríes), organismos que se han comprobado que transportan el néctar y polen a una distancia menor de 1000 m (Kwak et al., 1991); (c) en relación

a lo anterior, los recorridos en campo nos permitieron registrar que existe más de 5 Km de distancia entre las diferentes poblaciones, llegando a ser en algunos casos hasta de 40-60 Km. (d) la diferenciación genética entre poblaciones ( $F_{st}$ ) para cada uno de los 10 loci, se presentó una elevada significancia, lo anterior muestra una elevada diferenciación entre las poblaciones (Tabla 3); (e) la heterocigocidad esperada ( $H_s$ ) es relativamente alta (0.335) (Tabla 1 y 6), lo que indica una selección natural por ciertos genotipos heterocigos y algunos tendiendo a ser homocigos, el índice de polimorfismo es igualmente alto (0.83); (g) el índice de fijación  $F_{is}$ , para observar la presencia de homocigos o heterocigos para la suma de todos los loci (Tabla 3), no mostró una significancia, lo cual indica que tiende a cero o al equilibrio de Hardy-Weinberg; (h) es posible que exista una ausencia o escasa presencia de autopolinización que derive en una endogamia, a este respecto es pertinente aclarar, (i) que en el caso de las poblaciones pequeñas, en varias estaciones se vio la necesidad de coleccionar hojas de individuos con distancias menores hasta de un metro, lo cual podría haber reducido la variación genética, sin embargo este fenómeno no fue notable; (j) a este respecto también se puede mencionar que existe una representación reducida de formación de Ramet en las poblaciones de Pared, ambiente que representa más del 95% de la distribución de las plantas, (k) en caso contrario, se sabe que otras especies de agaves, presentan un reclutamiento hasta del 95% de tipo Ramet (Nobel, 1987), lo cual puede disminuir la variación genética de las poblaciones y puede aumentar la endogamia; (l) se observó una distribución heterogénea de los reproductores, por lo general existía más de 4 metros de distancia entre dos reproductores. Sería recomendable realizar nuevos estudios para resolver a qué se debe la alta diferenciación entre las poblaciones.

**Tasas de entrecruzamiento y endogamia.** Autopolinizaciones *repetidas* dentro de una población reducen la frecuencia de heterocigos en una población. Eventualmente estos resultados originan un decremento en la aptitud individual de las plantas (Mitton y Grant 1984). Este fenómeno únicamente se observó en la población No. 4, que es relativamente pequeña y presenta aislamiento físico de 40 Km con la población No. 5, siendo ésta la más cercana de las reportadas para este estudio. La  $F_{is}$  promedio para el total de los 10 loci analizados resultó significativa, con valor positivo de 0.334 (Tabla 6), lo anterior sugiere la presencia de endogamia. El tamaño de la muestra es de un promedio de 40 individuos, esto permitiría descartar un efecto debido a deriva génica, además, los índices de fijación para cada locus nos muestran que de 10 enzimas analizadas, 6 tienen una alta

significancia de homocigosis y dos presentan heterocigosis alta (Tabla 4). A lo anterior, Nei et al. (1975) indican que la tendencia genética a un cuello de botella en las poblaciones, resulta en la pérdida de alelos poco frecuentes, esto origina una reducción en el número de loci polimórficos. Otros dos factores responsables en la reducción de heterocigos pueden ser la Selección Natural y la endogamia (Raijmann et al., 1994). Un análisis que nos permitiría descartar o afirmar estas aseveraciones, sería analizar la progenie de plantas madres de las que se colectaron semillas de esa población y comparar los resultados con los de otra población. Estudios complementarios de entrecruzamiento y endogamia, analizando parentales, flujo genético, polinizadores, etc., en una población de este tipo (No. 4) y una de mayor tamaño geográfico, permitiría esclarecer y ampliar los resultados obtenidos.

#### **Evaluación Demográfica de *A. victoriae-reginae*.**

Los valores de tamaños y número de individuos en la respuesta de Genet y Ramet, respecto al tipo de ambiente Pared o Suelo donde crece, se les realizó un análisis estadístico no paramétrico de U de Test de Mann-Whitney (M-Wh) y Test de Kolmogorov-Smirnov (K-Sm).

El análisis de M-Wh para la distribución de tamaños de formación Ramet para los dos ambientes (Figura 4A, 4B) no registró diferencia significativa (Tabla 7A), de igual forma resultó cuando se aplicó el modelo de K-Sm (Tabla 8A).

La distribución de Tamaños de individuos Genet en dos Ambientes (Figura 3A y 3B), al aplicarles el análisis estadístico no paramétrico de M-Wh (Tabla 7B), resultó ser altamente significativo ( $p < 0.000000$ ), esta misma evaluación por K-Sm (Tabla 8B) presentó un nivel de significancia de  $p < 0.001$ ,

Las Gráficas (Figura 3A) de distribución de Genet en dos ambientes muestran que en el ambiente Pared, presenta el mayor número de individuos juveniles o en el intervalo de tamaño de 0-10 (Figura 3A), lo que podría interpretarse como la presencia de un continuo reclutamiento de plantas provea antes de semillas (Genet), para el caso de Suelo (Figura 3A) es claro observar una disminución en la integración de plantas generadas de semillas, no obstante que el Suelo cerca o junto a la base de la Pared se deposita la semilla que cae de las plantas que se ubican en la Pared, es posible que en el área Suelo exista una alta depredación de semillas y plántulas, aunado a que la porosidad del Suelo pueda influir en la retención de humedad, impidiendo que la mayoría de las plántulas puedan sobrepasar el primer año de vida.

Las tallas intermedias en ambos ambientes es de 20 y 30 cm. El ambiente de Suelo registra las mayores tallas de desarrollo, efecto debido probablemente a la disponibilidad de nutrientes.

Las Gráficas (Figura 4A) de distribución de Ramet, muestran que el mayor reclutamiento de individuos en el ambiente Suelo es por Ramet, ésto se observó en la Población 3 donde la presencia de rizoma es alto, al descubrir la base de algunas plántulas, se reconoció que habían sido generadas por rizomas generados por plantas de mayor tamaño y a una distancia de entre 15-30 cm. Al igual que en el análisis de Genet, los Ramet en suelo registraron individuos de mayor talla.

Para el caso de Genet, resultó que el ambiente de Pared restringe la formación de Ramet y favorece el establecimiento de Genet. De este ambiente se registraron diversos factores que se analizaron : (a) existe en promedio una mayor densidad de plantas por área en Pared; (b) existe poca variación en el número de individuos por área entre los cuadrantes analizados de las poblaciones censadas, (c) la distribución en pared presenta mayor número de Genet, lo que genera en la población un intercambio genético dando como resultado una mayor variación genética, más estabilidad en las poblaciones, (d) después del recorrido realizado en campo, se observó que la mayor distribución (>95%) de plantas en los hábitats, se da en Pared de carbonato de calcio, en relación a la distribución en localidades de Suelo como aluvión, loma y sobre el lecho seco del río, la característica es que estas localidades están relativamente cerca (0-300 m) a las paredes con plantas, se incrementa el número de establecimientos cuando están prácticamente en la parte baja de la pared, lo que sugiere una influencia directa de aportación de semillas o Genet, además la forma en que se distribuyen es en pequeños manchones aislados, con superficie de distribución por lo general menor de 1000 m<sup>2</sup>. La única población en que es difícil dar una explicación acertada, es la población 3, donde se presentan las plantas más Atipo, las cuales son robustas, hojas anchas, largas, carnosas y de color verde intenso, con la línea blanca bien definida (2-3 mm de ancho). Las plantas por lo general presentan pocas hojas y extendidas en forma erecta, sin llegar a tomar las formas de hojas planas, son cóncavas, con tendencia a unirse las puntas de las hojas adultas con la hoja joven o eje de crecimiento, son éstas las características del resto de las plantas de las poblaciones visitadas. Los resultados de reclutamiento analizados difieren de los reportados para *Agave deserti*, donde el reclutamiento mayor (95%) fue del tipo Ramet (Nobel, 1992). En Pared el porcentaje de Genet respecto a Ramet fue de 74.1 %, en Suelo se redujo a 54.4%, los análisis no paramétricos U Test de Mann-Whitney y Test Kolmogorov

Smirnov, mostraron diferencias significativas en la distribución de Genet en los dos ambientes (Figura 3A y 3B).

En la Tabla 6 se evalúa en forma conservadora una aproximación del tamaño de las poblaciones: la superficie de distribución, el número total de individuos, la presencia de reproductores por año. Esta se realizó tomando en cuenta los análisis realizados para cada población en las dos visitas exploratorias en campo. Lo anterior muestra que las poblaciones 3 y 4 se presentan como las más pequeñas. La diferencia entre las dos es que, la No. 4 se presenta con una distribución continua, a diferencia de la No. 3 que se le localiza en forma discontinua, pero siempre en grupos de 30 o más individuos con una separación de los grupos por 100, 1000 o más metros, y se puede considerar que esta población estaría representada por las 5 estaciones visitadas. Lugareños conocedores de las plantas nos sugirieron la existencia de un número similar de estaciones cerca de estas localidades, las cuales no se localizaron, debido que al igual que las 5 estaciones reportadas, se presentan en pequeños lunares entre una distribución densa de *Agave lechuguilla*.

**Potencial reproductivo.** Las fechas de floración y fructificación en campo, corresponden a las reportadas por Gentry (1982). En algunas poblaciones fue posible observar individuos en etapa de reproducción fuera de la fechas reportadas, esto correspondía a menos del uno por ciento de los individuos en este estado, lo anterior estaba relacionado con la presencia de cuerpos de agua (presa o río) y/o al efecto de sombra.

El número de reproductores por área puede llegar a ser poco representativo, debido a que puede variar entre poblaciones, entre ambientes (plano o pared), entre efecto de sombra u orientación, entre la densidad de individuos que exista por área y en las condiciones climáticas de ese y años anteriores. Los tamaños de los cuadrantes se consideran pequeños para obtener un valor que represente a la presencia de reproductores por área, debido a que se observaron reproductores separados por distancias considerables, y se dificultaba la realización de un censo exclusivo para su evaluación, obligado por lo inaccesible para su cuantificación, crecen en paredes de carbonato de calcio con una inclinación tendiendo a la vertical. Se intentó el uso de binoculares y fotos fijas de poblaciones en pared pero se descartaron para la evaluación de plantas en estado reproductivo, debido a que existían fructificaciones del año pasado o de más años que se confundían con las fructificaciones de dos o tres meses de edad. Sin embargo, los reproductores registrados en los cuadrantes

establecidos se tomaron en cuenta para evaluar una aproximación por ambiente. La evaluación de plantas en estado de fructificación generada en el verano de 1995 por área para los dos tipos de ambiente (Pared y Suelo) registró un reproductor por cada 480m<sup>2</sup>. Los cuadrantes en ambiente plano o Suelo registró un reproductor por 720 m<sup>2</sup>, para el caso de la Pared se redujo a menos de la mitad de la superficie por reproductor, registrando 1 por cada 320 m<sup>2</sup> (Tabla 5). A este respecto es necesario denotar algunos factores como: a) existe diferencia significativa entre Genet y Ramet entre los dos ambientes, siendo el primero mayor en el ambiente de Pared (Figura 3), b) existe mayor densidad de individuos por área en el ambiente de Pared (Tabla 5). Las tallas de las plantas tienden a ser mayores en el ambiente de Suelo (Tabla 3), debido probablemente a la mayor disponibilidad de nutrientes, aunque esto parece no favorecer la reproducción sexual y sí la reproducción clonal por medio de a) rizoma que permite una separación considerable (30-40cm) entre planta madre y descendientes, se llegó a observar hasta 3 generaciones de Ramet (Genet- 1er. Ramet- 2o. Ramet- 3er. Ramet) y b) brotes que crecen unidos a la planta madre. En la población tres es claro observar los dos tipos de formación de Ramet, a diferencia de otras poblaciones donde lo común es observar la formación de Ramet por brote, crecen unidos a la planta madre.

Las semillas por fruto y los frutos por fructificación; fue posible cuantificarlos de unos cuantos individuos por población, con excepción de la población No. 3, que únicamente en una de las cinco estaciones se observó una planta en fructificación, no se colectaron semillas debido a que se observaron evidentes signos de saqueo de (semillas) toda la fructificación, además de observar esto mismo con plantas de diversos tamaños. Cada estación es muy pequeña, los sitios presentan menos de 5 individuos en estado potencial de reproducción, distribuidas en superficies menores de 1000 m<sup>2</sup> de lomeríos con material de arrastre, rocas de canto rodado y de fragmentos de carbonato de calcio, con inclinación de 75° o más, respecto a la vertical, en ladera con inclinación orientada generalmente al NE. Dos plantas que fructificaron el año anterior mostraban el mismo fenómeno de depredación de toda la fructificación, presentaban cortes en la base de la fructificación, lo que puede indicar que existe colecta de semillas para un mercado ilícito.

Se cuantificó el número de semillas, logrando registrar en el mejor de los casos fructificaciones con 2560 frutos, con un promedio de 102 semillas por fruto, dando un total de 260,000 semillas por plantas, registrando un 88% de germinación (BD: id semilla).

Germinación de semillas. Las semillas colectadas que fueron generadas el mismo año de colecta, presentaron altos porcentajes de germinación (90-100%), a diferencia de las semillas rescatadas de frutos dehiscentes con más de un año de edad, los porcentajes de germinación fluctuaban en 20-80% (Tabla 7).

Reclutamiento de plantas. Las observaciones de campo muestran la presencia de reclutamiento asexual (Ramet) en todos los cuadrantes realizados y en todas las poblaciones visitadas, un análisis estadístico no paramétrico de U de Test de Mann-Whitney y Test de Kolmogorov-Smirnov (Tabla 7, Tabla 8) mostró diferencias en tamaños en organismos Genet para ambos ambientes. Los ambientes de Pared presentan mayor reclutamiento de Genet que de Ramet, con mayor número de juveniles (Figura 3A), siendo esto una respuesta contraria en el ambiente Suelo. La mayor distribución de plantas se da en paredes de carbonato de calcio, en estos ambientes es posible localizar plantas que en forma de pequeños grupos se distribuyen en el aluvión muy cerca de la Pared, o en la parte superior de la sierra, en ambos casos casi siempre junto a la pared. Únicamente la población 3, en las cinco estaciones visitadas presentan un hábitat de lomerios con substrato con alta erosión, las plantas de *A. victoriae-reginae* mas cercanas que crecen en pared se encuentran a más de 15 Km de distancia.

Germinados de Plántulas. En el campo nos fue posible observar plántulas con edades mayores de un año, tallas promedio de 3 cm de diámetro fueron observadas en mayor proporción en los cuadrantes ubicados en paredes de carbonato de calcio, establecidas entre pequeñas grietas y abajo de pequeñas lajas movibles sobre la roca firme del mismo material y que han acumulado materia orgánica, representando microhábitats que las protegen en contra de la desecación e insolación. También fue claro observar en repisas de paredes únicamente de la población número uno, plántulas originadas de la germinación de semillas, con una edad menor de 15 días, registrándose en el mes de septiembre del año de colecta, lo anterior se relacionó con el mal tiempo que prevalecía en la región, nublados con ligeras lluvias que se presentaron por más de 10 días, originado por una tormenta tropical (tipo "ciclón") en el Golfo de México. Para el *Agave deserti*, se reporta que la germinación de semillas se presentó de igual forma que en nuestras observaciones, durante los periodos de lluvia del verano (Nobel, 1992).

Debido a la duración del proyecto y del tiempo de estudio en campo, entre el primer viaje (enero-febrero 1995) y el segundo viaje (septiembre 1995) es un periodo menor de un año o ciclo

reproductivo, por lo anterior, no es posible valorar el reclutamiento de Genet (sexual o por semillas) y Ramet (asexual: rizoma y/o brotes) por año.

A este respecto, investigaciones realizadas en campo con *A. deserti*, reportan que el primer año fue crucial para la sobrevivencia de las plántulas generadas de la germinación de semillas. De 19 años de estudio, en sólo un año existió reclutamiento de 6 plántulas en 1500m<sup>2</sup> que presentaba la superficie analizada (Nobel, 1985, 1992). Este evento estuvo relacionado con el incremento de lluvia en uno de los años del estudio; lo que permitió la germinación de semillas en ese mismo año y que sólo 6 plántulas lograran reclutarse. En este mismo estudio, se cuantificó que *A. deserti* en el NW del desierto de Sonora, el 95% de su reclutamiento es por reproducción vegetativa o Ramet (Nobel, 1977).

Dispersión de semillas en campo. Para la especie en estudio, las siguientes características permiten una adecuada dispersión de semillas dentro de la población: (1) por su forma aplanada y de bajo peso, les permite ser transportadas por el viento dentro de la población, (2) más del 95 % de los reproductores se establecen en paredes de carbonato de calcio, que en estado de dehiscencia existe una dispersión a lo largo y alto de la pared, y (3) se percibieron fuertes corrientes de aire en todas las poblaciones, las cuales permitían el flujo de aire en todas direcciones a lo largo de la pared.

#### **Banco de semillas de *A. victoriae-reginae* T. Moore.**

La colecta de semillas se realizó en 9 de las 10 poblaciones establecidas, se colectaron semillas de 1-3 o más plantas por población (BD). Se les evaluó el porcentaje de germinación, las semillas de la fructificación del año de colecta, presentaron porcentajes altos de germinación (>90%). Las semillas con edades mayores a un año, registraron una disminución considerable en el porcentaje de germinación (intervalo de 20 a 80%) (Tabla 7).

Como trabajo posterior al planteado para la realización de esta investigación, se podría evaluar la pérdida de germinación en tiempo de las semillas almacenadas en refrigeración, además, serían fuente para otros trabajos relacionados con análisis de entrecruzamiento y en la biología de la conservación.

**Aplicación de las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales.** La presencia de 2,4-D (auxina) en cualquiera de las concentraciones usadas, en ausencia o presencia de citocinina: kinetina (K) o Benciladenina (BA), al cabo de las 3 primeras semanas de cultivo se inició la desdiferenciación del

tejido y dio origen a la formación de callo. Dos semanas más tarde en los callos se observó la diferenciación de estructuras en forma de nódulos. Groenewald et al. (1977) reportó que en fragmentos de semillas de *Agave* sp. obtuvo la formación de nódulos a los cuales les encontró semejanza con proembriones adventicios. El medio utilizado por estos autores contenía 2,4-D 0.2mg/l y K 1mg/l. En fragmentos de *Agave sisalana* cultivados en presencia de Benciladenina (BA) a 22.2 y 44 micromolar se generaron estructuras nodulares (Das, 1992).

En ausencia de reguladores del crecimiento o con sólo citocininas, las yemas apicales formaron 1-3 brotes que han finalizado en la regeneración de plántulas completas. En el medio MS con 1 mg/l de 2,4-D y 1mg/l de BA, las bases (tallos) derivaron en un callo compacto en cuya superficie se observó la presencia de estructuras meristemoides (primordios de hojas).

Con los regenerantes, se procedió a evaluar la estabilidad o variación genética a partir de un análisis isoenzimático, tomando en cuenta las diferentes vías regenerativas que se observaron. Se cuenta con la respuesta morfogénica de embriogénesis y organogénesis con más de 15 subcultivos desde su origen (6 años), la embriogénesis se presentó muy al inicio de la formación de callo. Sin embargo, la regeneración masiva fue con mayor incidencia vía organogénesis directa. Se les realizó un análisis, electroforético de isoenzimas, utilizando el sistema aplicado para las poblaciones silvestres, se evaluaron 7 enzimas con un total de 10 locus: PGI-2, PG1-3, ME-1, GGT-1, AcP-2, LAP- I , PGM-1, PGM 2, EST-1 Y EST-2, para su lectura se utilizó el mismo control que en el caso para evaluar las plantas de campo. Los resultados de las lecturas de los geles, en todos se manifestó un 100% de estabilidad genética, los locus eran iguales en todas las muestras analizadas no presentaron variación en ninguno de sus alelos (Tabla 6A).

La nula variación genética que expresa este estudio de isoenzimas, puede deberse a que por el momento se ha analizado únicamente la respuesta en un clon que ha sido subcultivado durante 6 años, no ha perdido el potencial de respuesta morfogénica, tampoco ha requerido de aplicación de ninguna hormona de crecimiento para mantener la propagación masiva, se considera una respuesta altamente genética, únicamente se utilizaron hormonas para revertir la respuesta a callo, el cual inmediatamente se subcultivaba a un medio sin regulador del crecimiento y la respuesta derivaba a embriones en la primera etapa y posteriormente la respuesta continuaba en una alta proporción en organogénesis somática directa. La presencia de reguladores endógenos activados por los tejidos y las

CLAVES PARA LAS POBLACIONES ESTUDIADAS DE  
**A. victoriae-reginae T. MOORE.**

TABLA A

Clave de la Pobl.	No. de la Población	Nombre de la Población
DS1	1	C. HUASTEKO
DS2	2	MINA
DS3	3	L. LANDEROS
DS4	4	S. PARRAS
DS5	5	AHUICHILA
DS6	6	S. NOAS
DS7	7	S. MULATO
DS8	8	S. DELICIAS
DS9	9	C. ANGOSTO
DSO	10	C. MEZCAL

**TABLA 1. VARIABILIDAD GENÉTICA EN 10 LOCI EN TODAS LAS POBLACIONES ESTUDIADAS**

Población	(A)		(P) Media de heterocigosis		
	Media de la muestra por Locus	Media de alelos por locus	Porcentaje de loci polimorfico*	Direct-observada	HdyWbg esperada**
1. C. HUASTECO	37.8 ( 3.9)	2.2 ( .2)	70.0	.209 ( .077)	.311 ( .076)
2. MINA	33.9 ( 1.6)	2.2 ( .1)	70.0	.222 ( .081)	.248 ( .060)
3. L. LANDEROS	38.1 ( 2.9)	2.1 ( .1)	100.0	.399 ( .082)	.325 ( -.044)
4. S. PARRAS	36.7 ( 3.4)	2.2 ( -.1)	90.0	.232 ( .072)	.351 ( .059)
5. AHUICHILA	33.8 ( 1.3)	2.2 ( .2)	90.0	.372 ( .082)	.406 ( .054)
6. S. NOAS	42.1 ( 1.1)	2.3 ( .2)	90.0	.457 ( .109)	.435 ( .057)
7. S. MULATO	41.7 ( .6)	2.3 ( .2)	80,0	.381 ( .106)	.377 ( .064)
8. S. DELICIAS	28.4 ( 1.2)	2.1 ( .2)	90.0	.431 ( .083)	.363 ( .056)
9. C. ANGOSTO	40.1 [ 1.5)	2.4 ( .2)	90.0	.270 ( -.088)	.323 ( -.061)
10. C. MEZCAL	22.7 [ 4.1)	1.8 ( .2)	60.0	.187 ( .073)	.209 ( .060)
PROMEDIO		2.18	83.0	0.316	0.335

\* A locus is considered polymorphic if the frequency of the most common allele does not exceed .95 \*\*  
 Unbiased estimate (see Nei, 1978)  
 (error standard entre paréntesis)



Tabla 3. RESUMEN DE F-statistics PARA TODOS LOS LOCI

Locus	F (IS)	F (IT)	F (ST)
LAP-1	.004	.386****	.383****
GOT-1	.794****	.842****	.235****
DIA-1	.184***	.348****	.201****
DIA-2	.068	.293****	.241****
ACP-2	.036	.647****	.634****
EST-1	.423****	.463****	.070****
EST-2	-.260****	-.098	.128****
PGI-2	-.646****	-.576****	.042****
PGI-3	-.459****	-.378****	.055****
ME -1	.485****	.575****	.176****
Mean	.040	.270****	.240****

Chi-cuadrada = \*\*\* P=0.001 ; \*\*\*\* P<0.001

Tabla 4. INDICE DE FIJACIÓN (F) POR LOCUS PARA CADA POBLACIÓN DE *A. victoriae-reginae*. T. MOORE, QUE ILUSTR LA DEFICIENCIA Ó EXCESO DE HETEROCIGOS. No. POBLACIÓN

LOCUS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LAP-1	0.589	-0.026	-0.147	0.470	-0.297	-0.065	-0.353	-0.033	0.037	
GOT-1	0.891	0.939	0.146	1.000	0.680	0.894	0.961	-0.094	0.845	
DIA-1		-(1.055, -0.015)		0.687	0.440	-0.025	-0.131	=0.067	0.189	(1,707)
DIA-2		-0.018 -0.214	-0.356 -0.147	0.338 -0.188	0.194 0.323	-0.317 -0.182	-0.051 1.000	0.416 -0.164	0.631 0.619	-0.120 0.653
EST-1	-0.044	-0.013	-0.147	1.000		0.904				
EST-2	-0.005	-0.154	-0.091	-0.111	-0.103	-0.675	-0.206	-0.548	-0.091	0.077
PGI-2	-0.492	-0.400	-1.000	-0.458	-0.846	-0.957	-0.953	-0.397	-0.452	-0.250
PGI-3	-0.073	-0.533	-0.123	-0.433	-0.309	-0.544	-0.415	-0.730	-0.463	-0.42
ME-1	0.952	0.738	-0.014	0.513	0.704	0.381	0.661	-0.129	0.848	0.657j
Prom.	0.12	0.033	-0.194	0.1334	0.031	-0.045	0.057	-0.194	0.240	0.116v

(P)  
cuadrada - \*\*\*\* P<0.0005 ; \*\*\* P<0.001 ; \*\* P<0.01 ; \* P<0.05

Chi-

P<0.05

**ESTUDIO DEMOGRÁFICO (120m2) EN *Agave victoriae-reginae* T. MOORE, ANALIZANDO DOS TIPOS DE CRECIMIENTO, GENET Y RAMET, EN Tabla 5  
DOS TIPOS DE AMBIENTES, SUELO Y PARED.**

**Poblaciones en ambiente de SUELO**

<u>Análisis</u>	<u>Pob 1 C1</u>	<u>Pob 1 C2</u>	<u>Pob 1 C3</u>	<u>Pob 1 C4</u>	<u>Pob 3 C1</u>	<u>Pob 3 C2</u>	<u>Pob 3 C3</u>	<u>Pob 3 C4</u>	<u>Pob 5 C1</u>	<u>Pob 5 C2</u>	<u>Pob 5 C3</u>	<u>Pob 8 C1</u>	<u>SUM</u>	<u>Prom Total</u>
No Inds.	66	17	133	120	182	38	27	12	18	27	27	28	<b>695</b>	<b>57.91667</b>
Si M. Diam(cm)	<u>1383</u>	<u>499</u>	2158	2606 i 1166 <sup>1</sup>	787	692	257	339	<u>358</u>	<u>258</u>	439	10942	911.8333	
<u>Prom Diam (cm)</u>	<u>20.95</u>	<u>29.35</u>	16.23	21.72	6.41	20.71	25.63	21.42	<u>18.83</u>	13.26	9.56	15.68	18.3125	
<u>Indivs/m2</u>				<u>0.55</u>	<u>0.14167</u>	<u>1.10833</u>	<u>1</u>	<u>1.51667</u>	<u>0.31667</u>	<u>0.225</u>	<u>0.1</u>	<u>0-15</u>	<u>0-225</u>	<u>0-225</u>
				<u>0.23333</u>		<u>0.482639</u>								
<u>Reprod./cuadrant</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	
				<u>211440m2</u>	<u>1.1720m2</u>									
No. GENETs	64	17	89	<u>82</u>	30	17	12	8	<u>10</u>	14	6	23	<b>378</b>	<b>31.5</b>
SUM.Diam (cm)	<u>1312</u>	<u>499</u>	<u>1638</u>	<u>1907</u>	486	598	444	232	253	216	144	407	8136	<u>678</u>
<u>Prom Diam (cm)</u>				<u>20-5</u>	<u>29.35</u>	<u>18.4</u>	<u>23.26</u>	<u>13.5</u>	<u>35.18</u>	<u>37</u>	<u>29</u>		<u>25.3</u>	<u>15.43</u>
				<u>24</u>	<u>17-7</u>	<u>24.05167</u>								
No. RAMETS	2	<u>0</u>	<u>44</u>	<u>38</u>	<u>146</u>	<u>21</u>	15	4	8	13	21	5	317	26.41667
Si TM. Diam (cm)	71	0	<u>520</u>	699	<u>680</u>	<u>189</u>	<u>248</u>	25	<u>86</u>	142	114	32	2806	<u>233.8333</u>
<u>Prom Diam (cm)</u>	<u>35.5</u>	<u>0</u>	<u>1182</u>	<u>18-39</u>	<u>4.66</u>	<u>9</u>	<u>16-53</u>	<u>6-25</u>	<u>10-75</u>	<u>10-92</u>	<u>5.43</u>	<u>6.4</u>	<b>11.30417</b>	

**Poblaciones en ambiente de PARED**

<u>Análisis</u>	<u>Pob 2 C1</u>	<u>Pob 2 C2</u>	<u>Pob 6 C1</u>	<u>Pob 7 C1</u>	<u>Pob 7 C2</u>	<u>Pob 7 C3</u>	<u>Pob 7 C4</u>	<u>Pob 7 C5 SUM</u>	<u>Prom. Total : No Inds.</u>	39	52	60	102	101	<u>106</u>
	44	99	<b>603</b>	<b>75.375</b>											
SUM. Diam (M)	<b>945</b>	<b>1484</b>	<b>884</b>	<b>959</b>	<b>1358</b>	<b>916</b>	<b>685</b>	<b>1158</b>	<b>8389</b>	<b>1048.63</b>					
<u>P2-0113 Diam (cm)</u>	<u>24.23</u>	<u>28.54</u>	<u>1473</u>	<u>9.4</u>	<u>13-45</u>	<u>8.64</u>	<u>15-57</u>	<u>11.7</u>		<u>15.7825</u>					
<u>Indivs/m2</u>	<u>0.325</u>	<u>0.43333</u>	<u>0.5</u>	<u>0.85</u>	<u>0.84167</u>	<u>0.88333</u>	<u>0.36667</u>	<u>0.825</u>		<u>0.62813</u>					
<u>Reprod./crusdrant</u>	<u>0</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	<u>31960m2</u>	<u>11320m2</u>					
No. GENETs			<b>36</b>	<b>48</b>	<b>29</b>	<b>61</b>	<b>67</b>	<b>88</b>	37	81	447	55.875			
SUM. Diam (cm)	869	1385	622	647	<u>1025</u>	<u>776</u>	622	<u>969</u>	<u>6915</u>	<u>864.375</u>					
<u>Prom Diam (cm)</u>	<u>24.14</u>	<u>28.85</u>	<u>21.45</u>	<u>10.61</u>	<u>15.3</u>	<u>8.82</u>	<u>16.81</u>	<u>11.96</u>		<u>17.2425</u>					
No. RA.METS	3	4	31	41	34	<u>18</u>	7	18	156	19.5					
SUM. Diam (cm)	76	99	262	312	333	<u>140</u>	63	189	1474	184.25					
<u>Prom Diam (cm)</u>	<u>25.33</u>	<u>24.75</u>	<u>8.45</u>	<u>7.61</u>	<u>9.79</u>	<u>7.78</u>	<u>9</u>	<u>10.5</u>		<u>12.9013</u>					

Tabla 6. RELACIÓN ENTRE EL		INDICE DE FIJACIÓN QUE ILUSTR		(F) Y LOS TAMAÑOS DE CADA POBLACIÓN DE A. LA DEFICIENCIA Ó EXCESO DE HETEROCIGOS.					T. MOORE.	
FACTOR	No 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Prom. F(10 Loci)	0.201	0.033	-0.194	0.334	0.031	0.045	0.057	-0.194	0.240	0.163
P<0.05										
Med. H esperada E. S.	0.311 0.076	0.248 0.06	0.325 0.044	0.351 0.059	0.406 0.054	0.435 0.057	0.377 0.064	0.363 0.056	0.323 0.061	0.209 0.06
TAMAÑO DE LAS POBLACION										
.Arca (m2) total'	640 000	80 000	2020	7,000	100 000	30; 000	320,000	80 000	12,000	20 000
SUM- total Indivs,**	402,133	50,266	888	4.398	62,833	18.850	201,067	50,267	4 7,540	12.567 _.
Si 1A4 total Reprod	2,000	157	1	22	313	94	1,000	250	38	63
(") = longitud X 10 in de la pared: (**) -	120m2 X 75.4 = 0.63 indivs/m2:								(') =320 m2 X reproductor (en pared): Pob. 3 únicamente e localizó 1 reproductor.	

STAT.	Mann-Whitney U Test					- TABLA 7A			
NONPAR STATS	By variable: Diferencias de Tamaño en formas				Ramet en	dos Ambientes			
	Grup 1:1		Grup 2:2						
variable	SUM Rank	SUM Rank			p-level	z	p-level	Valor N	
	Grupo 1	Grupo 2				ajustado		Grupo 1	
Tamaño	39415'	73160	22439	-1.68771	0,091476	-1.693181	0.0904311	156	318
STAT	Mann-Whitney U Test					TABLA 7B			
NONPAR	By variable: Diferencias de Tamaño en formas Genet en dos				Ambientes				
	Grup 1:1		Grup 2:2						
variable	SUM Rank	SUM Rank	U				p-level)	Valor N	
	Grupo 1	Grupo 2				ajustado	, Grupo 1	Grupo 2	
Tamaño	157872	182028	57744	-7.790031	o.000000	-7.796	o.000000	447	337

STAT.	Kolmogorov-Smirnov Test						TABLA 8A		
NONPAR	By variable: Diferencias de Tamaño en formas Ramet en dos Ambientes								
STATS	'Grupo 1:1 Grupo 2:2		1		T				
variable	Max Neg	Max Posit	p-level	Media	Media	Std. Dev.	Std. Dev.	Valor N	Valor N
	Diferencia	Diferencia.		Grupo 1	Grupo 2	Grupa 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2
Tamaño	-0.02637	0.101838	p = n.s.	9.4487161	8.845908	6.8826991	7.559113	156	318
STAT.	Kolmogorov-Smirnov Test - -- L -----						TABLA 8B		
NONPAR	By variable: Diferencias de Tamaño en formas Genet en dos Ambientes								
STATS	Grupo 1:1 Grupo 2:2		T						
variable	Max Neg	Max Posit	p-level	Media	Media	Std. Dev.	Std. Dev.	Valor N	Valor N
	Diferencia	Diferencia		Grupo 1	Grupo 2	Grupo 1	Grupo 2 ; Grupo 1	Grupo 1	Grupo 2
Tamaño	-.271145	0.00	p .001	15.4698	21.71883	11.23409	11.85733	447	377



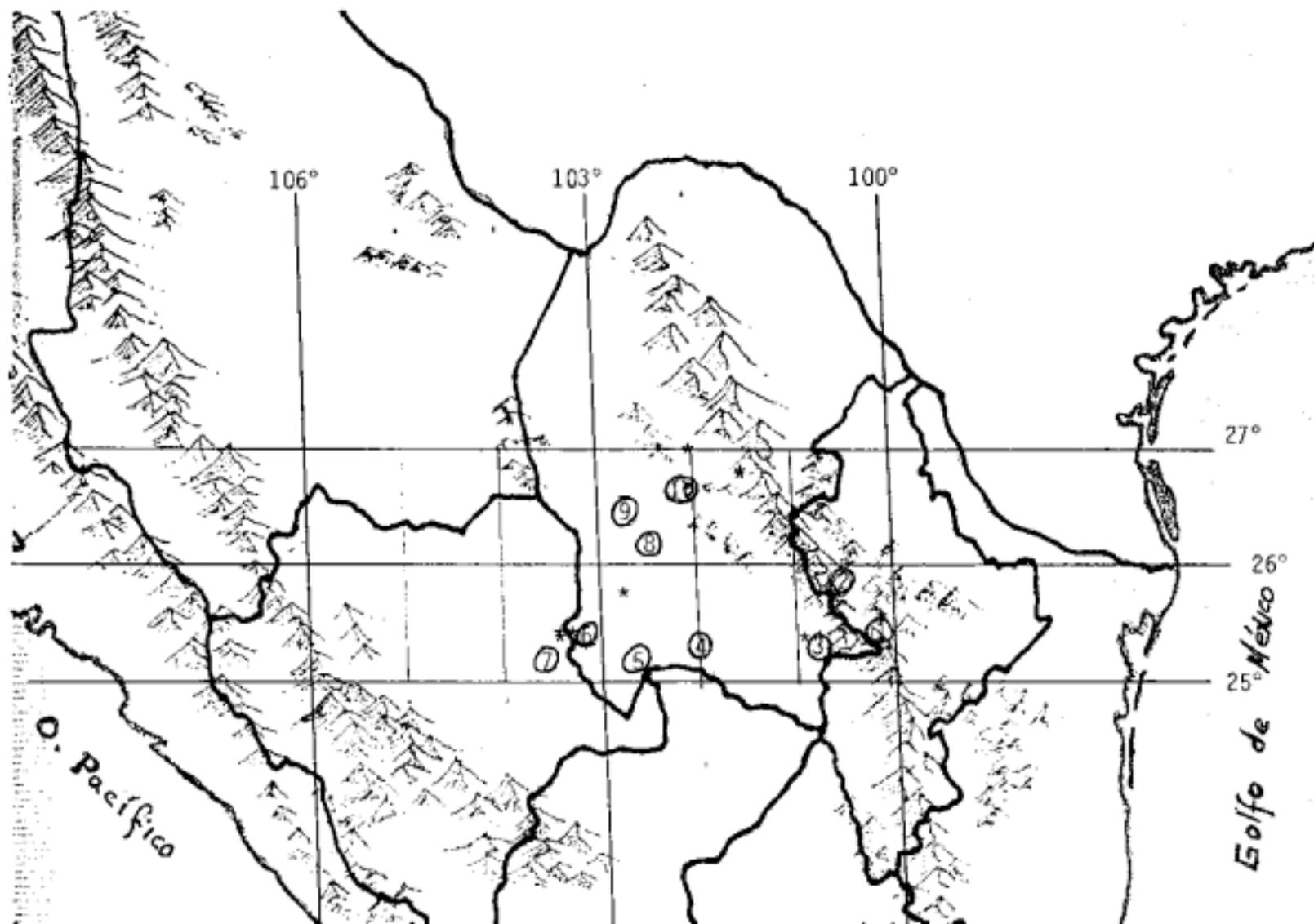


Figura 1. Ubicación geográfica de las 10 poblaciones de *Agave victoriae-reginae* T. Moore, especie mexicana en peligro de extinción.

DISTRIBUCION DE TAMAÑOS DE INDIVIDUOS GENET EN DOS AMBIENTES  
FIGURA 3A

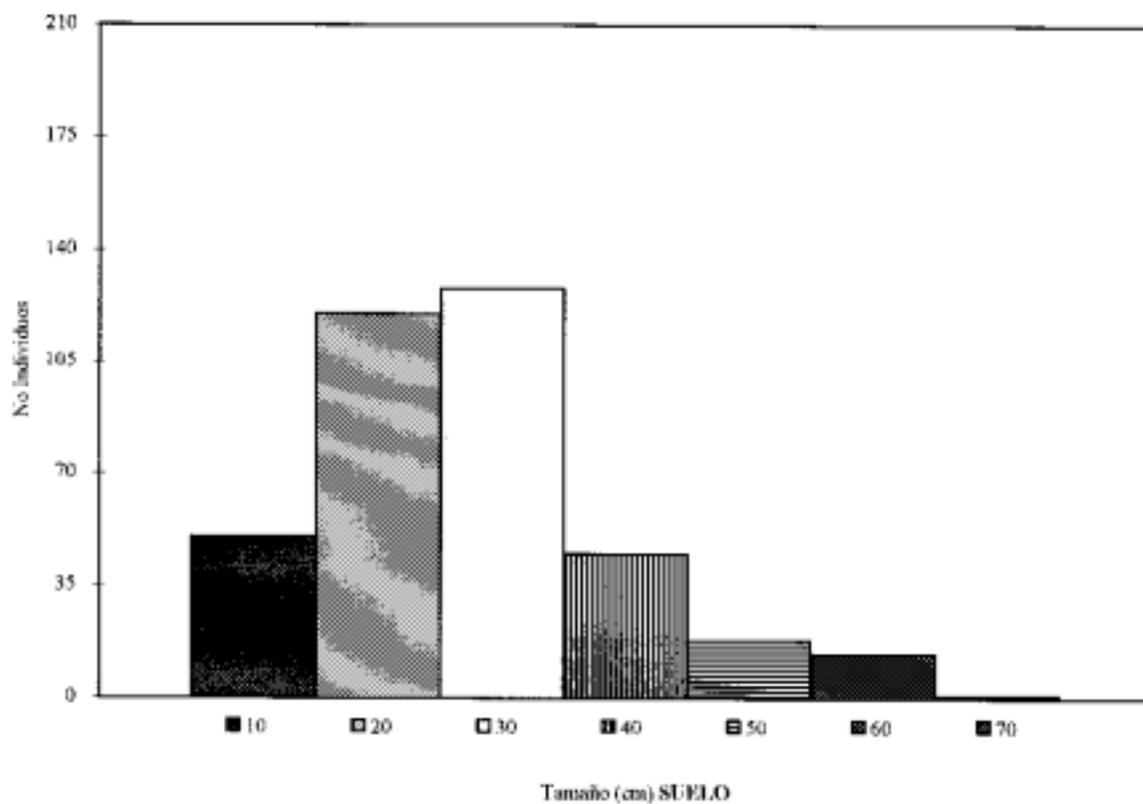
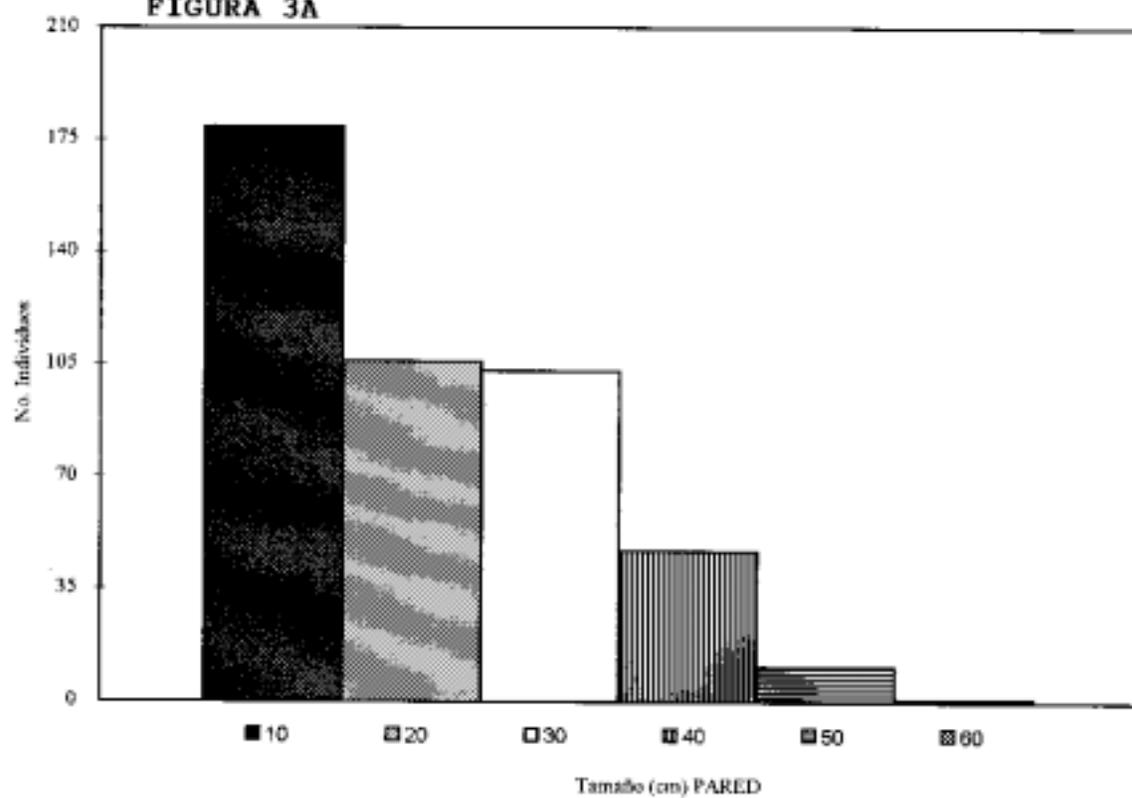
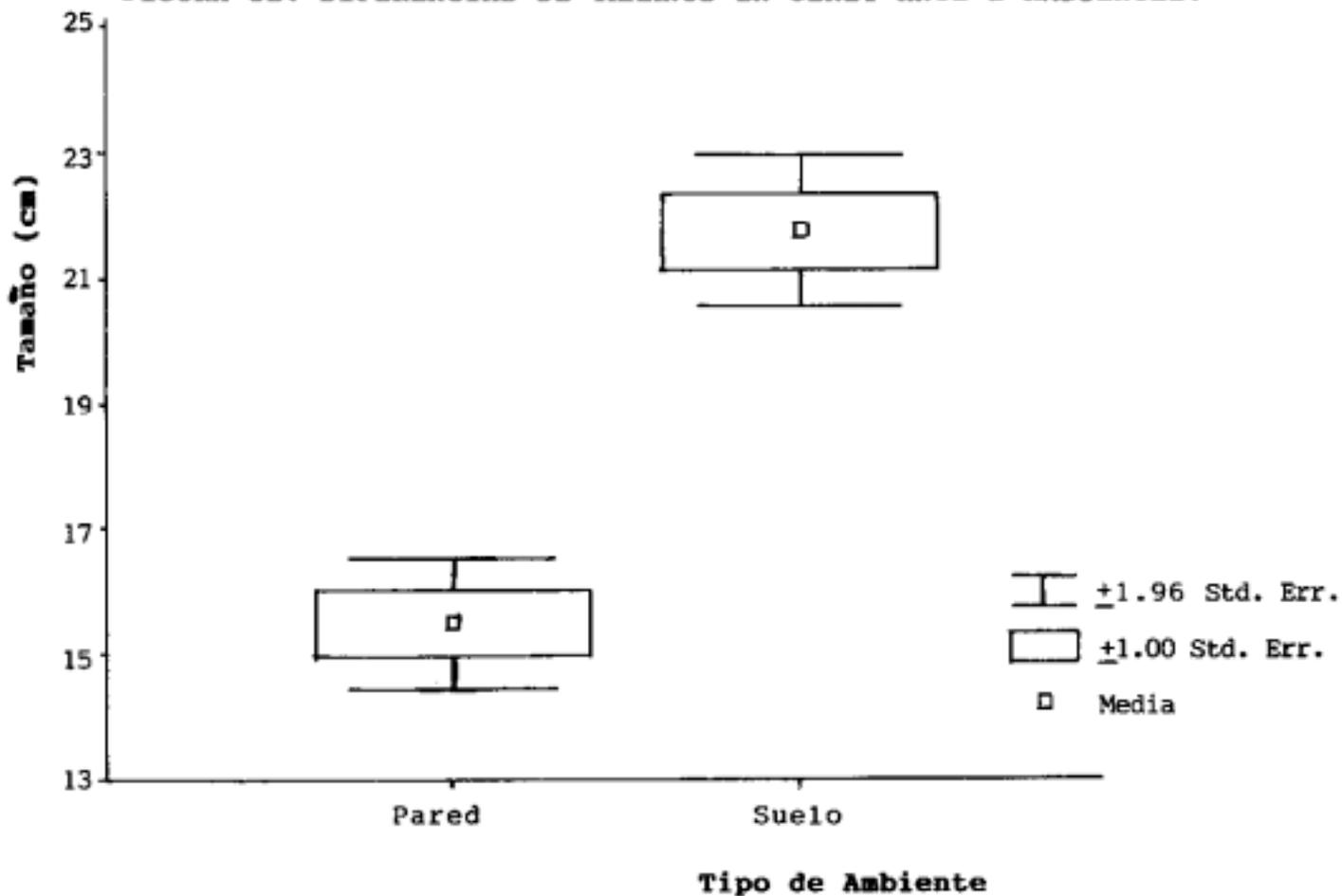


FIGURA 3B. DIFERENCIAS DE TAMAÑOS EN GENET ANTE 2 AMBIENTES.



# DISTRIBUCION DE TAMAÑOS DE INDIVIDUOS RAMET EN DOS AMBIENTES

FIGURA 4A

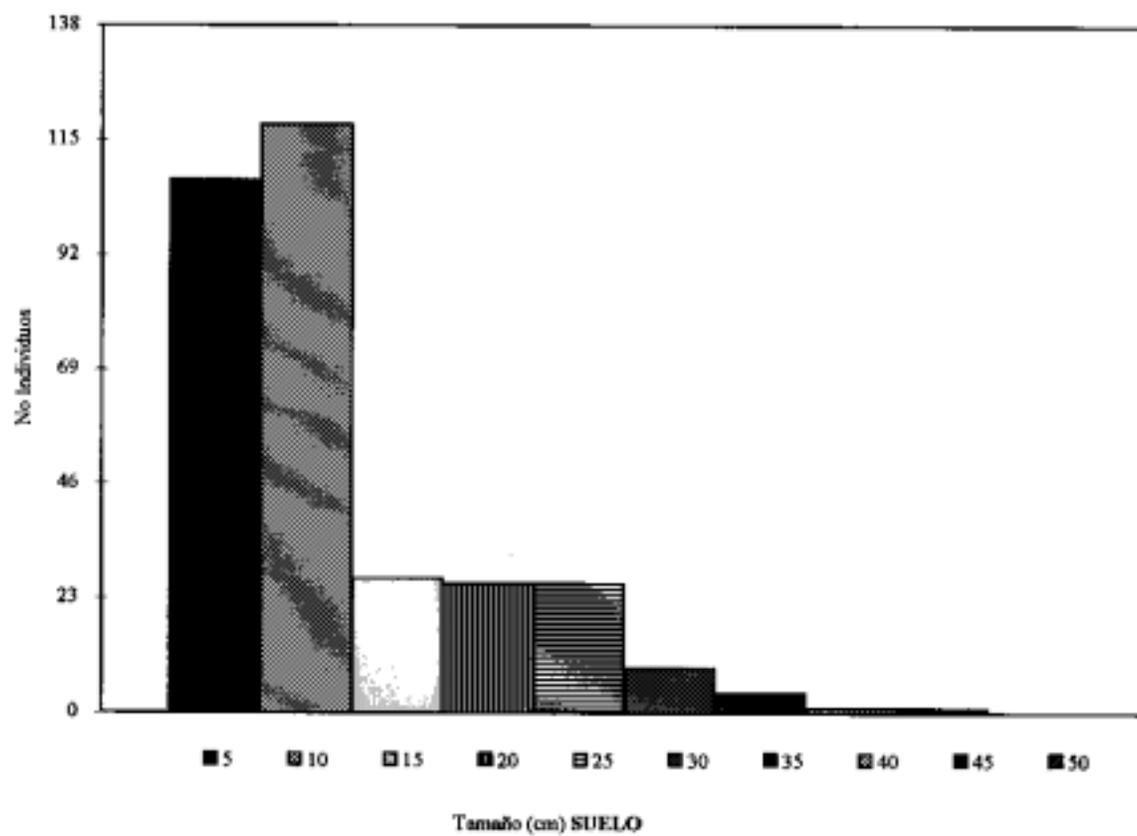
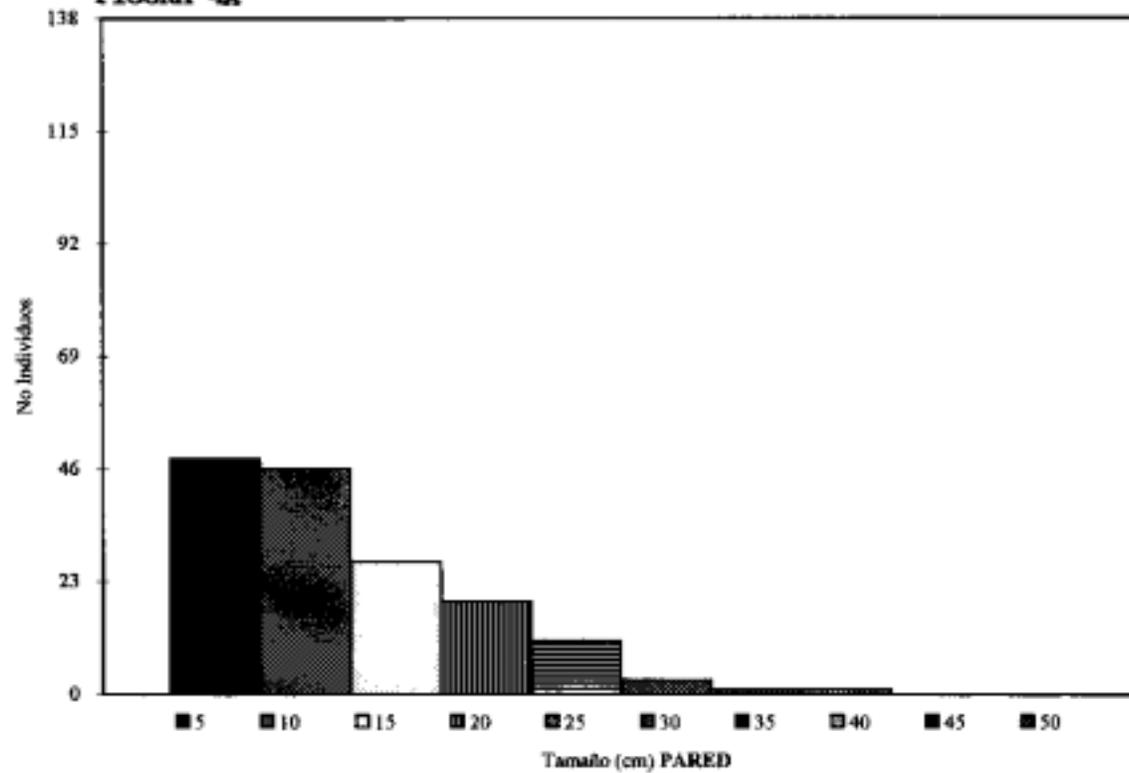
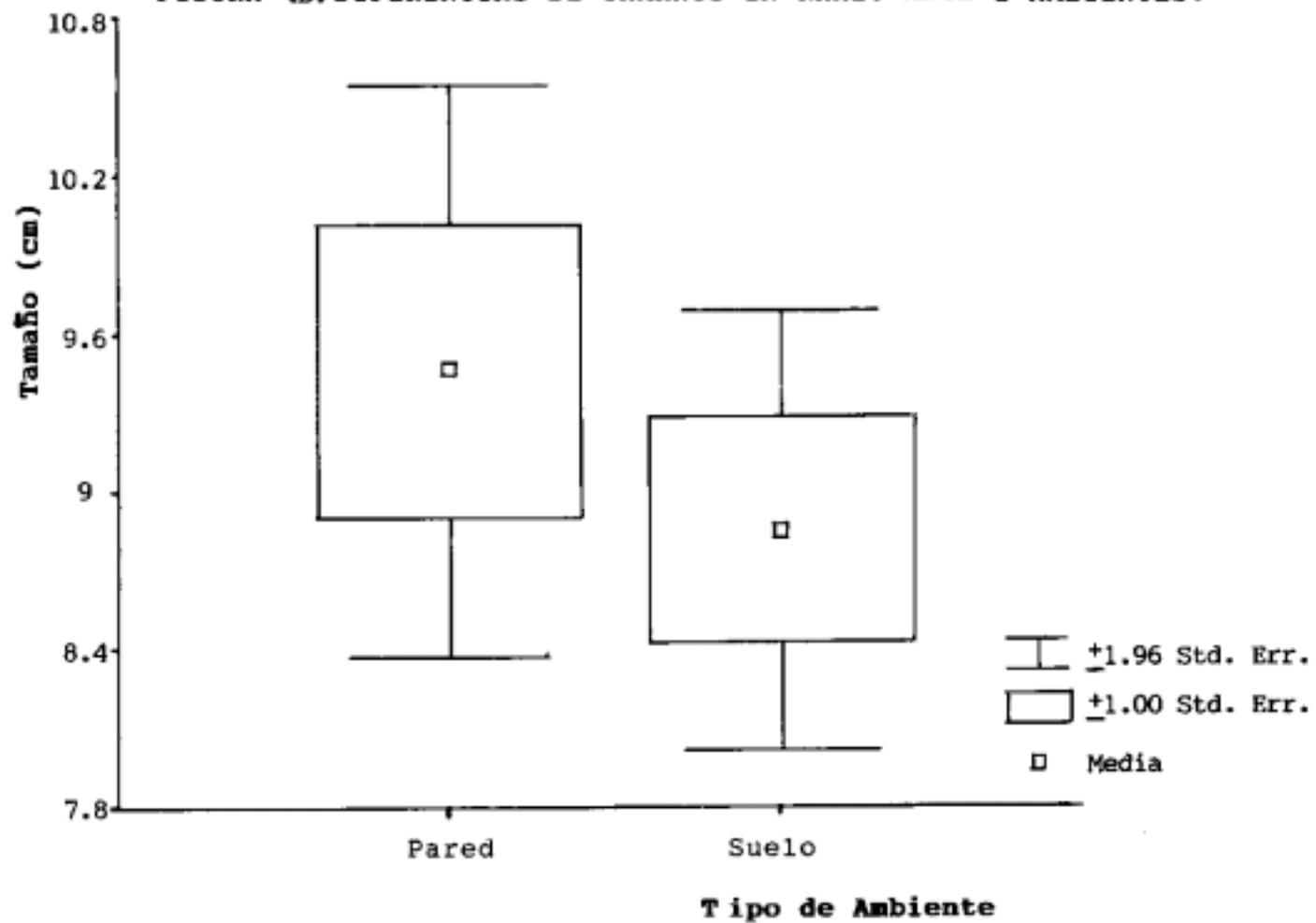


FIGURA 4B. DIFERENCIAS DE TAMAÑOS EN RAMET ANTE 2 AMBIENTES.



condiciones artificiales *in vitro* fue suficiente para mantener la respuesta da micropropagación del clon, el cual hasta el momento no ha perdido el potencial da respuesta. Locus

Alelo Locus Alelo

PGI-2	®	LAP-1	
PGI-3			
ME- 1			
GOT-1	®	E,ST-1	
AcP-1	22	EST-2	12

Tabla 6A. Estructura genética da un clon de *A. victoriae-reginae*, generado y subcultivado *in vitro* por más de 1 veces (6 años)

Los cortes histológicos de las respuestas morfogénicas da los tejidos *in vitro*, mostraron una gran incidencia da embriogénesis somática en las primeras etapas de la generación da callo, posteriormente la respuesta a embriones se reduce hasta llegar e ser insignificante, da igual forma al callo adopta una respuesta orgenogénica que en forma directa se establece la formación da múltiples brotes de los ya existentes, la actividad del callo se reduce notablemente.

## CONCLUSIONES

Análisis estadístico. Será necesario continuar con los análisis estadísticos para valorar las diferencias en forma significativa entre los diferentes patrones cuantificados. Será una da las actividades a realizar en la presente investigación, para integrar le redacción da la tesis da Doctorado y de los artículos científicos a publicar.

Existe diferencias en el tamaño, presencia de Genet y Remet en los dos ambiente. Exista presencia de homócigos y heterócigos, une Hs relativamente alta en todas las poblaciones, efecto debido muy probablemente a la selección de heterócigos, los polinizadores parecieran ser da tipo local (colibríes, abejas y abejorros), lo que pueda no facilitar al flujo génico entre las poblaciones. Las zonas áridas da México, son consideradas como regiones ricas en endemismos, esta especie presenta una

gran diferenciación genética entre las poblaciones, será de fundamental importancia desarrollar nuevos estudios de campo para encontrar si esta habiendo flujo genético entre las poblaciones de *Agave*

*victoriae-reginae*.

Con las semillas almacenadas, se podrá incrementar el análisis de genética de poblaciones para esclarecer algunas interrogantes que se presentan en la discusión, ej. flujo genético y endogamia dentro de la población.

Demografía de las poblaciones. Existen diferencias en la formación de Genet y Ramet en los dos ambientes, Pared y Suelo, la presencia de Ramet se presenta en forma significativa en los ambientes de Suelo, aunque en estos ambientes se reduce notablemente la presencia de reproductores. Las tallas de las plantas en promedio son mayores en los ambientes de Suelo, existe mayor densidad en el ambiente de Pared. Más del 95% de la distribución de plantas de *A. victoriae-reginae* se presenta en Pared, lo que permite afirmar que es el hábitat natural, y que incursiona a los ambientes de Suelo en forma de pequeños cúmulos de plantas.

Aplicación de las técnicas de Cultivo de Tejidos Vegetales. Se establecieron sistemas de micropropagación por dos diferentes vías morfogénicas, utilizando explantes jóvenes de semillas germinadas *in vitro*, se están procesando los análisis anatómicos para evaluar los tipos de respuestas morfogénicas de los regenerantes. De las plántulas regeneradas se está concluyendo el análisis isoenzimático, utilizando las mismas enzimas y el mismo sistema de corrimiento que se aplicó para la estructura genética de las poblaciones silvestres realizadas. Estas técnicas podrían ser utilizadas para propagar aquellos individuos con genotipos raros que se presenten dentro de las poblaciones, y evitar su erosión o extinción.

Banco de semillas. Con los resultados generados, se establecen las bases para el banco de semillas de la especie en estudio, podrían ser utilizadas en programas de biología de la conservación.

Biología de la conservación. Una conclusión preliminar para la conservación de la especie, según los resultados de la  $F_{st}$  que se muestran en la Tabla 3, nos indica una alta diferenciación entre las poblaciones, lo cual sugiere que es indispensable conservar si es posible todas y cada una de las poblaciones. Sería recomendable que se mantenga el nivel de peligro de extinción en que se consideró en el listado del diario oficial de la federación publicado en el año de 1994. Es importante que el INE tome en cuenta las recomendaciones que se le entregaron en un informe para la conservación de

algunas de las poblaciones, que esta siendo destruida en forma inminente y alarmante por la explotación de minerales (cemento, mármol, grava, etc.)

Se entregará a la CONABIO análisis más profundo con la publicación de la Tesis de Doctorado y los artículos que de la investigación se derive.

## REFERENCIAS

- AMMIRATO, P.V. 1989.** Recent progress in somatic embryogenesis. Newsletter IAPTC 57:2-16.
- BEVERSDORF, W.D. 1990.** Micropropagation in crop species. 3-12. En: H.J.J. Nijkamp et al. (Eds.) Progress in plant cellular and molecular biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. **CHAVEZ, V.M., R.E. LITZ, Y K. NORSTOG. 1992a.** *In vitro* Morphogenesis of *Ceratozamia hildae* and *C. mexicana* from megagametophytes and zygotic embryos. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 30: 93-98.
- Y \_\_\_\_\_..1992b. Somatic Embryogenesis and Organogenesis in *Zamia fischeri*, *Z. furfuracea* and *Z. pumila*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 30: 99-105.
- \_\_\_\_\_, **P.A. MOONY** . 1992c. Somatic Embryogenesis from Leaf Callus of Mature Plants of the Gymnosperm *Ceratozamia mexicana* var. *robusta* (Miq.) Dyer Cycadales. In Vitro Cell Dev. Biol. 28p: 59-63.
- , \_\_\_\_\_ , **A. VOVIDES, Y K. NORSTOG. 1994.** Somatic Embryogenesis from leaf from a mature plant of *Ceratozamia euryphyllidia* (Cycadales, Gymnospermae) an Endangered species, p 180 En: Abstracts *VIIIth* International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, IAPTC, Firenze, Italy, June 12-17.
- CRIASE, M.R., D.H. BOSHER, Y K.S. BAWA.** 1995. Population Genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a Neotropical Tree. 1. Genetic Variation in Natural Populations. Amer. J. Bot. 82(4):468-475.
- C.I.T.E.S., **1987.** La Convention de Washington L'Application pour les Plantes. Brochure d'information réalisée par le Ministère de l'Agriculture et le WWF-Belgium a.s.b.l. 23. **CROW, J.F. Y K. AOKI 1984.** Group Selection for a Polygenic Behavioral Trait- Estimating the Degree of Population Subdivision . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 6073-6077.

- EGUIARTE, F.L.E. 1990.** Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. en Los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de Doctorado, Centro de Ecología/UACPYT, UN AM, México.
- Y D. PIÑERO. 1990.** Genética de la conservación: leones vemos, genes no sabemos. Fac. Ciencias UNAM, Rev. Ciencias, No 4: 34-47.
- FAY, M.F. 1994.** In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation?. Biodiversity and Conservation, 3, 176-187.
- GENTRY, H.S. 1982.** Agaves of Continental North America. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona. 670 pp.
- GROENEWALD, E.G., WESSELS, D.C.J., Y KOELEMAN, A. 1977.** Callus formation and subsequent plant regeneration from leed tissue of an *Agave* species (Agavaceae). Z. Pflanzen Physiol. 81: j69-j73.
- HAMRICK, J.L. , Y M.J.GODT. 1990.** Allozyme diversity in plant species. In: A.D.H. Brown, M.T.Clegg, A.W.Kahler, and B.Weir (eds.), Plant Population Genetics, breeding and genetic resources, 43-67. Sinauer, Sunderland, MA.
- HARTL D.L. Y A.G. CLARK. 1989.** Principles of Population Genetics. 2a. ed. Sinauer. Sunderland, Massachusetts.
- HEDRICK, D.W. 1983.** Genetics of Populations. Science Books, Int. Boston.
- HU, C.Y., Y P.J. WANG. 1983.** Meristem, Shoot, and Bud Culture. In: D.A. Evans et al., (Eds.), Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 1: 177-227.
- HUNAUULT, G. 1974.** Obtention de souches de tissus a partir de diversas especies de monocotylédones. Comp. Rend. Acad. Se]. Paris, Sér. D278: 2509-2512.
- JOHANSEN, D.A. 1940.** Plant microtechnique. McGraw 1-1111 Book Co. New York. 523pp.
- KWAK, M.M., P. KREMER, E. BOERRICHTER, AND C. VAN DEN BRAND. 1991.** Pollination of the rare species *Phyteuma nigrum* (Campanulaceae): Flight distances of bumblebees. Proceedings Experimental and Applied Entomology 2:131-136.
- MADRIGAL, L.R., F. PINEDA-ESTRADA, Y RODRIGUEZ DE LA O. 1990.** *Agave*. In: Handbook of Plant Cell Culture, Ammirato et al., (eds.). Vol, 5:206-227,

- MARTINEZ-PALACIOS, A. 1991.** Propagación masiva *in vitro* y recuperación de poblaciones de orquídeas en peligro de extinción. Tesis de maestría, Fac. Ciencias, UNAM. 100pp. **MARTINEZ-PALACIOS A., Y DELGADILLO-REYNOSO, G. 1991.** Micropropagation of Desert Mexican Endangered Plant Species (Cactaceae and Agavaceae). 1991 World Congress on Cell and Tissue Culture, Anaheim CA, USA.
- MISTRETTA, O. 1994.** Genetics of species re-introductions: applications of genetic analysis. *Biodiversity and Conservation*, 3: 184-190.
- MITTON, J.B. AND M.C. GRANT. 1984.** Associations among protein Heterozygosity, grow rate and Developmental homeostasis. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 15:479-499. **MURASHIGE, T. Y F. SKOOG. 1962.** A Revised Medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-494.
- NEI, M., MURAYAMA, T. Y CHAKRABORTY, R. 1975.** The Bottleneck Effect and Genetic Variability in Populations. *Evolution* 29: 1-10.
- NEI, M. 1973.** Analisis o gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 70:3321-3323,
1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- NOBEL, P.S., 1985.** Environmental Responses of Agaves a case study *with Agave deserti*. *En: Carlos Cruz, et al. (eds.), Biología y Aprovechamiento integral del Henequen y otros Agaves*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. 55-66.
1992. Annual variations in flowering percentage, seedling establishment and ramet production in a desert perennial. *Int. J. Plant Sci.* 153(1): 102-107.
- RAIJMANN, L.E.L., N.C. VAN LEEUWEN, R.KERSTEN, J.G.B. OOSTERMEIJER, H.C. DEN NIJS Y S.B.J. MENKEN. 1994.** Genetic Variation and Outcrossing Rate in Relation to *Population Size in Gentiana pneumonanthe L.* *Conservation Biolog.* 8(4): 1014-1026.
- RUBLUO, A., V. CHAVEZ Y A. MARTINEZ-PALACIOS. 1989.** *In vitro* seed germination and re-introduction of *Bletia urbana (orchidaceae)* in its natural habitat. *Lindleyana.* 4(2). 68-73.

, Y O. MARTINEZ-VAZQUEZ. 1993.

Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. Biological Conservation, 63: 163-169.

**SEDE SOL, 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.

**SOLTIS, D.E., C.H. HAUFLER, D.C. DARROW Y G.J. GASTONY. 1983.** Starch gel electrophoresis of ferns: An compilation of grinding buffers and staining schedules. Am Fern J. 73: 927.

**SWOFFORD, D.L., Y R.B. SELANDER. 1981.** A computer program for the analysis of allelic variation in genetics. Journal of Heredity 72:281-283.

**VALLEY, P. 1976.** Industrial Park JB-4 embedding Kit. Polysciences Inc, Printed in USA. **VAZQUEZ-**

**YANES, C. 1990.** Ecología y conservación de semillas. Fac. Ciencias UNAM, Rev. Ciencias, No. 4: 30-33

**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.

**WEIR, B.S. 1990.** Genetic data analysis. Sinauer Assoc. Sunderland, Massachusetts, USA. **WOCHOK, Z.S. 1981.** The role of tissue culture in preserving threateried and endangered plant species. Biological Conservation 20:83-89.

**WORKMAN, P.L. Y J.D. NISWANDER. 1979.** Population Studies on Southwestern Indian Tribes. II. Local Genetic Differentiation in the Papago. Amer. J. Hum. Genet. 22: 24-29. **WRIGHT, S. 1978.** Evolution and the Genetics of Populations, vol. 4: Variability within and among natural populations. University of Chicago Press, USA.

## Observación Periódica de las Estaciones (visitas a las estaciones o localidades de estudio)

27-Jun-96

<u>IdPoblacion</u>	<u>IdEstacion</u>	<u>IdObservacion</u>	<u>MesObservacion</u>	<u>Añoobservacion</u>
1	1	1	1	1995
1	2	2	1	1995
1	3	3	1	1995
1	4	4	1	1995
1	5	5	1	1995
1	6	6	1	1995
1	7	7	1	1995
1	8	8	1	1995
2	1	9	1	1995
3	1	10	2	1995
3	2	11	2	1995
3	3	12	2	1995
3	4	13	2	1995
3	5	14	2	1995
4	1	15	2	1995
5	1	16	2	1995
5	2	18	2	1995
6	1	19	2	1995
6	2	20	2	1995
7	1	21	2	1995
7	2	22	2	1995
7	3	23	2	1995
8	1	24	2	1995
8	2	25	2	1995

<u>IdPoblación</u>	<u>IdEstación</u>	<u>IdObservación</u>	<u>MesObservación</u>	<u>AñoObservación</u>
1	9	26	1	1995
1	10	28	1	1995
1	11	29	1	1995
1	12	30	1	1995
1	13	32	1	1995
1	14	34	1	1995
1	15	35	1	1995
9	1	37	9	1995
10	1	39	9	1995
2	2	41	9	1995

## Estación (características geográficas de las estaciones)

27-Jun-96

<u>IdPoblación</u>	<u>IdEstación</u>	<u>Latitud (grad,</u> <u>min y seg)</u>	<u>Longitud (grad,</u> <u>min y seg)</u>	<u>Altitud</u>	<u>Orientación (azimut)</u>	<u>Inclinación (respecto</u> <u>a la vertical)</u>
1	1	25 28 46	100 18 54	700	90	25
1	2	25 29 10	100 19 39	700	90	30
1	3	25 30 0	100 20 24	700	0	85
1	4	25 30 40	100 21 27	700	0	85
1	5	25 31 21	100 22 12	700	1	30
1	6	25 33 24	100 24 18	820	170	40
1	7	25 34 5	100 23 24	700	320	20
1	8	25 36 8	100 27 9	690	240	10
1	9	25 37 30	100 30 36	700	90	10
1	10	25 37 46	100 27 36	660	300	10
1	11	25 39 8	100 27 0	700	180	60
1	12	25 39 40	100 33 9	700	230	30
1	13	25 38 59	100 31 25	940	190	30
1	14	25 39 0	100 30 18	880	200	60
1	15	25 38 35	100 28 48	780	150	60

<u>IdPoblación</u>	<u>IdEstación</u>	<u>Latitud (grad. min y seg)</u>	<u>Longitud (grad. min y seg)</u>	<u>Altitud</u>	<u>Orientación(azimut)</u>	<u>Inclinación (respecto a la vertical)</u>
2	1	25 57 32	100 36 0	680	40	20
3	1	25 30 39	100 54 1	1440	42	60
3	2	25 30 35	100 53 35	1440	42	60
3	3	25 30 50	100 53 38	1470	270	60
3	4	25 30 59	100 53 26	1560	90	60
3	5	25 28 29	100 51 39	1740	10	60
4	1	25 21 20	102 29 9	1140	280	15
5	1	25 11 14	102 38 59	1110	159	20
5	2	25 12 26	102 39 41	1230	200	20
6	1	25 29 3	103 25 17	1500	340	15
6	2	25 29 5	103 26 2	1140	340	15
7	1	25 13 34	103 44 10	1260	50	30
7	2	25 13 5	103 44 43	1230	60	20
7	3	25 16 21	103 45 19	1270	30	25
8	1	26 8 16	102 45 2	1080	230	30
8	2	26 23 8	102 36 24	900	230	40
9	1	26 40 11	102 17 40	860	90	30

<u>IdPoblación</u>	<u>IdEstación</u>	<u>Latitud (grad. min y seg)</u>	<u>Longitud (grad. min y seg)</u>	<u>Altitud</u>	<u>Orientación (azimut)</u>	<u>Inclinación (respecto a la vertical)</u>
10	1	26 30 34	102 9 23	950	280	20
5	3	25 11 24	102 38 58	1350	50	50
2	2	25 56 53	100 34 54	630	40	40