

**MAESTRÍA EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**Biología de la reproducción y variación isoenzimática en  
*Tillandsia elongata* Kunth var. *subimbricata* (Baker) L. B. Sm. y  
*Tillandsia brachycaulos* Schldl. (Bromeliaceae), en el Parque  
Nacional de Dzibilchaltún, Yucatán, México**

**Tesis que presenta:**

**José Ulises González de la Cruz**

**Para obtener el grado de Maestro en Ciencias y  
Biotecnología de Plantas**

**Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.**

**Mérida, Yucatán, México  
2004**





## **DEDICATORIAS**

A mi esposa Ma. Concepción de la Cruz por su cariño, apoyo y por ser la persona con quien comparto mi vida en los buenos y malos momentos; y a mis dos hijas Sesilú y Sayuri por ser las personitas que ocupan un lugar especial en mi mente y corazón.

A mis padres Edilia de la Cruz Gómez y Omar González Martínez por su gran cariño y apoyo en todos los aspectos de mi vida; a mis hermanos Ma. Etelvina, Juan Carlos y Jesús Omar.

A Dios.

**"Recoger la sabiduría de  
otros también es de sabios"**  
Juan Guerra C.



## **AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo se realizó en la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., haciendo uso de sus instalaciones y equipo. Agradezco a las autoridades del CICY las facilidades que me brindaron para cursar este posgrado.

A mi directora de tesis Dra. Ivón Ramírez Mercedes Morillo por su infinita paciencia, asesorías y ayuda invaluable.

Al técnico Francisco Chi May, por sus observaciones, ayuda y sugerencias invaluable que enriquecieron este trabajo.

A los técnicos Filogonio May Pat, Paulino Simá Polanco, Julián Coello por sus sugerencias, ayuda y trabajos de campo y al biólogo Eduar Ciau Cardozo, por su ayuda en los trabajos de polen.

A Guadalupe Chuc Puc por su ayuda en campo, a Demetria Mondragón por sus comentarios y sugerencias, y al M. C. José Antonio González-Iturbe por sus comentarios y material facilitado.

A los técnicos, Lilia Can Itzá, Felipe Barredo y María Narváez, Celene Espadas Manrique, Silvia Hernández Aguilar y José Luis Tapia Muños, que contribuyeron con la realización de esta tesis.

A mi comité tutorial Dra. Ingrid Olmsted, Dr. Fabián Vargas, M. C. Nydia Pérez y al Dr. Germán Camevali, por sus valiosas sugerencias en el diseño y ejecución del proyecto.

Al CONACYT por la beca crédito (153765) que me otorgó para realizar mis estudios.

A la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, por la beca que me otorgó y apoyo.

A mis amigos de generación especialmente a Leticia Abdala, Jaime Martínez, Juan Manuel Zaldívar y Virginia Meléndez por su apoyo.

A las autoridades del Parque Nacional de Dzibilchaltún, por las facilidades que me otorgaron para realizar este trabajo.

A mis amigos MVZ. Gerald W. Herrera Castellanos y al MC. Enrique Pecero Covarrubias por su apoyo incondicional.

A los maestros que me dieron clases en el posgrado.

Al personal de la biblioteca y del centro de cómputo del CICY, por su ayuda y apoyo.



### **Abreviaturas usadas**

<b>AP</b>	Autopolinización
<b>PC</b>	Polinización Cruzada
<b>PA</b>	Polinización Automática
<b>AG</b>	Agamospermia
<b>PN</b>	Eficiencia Natural
<b>GDH</b>	Glutamato deshidrogenasa
<b>LAP</b>	Leucil aminopectidasa
<b>MDH</b>	Malato deshidrogenasa
<b>PGI</b>	Fosfoglucoisomerasa
<b>PGM</b>	Fosfoglucomutasa
<b>ACP</b>	Fosfatasa ácida
<b>PER</b>	Peroxidasa





## ÍNDICE

	Resumen	1
	Abstrac	3
	Introducción	5
	Bibliografía	7
<b>Capítulo 1</b>	Antecedentes	9
	Epifitismo	9
	Bromelias	10
	Género <i>Tillandsia</i>	11
	Especies de estudio	11
	<i>Tillandsia brachycaulos</i> Schtdl.	11
	<i>Tillandsia elongata</i> Kunth var. <i>subimbricata</i> (Baker) L. B.	12
	Sm.	
	Sitio de estudio	14
	Isoenzimas, estructura genética y ecología de la polinización	16
	Hipótesis	17
	Bibliografía	18
<b>Capítulo 2</b>	Biología floral y sistemas de cruzamiento en <i>Tillandsia brachycaulos</i> Schtdl. y en <i>T. elongata</i> Kunth var. <i>subimbricata</i> (Baker) L. B. Sm.	21
	Introducción	21
	Objetivos	21
	Objetivo general	25
	Objetivos específicos	25
	Materiales y métodos	25
	Estudios de biología foral	26
	Estudios de la biología de la polinización	26
	Resultados	30
	<i>Tillandsia elongata</i> Kunth var. <i>subimbricata</i> (Baker) L. B.	34
	Sm.	
	Estudios de biología floral	34
	Estudios de biología de la polinización	34
	Sistemas de apareamiento	35
	<i>Tillandsia brachycaulos</i> Schtdl.	35
	Estudios de biología floral	38
	Estudios de biología de la polinización	39
	Sistemas de apareamiento	40
	Comparación entre las dos especies	42
	Discusión	45
	Bibliografía	48
<b>Capítulo 3</b>	Variabilidad genética de <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i> y de <i>T. brachycaulos</i> en el Parque Nacional de Dzibilchaltún, Yucatán	51
	Introducción	51
	Objetivos	55
	Objetivo general	55

	Objetivos específicos	55
	Materiales y métodos	56
	Colecta de material de campo	56
	Trabajo de laboratorio (macerar y almacenar)	56
	Análisis de datos	57
	Lectura de zimogramas	57
	Variación genética	57
	Estructura genética	59
	Tasa de migración (Nm)	61
	Resultados	62
	Sistemas enzimáticos de <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i>	62
	Variación genética	64
	Estructura genética	65
	Sistemas enzimáticos de <i>Tillandsia brachycaulos</i>	66
	Variación genética	69
	Estructura genética	71
	Discusión	76
	Bibliografía	79
<b>Capítulo 4</b>	Discusión general, conclusiones y perspectivas	81
	Discusión general	81
	Conclusión	85
	Perspectivas	87
	Bibliografía	88
<b>Anexo</b>	Receta para la preparación de buffer de extracción	89
	Sistemas de corrida	89
	Formulaciones para tinciones histoquímicas	89

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1</b>	Principales diferencias morfológicas y ecológicas entre <i>Tillandsia brachycaulos</i> y <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i>	13
<b>Cuadro 2</b>	Resultado de los cruces controlados en <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i> , indicando número de flores tratadas, número de frutos obtenidos y porcentajes de fructificación. Los literales con la misma letra no difieren estadísticamente ( $X^2=3.84$ )	36
<b>Cuadro 3</b>	Comparación de los índices fertilidad, auto compatibilidad y autogamia basados en número de frutos y semillas en <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i>	36
<b>Cuadro 4</b>	Número promedio de semillas producidas por cruce en <i>Tillandsia elongata</i> var <i>subimbricata</i>	37
<b>Cuadro 5</b>	Porcentaje de germinación para cada tratamiento de polinización en <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i>	37
<b>Cuadro 6</b>	Eficiencia natural de <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i>	38
<b>Cuadro 7</b>	Resultado de los cruces controlados en <i>Tillandsia brachycaulos</i> , indicando número de flores tratadas, número de frutos obtenidos y porcentajes de fructificación. Los literales con la misma letra no difieren estadísticamente ( $X^2=3.84$ )	40
<b>Cuadro 8</b>	Índices de fertilidad, auto compatibilidad y autogamia en <i>Tillandsia brachycaulos</i> , en el año 2001, basados en la producción de semillas (s) y frutos (f)	40
<b>Cuadro 9</b>	Número promedio de semillas producidos por cruce de <i>Tillandsia brachycaulos</i> . Los literales con las mismas letras, no representan diferencias significativas según las pruebas estadísticas aplicadas (ver texto)	41
<b>Cuadro 10</b>	Porcentaje de germinación para cada tratamiento de polinización en <i>Tillandsia brachycaulos</i>	41
<b>Cuadro 11</b>	Eficiencia natural de <i>Tillandsia brachycaulos</i>	42
<b>Cuadro 12</b>	Índices de fertilidad, auto compatibilidad y autogamia basado en frutos producidos (f) y semillas producidas (s) en los cruces de autopolinización y polinización cruzada, en <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i> y <i>Tillandsia brachycaulos</i>	44
<b>Cuadro 13</b>	Enzimas, abreviación y estructura cuaternaria que se ensayaron en <i>Tillandsia brachycaulos</i> y <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i>	57
<b>Cuadro 14</b>	Frecuencias alélicas, número de alelos por loci y heterocigosis observada en plantas de <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i> en el Parque Nacional de Dzibilchaltún. El número en paréntesis es la cantidad de individuos ensayados para cada población.	64
<b>Cuadro 15</b>	Variabilidad genética de siete loci en las tres subpoblaciones de <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i>	65
<b>Cuadro 16</b>	Índice de fijación de Wright por locus para plantas de <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i> en el Parque Nacional de Dzibilchaltún. N es el número de plantas ensayadas y K el número de alelos	65

<b>Cuadro 17</b>	Estadístico F para tres subpoblaciones de plantas de <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i> en el Parque Nacional de Dzibilchaltún. N es el tamaño de la muestra	66
<b>Cuadro 18</b>	Frecuencias alélicas, número de alelos por loci y heterocigosis observada en plantas de <i>Tillandsia brachycaulos</i> en el Parque Nacional de Dzibilchaltún. El número en el paréntesis es la cantidad de plantas ensayadas para cada subpoblación.	69
<b>Cuadro 19</b>	Variabilidad genética de diez loci en las tres subpoblaciones de <i>Tillandsia brachycaulos</i>	70
<b>Cuadro 20</b>	Índices de fijación de Wright por locus para plantas de <i>Tillandsia brachycaulos</i> en el Parque nacional de Dzibilchaltún. N es el número de plantas ensayadas y K es el número de alelos.	71
<b>Cuadro 21</b>	Estadístico F para las tres subpoblaciones de plantas de <i>Tillandsia brachycaulos</i> en el Parque Nacional de Dzibilchaltún. N es el tamaño de la muestra.	72
<b>Cuadro 22</b>	Diversidad genética determinada por aloenzimas en plantas leñosas con características diferentes	75
<b>Cuadro 23</b>	Estimadores de diversidad genética en los únicos estudios que han realizado de la familia Bromeliaceae	76
<b>Cuadro 24</b>	Cuadro comparativo de los resultados de la biología de la reproducción y de la variación genética de <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i> y <i>Tillandsia brachycaulos</i>	82

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<i>Tillandsia brachycaulos</i> (Foto por Ivón Ramírez)	12
<b>Figura 2</b>	<i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i> (Foto por Ivón Ramírez)	13
<b>Figura 3</b>	Principales edificaciones mayas reconstruidas en el parque Nacional de Dzibilchaltún con la ubicación de las parcelas de estudio para cada una de las especies	16
<b>Figura 4</b>	Volumen y concentración total de azúcares del néctar, colectado en flores de <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i> durante el periodo de floración 2001, para flores protegidas con bolsas y flores sin proteger. [Cada punto representa el promedio de 6 flores, en dos días de muestreo].	35
<b>Figura 5</b>	Cantidad de néctar y concentración (grados Brix) en <i>Tillandsia brachycaulos</i> en el periodo de floración del 2001, en flores protegidas y no protegidas.	39
<b>Figura 6</b>	Comparación de la cantidad y concentración de azúcares totales del néctar en <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i> y <i>Tillandsia brachycaulos</i> en flores embolsadas y sin embolsar.	42
<b>Figura 7</b>	Concentración total de azúcares (° Brix) de <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i> y <i>T. brachycaulos</i> en flores embolsadas y sin embolsar.	43
<b>Figura 8</b>	Zimograma de los patrones de variación de la enzima ACP ensayadas en 3 poblaciones de <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i> en el Parque Nacional de Dzibilchaltún	62
<b>Figura 9</b>	Zimograma de los patrones de variación de la enzima PER ensayadas en 3 poblaciones de <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i> en el Parque Nacional de Dzibilchaltún	62
<b>Figura 10</b>	Zimograma de los patrones de variación de la enzima PGM ensayadas en 3 poblaciones de <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i> en el Parque Nacional de Dzibilchaltún	63
<b>Figura 11</b>	Zimograma de los patrones de variación de la enzima PGI ensayadas en 3 poblaciones de <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i> en el Parque Nacional de Dzibilchaltún	63
<b>Figura 12</b>	Zimograma de los patrones de variación de la enzima LAP ensayadas en 3 poblaciones de <i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i> en el Parque Nacional de Dzibilchaltún	63
<b>Figura 13</b>	Zimograma de los patrones de variación de la enzima ACP ensayadas en 3 poblaciones de <i>Tillandsia brachycaulos</i> en el Parque Nacional de Dzibilchaltún	67
<b>Figura 14</b>	Zimograma de los patrones de variación de la enzima PER ensayadas en 3 poblaciones de <i>Tillandsia brachycaulos</i> en el Parque Nacional de Dzibilchaltún	67
<b>Figura 15</b>	Zimograma de los patrones de variación de la enzima MDH ensayadas en 3 poblaciones de <i>Tillandsia brachycaulos</i> en el Parque Nacional de Dzibilchaltún	68
<b>Figura 16</b>	Zimograma de los patrones de variación de la enzima PGM ensayadas en 3 poblaciones de <i>Tillandsia brachycaulos</i> en el Parque Nacional de Dzibilchaltún	68
<b>Figura 17</b>	Zimograma de los patrones de variación de la enzima PGI ensayadas en 3 poblaciones de <i>Tillandsia brachycaulos</i> en el Parque Nacional de Dzibilchaltún	68
<b>Figura 18</b>	Zimograma de los patrones de variación de la enzima LAP	69

ensayadas en 3 poblaciones de *Tillandsia brachycaulos* en el  
Parque Nacional de Dzibilchaltún

## RESUMEN

Se estudiaron aspectos de la biología floral y sistema de cruzamiento, así como la variación y estructura genética mediante, datos morfológicos e isoenzimáticos de tres poblaciones de *Tillandsia brachycaulos* Schlttdl. y tres poblaciones de *T. elongata* Kunth var. *subimbricata* (Baker) L. B. Sm., en el Parque Nacional de Dzibilchaltún, Yucatán, México; *Tillandsia brachycaulos* y *T. elongata* var. *subimbricata* son especies simpátricas, ambas son epífitas y constituyen un importante componente de la flora local en selvas bajas caducifolias al norte de la Península de Yucatán. Se observaron diferencias entre las dos especies en diversos aspectos de su estrategia de vida: *Tillandsia brachycaulos* tiene una abundancia relativa mayor que la otra especie, crece sobre varias especies de forofito y es más abundante en sitios sombríos, los genets están formados por varias rosetas donde mediante crecimiento basal o axilar, se forman nuevas rosetas. Por el otro lado, *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* tiene una distribución diferente, ya que forma parches en sitios más expuestos con un mayor número de especies de forofito y el reclutamiento de nuevos individuos es principalmente vía semillas. Ambas especies presentan una morfología y biología floral que sugiere la ornitofilia como síndrome de polinización, se observaron colibríes libando en flores *T. brachycaulos*, además de individuos de *Apis mellifera*. Sin embargo, la antesis diurna de *T. brachycaulos* y la crepuscular de *T. elongata* var. *subimbricata*, las diferencias en la morfología floral en lo que respecta a la exposición de los estambres y el estigma (exsertos en *T. brachycaulos* e insertos en la otra especie) así como diferencias en la cantidad de néctar que producen (*T. brachycaulos* produce en promedio 4.6  $\mu$ l y *T. elongata* var. *subimbricata* 1.050  $\mu$ l), sugieren que no hay solapamiento en el uso de los polinizadores. Ambas especies presentan un índice de eficiencia natural y de germinación de polen alto, también un porcentaje similar de concentración total de azúcares en el néctar (28 %) y una relación polen/óvulo baja, mientras que *Tillandsia brachycaulos* presenta una incompatibilidad parcial, *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* resultó ser autógena con una autocompatibilidad completa. En ambas especies no hay efecto evidente de consanguinidad, basados en el número de frutos, número de semillas y porcentaje de germinación de semillas de frutos producidos por autopolinización y por polinización cruzada. Las dos especies mostraron niveles altos de variación genética, con un 100% de loci polimórficos y similar número de alelos efectivos (4), *T. brachycaulos* presentó un valor de 0.501 para la heterocigosis observada y *T. elongata* var. *subimbricata* de 0.377; en las dos especies se observó una cantidad considerable de homocigotos, lo que sugiere que la autogamia puede estar jugando un papel importante en la evolución de la estructura y variación genética de las poblaciones de éstas especies. Los índices de fijación ( $F_{is}$  and  $F_{st}$ ) sugieren que la autogamia ejerce una presión importante sobre las dos especies. La tasa de migración efectiva fue mayor en *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* (3.782), lo que indica que hay una eficiente migración entre las poblaciones de esta especie, y esto se debe posiblemente a la dispersión de semillas y al mayor número de semillas producidas por planta; *T. brachycaulos* obtuvo un valor de 1.450, lo que sugiere una migración más baja, tal vez por el crecimiento vegetativo en la especie. Los resultados de la morfología, biología floral y estrategias reproductivas, así como de los estudios de variación y estructura genética de estas dos bromelias epífitas, y parámetros demográficos, nos dan nuevos elementos para entender de mejor manera las historias de vida de

las dos especies, sugiriendo que en *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*, la dispersión de semillas y en *T. brachycaulos*, el crecimiento vegetativo, son de gran importancia para el mantenimiento de sus poblaciones.



## ABSTRACT

Floral biology, breeding systems, and genetic structure and variation, were studied in two epiphytic species: *Tillandsia brachycaulos* and *T. elongata* var. *subimbricata* in the National Park of Dzibilchaltún, Yucatán, México. *Tillandsia brachycaulos* y *T. elongata* var. *subimbricata* are sympatric species; both are epiphytes and are an important component the flora in low caducifolious forest at the northern area of the Yucatan Peninsula. Both species differ on several aspects of their life history: *Tillandsia brachycaulos* has a relative higher abundance than the other species, grows on several host species and it is more abundant on shady places, genets are conformed by several rosettes and through vegetative grown new rosettes are added on axillary or basal position to the flowering rosette. On the other hand, *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* has a different distribution pattern since the rosettes tend to be solitary (rarely produce new rosettes on axillary or basal position), they form patches on exposed (not shady) places of few species (not several) phorofite species, the recruitment of new individuals is mainly through seeds. Both species present a floral morphology that suggest ornitophily as the pollination syndrome, and even though several hummingbirds' individuals were observed feeding on nectar, *Apis mellifera* individuals were observed on sexual organs of flowers of *T. brachycaulos*. Nevertheless, diurnal anthesis of *T. brachycaulos* flowers and crepuscular anthesis on *T. elongata* var. *subimbricata*, differences on floral morphology (exserted sexual organs on the first and included in the second), differences in the quantity on nectar produced (*T. brachycaulos* produce has an average 4.6  $\mu$ l and *T. elongata* var. *subimbricata* 1.050  $\mu$ l), suggest that there is not overlapping on pollinator usage. Both species present a high natural efficiency index and pollen germination rate, similar percentage of total sugar concentration of nectar (28 %), and a low pollen/ovule ratio. *Tillandsia brachycaulos* presents a partial incompatibility; *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* is autogamous with a complete self compatibility. In both species there is not breeding depression effect based on fruit production, number of seeds, and seed germination on fruits produced by selfing and cross pollination. Both species showed high levels of genetic variation with 100% of polymorphic loci, similar number of effective alleles (4); *Tillandsia brachycaulos* showed a value of 0.501 for observed heterocigocity and 0.377 in *T. elongata* var. *subimbricata*, as well as a relatively high homocogocity level, suggesting that selfing in playing an important role in the evolution of these species. Fixation indexes ( $F_{is}$  and  $F_{st}$ ) suggest that endogamy is playing an important role at population level on both species. Effective migration rate was higher in *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* (3.782) than in *T. brachycaulos* (1.450), which is probably related to the higher recruitment by seed of the first species compared to the second by vegetative growth (production of new rosettes). Results indicate that the differences on floral biology, breeding systems, demographical parameters, and genetic variation of these species are highly correlated with their life history traits.



## INTRODUCCION

La polinización es el primero de una serie de procesos que conducen a la reproducción sexual de las plantas superiores. El campo de la ecología de la polinización, sin embargo, abarca todos los procesos ecológicos que intervienen en la reproducción de una planta, desde la producción de flores hasta la fecundación de los óvulos (Murcia, 2002). El polen puede ser llevado de las anteras al estigma por medios abióticos o bióticos. La polinización abiótica tiene lugar por la acción del viento o del agua y la biótica por animales.

Prácticamente cerca del 99% de las plantas de los bosques húmedos tropicales son polinizadas por animales (Bawa, 1990). En término del número de especies que polinizan, los vectores más importantes en orden decreciente son: abejas, abejorros, aves, escarabajos, polillas, murciélagos y mariposas (Bawa *et al.*, 1985; Ramírez, 1989, Kress & Beach, 1994). En el Neotrópico, la importancia relativa de los polinizadores varía según el estrato del bosque y de un ecosistema a otro, así como de un lugar a otro (Bawa *et al.*, 1985; Ramírez, 1989; Kress & Beach, 1994; Momose *et al.*, 1998).

La gran diversidad de formas, tamaños, colores y olores de las flores polinizadas por animales, refleja la gran diversidad de interacciones planta-polinizador que pueden existir (Murcia, 2002). Existe un cierto grado de correspondencia entre la forma, fragancia y el color de una flor y el tipo de animal que la visita y en ocasiones poliniza (Momose *et al.*, 1998; Murcia, 2002), lo que permite agruparlos bajo síndrome de polinización (Murcia, 2002). Por ejemplo, el síndrome de la ornitofilia comprende flores tubulares, sin fragancias, rojas, naranjas, amarillas o morado intenso que son polinizadas por aves (Benzing, 1980; Bernardello *et al.*, 1991; Murcia, 2002). Este síndrome es uno de los más importantes en la familia Bromeliaceae (Utley, 1994; Gardner, 1986; Bernardello *et al.*, 1991).

En la familia Bromeliaceae se han realizado diversas investigaciones. Por ejemplo, las relacionadas con la ecología de la polinización donde se ha estudiado aspectos de biología floral, biología y ecología de polinización y estrategias reproductivas (Salas, 1973; Bernardello *et al.*, 1991; Galletto & Bernardello, 1992; Sazima *et al.*, 1995), se han hecho revisiones muy completas donde se recaba información de los aspectos reproductivos de la bromelias (Martinelli, 1994), el entrecruzamiento, floración y fructificación a diferentes alturas; dispersión y germinación de las semillas (García-Franco, 1990), así como investigaciones relacionadas con la distribución espacial, la variación y estructura genética de las poblaciones (Murawski & Hamrick, 1990; Izquierdo, 1995; Izquierdo & Piñero, 1998; Sarthou *et al.*, 2001).

Los miembros de la familia Bromeliaceae tienen diversos hábitats, desde terrestres como la mayoría de los miembros de la subfamilia Pitcairnioideae, hasta epífitos como en la mayoría de los miembros de las Tillandsioideae. La subfamilia Bromelioideae comprende miembros en los dos tipos de hábitats. Adaptaciones a cada uno de los hábitats principalmente al medio epífita extremo, han sido el foco de estudio en esta familia, estudios meramente morfológicos descriptivos, estudios de los mecanismos fotosintéticos y evolución del CAM, así como los patrones evolutivos de ciertos caracteres ligados a cada tipo de hábitat.

El hábitat de las epífitas se presenta en parches, es inestable, y ofrece una serie de restricciones físicas para el desarrollo de estas plantas, por ejemplo: sequías pronunciadas, fuertes vientos, escasez de nutrientes, irradiación intensa, alelopatía y una fuerza constante contra la gravedad (Zotz & Andrade, 2002). En estos ambientes aquellas especies que dependan menos de agentes polinizadores, tendrán mayores posibilidades de dejar descendencia, ya que, la autofertilización y la propagación vegetativa son alternativas reproductivas comunes en las epífitas, que garantizan el éxito a corto plazo (Izquierdo, 1995). En consecuencia, es de esperar la evolución de sistemas genéticos que favorezcan una rápida diferenciación entre poblaciones pequeñas a través de la autocompatibilidad, retención de compatibilidad interespecífica y algunas veces de la poliploidía. Estas características son frecuentes en las epífitas (Bawa & Ashton 1991).

Gentry y Dodson (1987) de acuerdo a Izquierdo (1995), encontraron en comunidades de tierras bajas tropicales que las especies epífitas presentaban mayores niveles de autocompatibilidad y autogamia que las terrestres. Los altos niveles de endogamia pueden no ser importantes en los efímeros hábitats que explotan la mayoría de estas plantas (Izquierdo, 1995). La dinámica temporal de los ambientes a los que se asocian las epífitas provoca constante reducciones en el tamaño poblacional (Benzing 1981). En esta situación las especies autóгамas tendrán mayor probabilidad de dejar descendencia (Karron, 1991). En la subfamilia Tillandsioideae (Bromeliaceae) donde la mayoría de las especies que la forman son epífitas, encontramos *Tillandsia recurvata* (L.) L. la cual se autopoliniza debido al arreglo de sus órganos sexuales (insertos dentro de la corola de la flor), presenta baja variabilidad genética intrapoblacional, y una alta diferenciación genética entre poblaciones, esto debido a los efectos de la endogamia (Soltis *et al.* 1987). Resultados similares fueron encontrados por Kress *et al.* (1990 a, b) donde la estrategia reproductiva de tres especies de *Tillandsia* se refleja en la diversidad genética de las mismas.

El presente estudio plantea investigar la morfología y biología floral, biología y ecología de la polinización, así como las estrategias reproductivas, además, la variación y estructura genética de tres poblaciones de *Tillandsia elongata* Kunth var. *subimbricata* (Baker) L. B. Sm. y *Tillandsia brachycaulos* Schlttdl, especies epífitas, con estrategias de vida diferentes y contrastantes, y compararlas con la variación isoenzimática, en el parque Nacional de Dzibilchaltún.

Estas dos especies nos servirán como modelos para comparar los niveles de variación genética en las especies que presentan diferencias en la morfología y biología floral, en la estrategia reproductiva y en la historia de vida.

## BIBLIOGRAFIA

**Bawa, K. S., D. R. Perry, Beach.** 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain florets trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanisms. *American Journal of Botany*. 75: 331-345.

**Bawa, H. S.** 1990. Plant-pollinator interactions in tropical rain forest. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 21: 399-422.

**Bawa, K. S. & P. S. Ashton.**1991. Conservation of rare trees in tropical rain forest: a genetic perspective. Pp. 62-71. In: D Falk and K. Holsinger (eds), Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press, NY.

**Benzing, D. H.** 1980. The Biology of Bromeliads. Eureka, CA. Mad River Press. Pp 305-436.

**Benzing, D. H.** 1981. The population dynamics of *Tillandsia circinnata* (Bromeliaceae): cypress crown colonies in southern Florida. *Selbyana* 5: 256-263.

**Bernardello, L. M., L. Galletto and H. R. Juliani.** 1991. Floral nectar, nectary structure and pollinators in some Argentinian Bromeliaceae. *Annals of Botany* 67: 401-411.

**Galletto, L. and L. M. Benardello.** 1992. Extrafloral nectaries that attract ants in Bromeliaceae: structure and nectar composition. *Can. J. Bot.* 70:1101-1106

**García-Franco, J. G.** 1990. Biología reproductiva de *Tillandsia deppeana* Steudel. (Bromeliaceae). Tesis de Maestría, UNAM. Facultad de Ciencias Biología.

**Gardner, C. S.** 1986. Inferences about pollination in *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Selbyana* 9:76-86.

**Gentry, A. & C. H. Dodson.**1987. Diversity and biogeography of Neotropical vascular epiphytes. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 74: 205-233.

**Izquierdo, L.** 1995. Estructura y variación genética en 4 especies de *Aechmea* (Bromeliaceae) en México: *A mexicana* Baker, *A lueddemanniana* K. Koch, *A macvaughii* L.B. Smith y *A. tuitensis* P. Magaña & E. Lott. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México. Centro de Ecología UACP Y P-CCH.

**Izquierdo, L. & D. Piñero.** 1998. Allozyme divergente among four species of *Podaechmea* s. l. and the status of *Ursulaea* (Bromeliaceae, Bromelioideae). *Plant Systematics and Evolution*. 213: 207-215.

**Karron, J. D.** 1991. Breeding systems and levels of inbreeding depression in geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae) *American Journal of Botany*. 76:331-340

**Kress, W. J.; H. E. Luther, and C. S. Roesel.** 1990a. Genetic Variation in three Species of Florida *Tillandsia*. *The Journal of the Bromeliad Society*. 40: 59-63.

- Kress, W. J.;** H. E. Luther & C. S. Roesel. 1990b. Genetic variation in three species of Florida *Tillandsia* (concluded). *The Journal of the Bromeliad Society*. 40: 109-111
- Kress, W. J. & J. H. Beach.** 1994. Flowering plant reproductive systems. Pp. 161-182 en L. A. McDade, K S. Bawa, G. S. Harstshorn & H. A. Hespenhide (Eds. ) *La Selva: Ecology and natural history of a neotropical rain forest*. The University of Chicago Press. USA.
- Martinelli, G.** 1994. Reproductive biology of Bromeliaceae in the Atlantic Rainforest of Southeastern Brazil. Tesis doctoral, School of Biological and Medical Sciences University of St. Andrews. pp 23-67
- Momose, K., T. Yumoto, T. Nagamitsu, M. Kato & T. Inoue.** 1998. Pollination biology in a lowland dipterocarp forest in Sarawak, Malaysia. I. Characteristics of plant-pollinator community in a lowland dipterocarp forest. *American Journal of Botany*. 85: 1477-1501.
- Murawski, A. D. and Hamrick, J. L.** 1990. Local genetic and clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad; *Aechmea magdalenae*. *American Journal of Botany*: 1210-1208.
- Murcia, C.** 2002. Ecología de la polinización. En: Ecología y conservación de bosques Neotropicales. En: Guariguata M. R. y G. H. Cattán (eds:). Libro Universitario Regional. Costa Rica. pp 493-529
- Ramírez, N.** 1989. Biología de polinización en una comunidad arbustiva tropical de la alta Guayana Venezolana. *Biotropica* 21(4): 319-330.
- Salas, B.** 1973. Una Bromeliaceae Costarricense polinizada por murciélagos. *Brenesia* 2: 5-10
- Sarthou, C., Samadi S. and M. Boisselier- Dubayle** 2001. Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. *American Journal of Botany* 88: 861-868.
- Sazima, M., Buzato, S and Sazima, I.** 1995. Bat pollination of *Encholirium glaziovii*, a terrestrial bromeliad. *Plant Systematics and Evolution*. 168: 167-179.
- Soltis, D. E.;** A. J. Gilmartin; L. Reiseberg & S. Gardner. 1987. Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia elongata* and *T. recurvata* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany*. 74: 531-537.
- Zotz, G. & J. L. Andrade.** 2002. La ecología y la fisiología de las epífitas y las hemiepífitas. En: Ecología y conservación de bosques Neotropicales, Guariguata M. R. & H. Cattán (Edts.). Libro Universitario Regional. Costa Rica. Pp. 271-290.

## CAPITULO 1

### ANTECEDENTES

#### EPIFITISMO

Las epífitas vasculares constituyen un importante componente de la flora de los bosques tropicales (Zotz & Andrade, 2002) contribuyendo con la diversidad y riqueza de éstos bosques (Dodson & Gentry, 1987; Zotz & Andrade, 2002). Su abundancia es tal que en algunos bosques tropicales equivale al 50% de la riqueza total de las plantas vasculares (Zotz & Andrade, 2002). En general, los bosques nublados o mesófilos de elevación intermedia, son los que exhiben mayor cantidad de plantas epífitas (Dodson & Gentry 1987; Benzing, 1990).

Las epífitas se desarrollan sobre otras plantas conocidas como hospederos pero sin tener ningún contacto metabólico con ellas, es decir, no son plantas parásitas (Benzing, 1990; Mondragón, 2001; Zotz & Andrade, 2002). Las epífitas pasan total o parcialmente su ciclo de vida unidas a otra planta, y así, se subdividen en holoepífitas y hemiepífitas. Las hemiepífitas presentan el comportamiento de epífitas al inicio o al final de su ciclo de vida; por el contrario, las holoepífitas o epífitas verdaderas, pasan todo su ciclo de vida sobre el hospedero el cual puede ser árbol, roca, cactus, arbusto, poste y alambre de energía eléctrica, etc. (Benzing, 1990; Zotz & Andrade, 2002).

Las plantas epífitas comienzan su ciclo de vida en un ambiente, biológica y físicamente, más diverso que el mismo suelo de un bosque. Los sustratos y ambientes donde crecen las epífitas, presentan severas restricciones, son hábitats discontinuos e inestables (Benzing, 1981; 1990; Zotz & Andrade, 2002), con temporadas de sequías pronunciadas, con fuertes vientos al grado de huracanes, escasez de nutrimentos, irradiación intensa o altos niveles de oscuridad, alelopatía y una lucha constante contra la fuerza de gravedad (Zotz & Andrade, 2002). Para contrarrestar todos estos factores y ser exitosas, las epífitas recurren a una enorme diversidad morfológica, ecológica y fisiológica (Benzing, 1981; 1994; 2000; Zotz & Andrade, 2002).

Estos hábitats extremos seguramente han ejercido una presión particular en la evolución de plantas con esta forma de vida. Esto se puede comprobar con la presencia de especies epífitas en más de 80 familias indicando, que el epifitismo ha evolucionado varias veces en forma independiente (Kress, 1989). Cerca de un 10% de todas las plantas vasculares son epífitas (Kress, 1989; Benzing, 1990).

## BROMELIAS

La familia de las Bromelias pertenece al grupo de las plantas epífitas vasculares con flores, ocupan el segundo lugar en número de especies con este hábito por debajo de la familia Orchidaceae (Kress, 1989). La familia Bromeliaceae se distribuye en el Neotrópico y esta compuesta por más de 50 géneros y alrededor de 2,500 especies de donde 1,350 (45%) son epífitas. La familia Bromeliaceae está restringida al continente Americano, excepto por una sola especie: *Pitcairnia feliciana* (Chevalier) Harms & Mildbraed, la cual se encuentra al oeste del continente Africano (Smith & Downs, 1979; Benzing, 1990). La familia Bromeliaceae, en particular, le confiere una fisonomía característica a muchas comunidades de epífitas del bosque neotropical (Benzing, 1990).

La familia Bromeliaceae esta subdividida en tres subfamilias, basado principalmente en las características morfogeográficas: Pitcairnioideae, Tillandsioideae y Bromelioideae (Smith & Downs, 1974; Judd *et al.*, 1999), estas dos ultimas cuentan con mayor número de especies epífitas. Miembros de la subfamilia Pitcairnioideae se caracterizan por el margen foliar espinoso, ovario superior, una cápsula deshiciente, semillas sin apéndices plumosos y dispersas por el viento o gravedad, hábito predominantemente terrestre y centro de diversidad en las partes altas de la Guayana. Miembros de la subfamilia Tillandsioideae tienen hojas con margen entero, ovario superior, una cápsula deshiciente, semillas con apéndices plumosos dispersadas por el viento, hábito mayormente epífito y centro de diversidad en los Andes y México. Los miembros de la subfamilia Bromelioideae poseen características como margen foliar espinoso, ovario ínfero, una baya indehisciente, semillas desnudas dispersadas por animales, pájaros y murciélagos, hábito epifito, y centro de diversidad Sureste de Brasil (Benzing, 2000).

La adaptación, conquista y expansión en el hábito epifito por miembros de la familia Bromeliaceae, se ve facilitado por la presencia de una serie de características adaptativas como son: brácteas o flores muy coloridas para atraer a sus posibles agentes polinizadores y dispersores, alto porcentaje de germinación de semillas, como lo demuestran estudios de germinación en condiciones controladas de laboratorio en *Tillandsia circinnata* Schldl., con una tasa de germinación del 80-90% (Benzing, 1978) o en *Tillandsia brachycaulos* Schldl. con un 100% de germinación a los 15 días de siembra (Mondragón, 2001); dispersión de semillas por el viento, en *Tillandsia deppeana* Steud., las semillas se mueven a unos 35 metros de distancia de la planta madre (García & Rico-Gray, 1988) y en *Tillandsia brachycaulos* las semillas se dispersan a una distancia de 10-15 metros a una altura de 4.5 metros del suelo; crecimiento clonal (Mondragón, 2001); presencia de tricomas peltados; mecanismo fotosintético C<sub>3</sub> o CAM; estrategias tipo tanque y atmosférico, entre otras. Las especies con frutos no dehiscentes y que sus semillas no se dispersan por el viento, recurren a estrategias como producir frutos de colores atractivos, de diferentes formas, tamaños y diferentes concentraciones de azúcares, como los miembros de la subfamilia Bromelioideae; todos estos factores sugieren una dispersión por animales (aves, mamíferos) (McWilliams 1974). Algunas especies de *Billbergia* Thunb., en especial *Billbergia zebrina* (Herb.) Lindl., producen frutos los cuales despiden olores muy fuertes y sus frutos son dispersados por un murciélago *Glossophaga soricina* (Harms, 1930 citado por Martinelli, 1994).



## GENERO *Tillandsia*

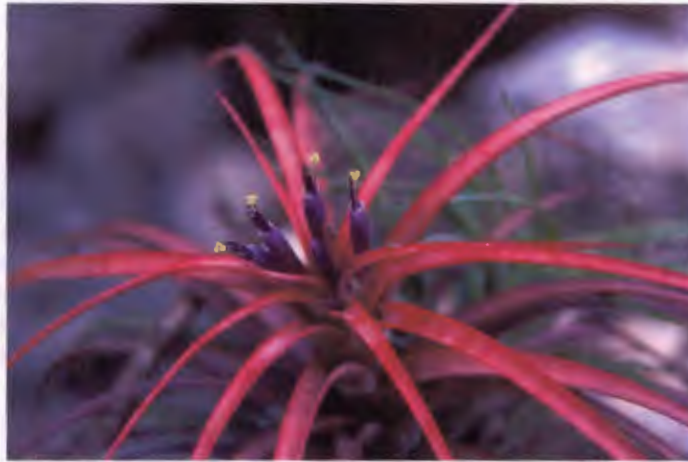
Miembros del género *Tillandsia* se distribuyen en el Neotrópico, son mayormente plantas epífitas (Soltis *et al.*, 1987; Benzing, 2000). Este género abarca cerca de 400 a 500 especies distribuidas desde Estados Unidos, México, Centro y Sur América. Las principales características que las identifican son: las hojas se presentan en rosetas o a veces a lo largo de un tallo, las inflorescencias pueden ser de varios tipos y con flores de diversos colores, inflorescencias alargadas o cortas (como en *Tillandsia brachycaulos* (Smith & Downs, 1977, Mondragón, 2001) o hasta varios centímetros (50cm) como en *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* (Baker) L. B. Sm (obs. per.), flores actinomorfas o zigomorfas, sépalos convolutos libres o más o menos connados, pétalos desnudos o apendiculados, estambres con filamentos libres o adnatos a los pétalos o raramente connados en un tubo, ovario superior o casi, estambres y estigma exertos, el fruto es una cápsula dehiscente, semillas plumosas con apéndices caudados finamente divididos y formando una coma (Smith 1971, 1974).

## ESPECIES DE ESTUDIO

### *Tillandsia brachycaulos* Schltdl.

*Tillandsia brachycaulos* (Figura 1), es una planta epífita o litófito, se distribuye desde el sureste de México, América Central, Panamá, Costa Rica, Honduras (Smith & Downs, 1977) y Venezuela (Ramírez & Carnevali, 1994). En México se distribuye en los estados de Campeche, Querétaro, Quintana Roo, Tabasco, Veracruz y Yucatán (Smith & Downs, 1977; Isley, 1987). La planta es herbácea, arrosada, de 12-26 cm de altura, acaule, con hojas triangulares, las cuales toman un color rojo intenso cuando entran en floración, la planta tiene la capacidad de reproducirse por semillas (Mondragón, 2001) y producir rosetas hijas en la base de la roseta o axilas foliares.

Las flores de *Tillandsia brachycaulos* son tubulares, de 3-4 cm largo, con la corola morada, pistilo y estambres exertos. Sus rosetas son monocárpicas, mueren una vez que el evento de la reproducción ha pasado, aproximadamente pasan de un año a año y medio para que esto ocurra. La inflorescencia es una panícula que emerge por encima de la roseta aunque con un escapo muy corto (Mondragón, 2001). Las características florales como forma tubular de la flor, coloración de las brácteas florales, flores sin fragancias y de anthesis diurna, sugieren ornitofilia. La planta se puede encontrar en matorrales xerófilos, selva baja caducifolia, selva mediana decidua, selva mediana subcaducifolia y selva mediana subperennifolia. La floración es entre junio y julio y los periodos de fructificación entre noviembre a marzo.



**Figura 1.** *Tillandsia brachycaulos* (Foto por Ivón Ramírez)

***Tillandsia elongata* Kunth var. *subimbricata* (Baker) L. B. Sm.**

*Tillandsia elongata* var. *subimbricata* (Figura 2) se distribuye desde México, Jamaica, Perú y el norte de Brasil. Las plantas son subterrestres o epífitas, y crecen en matorrales y bosques, en lugares que van de 15 a 450 msnm de altura (Smith & Downs, 1977). Las rosetas son acaules, utriculadas, con hojas numerosas, hasta 80 cm de largo, densamente punteado-escamosas; vainas no infladas; láminas recurvadas, subulado-atenuadas, hasta 4 cm de ancho. El escapo es erguido, con brácteas imbricadas, las inferiores foliáceas con láminas largas, deflexas, las superiores ovadas y usualmente apiculadas o con láminas cortas, filiformes, erguidas.

La inflorescencia en ésta especie es escamosa, central, laxa, bipinnada o veces subtripinnada, con las brácteas primarias como las brácteas superiores del escapo, mucho más cortas que las ramas, encorvadas o ascendentes; espigas lineales, complanadas, de 12 mm de ancho, la base estéril con brácteas; raquis casi recto, delgado angulado, glabro; brácteas floríferas erguidas, usualmente dos tres veces tan larga que los entrenudos pero el raquis desnudo, estrechamente ovadas, obtusas, o apiculadas, enrolladas en el ápice, de 18 a 20 mm de largo, superando los sépalos, subcartáceas, nervadas, glabra (en las poblaciones del área de estudio en el Parque Nacional de Dzibilchaltún, el tamaño de las inflorescencias varía desde 20-60 cm de largo llegando a producir desde 8-150 yemas florales).

Las flores son subsésiles; sépalos estrechamente elípticos, obtusos de 1-3 mm de largo, glabros, nervados; pétalos de 25 mm de largo azules o lilas apicalmente, blancos basalmente, de forma oblonga; estambres y estigma inclusos. Cápsula delgadamente cilíndrica de 3-4 cm de largo. La estructura, color y disposición de las flores sugieren ornitofilia. Habita en selvas bajas caducifolias, entre 15-100 msnm en el área de la Península de Yucatán. La planta florece en agosto-septiembre y se han colectado frutos entre julio y marzo. Se propaga principalmente por semillas, y salvo si hay daño mecánico en el meristemo apical, produce un hijuelo en la base de la roseta. El cuadro uno presenta las principales características contrastante de ambas especies.



**Figura 2.** *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* (Foto por Ivón Ramírez)

**Cuadro 1:** Principales diferencias morfológicas y ecológicas entre *Tillandsia brachycaulos* y *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*.

Características	<i>Tillandsia brachycaulos</i> (Mondragón, 2001)	<i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i> (Olmsted <i>et al</i> ; no publicados).
Órganos sexuales (estigma y anteras)	Exertos	Insertos en el tubo de la corola
Reclutamiento	Crecimiento vegetativo y semillas	Principalmente por semillas
Síndrome de polinización	Ornitofilia	Ornitofilia
Zona de distribución en el forofito	Sitios desde sombreados hasta expuestos	Sitios expuestos
Distribución en el área de estudio	Amplia y dispersa en varios forofitos	Abundante pero, en número mayor de forofitos
Color de la planta al florecer	Rojo cereza	No cambia el color de hojas y brácteas
Apertura floral	Matutina	Crepuscular
Color floral	Morado intenso	Morado pálido apicalmente y blanco en la base
Color del polen	Amarillo	Blanco o crema pálido
Tipo de panícula	No escamosa, ramas cortas, densas	Escapo largo, ramas largas, laxas



## SITIO DE ESTUDIO

La Península de Yucatán es una plataforma de roca caliza que desde el punto de vista orogénico, presenta una extensión geográfica que abarca los estados mexicanos de Yucatán, Campeche y Quintana Roo, además del norte de Belice y el Petén de Guatemala. Se sitúa en la porción intertropical, próxima al Trópico de Cáncer; colinda al este con el Mar Caribe, al norte y occidente con el Golfo de México y al sur con Centroamérica (Smith & Lundell, 1940; Barrera, 1962; Rzedowski, 1978).

La vegetación en Yucatán esta constituida principalmente por las selvas caducifolias, subcaducifolia y subperennifolias (Olmsted *et al.*, 1999). En menor proporción se presentan parches de otros tipos de vegetación como los matorrales de dunas costeras, las selvas inundables, los palmares, los pastizales inundables y las comunidades hidrófitas flotantes y emergentes entre otros (Olmsted *et al.* 1999).

El sitio de estudio está localizado en el Parque Nacional de Dzibilchaltún, un área protegida, donde el objetivo es conservar y restaurar la vida silvestre además de los vestigios arqueológicos mayas que alberga. Fue decretado Parque Nacional en el año de 1987 y está ubicado en la parte norte del Estado de Yucatán a 21° 09' N y 89° 49' O, a 15 Km al norte de la ciudad de Mérida y 20 km al sur del puerto de Progreso, con una extensión de 539.4 ha, suelos jóvenes y poco profundos, con numerosos afloramientos rocosos calcáreos, con una topografía plana, alterada por la presencia de un cenote (Thien *et al.*, 1982; González-Iturbe *et al.*, 2002).

El área de Dzibilchaltún en el pasado, fue una densa selva de mayor altura que la actual y albergó una gran cantidad de especies animales y vegetales (Thien *et al.*, 1982). En la actualidad, es una selva baja caducifolia que no rebasa los 10–15 metros de altura, de tipo secundario, lo que quiere decir que no cuenta con el tamaño y composición de su flora y fauna original, debido a la inmensa y continua actividad del hombre (Thien *et al.*, 1982). El clima de Dzibilchaltún es cálido subhúmedo y presenta una marcada época de lluvias en verano de los meses de junio a septiembre. La temperatura media anual de la región es de 26 °C con 760 mm de precipitación al año (Thien *et al.*, 1982; Mondragón *et al.*, 1999; González-Iturbe *et al.*, 2002).

En el sitio de estudio podemos encontrar especies del mismo género que nuestras especies de estudio como *Tillandsia balbisiana* Schult. f., *T. paucifolia* Baker, *T. fasciculata* Sw., *T. schiedeana* Steudel., *T. recurvata* (L.) L., *T. maya* I. Ramírez & Carnevali; de la misma familia (en la subfamilia Bromelioideae) *Aechmea bracteata* (Sw.) Grisebach, *Bromelia pinguin* L., *Bromelia karatas* L., de la familia Orchidaceae: *Catasetum integerrimum* Hook., *Cyrtopodium macrobulbum* (La Llave & Lex.) G.A. Romero & Carnevali, *Trichocentrum cebolleta* (Jacq.) Christenson, *Harrisella porrecta* (Rchbch f.) Fac. & Rendle (Carnevali *et al.* 2001). Los principales forofitos donde se encuentran ambas especies son: *Randia aculeata* L., *Aoplanesia paniculata* Presl., *Acacia gaumeri* Blake., *Senna atomaria* (L.) H.S. Irwin & Barneby, *Pithecellobium dulce* Benth, *Pithecellobium mangense* (Jacq.) Macbride, *Podoptherus mexicanus* Humb. & Bompl., *Malpighia glabra* L., *Gymnopodium floribundum* Rolfe.

Mondragón (2001) menciona que *Gymnopodium floribundum* es el principal forofito donde se desarrolla *Tillandsia brachycaulos*. Por otro lado, *Pithecellobium dulce* Benth es el forofito donde es más abundante *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* (F. Chi May, com. per.). Asimismo, se les puede encontrar a ambas especies como epifitas en *Pterocereus gaumeri* (Britton & Rose) Th. MacDoug. & Miranda perteneciente a la familia Cactaceae.

En este estudio se seleccionaron áreas dentro del parque para llevar a cabo observaciones de la biología floral y de polinización, cruces para determinar el sistema de apareamiento y sitios para coleccionar los genotipos para análisis isoenzimáticos. Para tal fin, se seleccionaron tres áreas o parcelas por especie donde había abundantes individuos de ambas. Es necesario mencionar que la distribución de las dos especies difiere en lo siguiente: individuos de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* están en sitios más expuestos en la parte alta de la copa de los árboles, donde usualmente se observa una planta "madre" ya muerta y muchos individuos prácticamente del mismo tamaño alrededor de la planta madre. Esto sugiere que los individuos de cada "parche" en cada árbol, provienen de una misma madre. Por el contrario, individuos de *Tillandsia brachycaulos* tienen una distribución más continua en el parque, si bien es cierto que también forman "colonias" (de individuos generados por semillas y crecimiento vegetativo), estas son de mayor tamaño, en sitios más sombríos y con diferentes tamaños. Estudios de la demografía de esta última especie han sido publicados (Mondragón *et al.*, 1999, Mondragón 2001), donde se explica detalladamente la distribución dentro del parque. Por otro lado, estudios demográficos de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* están completos pero no publicados aún (Chi, F. com. pers.). Sin embargo, información pertinente de la demografía de las especies se menciona en los capítulos sucesivos.

La composición florística en las tres áreas de estudio es homogénea, es decir, no se observa predominancia de algún tipo de forofito, a excepción de la parcela tres, en la cual es más abundante *Gymnopodium floribundum*. Es importante mencionar que en esta parcela, prácticamente no existen individuos de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y la otra especie, *Tillandsia brachycaulos*, no es tan abundante como en los otros dos sitios (ver figura 3). Las parcelas están separadas 400 metros aproximadamente entre la parcela número uno y dos; 450 metros entre la parcela número dos y número tres, y 630 metros entre la parcela tres y uno.

Las parcelas de estudio de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* están separadas de acuerdo a la ocurrencia de las plantas, como ya mencionamos esta especie es menos abundante y su distribución es más discreta en el sitio de estudio, la distancia entre la parcela uno y dos son 380 metros, entre la parcela dos y tres hay 300 metros y entre la tres y la uno existen 90 metros.

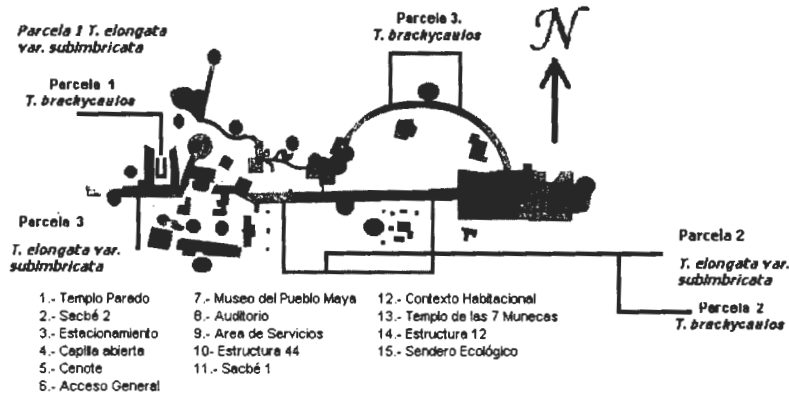


Figura 3. Principales edificaciones mayas reconstruidas en el Parque Nacional de Dzibilchaltún con la ubicación de las parcelas de estudio para cada una de las especies.

### ISOENZIMAS, ESTRUCTURA GENÉTICA Y ECOLOGÍA DE LA POLINIZACIÓN.

La estructura genética de individuos pertenecientes a la familia Bromeliaceae, se ha estudiado principalmente mediante la técnica de electroforesis de aloenzimas y básicamente comparando especies con diferentes aspectos de su ecología de la polinización (Soltis *et al.* 1987; Kress *et al.* 1990; Murawski & Hamrick, 1990), técnica que permite determinar los diferentes alelos que existen en un locus e identificar el genotipo de un individuo. Las aloenzimas son marcadores genéticos, pero para poderlas utilizar como tales, es preciso suponer que la variación alélica es neutra con respecto a la selección natural; es decir que el genotipo tiene un pequeño efecto o ninguno en la supervivencia y en la reproducción de los individuos. Los marcadores genéticos constituyen, pues, una valiosa herramienta para estudiar el efecto de los sistemas de apareamiento y de la dinámica de dispersión de polen y semillas en la estructura genética de una población (Nason, 2002).

A cualquier escala espacial, ya se trate de unos pocos metros o de varios kilómetros de distancia, la importancia relativa de la deriva genética con respecto al flujo genético está determinada principalmente por el potencial de dispersión de los organismos. Las especies con características que favorecen la dispersión de sus propágulos a largas distancias, deberían presentar una estructura genética con menor diferenciación en término de las frecuencias alélicas interpoblacionales que las especies con dispersión más localizada. Ahora bien, a medida que aumenta la distancia de dispersión del polen y semillas aumenta también la escala espacial a la que interactúan, ecológica y genéticamente, los individuos; de manera que las poblaciones más móviles estarían caracterizadas por un mayor número de individuos que interactúan reproductivamente. Por eso, y debido a que la tasa de deriva genética es inversamente proporcional al tamaño de la población, tales especies deberían mantener, a nivel de población, una diversidad genética mayor que las especies con dispersión más localizada. Así mismo, los organismos con mayor potencial de dispersión también deberían mantener una mayor diversidad genética a nivel de especie, ya que una migración marcada disminuye las probabilidades de que se extinga una población local o de que se pierdan los alelos locales (Nason, 2002). Hamrick & Loveles (1986) basándose en

observaciones empíricas mencionan, que las plantas con polinización cruzada muestran, en promedio, un mayor nivel de diversidad genética que las especies en las que predomina la autopolinización.

En teoría, aquellos factores que disminuyen el flujo genético tienden a aumentar la tasa de especiación (por diferenciación genética), y uno de los factores que más influye en el flujo genético es el sistema de apareamiento. El sistema de apareamiento se define como la relación que existe entre el número de frutos o semillas producidas por autofecundación (de una población o una especie) y el número de frutos o semillas producidos por polinización cruzada (exogamia). Esta relación entre autofecundación y exogamia depende de factores determinados genética y ambientalmente, por ejemplo: número de individuos en flor, sistema sexual y mecanismos de autoincompatibilidad reproductiva. De esta forma se obtienen valores a partir de los cuales se define de manera arbitraria, si el sistema de apareamiento es predominantemente autogámico o exogámico. La autofecundación no solo restringe el flujo de genes sino que, al promover la endogamia y disminuir el entrecruzamiento, reduce el tamaño efectivo de la población, o sea, su tamaño funcional. Es de esperarse entonces que un sistema de apareamiento cerrado y básicamente autogámico, aumente el efecto perturbador de la deriva genética y posiblemente también el de la presión selectiva, la cual, a nivel de microhábitat podría llegar a originar diferencias genéticas interpoblacionales.

### HIPÓTESIS

La morfología y biología floral y de polinización, así como las diferencias en la historia de vida de ambas especies, se ven reflejadas en la variación y estructura genética de las poblaciones. Esperamos encontrar una mayor estructura genética entre subpoblaciones de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y menor entre subpoblaciones de *Tillandsia brachycaulos* estructura genética. En cuanto a la variación genética dentro de un subpoblación esperamos encontrar menor diversidad genética en *T. elongata* var. *subimbricata* y una mayor diversidad en *T. brachycaulos*.

## BIBLIOGRAFIA

**Barrera**, A. 1962. La Península de Yucatán como provincia biótica. Natural History Society Review. Tomo XXIII. 71-104.

**Benzing**, D. H. 1978. The life history profile of *Tillandsia circinnata* (Bromeliaceae) and the rarity of extreme epiphytism among the angiosperms. *Selbyana* 2: 325-337.

**Benzing**, D. H. 1981. The population dynamics of *Tillandsia circinnata* (Bromeliaceae): cypress crown colonies in southern Florida. *Selbyana* 5: 256-263.

**Benzing**, D. H. 1990. Vascular epiphytes. Cambridge University Press. Cambridge. 354 pp.

**Benzing**, D. H. 1994. How much is known about Bromeliaceae in 1994?. *Selbyana* 15: 1-7.

**Benzing**, D. H. 2000. Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press. Cambridge. 665 pp.

**Carnevali**, G., J.L. Tapia-Muñoz, R. Jiménez-Machorro, L. Sánchez-Saldaña, L. Ibarra-González, I. M. Ramírez-Morillo, and M. Gómez-Juárez. 2001. Notes on the flora of the Yucatan Peninsula II: A synopsis of the orchid flora of the Mexican Yucatán Peninsula and a tentative checklist of the Orchidaceae of the Yucatán Peninsula Biotic Province. *Harvard Papers in Botany* 5(2): 383-466.

**Gonzalez-Iturbe**, J. A., I. Olmsted. & F. Tun-Zul. 2002. Tropical dry forest after long term Henequen (sisal, *Agave fourcroydes* Lem.) plantation in northern Yucatan, Mexico. *Forest Ecology and Management*. 167: 67-82.

**Hamrick**, J. L. & M. D. Loveless. 1986 Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. *Biotropica* 18:201-207.

**Harms**, H. 1930. Bromeliaceae. In: Engler & Prantl, Die Natürlichen Pflanzenfamilien ed .2, 15a: 65-159.

**Isley III**, P. T. 1987. *Tillandsia*. Botanical Press. Gardena, California. Pp. 26-27

**Judd** W. S., C. S Campbell, E. A. Kellogg, and P. F. Stevens 1999. Bromeliales: In Plant Systematics, a phylogenetic approach. Sinauer Associates. Pag: 199-201. US.

**Kress**, W J. 1989. The systematic occurrence of vascular epiphytes, Pp. 234-261 en U. Luttge, editor. Vascular Plants as Epiphytes: Evolution and Ecophysiology. Springer-Verlag, Germany.

**Martinelli**, G. 1994. Reproductive biology of Bromeliaceae in the Atlantic Rainforest of Southeastern Brazil. Tesis doctoral, School of Biological and Medical Sciences University of St. Andrews. pp 23-67



**Mc Williams, E. L.** 1974. Evolutionary ecology In: L.B. Smith & R.J. Downs (editors), Bromeliaceae (Pitcairnioideae). Flora Neotropica Monograph No. 14 pp. 40-55. Hafner Press, N. Y.

**Mondragón, D M., R. Durán, I., Ramírez & I. Olmsted.** 1999. Population dynamic of *Tillandsia brachycaulos* Schldl. (Bromeliaceae) in Dzibilchaltún National Park, Yucatán. *Selbyana* 20:250-255.

**Mondragón, D.** 2001. Dinámica poblacional de *Tillandsia brachycaulos* Schldl. en el Parque Nacional de Dzibilchaltún, Yucatán. Tesis Doctoral. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán.

**Murawski, A. D. and Hamrick, J. L.** 1990. Local genetic and clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad; *Aechmea magdalenae*. *American Journal of Botany*: 1210-1208.

**Nason, D. J.** 2002. La estructura genética de las poblaciones de árboles. En: Ecología y conservación de bosques Neotropicales. Guariguata M. R., G. H. Cattán (Eds.). Libro Universitario Regional. Costa Rica. Pp. 299-320.

**Olmsted, I., R. Durán, J. A. González-Iturbe, J. Granados y F. Tun.** 1999. Vegetación. En: García, A. y J. Córdoba (eds.) *Atlas de Procesos Territoriales de Yucatán*. Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Arquitectura, Mérida, Yucatán, pp. 183-194.

**Ramírez, I. & G. Carnevali.** 1994. Note: new records for Venezuela. *Selyana* 15: 85-86.

**Ramírez, N.** 1989. Biología de polinización en una comunidad arbustiva tropical de la alta Guayana Venezolana. *Biotropica* 21(4): 319-330.

**Rzedowski, J.** 1978. Vegetación de México. Ed. Limusa, México. pp. 317-389

**Smith, B. & R. J. Downs,** 1977. Tillandsioideae (Bromeliaceae) Flora Neotropica. No.14 part. 2. Organization for Flora Neotropica, New York. Pp 103-105.

**Smith, L. B.** 1974. Geographical distribution In: L.B. Smith & R.J. Downs (Eds.), Bromeliaceae (Pitcairnioideae). Flora Neotropica Monograph No. 14:57.

**Smith, L. B. and C. L. Lundell.** 1940. The Bromeliaceae of the Yucatan Peninsula. Botany of the Maya Mexico.

**Soltis, D. E.; A. J. Gilmartin; L. Reiseberg & S. Gardner.** 1987. Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia elongata* and *T. recurvata* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany*. 74: 531-537.

**Thien, L. B., A.S. Bradburn & A.L. Welden.** 1982. The woody vegetation of Dzibilchaltún, A Maya archaeological site in Northwest Yucatan, Mexico. Middle American Research Institute Tulane University, New Orleans. Pp 4-10

**Zotz, G. & J. L. Andrade.** 2002. La ecología y la fisiología de las epífitas y las hemiepífitas. En: *Ecología y conservación de bosques Neotropicales*, Guariguata M. R. & H. Cattán (Edts.). Libro Universitario Regional. Costa Rica. Pp. 271-290.

## CAPITULO 2

### **BIOLOGÍA FLORAL Y SISTEMA DE CRUZAMIENTO EN *Tillandsia brachycaulos* Schltdl. Y *T. elongata* Kunth var. *subimbricata* (Baker) L. B. Sm.**

#### **INTRODUCCION**

Las plantas interactúan constantemente con factores bióticos y abióticos en el medio ambiente donde se desarrollan. Para poder sobrevivir y ser exitosas en estos ambientes, las plantas han desarrollado diferentes estrategias de vida. Una parte fundamental de las estrategias de vida son los sistemas de apareamiento los cuales son estudiados en relación con otras disciplinas como la biología floral, biología reproductiva y la biología de la polinización (Stuessy 1990; Kearns et al. 1998.). Por ejemplo, los aspectos reproductivos se pueden relacionar con la variación y estructura genética que puede existir entre poblaciones de plantas autógamas y xenógamas, donde esperaríamos encontrar menor variación genética en el primer caso que el segundo.

La coevolución planta-animal es un evento complejo de la historia natural, el cual ha generado algunos de los estudios más interesantes de la biología, entre los más importantes, podemos citar las asociaciones simbióticas que han desarrollado las flores y los animales (Richards 1996), donde éstos últimos obtienen alimentos de las flores que visitan, usualmente en forma de néctar o polen, y por el otro lado, las plantas obtienen como beneficio los servicios de los polinizadores en el transporte del polen de una flor a otra (Proctor *et al.* 1996). Con el conocimiento de la morfología y biología floral de las plantas se pueden sugerir los síndromes de polinización. Entre estos síndromes esta la ornitofilia, en la cual las plantas presentan las siguientes características: corolas tubulares largas, secreción de néctar, estambres y estigmas extendidos o no fuera de la corola, flores sin fragancia perceptible, con coloraciones rojas, amarillas, violetas, etc. La mayoría de las bromelias presentan características que sugieren polinización por aves, especialmente colibríes (García-Franco 1990, Benzing 1980).

La información de la cantidad, patrón de producción y composición del néctar, también nos permite inferir el posible polinizador, siempre y cuando conozcamos las necesidades y preferencias de los posibles vectores del polen. Asimismo, nos permite detectar procesos de producción de néctar asociados a la hora de antesis y procesos de reabsorción de néctar. Sick (1984) observó que las especies de colibríes brasileños prefieren el néctar diluido, con un equivalente de 20 % de sucrosa, en contraste con las abejas que prefieren un néctar con concentraciones de sucrosa por encima de un 70%. Bernardello *et al.* (1991) estudiaron la composición química y la estructura de los nectarios de 20 taxones argentinos de bromelias, sugiriendo por la composición de néctar y la ubicación de los nectarios, que el principal polinizador era un colibrí.

La biología de la polinización, nos permite poner a prueba las hipótesis de los diferentes polinizadores sugeridos por características florales y del néctar. Utley (1986), en el grupo de *Vriesea* sección *Thecophyllum*, señala que este grupo

presenta diferentes fenologías florales y horas de antesis, tienen diferentes visitantes florales como colibríes, murciélagos, y posiblemente polillas. Martinelli (1994) realizó una extensa y muy completa revisión bibliográfica de la biología reproductiva de la familia Bromeliaceae, cuyos resultados señalan que el principal síndrome de polinización en la familia es la ornitofilia.

Gardner (1986) realizó observaciones de la arquitectura floral, pigmentación de la flor e inflorescencia y fenología de 85 especies en el género *Tillandsia* subgénero *Tillandsia* y subgénero *Allardtia*, para evaluar su contribución al conocimiento de la biología de polinización y al sistema de cruzamiento en el género. Estas observaciones las enmarcó dentro de cinco grupos que resultaron de un estudio taxonómico con la idea de producir una clasificación más natural que la existente (Smith & Downs, 1977).

El primer grupo compuesto por la gran mayoría de los taxa estudiados (60), agrupa especies con flores sin fragancia perceptible, de pétalos delgados, que se enrollan en un tubo que se constriñe apicalmente, filamentos alargándose de que las anteras maduren, de esta manera las anteras hacen contacto con el estigma; las brácteas son de colores brillantes, y la floración es nocturna o crepuscular; todo esto sugiere que la ornitofilia es el principal síndrome de polinización de este grupo, seguido por la entomofilia (polillas y abejas) (Gardner 1986, Benzing 1980). En este grupo se encuentra *Tillandsia brachycaulos*.

*Tillandsia brachycaulos* presenta inflorescencias con un escapo reducido o ausente, en cuyo caso la inflorescencia está escondida por las brácteas rojas de la inflorescencia, del escapo y por las hojas, las brácteas florales son lanceoladas, delgadas, tan largas como los pétalos; las flores son sésiles, la corola es de forma tubular, erecta, los sépalos son verdes, elípticos, ligeramente fusionados, los pétalos morados, con estambres y estigma exertos. Las flores producen néctar y no presentan fragancia perceptible, con antesis diurna y longevidad de un día. Todas estas características nos indican que el posible polinizador es un colibrí.

El segundo grupo presenta especies con pétalos de color blanco o verde amarillento, flores sin fragancia perceptible, sugiriendo posiblemente polinización por mariposas nocturnas (Gardner, 1986). El grupo tres (el cual incluye *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*), el cual cuenta con observaciones en cultivo pero no de campo, especies como *Tillandsia deppeana* Steud., *T. imperialis* E. Morren ex Roezl., fueron visitadas por abejas (Benzing 1980; Gardner, 1986) y *T. ponderosa* L. B. Sm. por abejas y abejorros. Los grupos cuarto y quinto, contienen especies cuyas características sugieren que el principal polinizador podría ser una mariposa nocturna, debido a la palidez de sus flores. Gardner concluye que ciertamente la ornitofilia es el principal síndrome de polinización, aunque podemos encontrar polinización por mariposas nocturnas en especies de los cinco grupos, excepto que las emisiones de fragancias solo estuvieron presentes en algunas de éstas especies.

*Tillandsia elongata* var. *subimbricata* presenta una inflorescencia erecta, pinnada o débilmente pinnada, un escapo erecto, flores ligeramente divergentes, con pétalos basalmente blanco verdoso y apicalmente morados formando un tubo basalmente y luego expandiéndose, nunca tubulares, con antesis diurna (últimas horas de la tarde) producción de néctar y sin fragancia perceptible; estigma y

estambres insertos en la corola tubular, la longevidad de cada una de ellas es de un día. Estas características sugieren que el posible polinizador sea un colibrí.

El polen puede ser transportado por vectores bióticos o abióticos. La polinización abiótica tiene lugar gracias a la influencia del agua o del viento (Murcia, 2002). Bawa (1990) menciona que prácticamente entre un 98- 99% de las plantas encontradas en los bosques húmedos son polinizadas por animales. La morfología del polen, el tamaño y la superficie del mismo, el arreglo del polen (suelto, tétradas, polinias), se relacionan con la cantidad de polen que un polinizador puede transportar, dependiendo del tamaño de este polinizador y de sus necesidades de consumo (Proctor *et al.* 1996). El movimiento de este polen puede influir en la estructura genética de una población (Sarhou *et al.* 2001).

Chuc (2002) realizó estudios para estimar la distancia y dirección de dispersión de polen en poblaciones de una bromelia dioica, *Hechtia schottii* Baker en Yucatán, México. Con el uso de polvos fluorescentes estimó que el polen es dispersado en las mejores condiciones a una distancia de 2 a 4.9 metros por varias especies de abejas, especialmente *Apis mellifera*. Este restringido rango de dispersión, combinado con la condición dioica de la especie y el crecimiento en colonias, deben influir marcadamente en la variación y estructura genética de la población.

En las comunidades naturales, coexisten una gran variedad de plantas y animales dando lugar a una gran cantidad de procesos complejos, relacionados con el sistema de apareamiento de las plantas, como por ejemplo, la competencia por polinizadores (Stiles, 1978; Feinsinger *et al.* 1991). Dicha competencia puede ser reducida al disminuir el solapamiento fenológico en la floración de las plantas (Stiles, 1978); o segregando la ubicación de las cargas de polen sobre el polinizador (Ramírez 1992), entre otros mecanismos.

McWilliams (1974) propuso la presencia de diversos mecanismos de cruzamiento en las Bromeliaceae, de autofértiles como en algunas especies de *Tillandsia* subgénero *Tillandsia* y de especies que se autopolinizan como en los géneros *Guzmania* Ruiz & Pavon y *Vriesea* Lindl. Asimismo, sugiere que la mayoría de los miembros de las Bromelioideae, en especial del género *Aechmea* Ruiz & Pavon, se autopolinizan y que especies de ésta subfamilia y de la subfamilia Pitcairnioideae se autocruzan. Este autor basó sus aseveraciones en experimentos u observaciones en el campo.

Gardner (1986) con *Tillandsia variabilis* Schtdl. y Gilmartin & Brown (1985) con *Tillandsia capillaris* Ruiz & Pavon, realizaron estudios de las estrategias reproductivas, concluyendo que ambas se autopolinizan, posiblemente por la posición cercana del gineceo y el androceo los cuales se encuentran dentro del perianto, donde las anteras abrazan al estigma.

García-Franco (1990) estudió la biología reproductiva de *Tillandsia deppeana* Steud. en Veracruz, México, y sus resultados indican que la especie lleva a cabo polinización cruzada, esto debido a la asincronía en la maduración de los órganos sexuales, así como también a que la especie es autoincompatible. Asimismo, indica que debido a las características florales, el síndrome de polinización es la ornitofilia, cuyo proceso de polinización puede verse favorecido ya que esta especie crece en forofitos caducifolios que podrían mejorar la

visibilidad de las flores por el polinizador, durante la época de secas que es cuando sucede la floración de la especie.

La eficiencia natural se define como la capacidad que tienen las especies para tener éxito en su sistema reproductivo y poder perpetuarse como especie. Se determina contando el número de flores por inflorescencias y de frutos producidos por infrutescencia, así como el número de óvulos por ovario y de semillas por fruto, niveles de aborto de flores-fruto, aborto de óvulos y de semillas (Grases y Ramírez 1998). García-Franco (1990) determinó este parámetro en *Tillandsia deppeana* realizando pruebas de germinación de semillas; encontrando que menos de una cuarta parte de las flores producen frutos con semillas fértiles, por lo que el autor concluye que la eficiencia reproductiva de la especie es relativamente baja. Estos resultados según el autor pueden deberse a una limitación en el polen y que pocas flores lleguen a ser polinizadas, o que habiendo suficiente polen, exista una deficiencia de polinizadores, o finalmente, que exista aborto selectivo de algunos frutos.

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue determinar aspectos generales de la biología reproductiva de *Tillandsia elongata* (Kunth) var. *subimbricata* (Baker) L. B. Sm. y de *Tillandsia brachycaulos* Schldl., en el Parque Nacional de Dzibilchaltún en Yucatán México.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Determinar aspectos generales de la biología reproductiva de *Tillandsia elongata* (Kunth) var. *subimbricata* (Baker) L. B. Sm. y de *Tillandsia brachycaulos* Schtdl., en el Parque Nacional de Dzibilchaltún en Yucatán México.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Conocer la biología floral en poblaciones de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y de *T. brachycaulos*.

Determinar el sistema de cruzamiento de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y de *T. brachycaulos*.

Calcular los índices de fertilidad, compatibilidad y autogamia de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y de *T. brachycaulos*.

Determinar la eficiencia natural de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y de *T. brachycaulos*.

## MATERIALES Y METODOS

El trabajo se realizó en dos años consecutivos y en dos grandes áreas diferentes. En el año 2002, trabajamos en el primer sitio, el cual está situado al costado derecho de la entrada de servicio del parque (parcela uno de *Tillandsia brachycaulos* y de *T. elongata* var. *subimbricata*) y durante el año 2001, trabajamos en la parte central conocida como La Herradura (parcela 2 de *Tillandsia brachycaulos* y *T. elongata* var. *subimbricata*). Entre ambas áreas hay una separación espacial de aproximadamente de 350 metros (Figura 3).

Inicialmente se hizo un recorrido y localización de todos los sitios en los que se encontraran individuos de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y *T. brachycaulos* en estado reproductivo dentro de las áreas para posteriormente seleccionar las parcelas. Las plantas de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* crecen en sitios localizados o en parches, a menores densidades que la otra especie, *Tillandsia brachycaulos* la cual prácticamente se le puede encontrar por todo el parque.

### MATERIAL DE CAMPO

Seleccionamos durante el periodo de floración de junio a septiembre del año 2000, 47 plantas con un total de 336 flores para *Tillandsia brachycaulos* y para *T. elongata* var. *subimbricata*, utilizamos 57 plantas y un total de 1542. Al siguiente ciclo de floración en el año 2001, se utilizaron para *T. brachycaulos* 64 plantas y 184 flores, mientras que para *T. elongata* var. *subimbricata* utilizamos 44 plantas y 341 flores. Se realizaron varios experimentos para determinar: la biología floral y los sistemas de apareamiento.

### ESTUDIOS DE BIOLOGÍA FLORAL

#### Análisis morfológico

Con el objetivo de estudiar la morfología floral, colectamos en agosto del 2000, 20 flores por especie, provenientes de mas 15 individuos repartidos en las tres parcelas. Determinamos las dimensiones florales en estas 20 flores, donde medimos longitud y diámetro de la flor, de las brácteas, sépalos, pétalos, ovario y estilo; la longitud de los filamentos, el diámetro de las anteras y contamos el número de óvulos por flor. Para realizar esta actividad, las flores que colectamos las preservamos una solución de alcohol (etanol) 70% y 5% de glicerina, para posteriormente ser estudiadas en el laboratorio con la ayuda de una hoja de bisturí, una pequeña regla graduada, un microscopio estereoscopio y un calibrador vernier. Estos estudios se realizaron con la finalidad de conocer la variación en la morfología floral de ambas especies en el sitio de estudio y para poder sugerir al menos parcialmente, un posible síndrome de polinización.



## Antesis

El proceso de antesis (estigma receptivo para la función femenina y anteras deshicentes para la función masculina), se estimó en flores de diferentes individuos (en un mínimo de 30 flores por especie) en ambas especies, para lo cual marcamos las flores. Cuantificamos las flores desde su apertura hasta su cierre, en intervalos de una hora. Por las mañanas, las observaciones se concentraban en *Tillandsia brachycaulos* durante los dos años de estudio, y por las tardes, en *T. elongata* var. *subimbricata* durante el año 2001. La longevidad floral se estimó mediante observaciones periódicas cada hora, cubriendo el periodo desde la antesis hasta que las flores cerraron sus pétalos y se tomaron flácidas, poniendo un particular cuidado en observar si las flores marchitas del día anterior reciben visitas de posibles polinizadores.

## Colecta del polen

Para obtener el polen, colectamos por la mañana (8:30 horas) yemas florales maduras de *Tillandsia brachycaulos* que abrirían al día siguiente y yemas de *T. elongata* var. *subimbricata* que abrirían por la tarde. Esto con la finalidad de evitar que las anteras abran y liberen los granos de polen. Las anteras fueron colocadas en cápsulas de Petri y llevadas al laboratorio para cuantificar los granos de polen y realizar las pruebas de germinación del mismo.

## Estimación de número de granos de polen

Para la cuantificación de los granos de polen por antera, se realizaron un total de dos muestras por especie en un volumen de 3 ml de una solución de agua destilada con 0.01 % de Twen 20 y azul lactofenol (colorante), conteniendo cada muestra una antera madura (por taxón) sobre la cual se hicieron tres conteos de un mililitro cada uno por caja.

Los conteos se realizaron en cajas Sedgewick-Rafter Cell S50 (microlitre) bajo un microscopio estándar Carl Zeiss a 10x. Esta caja cuenta con una capacidad de 100  $\text{ml}^3$ , dividida en 1000 celdillas con una capacidad de 1  $\mu\text{l}$  cada una, se contaron al azar en total 50 de estas celdillas por conteo por taxón, por muestra; para estimar la cantidad de polen por antera por especie se hicieron los siguientes cálculos:

Suma del total de granos de polen encontradas en las 50 celdillas de los tres conteos, de las 3 muestras por especies y se aplicó una regla de tres para obtener el numero de granos de polen por muestra por taxón.

150 ----- No. de granos de polen  
1000 ----- ¿X?  
Total de granos de polen de la muestra

Obtenido los resultados de cada una de las muestras (m), se procede a calcular el número de granos de polen por antera por taxón en las dos muestras, estas se sumaron y se dividieron entre dos:

$$\frac{\# \text{ granos de la m1} + \# \text{ granos de polen de la m2}}{2} = \text{Total granos de polen por antera}$$

El número de granos de polen por antera se multiplicó por el total de anteras (6) por flor obtenida en el análisis morfológico para estimar el número de granos de polen por flor por especie.

### **Fertilidad de polen**

El porcentaje de fertilidad del polen se obtuvo basándose en el porcentaje de granos de polen viables en una muestra de 600 granos de polen para *Tillandsia brachycaulos* y 600 granos de polen para *T. elongata* var. *subimbricata*. Se prepararon las muestras de polen por especie, cada muestra fue previamente teñida con una solución preparada con una gota de azul lactofenol y una gota de glicerina; los granos de polen se montaron sobre un portaobjetos y se dejaron reposar por 24 horas para asegurarnos del que núcleo del polen quede bien teñido. Se realizó un conteo bajo un microscopio estándar Carl Zeiss a 10X, comenzando por un extremo y moviendo el portaobjetos hacia arriba hasta llegar al otro extremo y moviéndolo hacia la derecha (barriendo) y contando hasta completar en este caso 600 granos de polen. Se pueden observar e identificar dos tipos de granos de polen, los granos de polen normal (fértil) y los anormales (no fértil). Los granos de polen fértil se tiñen y los no fértil no se tiñen cuando se ponen en contacto con el lactofenol. Porcentajes por arriba del 90% de granos de polen fértil se interpretan como fertilidad alta (F. Barredo, com. per. ).

### **Relación polen/óvulo (P/O)**

Las proporciones P/O fueron determinadas dividiendo el número de granos de polen por flor entre el número de óvulos por flor (Cruden, 1977) citado por Pérez (1990). El número de óvulos se calculó de una muestra de 20 flores para cada taxa. Los valores más altos de la relación P/O se registran, por ejemplo, para plantas anemófilas (xenógamas), mientras que los menores se registran para plantas cleistógamas.

### **Germinación de polen**

Para el caso de *Tillandsia brachycaulos*, colectamos el polen de flores que estaban en anthesis aproximadamente a las 9:00 hrs y en flores que abrieron un día antes (24 horas), esto lo hicimos para los años 2000 y 2001. En el caso de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* en el año 2000, se colectó polen de flores cerradas, ya que considerábamos que las flores eran cleistógamas, pero luego de observaciones de plantas en cultivo, constatamos que las flores eran de anthesis

vespertina, por lo que en el 2001 colectamos el polen aproximadamente a las 15:00 hrs, cuando las flores apenas empezaban a dilatar los pétalos. El polen colectado de ambas taxa se guardó en cajitas Petri y se llevó al laboratorio de la Unidad de Recursos Naturales en el CICY, con la finalidad de germinarlo en un medio de cultivo.

El medio de germinación de polen estaba compuesto por sacarosa (15 gr.),  $H_3BO_3$  (0.010 gr),  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  (0.0086 gr),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0.004 gr),  $KNO_3$  (0.002 gr) y Agar (1gr); todas las sustancias se mezclan a temperatura ambiente en 100 ml de agua destilada, para posteriormente calentarlo hasta que empiece a hervir, dejándolo que se enfríe para vaciarlo en las cajas de Petri, hasta que el medio solidifique, cuando es esparcido el polen en las cajas las cuales se tapan y se colocan dentro de una estufa a 30°C por 24 horas. El experimento contó con 5 replicas con una cantidad incontable de polen cada una, el cual provenía de aproximadamente 10 flores por taxa. El porcentaje de germinación se estimó 24 horas mas tarde, cuando añadimos un colorante que se prepara de la siguiente manera: se mezclan alcohol etílico al 25%, 0.03 g. de azul de anilina y 0.02 gr. de fucsina básica; ésta solución se filtró y se guardó en un frasco gotero color ámbar. Se colocaron 0.5 ml de colorante dentro de la caja de Petri donde se tenía el polen germinado (polen de color rosa y tubo polínico de color azul) y se esperó de 2 a 3 minutos para observar al microscopio. En un área de un centímetro cuadrado cuantificamos cuantos granos de polen (de un total de 100) habían desarrollado el tubo polínico.

### **Colecta del néctar**

Debido a la forma y el tamaño de las flores de ambas taxa, el uso de tubos capilares graduados de 10  $\mu$ l se ajustó adecuadamente para la extracción de néctar. El tubo de la corola de las flores *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*, es muy estrecho y en muchos casos, la extracción de néctar significó la destrucción de la flor. Cabe destacar que la extracción del néctar la realizamos los dos años de muestreo. Se estimaron los siguientes parámetros a partir de las tomas de néctar.

### **Patrón de producción de néctar**

Este parámetro fue medido para cada especie de la siguiente manera: durante dos días consecutivos se embolsaron yemas florales próximas a abrir al día siguiente, un total de 70 flores para *Tillandsia brachycaulos* y 30 para *T. elongata* var. *subimbricata* por día (140 y 60 en total respectivamente para el total de dos días). Cada día se midió la cantidad de néctar en 5 flores embolsadas y sin embolsar por hora entre las 8:00-14 hrs para *Tillandsia brachycaulos* y de 3 flores por hora de 15:00-20:00 hrs para *T. elongata* var. *subimbricata*. Con los resultados obtenidos, elaboramos las curvas de acumulación de néctar, donde cada punto representa un promedio de varias flores (10 y 6 para *T. brachycaulos* y *T. elongata* var. *subimbricata* respectivamente), los valores obtenidos durante los dos días de estudios, se promediaron y se graficaron, representando un solo punto en el grafico.

El patrón de producción de néctar se puede relacionar con la hora de apertura floral, hora de antesis y procesos de reabsorción y cambios en la concentración de néctar, así como puede relacionarse también, con especies que tienen diferentes sistemas de apareamiento (autogamia estricta vs. xenogamia estricta).

Adicionalmente, medimos la cantidad de néctar en flores no embolsadas durante los periodos de apertura floral, antesis y cierre floral, 5 flores por cada toma en *Tillandsia brachycaulos* (15 flores en total), y 2 para cada toma *T. elongata* var. *subimbricata* (6 flores en total), durante un día solamente para ambas especies. Los resultados aquí obtenidos los comparamos con aquellos obtenidos en flores protegidas, lo que nos permite estimar si el recurso está siendo consumido (por polinizadores o ladrones de néctar). Si el consumo de néctar en flores no protegidas es por polinizadores, deberíamos observar entonces, resultados que así lo indiquen en la producción de frutos en plantas no protegidas (polinización natural, ver mas adelante). El patrón de variación (diferentes cantidades en las flores estudiadas en un determinado momento), nos permite inferir el comportamiento de los polinizadores y/o ladrones de néctar y el patrón de producción de néctar.

### **Concentración total de azúcares del néctar**

Este parámetro se estimó en las muestras colectadas en los dos experimentos anteriores, usando un refractómetro manual Atago modelo N-1E de 0-32% Brix y se expresa como concentración total de azúcares en grados Brix.

### **Estudios de la biología de polinización**

Las especies polinizadoras y modo de polinización se determinaron mediante la observación directa de la actividad de los visitantes. En ambas especies por la forma y color de las flores de ambas, sugiere que el síndrome de polinización es la ornitofilia, por lo cual se colocaron mallas de niebla para atrapar, identificar y retirar polen de los colibríes. Lamentablemente no se pudieron capturar ya que las aves evadían las mallas. La identificación de los colibríes observados fue realizada por comparación directa de los pájaros al observarlos con binoculares y/o fotografiarlos, con las descripciones e ilustraciones publicadas por Peterson & Chalif (1973). Se consideraron que aquellos que al libar en la flor tocaban las anteras y se llevaban polen, eran los posibles polinizadores, en comparación con aquellos agentes visitantes que solo visitaban sin entrar en contacto con ningún órgano sexual de la flor.

### **Sistemas de apareamiento**

El sistema de apareamiento se estimó realizando 4 pruebas controladas siguiendo la metodología de Grases & Ramírez (1998) en flores hermafroditas (homomórficas y heteromórficas), sub-monoicas y monoicas: se localizaron individuos de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y de *T. brachycaulos* con yemas florales maduras y próximas a abrir. Se usaron al menos 30 flores para

cada una de las pruebas, para que los resultados sean estadísticamente significativos. Las pruebas que hicimos fueron las siguientes:

### **Autopollinización (AP)**

Se seleccionaron yemas próximas a abrir al día siguiente y se encerraron en bolsas de polinización de agribón. Al día siguiente, se abrieron las bolsas, se descartaron las yemas que no abrieron y se polinizaron las abiertas con el polen proveniente de la misma flor. Para *Tillandsia brachycaulos* utilizamos en el año 2000, 5 plantas y 27 yemas, y para el año 2001, 12 plantas y 35 yemas. Para *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*, en el año 2000 usamos 4 plantas y 6 yemas y en el 2001, 10 plantas y 45 yemas.

### **Polinización cruzada (PC)**

Se seleccionaron yemas que abrirían al día siguiente, descartando todos los estambres, sin maltratar el gineceo. Se colocó una bolsa de polinización de la misma manera que en el caso anterior, regresando al día siguiente para tomar flores de diferentes individuos y fertilizar las flores que abrieron, descartando las yemas que no abrieron y las maltratadas. Esta prueba solo se realizó en el año 2000 para *T. brachycaulos*, utilizando 11 plantas y 36 yemas, repetimos la prueba el año 2001 y usamos 14 plantas y 30 yemas. La apertura floral en *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* desconocida hasta esa fecha, impidió que tales pruebas se realizaran en el año 2000; se usaron 10 plantas y 32 yemas para el año 2001.

### **Polinización automática (PA)**

En individuos de ambas especies, se escogieron inflorescencias con yemas próximas a abrir, se descartaron todas las flores abiertas y frutos presentes y se cuantificó el número total de yemas, encerrándolas en una bolsa de polinización (agribón). Se observó la formación de frutos después de varios meses. Para *Tillandsia brachycaulos* utilizamos cinco plantas y 93 flores en el año 2000, y seis plantas y 30 flores para el año 2001, en cuanto a *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* utilizamos 10 plantas y 179 yemas florales en el año 2000 y tres plantas y 90 flores en el 2001.

### **Agamospermia (AG)**

Se escogieron yemas próximas a abrir y se emascularon, posteriormente las encerramos en la bolsa de polinización para una observación posterior de formación de frutos. Esta prueba se llevó a cabo en los dos taxa durante los dos años, en el año 2000 para *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* usamos 5 plantas y 9 yemas, en el año 2001 usamos 11 plantas y 30 yemas, con *Tillandsia brachycaulos* se usaron para el año 2000 7 plantas y 32 yemas, y en el año 2001, 14 plantas y 30 yemas.

## **Anemofilia (AN)**

Se seleccionaron yemas próximas a abrir y se emascularon, se cubrieron con una bolsa de polinización, que permite la entrada de polen pero no la de insectos o aves. Para *Tillandsia brachycaulos* se utilizaron 4 plantas y 23 yemas en el año 2000, así como 12 plantas y 30 yemas en el 2001; en *T. elongata* var. *subimbricata* solo se realizó en el año 2001 en 7 plantas y 30 flores. Para cada tipo de prueba aplicada se cuantificó el número de frutos y semillas producidas.

## **Eficiencia natural**

Para este experimento, en el periodo de floración del 2000 para *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*, utilizamos 31 plantas y 1348 yemas florales, el 2001 usamos 3 plantas y 112 yemas florales; en lo que respecta a *T. brachycaulos*, utilizamos en el año 2000, 15 plantas y 125 yemas, y en el año 2001, 6 plantas y 30 yemas, a las plantas se les quitaron las flores y los frutos ya existentes, además se dejaron sin cubrir para que se llevara a cabo la polinización natural. Las semillas producidas en esta prueba se germinaron de la misma forma que las anteriores y en igual cantidad. Se obtuvo el promedio y el porcentaje de germinación para el tratamiento y realizamos un análisis de eficiencia natural, comparando el número de flores utilizadas, con el número de frutos amarrados, el número de óvulos por ovario y de semillas por fruto.

## **Índice de Fertilidad**

Estos índices se calcularon basándose en el porcentaje de amarre frutos en las pruebas de polinización automática y polinización cruzada: PA/PC ( $IAF_f$ ). De la misma manera se calcula para el número de semillas ( $IAF_s$ ) en cada uno de los cruces mencionados, o para el porcentaje de germinación de semillas. Valores de los índices mayores de 1, sugieren que existe una compatibilidad o una polinización autógena (sin mecanismos de polinización). Índices menores de 1 sugieren que la especie depende de un agente polinizador para poder producir frutos o semillas y que la planta es alógama (geitonogamia o xenogamia) (Wendt *et al.* 2002).

## **Índice de Autocompatibilidad**

Se calcularon basándose en el porcentaje de frutos producidos en autopolinización comparados con aquellos producidos en polinización cruzada: AP/PC ( $IAC_f$ ). Igual se calcula para el número de semillas totales o el número de semillas viables (germinadas) ( $IAC_s$ ). Valores de índices iguales o mayores de 1, indican que la planta es completamente autocompatible, mientras que valores entre 1-0.7, indican una autocompatibilidad parcial. Y por último, los valores menores de 0.75, indican una incompatibilidad parcial.

## **Índice de Autogamia**

Se calcula dividiendo el porcentaje de frutos producidos por polinización automática, con aquellos producidos por la autopolinización, si el índice tiende a ser mayor de 1 indica que la especie es autógama, ya que produce considerablemente gran cantidad de frutos por polinización automática (sin asistencia de polinizador).

## **Germinación de semillas**

Esta prueba tiene la finalidad de evaluar el éxito reproductivo a otro nivel, más allá del número de frutos o semillas producidas, siendo más cercana a evaluar la fertilidad de las plantas que si se hiciera solo en el número de frutos producidos. La prueba de germinación se realizó colocando semillas de frutos recién cosechados de las pruebas donde hubo producción de frutos (auto polinización, polinización cruzada y polinización automática), en cajas Petri desechables, en cuyo fondo se colocó un papel filtro como sustrato. Se hicieron 3 replicas de 100 semillas por prueba de germinación, con tres repeticiones, haciendo un total de 900 semillas en observación. A las semillas se les dio un tratamiento con agua de cloro al 30% y detergente Twen antes de ser sembradas. Las cajas fueron selladas y colocadas en una incubadora con 12 horas de fotoperiodo a una temperatura de 36 °C y humedad constante. Se revisaron las semillas de los lotes diariamente, por un mes, aplicando agua destilada por aspersión cuando así lo consideramos necesario, con la finalidad de mantener húmedo el papel filtro. Se obtuvo el promedio y el porcentaje de germinación para cada uno de los tratamientos realizados y se analizaron los datos con un análisis de varianza para detectar diferencias entre los tratamientos.

## RESULTADOS

### *Tillandsia elongata* (Kunth) var. *subimbricata* (Baker) L.B. Sm.

#### Estudios de Biología Floral

##### Análisis morfológico

La planta tiene una altura de 0.20–1m cuando esta en floración. Las inflorescencias miden de 10–80 cm de altura (medidas desde la base de la roseta), una panícula pinnada o débilmente pinnada, alargada, como unidad de atracción y la flor como unidad de polinización. Las flores miden  $2.25 \pm 0.074$  cm largo y  $0.45 \pm 0.043$  cm de diámetro, el ovario  $0.62 \pm 0.08$  cm largo,  $0.20 \pm 0.00$  cm de diámetro, trilocular, con un promedio de  $40.1 \pm 5.25$  óvulos por lóculo, la bráctea floral  $2.54 \pm 0.135$  cm de largo y  $1.725 \pm 0.192$  de ancho, 3 sépalos de  $1.87 \pm 0.122$  cm de largo por  $0.536 \pm 0.022$  de ancho cada uno, tres pétalos con una longitud de  $1.598 \pm 0.73$  cm y un ancho de  $0.536 \pm 0.093$  cm cada uno, estilo de  $0.976 \pm 0.25$  cm de longitud. Las plantas presentan en su coloración un predominio de colores verde amarillento en la inflorescencia al igual que las brácteas; flores con corola blanca basalmente, púrpura apicalmente. La corola es tubular, con las láminas de los pétalos abriéndose formando una estructura campanulada, erectas. Los estambres y el estigma se encuentran insertos en el tubo de la corola, no son visibles. La planta se reproduce principalmente por semillas, en ocasiones cuando la planta sufre un daño en el meristemo apical por pudrición o daño mecánico, produce una roseta en las axilas foliares o en la base de la planta.

##### Antesis

La antesis de la planta fue crepuscular, entre las 17:00 y 18:00 horas, aunque la flor abre a las 15:00 hrs y cierra a las 20:00 hrs. En promedio abren el 5% de las flores en una inflorescencia por día y la floración se prolonga varios días dependiendo del número de yemas florales que tenga una planta, el cual fluctúa de 8 hasta 154 yemas por planta encontradas en el sitio de estudio.

##### Relación polen/óvulo y fertilidad del polen

La relación polen/óvulo se calculó dividiendo el número de granos de polen producidos por flor (6 veces el que produce una antera), por el número de óvulos por flor (3 veces el producido por lóculo). Los resultados indican una relación polen óvulo P/O  $(699/120.3) = 5.81$  en *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*. La fertilidad de los granos del polen estimada por el proceso de tinción con lactofenol, resultó ser por encima de un 97%. Estos parámetros se pueden relacionar con el número de semillas producidas, el número de óvulos y el porcentaje de aborto de óvulos.



## Patrón de producción y concentración del néctar

Los resultados de la producción de néctar y concentración total de azúcares se resumen en la Figura 4. La producción de néctar varió entre 0 -1.5  $\mu$ l; la concentración total de azúcares fluctuó entre 22° y 28° Brix. El patrón de volumen de néctar presenta una tendencia similar en cuanto a la hora de producción y a la hora del cese en la producción en los dos tratamientos, pero la máxima cantidad de néctar producido se alcanza mas temprano (ca. 5.00 pm) en flores embolsadas en comparación con las flores que no están protegidas. La concentración total de azúcares, es mayor ca. 7:00 pm en ambos tratamientos, probablemente debido a la evaporación de agua del néctar, ya que el volumen disminuye dramáticamente.

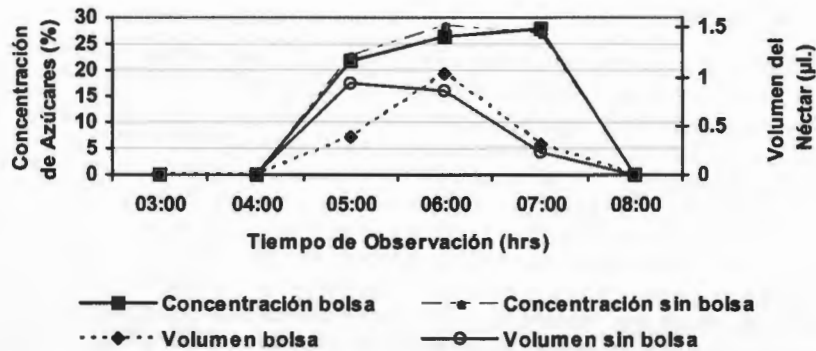


Figura 4. Volumen y concentración total de azúcares del néctar, colectado en flores de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* durante el período de floración del 2001, para flores protegidas con bolsas y flores sin proteger. [Cada punto representa el promedio de 6 flores, en dos días de muestreo].

## Estudios de la biología de polinización

Durante los dos años de investigación, no se observaron visitas de polinizadores en las flores de esta especie; en la zona es común encontrar al colibrí *Amazilia yucatanensis*, el cual revolotea cerca de las plantas, pero no se le observó extrayendo néctar de las flores. Si nos basamos en la forma tubular de la flor, el color morado y la concentración total de azúcares del néctar, podemos inferir que el síndrome de polinización es la ornitofilia. La prueba de anemofilia nos permitió comprobar que las plantas no son polinizadas por el viento, debido a la ausencia de producción de frutos.

## Sistema de apareamiento

La especie es hermafrodita y no es apomíctica. Al comparar los valores de producción de frutos de la prueba de polinización cruzada (7.7%) y de autopolinización (64.70%), observamos que la planta presenta valores de frutos formados por autopolinización significativamente mayores a los producidos por polinización cruzada, por lo que se considera que la planta es autocompatible.

Cuadro 2. Resultado de los cruces controlados en *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*, indicando número de flores tratadas, número de frutos obtenidos y porcentajes de fructificación. Los literales con la misma letra no difieren estadísticamente ( $\chi^2= 3.84$ ).

Cruce	AP(a)	PA (b)	PC (c)	PN (a,b)	AN (d)	AG (d)
# Flores	51	269	26	1421	30	32
# Frutos	33	123	2	800	0	0
% fructificación	64.70	45.72	7.7	56.3	0	0

La planta presenta porcentajes de fructificación por polinización automática (45.72%) significativamente menores a los producidos por autopolinización (manual) (64.70%), por lo que sugerimos que la planta es autógama (Cuadro 3) pero que además puede presentar dicogamia o hercogamia, ya que el porcentaje de fructificación es mayor cuando se realiza la polinización que cuando se autopoliniza la flor sin asistencia.

Al calcular el índice de autogamia (Cuadro 3), los valores son de 0.70 cuando se calcula en base a número de frutos y, cercanos a 1 cuando se calcula con el número de semillas, sugiriendo que no hay efecto por consanguinidad. La misma tendencia se observa con el índice de autocompatibilidad, así como también este índice indica que la asistencia de un vector de polen (polinizador) no es necesaria para producir los frutos. Para el caso del cálculo de cualquiera de los índices con el número de semillas, los valores son altos para los tres índices, indicando que no hay efecto de consanguinidad, ya que siempre puede haber formación de frutos sin semillas, contrario a este caso. Es importante destacar que los valores de polinización automática son muy significativos y que posiblemente siendo la especie autocompatible, la polinización automática se vea favorecida por la cercanía relativa de los órganos sexuales en el tubo de la corola y al periodo corto de antesis, aunque no se alcanzan porcentajes de 100% de haber total compatibilidad y ausencia de hercogamia y dicogamia.

Cuadro 3. Comparación los índices fertilidad, autocompatibilidad y autogamia basados en número de frutos y semillas en *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*.

Índices	Fertilidad (PA/PC)		Auto-compatibilidad (AP/PC)		Autogamia (PA/AP)	
	IAF <sub>f</sub>	IAF <sub>s</sub>	IAC <sub>f</sub>	IAC <sub>s</sub>	IAG <sub>f</sub>	IAG <sub>s</sub>
Frutos (f) y semillas (s)						
Valores	5.94423	0.99132	8.41176	0.97830	0.70633	0.9783

### Número de semillas por fruto

El número de semillas por fruto por cruce fue calculado y los resultados se muestran en el Cuadro 4. No existen diferencias significativas entre los tratamientos [ $F(3,86)=2.30$ ;  $p<0.0829$ ], pero se puede observar que el número de semillas producidas en los frutos por polinización cruzada es relativamente mas alto y mas constante en su alto número de producción de semillas.

Cuadro 4. Número promedio de semillas producidas por cruce de *Tillandsia elongata* var *subimbricata*

Polinización automática	Polinización cruzada	Autopolinización	Polinización natural
112.1±7.86	119.5±0.70	108±8.28	111.73±8.16

### Prueba de germinación de semillas

Todos los frutos producidos por cada cruce fueron abiertos. De este lote se escogieron 300 semillas por prueba y se pusieron a germinar en 3 cajas de Petri con 100 semillas cada una. La prueba de germinación duró 15 días, desde la siembra hasta que ya no se registraron nuevas germinaciones; las semillas empezaron a germinar a los 4 días y aproximadamente a los 7 días no se presentaron más germinaciones, suspendiéndose la prueba cuando las semillas que no germinaron presentaron contaminación por hongos.

En el Cuadro 5 se presentan los resultados de los porcentajes de germinación para las pruebas donde se obtuvieron frutos. Se aplicó una prueba estadística para determinar si existían diferencias entre los tratamientos ( $\chi^2$  0.4195,  $p < 0.1$ ), indicando que no existen diferencias entre los tratamientos empleados, pero el cruce con mayor porcentaje de germinación fue para las semillas de los frutos generados por polinización cruzada.

Cuadro 5. Porcentaje de germinación para cada tratamiento de polinización en *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*

Tratamiento	% de germinación
PC	97.00
PN	94.12
PA	95.23
AP	95.00
Promedio	95.34

### Eficiencia natural

Esta especie presenta bajos niveles de aborto de óvulos por frutos (4.16%) y una alta fertilización de óvulos (Cuadro 6), lo que sugiere una alta eficiencia en los procesos reproductivos. Por el contrario el porcentaje de aborto de flores es alto (43.70%) y el porcentaje de polinización natural es bajo ( $800/1421 = 56.3\%$ ), compensando estos bajos valores al tener un alto índice de fertilidad de los óvulos (Cuadro 5) y su alto porcentaje de polinización automática y niveles altos de autocompatibilidad.

Cuadro 6. Eficiencia natural de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*.

No. De flores	No. de frutos en PN	Flores abortadas (%)	No. de óvulos por ovario	No. de semillas por fruto	Óvulos abortados (%)
1421	800	43.70	120.3±5.25	115±5.0	4.16

### ***Tillandsia brachycaulos* Schldl.**

#### **Estudios de Biología Floral**

##### **Análisis morfológico**

Las plantas se reproducen por semillas, pero crecen principalmente mediante la emisión de hijuelos en la base de la roseta, formando colonias. La planta llega a medir hasta 28 cm de altura cuando está floreciendo. Posee un escapo muy reducido, la inflorescencia se encuentra inmersa dentro de las brácteas del escapo y de las hojas. Las brácteas toman parte en la atracción de polinizadores y se tornan de color rojo cereza, las brácteas florales son lanceoladas con una longitud de  $1.5 \pm 0.19$  cm y  $0.7 \pm 0.8$  cm de ancho. La flor es la unidad de polinización y es de color morado intenso con una longitud de  $5.4 \pm 0.3$  cm y un diámetro de  $0.4 \pm 0.05$  cm, tres sépalos de  $1.36 \pm 0.145$  cm de largo y  $0.37 \pm 0.045$  cm de ancho, tres pétalos de  $4.07 \pm 0.342$  cm de longitud y  $0.60 \pm 0.054$  cm de ancho, abriendo un promedio de 4.5 flores por día. El ovario es glabro, trilobular de  $0.6 \pm 0.04$  cm de longitud y  $0.22 \pm 0.03$  cm de diámetro, aproximadamente  $54.8 \pm 6.3$  óvulos por lóculo. La corola es tubular, las estructuras reproductivas son exertas.

##### **Antesis**

Las flores en *Tillandsia brachycaulos* abren a las 7:00 horas y se mantienen abiertas durante 10 horas en promedio, las anteras emergen antes que el estigma y el polen esta disponible a las 8:00; posteriormente el estigma emerge en promedio a las 9:00 horas y esta receptivo a partir de las 9:30 y 10:00 de la mañana. La longevidad foral es de aproximadamente 9 horas, a partir de las 07:00 de la mañana que es cuando abre la flor hasta las 16:00 horas, cuando la flor se empieza a marchitar y se torna flácida.

##### **Relación polen/óvulo y fertilidad del polen**

La relación P/O es cercana a 7 en *Tillandsia brachycaulos*, esto es, que existen ca. 7 granos de polen por cada óvulo. La fertilidad de los granos de polen esta por encima de un 97%.

##### **Patrón de producción de néctar**

La Figura 5 muestra resultados de la producción de néctar y la concentración del mismo expresada en grados Brix durante las horas de apertura floral. Se tomaron muestras desde las 7:00 am y se registraron cantidades a partir de las 8:00 am, cuando alcanza su máximo de producción para ambos tratamientos. En ambos tratamientos tanto el volumen como la concentración del

néctar una vez producida la máxima cantidad, va disminuyendo su volumen y su concentración subiendo ligeramente a lo largo del día, para alcanzar un mínimo a las 14:00 horas. Las muestras siempre se tomaron de plantas distintas, y se detectó que la planta no produce más néctar cuando este es removido, ya sea de forma artificial o por el polinizador. Los grados Brix fluctuaron entre los 5 y 28° y aunque sufren un ligero incremento entre las 11:00 am y 2:00 pm y es mayor a las 13:00 hrs, probablemente debido a la evaporación del líquido del néctar por el aumento de la temperatura durante el día. La concentración de azúcares totales disminuye al final del día al llegar los volúmenes de néctar a cero. Es interesante indicar, que el néctar aparentemente se reabsorbe en flores embolsadas, donde no se ha expuesto la flor a ladrones de néctar.

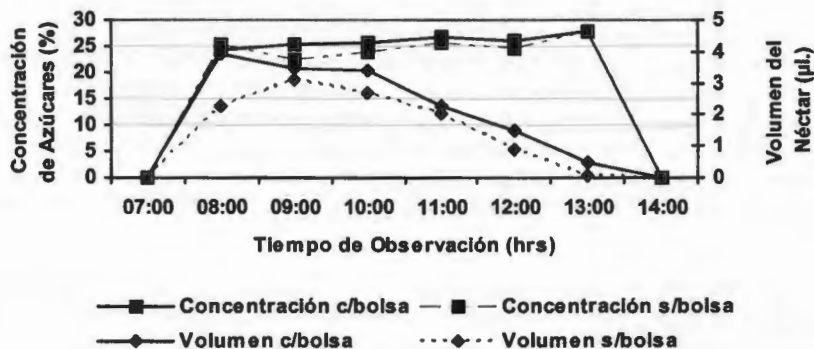


Figura 5. Cantidad de néctar y concentración (grados Brix) en *Tillandsia brachycaulos* en el periodo de floración del 2001, en flores protegidas y no protegidas

La cantidad del néctar que no es removido, es reabsorbido por la planta, esto lo sugiere el hecho de que la cantidad de néctar tanto en flores embolsadas como en descubiertas disminuyó al final de la antesis (14 hrs). En cuanto a la concentración es prácticamente igual tanto en flores con y sin bolsa, aunque es importante indicar que es ligeramente mayor en flores embolsadas, lo cual sugiere que puede haber un efecto de la temperatura que se alcanza en el interior de las bolsas, induciendo a la pérdida de agua y produciendo una mayor concentración de solutos.

#### Biología de polinización de *Tillandsia brachycaulos* Schtdl.

Observamos visitas legítimas a la flor de un colibrí identificado como *Amazilia yucatanensis* (macho). La tendencia del patrón de visita de este colibrí revela una intensa actividad entre las 08:00 y las 12:00. Es importante mencionar que este colibrí visita el genet en repetidas ocasiones cuando hay varias rosetas floreciendo al mismo tiempo. Al tomar muestras de néctar de flores visitadas por este colibrí, no se encontró néctar, indicando que no hay producción continua o posterior de néctar una vez que éste es removido por el polinizador.

Las plantas fueron visitadas además, por *Apis mellifera*, las cuales colectan polen, y aunque portaban muy pocas cantidades del mismo, el insecto tocaba el estigma y las anteras simultáneamente, pudiendo operar como un

polinizador. En la zona de estudio se han encontrado plantas presumiblemente híbridos entre *Tillandsia brachycaulos* y *T. balbisiana*, otra especie con floración en la misma época de *T. brachycaulos* (l. Ramírez com. per.). Observamos que el colibrí *Amazilia yucatanensis* visita al mismo tiempo a *Tillandsia brachycaulos* y *T. balbisiana*, inclusive visitando una misma planta en repetidas ocasiones. Las pruebas de anemofilia no generaron frutos, por lo cual descartamos que en *Tillandsia brachycaulos* el viento actúe como vector del polen.

### Sistema de apareamiento

La especie es hermafrodita y no es apomíctica y precisa de un vector biótico de polen. La comparación con pruebas estadísticas de los resultados de porcentaje de producción de frutos luego de pruebas controladas, indican que si hay diferencias entre algunos de los tratamientos: autopolinización (19.35%) no es significativamente diferente de polinización automática (23.85%), lo cual sugiere que el proceso de autopolinización se puede llevar a cabo con o sin presencia de vector de polen y que hay sincronía de maduración de órganos sexuales y no hay barreras espaciales para que ambas estructuras entren en contacto. Los porcentajes de fructificación por polinización natural y cruzada no son significativamente diferentes, indicando que hay un eficiente movimiento de polen por colibríes.

Cuadro 7. Resultado de los cruces controlados en *Tillandsia brachycaulos*, indicando número de flores tratados, número de frutos obtenidos y porcentajes de fructificación. Los literales con la misma letra no difieren estadísticamente ( $X^2 = 3.84$ ).

Cruce	AP(c)	PA (b,c)	PC (a)	PN (a)	AN (d)	AG (d)
# Flores	62	109	63	155	56	50
# Frutos	12	26	27	77	0	0
% fructificación	19.35	23.85	42.85	49.67	0	0

Cuadro 8. Índices de fertilidad, autocompatibilidad y autogamia en *Tillandsia brachycaulos* en el año 2001, basados en la producción de semillas (s) y frutos (f).

Fertilidad (PA/PC)		Auto-compatibilidad (AP/PC)		Autogamia (PA/AP)	
IAF <sub>f</sub>	IAF <sub>s</sub>	IAC <sub>f</sub>	IAC <sub>s</sub>	IAG <sub>f</sub>	IAG <sub>s</sub>
0.55657	0.98624	0.45161	1.00529	1.2319	1.9810

*Tillandsia elongata* var. *subimbricata* es una planta autocompatible con altos calores de autogamia. Los valores de los índices de fertilidad cuando basados en frutos (0.55657), son mucho menores que cuando se calcula por semillas (0.98624), indicando que aunque se producen pocos frutos, las semillas tienen alta viabilidad (se contabilizaron solo semillas con embrión). El índice de autocompatibilidad por otro lado, muestra la misma tendencia que el índice anterior en lo que respecta altos valores al tomar en cuenta frutos y semillas, su valor de 1.00529 indica que no hay depresión por consanguinidad (no afecta el número de semillas viables). Por último el índice de autogamia, tiene la misma tendencia que el anterior. No obstante, la planta tiene la capacidad de ser autocompatible lo cual le podría permitir, en caso de una colonización en el que generalmente llega una sola semilla y no hay fuentes cercanas de polen externo, el poder autopolinizarse y producir semillas para la conquista de nuevo forofitos

### Numero de semillas por fruto

El Cuadro 9 muestra los resultados de número de semillas producidas por fruto, en cada una de las pruebas de estrategia reproductiva, observamos que el resultado de polinización cruzada es ligeramente mayor y no difiere de los resultados por polinización automática. Análisis estadísticos de los resultados indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos [F(3,46)=2.93;  $p < 0.0434$ ], en donde la prueba con mayor productividad de semillas fue la polinización cruzada respecto a todas las demás ( $P < 0.05$ ), según la comparación de medias realizado (LSD).

Cuadro 9. Número promedio de semillas producidas por cruce en *Tillandsia brachycaulos*. Los literales con las mismas letras, no presentan diferencias significativas según pruebas estadísticas aplicadas (ver texto)

Polinización Natural (a)	Polinización automática (b)	Polinización Cruzada (b)	Auto polinización (b)
134.65±20.17	131.69±18.31	149.22±6.88	125.37±16.97

### Prueba de germinación de semillas

Las semillas de *Tillandsia brachycaulos* se pusieron a germinar en las mismas condiciones que las de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*, los resultados se presentan en el Cuadro 10. Se aplicó una prueba estadística para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos ( $\chi^2$ ), encontrándose que no existen diferencias entre los tratamientos ( $\chi^2$  0.7226,  $p < 0.1$ ), indicando que el cruce con mayor porcentaje de germinación fue en los semillas generadas por polinización natural seguido por polinización cruzada.

Cuadro 10. Porcentaje de germinación para cada tratamiento de polinización en *Tillandsia brachycaulos*

Tratamiento	% de germinación
PN	93.40
PC	92.20
PA	91.40
AP	90.20

### Eficiencia natural

En el Cuadro 11 se muestran los resultados de la eficiencia natural de *Tillandsia brachycaulos* donde se observa que los valores de aborto de flores son relativamente altos (50.32%), comparados con el porcentaje de aborto de óvulos el cual es relativamente bajo (18.24%). Esto sugiere un compromiso reproductivo al producir gran cantidad de flores, donde aproximadamente la mitad no es polinizada, pero el resto de las flores polinizadas produce un alto número de semillas, sugerido por el bajo porcentaje de aborto de óvulos.



Cuadro 11. Eficiencia natural de *Tillandsia brachycaulos*

#Flores	#Frutos	%Aborto flores	#Óvulos/ovario	# de semillas x fruto	%Aborto óvulos
155	77	50.32	164.45±6.26	134.65±20.7	18.24%

### Comparación entre especies

La figura 6 muestra la comparación del volumen de néctar de ambas especies, *Tillandsia brachycaulos* produce un volumen máximo de 4.5 µl de néctar en flores embolsadas y 4 µl sin embolsar, mucho mayor que la cantidad de néctar que producen las flores de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*, las cuales producen relativamente menores cantidades máximas de volumen en ambas condiciones (1.08 µl en flores embolsadas y ligeramente menor en flores sin embolsar). En *Tillandsia brachycaulos* en cuanto abre la flor, inmediatamente se detecta néctar disponible (8:00 horas), por el contrario en *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* el néctar lo comienza a producir después de 2 horas que se completa la elongación y apertura floral.

La longevidad floral es muy diferente ambas especies, en *Tillandsia brachycaulos* las flores permanecen abiertas por aproximadamente 7 horas, mientras que el *T. elongata* var. *subimbricata* apenas 4 horas.

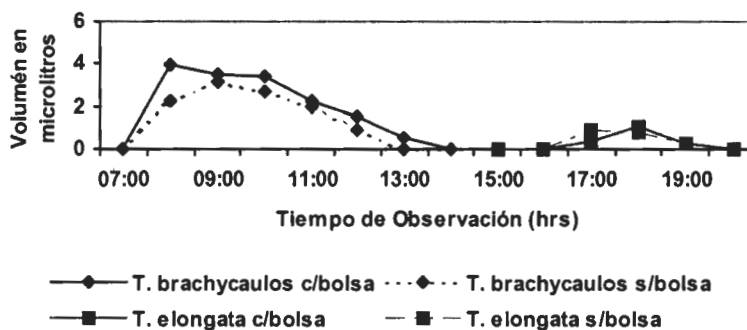


Figura 6. Comparación de la cantidad y concentración de azúcares totales del néctar en *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y *T. brachycaulos*, en flores embolsadas y sin embolsar

La cantidad de néctar varía entre especies, es decir *T. elongata* var. *subimbricata* produce menor cantidad de néctar posiblemente relacionado con su sistema de apareamiento, donde las flores al autopolinizarse, han evolucionado un sistema de poca oferta de recompensa al polinizador innecesario, aunque sí produce néctar como una opción a la atracción de agentes polinizadores para poder posibilitar una variabilidad genética a sus poblaciones, mientras que *T. brachycaulos* si produce mas néctar ya que ofrece mas recursos a los polinizadores y lleva a cabo principalmente polinización cruzada.

La figura 7 presenta una comparación de la concentración total de azúcares en flores embolsadas y sin embolsar de ambas especies. Los resultados son similares (*Tillandsia brachycaulos* 26.88° Brix y *T. elongata* var. *subimbricata*



28.5°Brix ) no encontrando una diferencia significativa entre flores embolsadas y sin embolsar de las dos especies ni entre estas, tal vez el néctar ligeramente más concentrado en flores sin embolsar, debido posiblemente a la evaporación de agua del néctar. El pico más alto de concentración total de azúcares se alcanza entre las 13:00 y 14:00 horas del día para *Tillandsia brachycaulos*, que ocurre cuando la planta tiene bajos volúmenes de néctar. De la misma manera, *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* alcanza el pico más alto de volumen a las 18:00 horas, igualmente coincidiendo con el momento de mayor concentración de néctar.

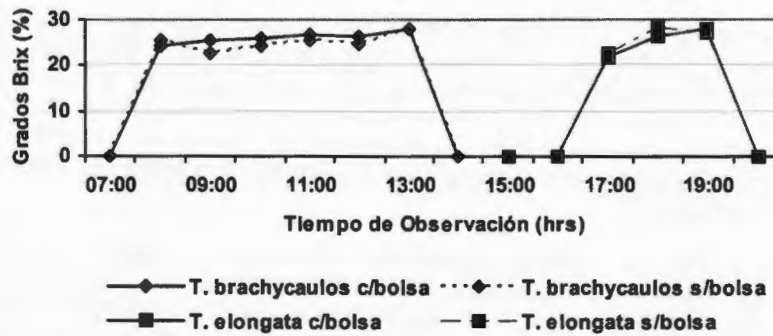


Fig. 7 Concentración total de azúcares (° Brix) de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y *Tillandsia brachycaulos* en flores embolsadas y sin embolsar.

### Índice de Autocompatibilidad

El índice de fertilidad fue calculado con el porcentaje de frutos en polinización automática dividido por el porcentaje de frutos en polinización cruzada ( $AFI_f$ ) y también calculado en base al porcentaje de semillas totales viables = PA/PC ( $AFI_s$ ). Valores mayores de 1 sugieren que existe autogamia, valores < 1 que las plantas dependen de un agente polinizador para poder producir frutos o semillas y que es alógama (puede ser geitonogamia o xenogamia).

La utilización de frutos en el índice de compatibilidad es para conocer si la planta es capaz de auto polinizarse o si necesita de otra flor o de otra planta para poder realizar la producción de frutos, y esto se midió a través de la producción de frutos en pruebas de PC y de AP. El uso del número de semillas para el cálculo del mismo índice, permite además de tener un estimador más real de la autocompatibilidad, de estimar el efecto de la consanguinidad en la producción de semillas (Cuadro 12).

Cuadro 12. Índices de fertilidad, auto compatibilidad y autogamia basados en frutos producidos (f) y semillas producidas (s) en los cruces de autopolinización, polinización automática y polinización cruzada, en *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y *T. brachycaulos*.

Taxón	Fertilidad (PA/PC)		Autocompatibilidad (AP/PC)		Autogamia (PA/AP)	
	IAF <sub>f</sub>	IAF <sub>s</sub>	IAC <sub>f</sub>	IAC <sub>s</sub>	IAG <sub>f</sub>	IAG <sub>s</sub>
<i>T. brachycaulos</i>	0.55657	0.98624	0.45161	1.00529	1.2319	1.9810
<i>T. elongata</i> var. <i>subimbricata</i>	5.94423	0.99132	8.41176	0.97830	0.70633	0.9783

Individuos de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* son capaces de producir frutos y semillas de manera espontánea en ausencia de polinizadores, ya que el índice de fertilidad de frutos es alto (IAF<sub>f</sub> =5.94), mientras que el caso de semillas fue cerca de 1 (IAF<sub>s</sub> =0.99). La diferencia de ambos valores indica que hay una marcada producción más alta de frutos por polinización automática pero que la consanguinidad no está afectando la producción de semillas ya que el IAF<sub>s</sub> en muy cercano a 1.

Individuos de *Tillandsia brachycaulos* presentan un índice de fertilidad calculado en base a los frutos menor de 1 (IAF<sub>f</sub> =0.55657), lo cual indica que depende de la actividad de los polinizadores para la producción de frutos. Mientras que en la producción de semillas se observó que el índice fue 0.98624, evidentemente la viabilidad de las semillas no depende directamente de un polinizador para la generación de frutos.

Para individuos de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* se pudo apreciar que el valor de autocompatibilidad basado en frutos fue por mucho mayor de 1 (ISCI<sub>f</sub> = 8.41176), indicando que la especie es totalmente auto compatible, mientras que en el caso del cálculo con semillas, se observó un valor ligeramente menor de 1 (SCI<sub>s</sub> 0.97830), sugiriendo que en esta especie no existe un efecto de la depresión por consanguinidad medido como la viabilidad de las semillas.

Para el caso de *Tillandsia brachycaulos*, se observó que los índices de autocompatibilidad basados en frutos son menores de 1 (ISCI<sub>f</sub> =0.45161). Según la clasificación de Wendt et al. (2002), esta especie presenta valores que sugieren una incompatibilidad parcial. Cuando el índice es calculado en base a semillas viables, sugiere que la especie es autocompatible ya que el índice calculado fue ligeramente mayor de 1 (ISCI<sub>s</sub> =1.00529). Por lo tanto, como se menciono antes, *Tillandsia brachycaulos* es una especie que tiende a la autoincompatibilidad ya que arroja índices por debajo de 0.5, pero cuando el índice es a partir de semillas viables, la especie parece ser autocompatible, mediante estos resultados se puede interpretar que esta especie no sufre los estragos de la endogamia y que la medida en base a frutos puede ser erróneas y/o incompletas.

## DISCUSIÓN

El presente estudio abarcó diferentes etapas de la biología floral y reproductiva de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y *T. brachycaulos*.

Biología floral: el crecimiento vegetativo está presente en las dos especies, además de la reproducción sexual. Benzing (1981, 1990) menciona que esta es una característica peculiar de las plantas epifitas y una estrategia clave en su éxito reproductivo. Ambas especies presentan similitudes en la forma de la flor (corola tubular), el color morado de los pétalos, ausencia de fragancias, antesis diurna, sugiriendo que la ornitofilia es el síndrome de polinización de estas dos especies, síndrome que es común en muchas especies de bromelias (Benzing 1980, Gardner 1986). El tamaño de la inflorescencia relacionado con la coloración de las brácteas, es una diferencia marcada entre las dos especies. *Tillandsia brachycaulos* tiene una inflorescencia con escapo corto, las brácteas se tornan de color rojo cereza en el momento de la floración; mientras que *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* presenta una inflorescencia tipo panícula de hasta 80 cm, con un escapo largo y con las brácteas del mismo color de las hojas. Estas diferencias están relacionadas con las estrategias reproductivas de ambas especies para la atracción de polinizadores (McWilliams 1974, Benzing 1980), aunque en el sitio de estudio no se observaron polinizadores para esta especie.

El arreglo de los órganos reproductivos de las dos especies, difiere en la posición de los estambres respecto al estigma, debido a que cuando ambas especies se encuentran en antesis, los estambres y estigma de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* no emergen y siempre están ambos en contacto dentro del tubo de la corola, por el contrario, los estambres y el estigma de *Tillandsia brachycaulos*, están exertos y separados, por lo que las flores son hercógamas (Dafni 1992; Kress *et al.* 1990). El primer arreglo floral está relacionado con la alta tasa de formación de frutos por autopolinización representando una ventaja para de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*. En *Tillandsia brachycaulos*, por el contrario, el arreglo de las estructuras sexuales promueve la xenogamia.

Ambas especies son simpátricas, florecen la misma época, lo cual podría ocasionar un solapamiento en la interacción polinizador-planta (Grases & Ramírez 1998), pero no ocurre ya que la antesis de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* es por las tardes y la de *T. brachycaulos* por las mañanas.

El tiempo de vida de las flores de ambos taxa, es menor a 8 horas. Se registro asincronía en la maduración sexual de las estructuras masculinas y femeninas de las flores en ambas especies, lo que nos sugiere que los individuos sean protandros, es decir las estructuras masculinas maduran antes que las femeninas (Eguiarte *et al.* 1992).

Por medio del conocimiento de la naturaleza adaptativa de la producción de néctar floral, se pueden conocer aspectos de la relación beneficio costo de las plantas en términos de crecimiento y reproducción. En la producción de néctar *Blandfordia nobilis* Sm. (Liliaceae), (Pyke & Waser 1981), se reporta el uso del 37% de su energía disponible a la producción de néctar sin causar efectos negativos en el crecimiento y proceso reproductivo de la planta; removieron néctar de las inflorescencias de *Blandfordia nobilis* lo cual produjo un incremento en la

producción de néctar pero redujo la habilidad de planta para producir semillas. Las plantas de *Tillandsia brachycaulos* produjeron una cantidad máxima de 4.6  $\mu$ l de néctar y las de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* ca. 1  $\mu$ l, ambos taxa ofrecen una recompensa que es relativamente baja en cantidad, pero con un 25.45% de azúcares totales en *Tillandsia brachycaulos* y 28.5% en *T. elongata* var. *subimbricata*. Este tipo de néctar cumple con las necesidades requeridas por colibríes (García-Franco 1990).

Es importante mencionar que plantas bajo severo estrés ambiental, y con un costo alto en los procesos reproductivos, han desarrollado mecanismos de adaptación que les permita ser exitosas en estas condiciones e incrementar su fitness. Un mecanismo de adaptación que les permita recuperar el néctar no utilizado, después de ser o no polinizadas las flores, podría ser una ventaja para plantas que necesitan, uno o pocos eventos de polinización para la producción de frutos (Koopowitz & Marchant, 1998). La reabsorción de néctar ha sido reportada en pocas familias de plantas como la Brassicaceae, Fabaceae, Mirtaceae, entre otras (Cruden *et al.*, 1983; Búrquez and Corbet, 1991 citado por Koopowitz and Marchant, 1998).

En ambos taxones, se observa una disminución marcada del néctar en cantidad y calidad una vez que se alcanza el pico máximo de producción, en flores embolsadas y sin embolsar, lo que nos sugiere que probablemente las plantas reabsorban el néctar que no se utilizó, plantas a las que le fue removido el néctar por colibríes presentaron el mismo comportamiento. Este comportamiento puede ser una estrategia importante para plantas que se desarrollan en condiciones xéricas o con limitaciones hídricas y nutrimentales, como en muchas orquídeas (Koopowitz and Marchant, 1998) o como las tillandsias epífitas, en las cuales la disponibilidad de nutrientes en baja y el costo energético de producir néctar es muy alto.

## SISTEMAS DE APAREAMIENTO

El sistema de apareamiento de las plantas está influenciado por una combinación de factores, íntimamente ligado con los índices de recombinación genética dentro de las poblaciones (Martinelli, 1994). Entre estos factores encontramos a la autopolinización y la polinización cruzada, plantas capaces de auto polinizarse y auto fertilizarse (autogamia). La fertilización cruzada se ve favorecida a través de mecanismos de autoincompatibilidad genética (Gibbs, 1990).

En el caso de las *Tillandsias* estudiadas, *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* se observó que esta especie es capaz de producir frutos y semillas de manera espontánea en ausencia de polinizadores, así el índice de fertilidad de frutos fue alto ( $AFI_f$  5.94), mientras que en el caso de semillas fue cerca de 1 ( $AFI_s$  0.99). La ausencia de polinizadores en las horas de antesis de las flores, no interfiere en la alta producción de frutos y semillas en condiciones naturales, ya que la alta cantidad de frutos producidos en inflorescencias cubiertas (embolsadas) indica que esta especie tiene un mecanismo de autogamia.

Para *Tillandsia brachycaulos*, se observó algo diferente, ya que el índice de fertilidad de los frutos fue menor de 1 ( $AFI_f$  0.55657), lo cual indica que esta

especie en particular depende parcialmente de la actividad de los polinizadores para la producción de frutos, mecanismo importante para el mantenimiento de la variabilidad genética de la población. Por otro lado, cuando el índice fue calculado en base al número de semillas, índice fue 0.98624, lo cual hace evidente que la viabilidad de las semillas es alta aun cuando la producción de fruto no es del 100%. Esto es por la capacidad que tiene la especie para producir frutos por autopolinización, y a la gran viabilidad de sus semillas independientemente del tipo de cruce por el cual fueron producidas.

Para *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* se pudo apreciar que el valor de autocompatibilidad calculado en base a frutos producidos, fue por mucho mayor de 1 ( $SCI_f$  8.41176), indicando claramente que la especie es compatible, mientras que el mismo índice calculado con el número de semillas viables, se obtuvo un valor ligeramente menor de 1 ( $SCI_s$  0.97830), indicando que en esta especie que no existe un efecto de depresión por consanguinidad, aún siendo una especie totalmente autógena.

Para *Tillandsia brachycaulos* se observó que los índices de autocompatibilidad calculados en base a frutos es mucho menor de 1 ( $SCI_f$  0.45161), lo cual indica que esta especie presenta una parcial incompatibilidad (Wendt *et al.* 2002). Pero cuando el índice es calculado basándose en semillas viables, la especie parece ser autocompatible ya que el índice calculado fue ligeramente mayor de 1 ( $SCI_s$  1.00529), además de que también sugiere que no existe un efecto de depresión por consanguinidad, al igual que *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*. La polinización autónoma puede ser ligeramente rara en estas plantas, ya que los niveles intermedios de autocompatibilidad así lo indican. La ausencia de polinizadores plantea una barrera para un cruzamiento exitoso.

## RELACIÓN POLEN/ÓVULO

Estos son los primeros reportes para la familia Bromeliaceae de los valores polen/óvulo. Cruden & Janzen (1979) citados por Grases & Ramírez (1988) mencionan que los valores bajos de la relación P/O, son el reflejo de una afluencia suficiente del polen movido por los polinizadores al estigma y la fertilidad de este, esto está relacionado aparentemente con un eficiente transporte del polen; por el contrario la eficiencia reproductiva de las plantas puede ser afectada drásticamente por la ausencia de sus polinizadores naturales (Grases & Ramírez 1998). Pérez (1990) menciona para *Psychotria faxlucens* Lorente & Dwyer (Rubiaceae), que el principal factor que afecta al cociente P/O es el número de granos de polen por flor y no el número de óvulos/ovario, ya que el número de óvulos por flor es de 2 y fue constante para dos tipos de morfos florales. En el caso de nuestras taxa el número de óvulos por flor es constante encontrando una mayor variación en el polen por flor.

## BIBLIOGRAFIA

- Bawa**, H. S. 1990. Plant-pollinator interactions in tropical rain forest. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 21: 399-422.
- Benzing**, D. H. 1980. The Biology of Bromeliads. Mad River Press. Eureka. Pp. 305- 436.
- Benzing**, D. H. 1981. The population dynamics of *Tillandsia circinnata* (Bromeliaceae): cypress crown colonies in southern Florida. *Selbyana* 5: 256-263.
- Benzing**, D. H. 1990. Vascular epiphytes. Cambridge University Press. Cambridge. 354 pp.
- Bernardello**, L. M.; L. Galleto & H. R. Juliani. 1991. Floral nectar, nectary structure, and pollinators in some Argentinean Bromeliaceae. *Annual of Botany* 67: 401-411.
- Cruden**, R. W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31:32-46.
- Cruden**, R. W., S.M. Hernann & S. Peterson. 1983. Patterns of nectar production and plant- pollination coevolution. Pag 80-122. In B. Bnetley and T. Elias (eds). The biology of nectaries. Columbia University Press, New York.
- Chuc**, M. G. 2002. Dispersión de polen de *Hechtia schottii* Baker ex Hemsley (Bromeliaceae). Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario No 2, Yucatán, México.
- Dafni**, A. 1992. Pollination Ecology: A practical approach. Oxford University Press Inc., New York, pp. 8-173.
- Eguiarte** L. E., N. Pérez-Naseer, & D. Piñero.1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and coservation. *Heredity* 69: 217-228.
- Feinsinger**, P., H. M. Tiebout III. and B. E. Young. 1991. Do tropical bird-pollinated plants exhibit density-dependent interaccctions? Field experiments. *Ecology* 72: 1953-1963.
- García-Franco**, J. G. 1990. Biología reproductiva de *Tillandsia deppeana* Steudel. (Bromeliaceae). Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias Biológicas. pp 7-58.
- Gardner**, C. S. 1986. Inferences about pollination in *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Selbyana* 9: 76-86.
- Gibbs**, P. 1990. Self-compatibility in flowering plants: a neotropical perspective. *Review Brasil Botany*. 13: 125-136.
- Gilmartin**, A. J. & G. K. Brown. 1985. Cleistogamy in *Tillandsia capillaris* (Bromeliaceae). *Biotropica* 17: 256-259.

- Grases, C. & N. Ramírez.** 1998. Biología reproductiva de cinco especies ornitófilas en un fragmento de bosque caducifolio secundario en Venezuela. *Revista de Biología Tropical* 46(4): 1095-1108.
- Kearns, A. C., W. D. Inoué and N. M. Waser.** 1998. Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 83-112.
- Koopowitz, H. & T. A. Marcht.** 1998. Postpollination nectar reabsorption in the African epiphyte *Aerangis verdickii* (Orchidaceae) *American Journal of Botany* 85(4): 508-512.
- Kress, W. J.; H. E. Luther, and C. S. Roesel.** 1990. Genetic Variation in three Species of Florida *Tillandsia*. *The Journal of the Bromeliad Society*. 40: 59-63.
- Martinelli, G.** 1994. Reproductive biology of Bromeliaceae in the Atlantic Rainforest of Southeastern Brazil. Tesis doctoral, School of Biological and Medical Sciences University of St. Andrews. pp 13-28.
- McWilliams, E. L.** 1974. Evolutionary ecology. En: L.B. Smith y R. J. Downs (eds.). *Flora Neotropica, Monograph No. 14 (Pitcairnioideae)* 40-45. Hafner Press, New York.
- Murcia, C.** 2002. Ecología de la polinización. En Guariguata M. R. y G. H. Kattan (eds.). *Ecología y conservación de Bosques Neotropicales. Libro Universitario Regional. Costa Rica.* pp 493-525.
- Pérez, N. N.** 1990. Biología reproductiva y estructura genética de *Psychotria faxlucens* (Rubiaceae) en los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de Maestría. UNAM. Facultad de Ciencias. pp 3-75.
- Peterson, R. & E. Calif.** 1973. A field guide to mexican birds and adjacent Central America. Houghton Mifflin Company Boston, Mass. U.S.A.
- Proctor, M., P. Yeo & A. Lack.** 1996. *The Natural History of Pollination.* Timber Press Inc. Portlan, Oregon, U.S.A. pp 225-265.
- Pyke, G. H. & N. M. Waser.** 1981. The production of dilute nectar by hummingbird and honeyeater flower. *Biotropica* 13:260.270.
- Ramírez, N.** 1992. Especificidad de los sistemas de polinización en una comunidad arbustiva de la Guayana Venezolana. *Ecotrópico* 5:1-19.
- Richards** 1996. *Vegetación de México.* Ed. Limusa, México. 317-389 pp 25-58.
- Sarthou, C., S. Samadi and M. Boisseler-Dubayle.** 2001 Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. *American Journal of Botany* 88: 861-868.
- Sick, H.** 1984. *Ornitología brasileira. Uma introducao Família Trochilidae.* Jose Olimpio Editora. 354- 383 pp.

**Smith, B.** and R. J. Downs, 1977. Tillandsioideae (Bromeliaceae) Flora Neotropica. No.14 part. 2 Organization for Flora Neotropica, New York.

**Stiles, F. G.** 1978. Temporal organization of flowering among the hummingbird foodplants of tropical wet forest. *Biotropica* 10:194-210.

**Stuessy, T. F.** 1990. Plant taxonomy: The systematic evaluation of comparative data. Columbia University Press, New York.

**Utley, J.F.** 1986. A revision of the middle American thecophyoid Vrieseas (Bromeliaceae). *Tulane Studies in Zoology and Botany* 24: 1-81.

**Wendt, T.;** M. B. F Canela; J.E. Monrrey-Jones, A. B. Henriques & R. I. Ríos (2002). Recognition of *Pitcairnia corcovadensis* (Bromeliaceae) at the species level. *Systematics. Botany*.25: 389-398.



## CAPITULO 3

### VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* Y DE *T. brachycaulos* EN EL PARQUE NACIONAL DE DZIBILCHALTÚN, YUCATÁN

#### INTRODUCCION

La evolución de la estructura genética y su mantenimiento en el tiempo y en el espacio, está sujeto a la acción de tres fuerzas con efectos divergentes (Futuyma, 2000, Nason, 2002). Por un lado la selección natural y la deriva génica como las fuerzas que favorecen la diferenciación genética de una población, y por otro lado el flujo genético (Brown, 1979; Slatkin, 1980; Futuyma, 2000 y Nason, 2002) que tiende a igualarlas. Estas fuerzas que tienden a determinar la diferenciación genética entre poblaciones juegan un papel importante en la diversidad y estructura genética, entre y dentro de las poblaciones.

La diversidad o variación genética de una especie es estudiada por la genética de poblaciones a partir de tres diferentes perspectivas: observando a los individuos independientemente, observando una población en particular o haciendo comparaciones entre poblaciones distintas (Hartl, 1988; Hartl & Clark, 1989, Nason, 2002). La diversidad genética al nivel de individuo, es definida por la frecuencia relativa de los alelos, el grado de heterocigosis, o la proporción de loci que poseen alelos distintos respecto al total de loci examinados. Hablando de poblaciones, la variación genética es definida tanto por el tipo de alelos presentes como sus frecuencias relativas y se expresa al nivel de una población dada y entre poblaciones distintas, conforma la estructura genética de una población (Nason, 2002).

La diversidad genética entre una misma especie pero entre poblaciones distintas, se refiere a las diferencias que muestran en su acervo genético, las poblaciones en número de estudio, diferencias que obedecen a factores biológicos o geográficos detectables a lo largo del rango de distribución natural de la especie, o a características ecológicas y de historia de vida, tales como mecanismos de polinización, dispersión de semillas y fecundidad (Pérez, 1990). Los sistemas de apareamiento y el movimiento de genes se consideran factores importantes en la determinación de la variación genética (Loveless & Hamrick, 1984; Nason, 2002).

En las plantas existe una gran variedad de sistemas de apareamiento, y pueden ser estudiados y estimados por medio de aproximaciones directas a partir de la biología floral y ecología reproductiva o por técnicas indirectas, obtenidos a partir de la variación isoenzimática (Pérez, 1990), utilizando datos de frecuencia alélicas, polimorfismos en las secuencias de restricción o secuencias de ADN y a partir de estos generar estimadores del número de gametos o de individuos que se mueven (Nason, 2002). Existe una estrecha relación entre el sistema de apareamiento de las plantas y la variación genética de éstas, las plantas que mayormente se autofertilizan presentan por lo general, bajo niveles de heterocigosis y una alta diferenciación entre poblaciones, por el contrario, las especies que predominantemente se entrecruzan presentan niveles de variación

genética mayores (Hamrick *et al.* 1981). El entrecruzamiento como sistema de apareamiento es muy importante ya que es el que promueve el movimiento de polen entre individuos y reduce la diferenciación entre poblaciones (Hamrick, 1989).

Soltis *et al.* (1987) estudiaron la variación genética en dos especies epífitas del género *Tillandsia*, *T. ionantha* Planch. y *T. recurvata* L., las cuales difieren en el sistema de apareamiento porque *T. ionantha* presenta polinización cruzada y *T. recurvata* se autopoliniza. Los datos electroforéticos indican niveles extremadamente altos de autopolinización en *Tillandsia ionantha* la cual exhibe características propias de las especies que se autocruzan. Los valores de "P" (proporción de loci polimórfico) y "H" (porcentaje de heterocigosis) de alelos por locus, es mucho mas alto en *T. ionantha* que en *T. recurvata*. El valor promedio de  $F_{is}$  (índice de fijación de un individuo relativo a la subpoblación) para *Tillandsia ionantha* es bajo (0.056) aproximadamente cercano con los valores en equilibrio con Hardy-Weinberg, en contraste con los valores de  $F_{is}$  de *T. recurvata* (1.00) lo que indica una completa ausencia de heterocigotos. Las dos especies difieren también en la estructura genética ya que los bajos valores para  $F_{st}$  (nivel de divergencia de la diversidad genética total de una especie, que se reparte entre diferentes poblaciones) en *Tillandsia ionantha* sugieren que existe pequeñas variaciones en las frecuencias alélicas entre sus poblaciones. Por el contrario, los altos valores  $F_{st}$  de obtenidos por *Tillandsia recurvata* sugieren una sustancial heterogeneidad genética entre sus poblaciones. Los valores promedio de loci polimórfico de *Tillandsia ionantha* (0.995) son un poco mayores que en *T. recurvata* (0.931). Los datos genéticos de las poblaciones están en concordancia con lo sugerido por Benzing (1978), donde propone que las epífitas extremas como *T. recurvata* se caracterizan por el incremento de la autogamia para asegurar la alta producción de frutos.

Del mismo modo Kress *et al.* (1990) estudiaron niveles de variación genética en especies del género *Tillandsia* que tienen diferentes sistemas de apareamiento autopolinización y fertilización cruzada, utilizando la electroforesis de isoenzimas. En *Tillandsia recurvata* tanto las anteras como el estigma están pegados en la corola en la parte más profunda y la misma permanece parcialmente cerrada durante la antesis. Por otro lado, en *Tillandsia usneoides* (L.) L. los lóbulos de la corola permanecen extendidos y abiertos durante la antesis exponiendo las anteras. Lo mismo que, en *Tillandsia utriculata* (L.) L. en donde tanto los estambres como el estigma, están exertos durante la antesis. Basados en estas observaciones infirieron que la consanguinidad podría ser mayor en *Tillandsia recurvata* que en *Tillandsia utriculata* ó *Tillandsia usneoides*. Los datos de fructificación evidencian que *Tillandsia utriculata* y *T. recurvata* tienen un amarre de fruto que se encuentra en proporción al número de flores producidas, sugiriendo que estas especies son ampliamente autógamas. Por otra parte *Tillandsia usneoides* se caracteriza por una tasa de fructificación baja en relación al número de flores, lo cual sugiere que presenta xenogamia o cruzamiento libre. Ellos predijeron que los estudios isoenzimáticos acerca de la variación genética dentro y entre poblaciones podrían darnos otra prueba de los sistemas de entrecruzamiento en estas especies de *Tillandsia*. Los resultados indican que *Tillandsia usneoides* presentó un mayor número de loci, mayor heterocigocidad y el mayor número de alelos por población comparadas con *Tillandsia utriculata* y *Tillandsia recurvata*.

La distribución territorial puede afectar la variación genética. Izquierdo (1995) estudió la estructura y variación genética en cuatro especies de *Aechmea* (subgénero *Podaechmea*) en México: *A. mexicana* Baker, *A. lueddemanniana* (K. Koch) Brong. ex Mez, *A. macvaughii* L.B. Sm. y *A. tuitensis* P. Magaña & E. Lott. Utilizó isoenzimas como una herramienta para investigar si había o no relación de la estructura y variación genética entre las cuatro especies. Se esperaba encontrar una mayor variación genética en especies de amplia distribución y menor variación en las especies endémicas. Los resultados indican que todas las especies mostraron niveles moderadamente bajos de variación genética. *Aechmea mexicana* una especie con amplia distribución mostró los valores más bajos en el número promedio de los alelos por locus polimórfico (2.4), porcentaje de loci polimórficos (49%) y heterocigosis observada (0.054). Las dos especies endémicas extremas *Aechmea macvaughii* y *A. tuitensis*, tuvieron mayores valores de alelos por locus polimórfico que el promedio de los valores de *A. lueddemanniana* (2.5), en *A. macvaughii* (2.6) y *A. tuitensis* (2.2) respectivamente). La proporción de loci polimórficos toma valores entre 0 y 1, si el valor obtenido es cercano a 0 no hay variación genética o es escasa. Por el contrario cuanto más cercano es el valor a uno, la variación genética es mayor. La amplia distribución geográfica comparada con las endémicas no resultó ser un buen pronosticador de la variación genética en estas especies. En la mayoría de las poblaciones estudiadas, se observó un exceso de homocigotos. Esto indica que la autofertilización ha sido importante en la evolución del grupo. Respecto a las relaciones filogenéticas, algunas poblaciones de especies diferentes estuvieron más cerca filogenéticamente que otras que pertenecían a la misma especie, indicando que las isoenzimas no dicen la misma historia que la morfología para establecer relaciones de parentesco.

De igual manera el tipo de crecimiento de las plantas es un factor determinante en la genética de algunas poblaciones. Murawski et al. (1990) utilizaron como modelo de estudio a una especie de bromelia *Aechmea magdalenae* (André) André ex Baker, la cual es de hábito terrestre y crecimiento clonal, en la Isla de Barro Colorado en Panamá. Utilizaron isoenzimas como herramienta para los análisis genéticos de nueve poblaciones localizadas en este sitio. El porcentaje de loci polimórfico fue de 33% y la diversidad genética de 0.121 para todas las poblaciones. El promedio de loci polimórfico 24.1% y el promedio de diversidad genética fue 0.084. Alrededor de la tercera parte de la diversidad aloenzimática total se encuentra entre las poblaciones  $G_{st} = 0.356$ . La distribución de *Aechmea magdalenae* en el sitio de estudio fue en forma de parches. Esto se acopla al relativo pequeño tamaño de las poblaciones efectivas, y a la posible formación de nuevas poblaciones por pocos individuos que puedan contribuir a un mayor componente de la diversidad genética entre las poblaciones. La extensión del crecimiento clonal fue inferido examinando las relaciones entre la proporción de los pares de roseta que comparten idénticos genotipos multilocus y distancias entre parejas. Este método indica que la separación clonal es local, los genotipos multilocus compartidos individualmente, ocurren mas frecuentemente en organismos separados por 10 metros de distancia uno del otro.

Para el caso particular de las especies de este estudio, los sistemas de apareamiento y la biología floral podrían estar influyendo en las cantidades y distribución de la variación genética por un lado las plantas de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* tienen flores que abren en la tarde por un período corto (empezando a abrir a partir de las tres de la tarde aproximadamente y cerrando de

ocho a nueve p.m.), y donde los órganos sexuales quedan incluidos en el tubo de la corola. Poblaciones de ésta especie están compuestas mayormente de plantas originadas por semilla, mientras que *T. brachycaulos* presenta una morfología floral donde las flores son tubulares, corola púrpura, órganos sexuales exertos, además, tiene una alta proporción de rosetas basales (hijuelos) comparada con poblaciones de la otra especie. Todos estos factores sugieren diferencias en la estructura y variación genética de estas.

Por tanto, el objetivo de este trabajo es analizar la variación y estructura genética de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y *Tillandsia brachycaulos*. Estas dos especies nos servirán como modelos para comparar los niveles de variación genética en las especies que presentan diferencias en la morfología y biología floral, en la estrategia reproductiva y en la historia de vida.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GENERAL

Estimar los niveles de variabilidad y estructura genética en tres poblaciones de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y en tres poblaciones de *T. brachycaulos*, distribuidas en el Parque Nacional de Dzibilchaltún en Yucatán.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar la variación genética dentro y entre tres subpoblaciones de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y de *T. brachycaulos* distribuidas en el Parque Nacional de Dzibilchaltún en Yucatán.

Estimar la tasa de flujo efectivo ( $Nm$ ) de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y de *T. brachycaulos*.

Relacionar estos parámetros genéticos con aspectos de biología floral y sistemas de apareamiento en *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y de *T. brachycaulos* distribuidas en el Parque Nacional de Dzibilchaltún en Yucatán.

## MATERIALES Y METODOS

La obtención de datos e interpretación se realizaron en agosto del 2000, en los laboratorios de la Unidad de Recursos Naturales del CICY.

Para los análisis isoenzimáticos, nos basamos en la metodología de Pérez y Piñero (1997), con algunas modificaciones (ver Anexo)

### COLECTA DE MATERIAL EN CAMPO

Es importante mencionar, que solo para los análisis de las primeras poblaciones de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y *T. brachycaulos*, el material colectado se transportó vivo y se cultivó en forofitos artificiales en el epítario del CICY; el material de las otras dos poblaciones restantes se colectó en campo en el Parque Nacional de Dzibilchaltún. Se eligieron hojas jóvenes, las cuales estaban situadas en el centro de la roseta. Para la primera población por especie, el material se colectó por las tardes, dichos individuos provenían de una parcela situada a un costado de la entrada de servicio (Parcela 1); en cuanto a las dos poblaciones restantes, provenientes de los sitios conocidos como "La herradura" y "El museo", realizamos las colectas por la mañanas. Se cortaron aproximadamente de 2 a 3 hojas por plantas, inmediatamente se envolvieron con papel aluminio comercial y se etiquetaron con el número de planta y la parcela a la cual pertenecían; posteriormente se colocaron dentro de un termo con refrigerante, y del parque se transportaron al laboratorio de la unidad de Recursos Naturales para su inmediato tratamiento. Cabe destacar que desde el momento del corte al macerado transcurrieron aproximadamente 2 horas.

### TRABAJO DE LABORATORIO (MACERAR Y ALMACENAR)

Se tomaron muestras de material foliar para ser macerado cuidadosamente en un mortero de porcelana, al cual se le agregó aproximadamente un mililitro de nitrógeno líquido, una vez agregado el nitrógeno se trituró el material, hasta que se obtuvo un polvo fino, a este se le agregaron 1.5 ml de buffer de extracción, hasta formar una pasta homogénea. El homogenizado resultante fue absorbido en papeles filtro (wicks) de 1.5x 0.2x1.0 cm, estos papeles se guardaron dentro de unos pequeños tubos de plástico Eppendorf, los cuales se almacenaron dentro de un congelador a -10°C por una semana. Para la preparación del buffer de extracción, utilizamos la receta de (Anexo1).

### Corridas de geles

La extracción se realizó con el buffer de extracción. Se utilizó la técnica de electroforesis de geles de almidón, con una concentración al 12 %, y los sistemas de corrida Histidina citrato 1-12 y litio borato 1-3 (Pérez & Piñero, 1997) histidina citrato se corrió por 4 hora a 250 voltios y litio borato por 4 horas a 200 voltios. Se utilizó un control al principio y al final de los carriles (anexo 2). Las enzimas se tiñeron con las metodologías de GDH, LAP, MDH, PGI, PGM, ACP, PER (anexo 3)

Las enzimas que mostraron actividad fueron 8 LAP, ALP, ACP, PGI, MDH, PER, GDH y PGM las cuales se describen en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Enzimas, abreviación y estructura cuaternaria que se nsayaron en *Tillandsia brachycaulos* y *T. elongata* var. *subimbricata*.

Enzima	Estructura cuaternaria	Nombre
GDH	Dímero	Glutamato deshidrogenasa
LAP	Monómero	Leucil aminopectidasa
MDH	Dímero	Malato deshidrogenasa
PGI	Dímero	Fosfoglucoisomerasa
PGM	Monómero	Fosfoglucomutasa
ACP	Monómero	Fosfatasa ácida
PER	Monómero	Peroxidasa

## ANÁLISIS DE DATOS

### Lectura de zimogramas

Los genotipos fueron determinados directamente de los geles, tomando los patrones de bandeo que representan la actividad enzimática. La designación de los loci y alelos en todos los geles y en todas las enzimas, se realizo en base a la migración relativa de las proteínas. El locus más lejano al origen para cada enzima se etiquetó como el número uno, el que le siguió como el dos y así sucesivamente hasta tener el número total de bandas.

### Parámetros de diversidad y estructura genética

#### Variación genética

Para estimar la diversidad genética se estimo la proporción de loci polimórficos (P), Un gen (locus) se considera polimórfico si la frecuencia del alelo más común es menor a 0.95 (Hamrick *et al.* 1981, Futuyma 1986, Nei 1987, Nason 2002). A nivel de la población, el nivel de polimorfismo se calcula como el número de loci polimórficos dividido entre el número de loci, polimórficos o no, presentes en todas las poblaciones examinadas (Pp). A nivel de especie, la proporción de loci polimórficos (Ps) se calcula dividiendo el número de loci polimórfico de al menos una población entre el numero total de loci examinados. Se espera que, si la diversidad genética total de una especie se encuentra repartida uniformemente entre todas sus poblaciones, estas dos medidas tengan valores similares; pero, si la misma distribución total se encuentra distribuida diferencialmente entre distintas poblaciones, los valores podrían diferir sustancialmente. Es importante destacar que el polimorfismo se basa en la distribución de alelos y no en la distribución de genotipos. En otras palabras, una población puede tener todos sus genotipos homocigotos para un locus dado pero el locus sigue siendo polimórfico (Nason 2002). La proporción de loci polimórficos toma valores entre 0 y 1, si el valor obtenido es cercano a 0 no hay variación genética o es escasa. Por el contrario cuanto más cercano es el valor a uno, la variación genética es mayor, al grado de llegar a uno, lo que indica que todos los



genes analizados son polimórficos, es decir, todos los genes tienen más de dos formas de alelo (Futuyma 1986). Se calcula de la siguiente manera:

$$p=x/m$$

Donde  $x$  es el número de loci polimórfico y  $m$  es el número total de loci muestreados. La heterocigosis observada hoy ( $H_e$ ). Para la estructura genética se utilizó el estadístico **GST** así como la tasa efectiva de migración de genes entre poblaciones (**Nm**). La tasa de deriva genética es proporcional al tamaño efectivo de la población e inversa de flujo genético (Nason; 2002). Se espera, entonces que las especies con mayor potencial de dispersión de polen y semillas, y con unidades de apareamiento más extensas, mantenga un nivel de diversidad genética relativamente alto ( $H_e$ ), y, por ende, un nivel de divergencia genética entre poblaciones (**Gst**) relativamente bajo (Nason 2002).

### **Heterocigosis promedio esperada y observada.**

Una segunda medida de la diversidad genética (**heterocigosis promedio esperada**) también a nivel de población y de especie, se refiere a la frecuencia esperada de genotipos heterocigotos en un determinado locus (monomórfico y polimórfico), suponiendo las condiciones de equilibrio de Hardy-Weinberg; es decir, que ha habido apareamiento aleatorio. La diversidad genética de una población se calcula para cada locus y para cada población como:

$$Hep=1-\sum p_i^2$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia del  $i$ -ésimo alelo. Los valores de  $Hep$  se promedian con respecto a todos los loci examinados en todas las poblaciones para tener un estimado medio de toda la diversidad genética que existe a nivel de la población. La diversidad genética a nivel de especie se calcula para cada locus como:

$$Hes=1-\sum p_i^2$$

Donde  $i$  es la frecuencia media del  $i$ -ésimo alelo. La diversidad genética se obtiene, entonces, promediando los valores de  $Hes$  con respecto a todos los loci examinados. Si la frecuencia alélica es constante a través de todas las poblaciones, entonces, las mediciones de diversidad genética, a nivel de poblaciones y de especies, serán iguales. Sin embargo, normalmente las poblaciones difieren en su frecuencia alélicas, de manera que cada población contendrá únicamente un subconjunto de la diversidad total observada a nivel de especie. En consecuencia, la diversidad genética es por lo general más baja a nivel de población que a nivel de especie (Nason 2002).



### Numero de alelos y alelos efectivos

El número de alelos es simplemente el promedio de alelos por locus. Mientras que número de alelos efectivos en un locus esta dado por la formula:

$$A_p = \frac{1}{\sum P_i^2}$$

Donde  $P_i$  es la frecuencia alélica del  $j$ -ésimo alelo de ese locus. Este índice toma en cuenta la abundancia de cada alelo donde los muy raros tienen poco peso y los comunes mucho.

Número promedio de alelos por locus y número de alelos efectivos. El número de alelos es el promedio simple de los alelos por locus, y el número efectivo de alelos es el inverso de la homocigosis teórica (Hamrick *et al.* 1981, Loveless y Hamrick 1984).

$$N_e = \frac{k}{\sum_{i=1}^k p_i}$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i$  en la población. De esta manera  $N_e$  toma en cuenta no solo el número de alelos en un locus, sino también sus frecuencias relativas.

### Estructura genética

El nivel de divergencia de la diversidad genética total de una especie, que se reparte entre diferentes poblaciones, se puede cuantificar mediante el  $G_{ST}$  de Nei (Nei 1973) citado por Nason (2002), el equivalente multialélico del  $F_{ST}$  de Wright, también llamado "índice de fijación" (Wright 1931, 1951). El  $F_{ST}$  o el  $G_{ST}$  pueden interpretarse de dos maneras, ambas igualmente útiles para medir la diferenciación genética entre poblaciones: a) como la varianza estandarizada en la frecuencia alélica entre subpoblaciones en relación con la varianza total de todas las poblaciones combinadas, calculada como:

$$F_{ST} = \frac{\sigma_p^2}{P(1-p)}$$

O b) como la proporcional de la heterocigosis (indicador de diversidad genética) de las subpoblaciones en relación con el total de la población o la especie, calculada como:

$$F_{ST} = \frac{Hes - Hep}{Hes}$$

Con cualquiera de los métodos es posible obtener una estimación media de la  $G_{ST}$  basta sacar el promedio de alelos de un locus y luego en de todos los loci polimórficos de cada especie. La  $G_{ST}$  tiene un mínimo teórico de 0 (que indica que no existe divergencia genética entre una población y otra) y un máximo teórico de 1 (que señala poblaciones entre las que hay un nivel máximo de divergencia

debido a que se ha perdido uno u otro alelo para un locus dado). Wright (1978) citado por Nason (2002) sugirió las siguientes pautas para interpretar los valores de  $F_{ST}$  (y, por tanto, de  $G_{ST}$ ): un rango de 0.0 a 0.05 indica poca diferenciación genética entre poblaciones (a nivel de la diversidad examinada), de 0.05 a 0.15, una diferenciación genética moderada, de 0.15 a 0.25 una diferenciación genética alta y valores superiores a 0.25 una diferenciación genética muy alta. No obstante, Wright (1978) citado por Nason (2002) advierte que “aun si  $F_{ST}$  es 0.05 o incluso menor, dicha diferenciación no debe menospreciarse.

Para analizar la distribución genética se calcula el índice de fijación de Wright (1951). Este es conocido como el índice de fijación y se define como:

$F_{IS}$ . Índice de fijación de un individuo relativo a la subpoblación.  $F_{IS}$  mide la desviación de un individuo con respecto a la población. Toma valores de  $-1$  y  $+1$ . Si es negativo significa que hay exceso de heterocigotos y puede deberse principalmente a la selección del heterocigoto. Si es de cero quiere decir que la población esta en equilibrio de Hardy-Weinberg. Valores positivos indican una deficiencia de heterocigotos. Si es de 1 significa que todos los individuos son homocigotos y los alelos provienen de un ancestro común. Estos valores se pueden deber a autopolinización, consanguinidad por apareamiento entre parientes, por el efecto Wahlund y por selección a favor de homocigotos (Nei, 1987).

$F_{IS}$  para loci multialélicos se calcula:

$$F_{IS} = \frac{(H_s - H_o)}{H_s}$$

En donde  $H_o$  es el promedio de la heterocigosis observada dentro de una subpoblación.  $H_s$  es el promedio de la heterocigosis esperada en las subpoblaciones.

$F_{IT}$ . Índice de fijación de los individuos respecto a total de población. Es la diferenciación total ya sea por la endogamia o por la deriva génica, toma valores de  $-1$  a  $+1$ . Valores negativos indican exceso de heterocigotos que puede ser por selección natural o a favor de ellos, números positivos indican excesos de homocigotos y puede ser debido a deriva génica y/o endogamia. Si el valor es de cero, indica un tamaño efectivo de población grande y un alto flujo génico.  $F_{IT}$  se calcula de esta manera:

$$F_{IT} = \frac{H_t - H_o}{H_t}$$

En donde  $H_o$  es el promedio de la heterocigosis observada dentro de una subpoblación.  $H_t$  es la heterocigosis esperada promedio en población total.

### Tasa de migración (Nm)

Las causas que operan tras un determinado valor de  $G_{st}$  son difíciles de identificar, puesto que en diferentes poblaciones, las frecuencias alélicas suelen variar debido a procesos aleatorios (deriva genética), selección natural y flujo genético entre poblaciones. Sin embargo, si se supone que la diversidad alélica encontrada en los loci es neutral con respecto a la selección natural, entonces el  $G_{st}$  se puede relacionar con la tasa de migración efectiva,  $Nm$ , de la siguiente manera:

$$G_{st} = \frac{1}{4Nm + 1}$$

Donde  $N$ , es el tamaño es el tamaño efectivo de la población y  $m$  la tasa de migración genética, por generación entre poblaciones. Una serie de estudios realizados por Slatkin & Barton (1989) citado por Nason (2002) mostraron que la variable

$$Nm = \frac{1 - G_{st}}{4G_{st}}$$

Es un buen estimador del número promedio de emigrantes, por generación, entre una población y otra. En concordancia con la interpretación de Wright del  $F_{st}$ , un valor de  $Nm$  superior a 4.75 indica que el flujo genético es suficiente para restringir la diferenciación interpoblacional que provocaría la deriva genética; en cambio, un valor inferior a 1.42 indica que, ante el empuje de la deriva genética, el flujo de genes es insuficiente para mantener la cohesión genética entre poblaciones. Esto implica que el flujo genético es una fuerza poderosa contra la diferenciación genética interpoblacional. A diferencia de los análisis de paternidad que se basan en la detección directa de eventos de flujo de una generación a otra, el  $Nm$  es un estimador indirecto de la migración total (a través del polen y a través de las semillas) vista a una escala de tiempo evolutiva, no contemporánea. Por eso, aunque ambos estimadores, directos e indirectos, indican procesos ecológicos y evolutivos similares, no se les puede comparar directamente (Nason 2002).

## RESULTADOS

### SISTEMAS ENZIMÁTICOS DE *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*

Se ensayaron un total de 7 enzimas de las cuales 2 no presentaron actividad (MDH y GDH). Las 5 enzimas con actividad fueron polimórficas (ACP, PER, PGM PGI y LAP), con un total de siete loci.

Fosfatasa ácida (ACP). El zimograma de la enzima ACP se presenta en la figura (8). Se presentaron dos locus polimórficos Acp-1 y Acp-2, con 4 alelos cada uno. En estos loci se observan el número de bandas típico de una enzima monomérica, es decir los individuos homocigos solo presentaron una banda y los heterocigos dos.

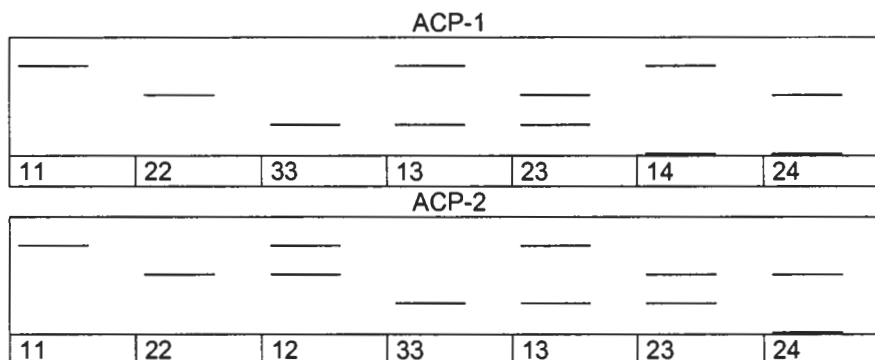


Fig (8 ). Zimograma de los patrones de variación de la enzima ACP ensayadas en 3 poblaciones de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* el Parque Nacional de Dzibilchaltún.

Peroxidasa (PER). La figura (9) muestra el patrón de bandeado encontrada en esta enzima. Esta enzima presentó actividad solo para un locus (Per-2), en el cual fue polimórfico, con 4 alelos, la enzima es monomérica, los individuos homocigos solo presentaron una banda y los heterocigos dos.

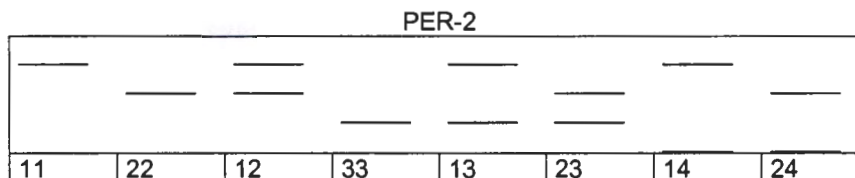


Fig (9). Zimograma de los patrones de variación de la enzima PER ensayadas en 3 poblaciones de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* en el Parque Nacional de Dzibilchaltún.

Fosfoglucomutasa (PGM). En esta enzima se observó un solo locus (Pgm-1) el cual fue polimórfico con 5 alelos (figura 10). La enzima es un monómero, y de igual manera que en los casos anteriores, los individuos homocigos presentan una sola banda, y los heterocigos 2.

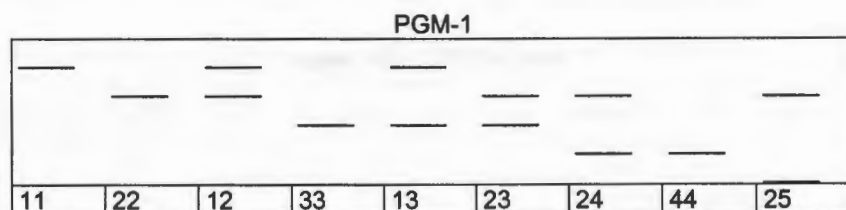


Fig (10). Zimograma de los patrones de variación de la enzima PGM ensayadas en 3 poblaciones de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* el Parque Nacional de Dzibilchaltún.

Fosfoglucoisomerasa (PGI). Se presentaron 2 loci polimórficos (PGI-1 con cinco alelos y PGI-2 con 6 alelos), en ambos loci las bandas de los organismos heterócigos presentaron 3 bandas y se debe a que la enzima es un dímero con subunidades idénticas y cuando están presentes ambos alelos, las cadenas polipéptidas forman una tercera banda intermedia. Los organismos homócigos solo muestran una banda (figura 11).

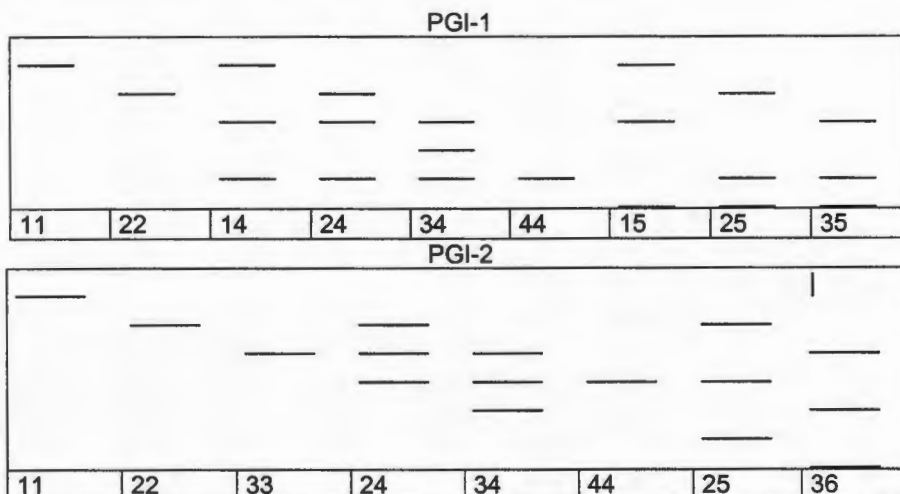


Fig (11). Zimograma de los patrones de variación de la enzima PGI ensayadas en 3 poblaciones de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* el Parque Nacional de Dzibilchaltún.

Leucil aminopectidasa (LAP-1). Esta enzima es un monómero. Se detectó un solo locus polimórfico con 5 alelos, con 2 bandas cuando el organismo es heterócigo y una cuando es homócigo (figura 12).

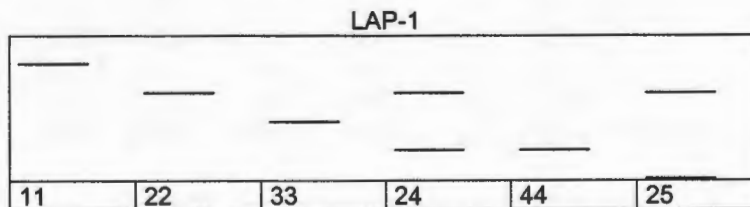


Fig (12). Zimograma de los patrones de variación de la enzima LAP ensayadas en 3 poblaciones de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* en el Parque Nacional de Dzibilchaltún

### Variación genética enzimática en *Tillandsia elongata* var. *Subimbricata*

Se detectaron un total de siete loci, los cuales fueron polimórficos, y un número máximo de seis alelos por locus. En la figura 12 se muestran los estimadores de diversidad: Número de alelos por locus, frecuencias alélicas y heterocigosis observada para cada locus y para cada subpoblación estudiada de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*. En las poblaciones de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* la heterocigosis observada fue similar para la mayoría de las enzimas, el rango de variación fue de 0.578 a 0.766, a excepción del locus LAP-1 que varió por debajo de este rango (0.420), la subpoblación dos (Herradura) presentó un alelo más para el locus PGI-2.

Cuadro 14. Frecuencias alélicas, número de alelos por loci, heterocigosis observada en plantas de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* en el Parque Nacional de Dzibilchaltún. El número en paréntesis es la cantidad de individuos ensayados para cada subpoblación.

Alelo/Loci	ACP-1	ACP-2	PER-2	PGM-1	PGI-1	PGI-2	LAP-1
Población 1 "Deme"	(20)	(20)	(20)	(20)	(19)	(13)	(12)
1	0.075	0.150	0.225	0.250	0.079	0.077	0.167
2	0.525	0.400	0.225	0.550	0.289	0.192	0.750
3	0.350	0.450	0.325	0.150	0.105	0.231	0.083
4	0.050	0.000	0.225	0.050	0.316	0.500	0.000
5	0.000	0.000	0.000	0.000	0.211	0.000	0.000
H locus/individual	<b>0.609</b>	<b>0.631</b>	<b>0.762</b>	<b>0.626</b>	<b>0.775</b>	<b>0.680</b>	<b>0.420</b>
Alelo/Loci	ACP-1	ACP-2	PER-2	PGM-1	PGI-1	PGI-2	LAP-1
Población 2 "Herradura"	(20)	(20)	(20)	(17)	(20)	(17)	(18)
1	0.125	0.125	0.225	0.176	0.125	0.000	0.111
2	0.350	0.450	0.250	0.529	0.325	0.235	0.500
3	0.450	0.425	0.225	0.265	0.050	0.294	0.056
4	0.075	0.000	0.300	0.000	0.325	0.353	0.278
5	0.000	0.000	0.000	0.029	0.175	0.059	0.056
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.059	0.000
H locus/individual	<b>0.671</b>	<b>0.617</b>	<b>0.765</b>	<b>0.636</b>	<b>0.759</b>	<b>0.749</b>	<b>0.654</b>
Alelo/Loci	ACP-1	ACP-2	PER-2	PGM-1	PGI-1	PGI-2	LAP-1
Población 3 "Museo"	(19)	(19)	(20)	(18)	(13)	(13)	(10)
1	0.316	0.132	0.275	0.167	0.385	0.385	0.200
2	0.132	0.474	0.200	0.361	0.538	0.231	0.200
3	0.368	0.263	0.300	0.472	0.077	0.154	0.500
4	0.184	0.132	0.150	0.000	0.000	0.231	0.100
5	0.000	0.000	0.075	0.000	0.000	0.000	0.000
H locus/individual	<b>0.713</b>	<b>0.672</b>	<b>0.766</b>	<b>0.637</b>	<b>0.578</b>	<b>0.751</b>	<b>0.695</b>

El Cuadro 15 muestra los valores de los estimados de la variabilidad genética de siete loci en las tres poblaciones de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*, número promedio de alelos por locus, porcentaje de loci polimórficos, heterocigosis observada y esperada. En la subpoblación dos la

heterocigosis observada fue mayor, y similares las otras dos subpoblación. El porcentaje de loci polimórfico fue de uno para las tres subpoblaciones, es decir todos los loci son polimórficos. La subpoblación dos presentó el mayor número de alelos por locus, no encontrando diferencias significativas entre las tres subpoblaciones.

Cuadro 15. Variabilidad genética de siete loci en las tres subpoblaciones de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*.

Sitio de estudio	*Error estándar			Heterocigosis promedio	
	Promedio de plantas ensayadas x locus	Promedio de alelos por locus	% de loci polimórfico	Directamente observada	Esperada en H. W.
1 Deme	17.7	3.9	100.0	0.426	0.643
	*1.4	*0.3		0.156*	0.045*
2 Herra	18.9	4.3	100.0	0.647	0.696
	*0.6	*0.3		0.099	0.023
3 Museo	16.0	3.9	100.0	0.430	0.696
	0.027	1.5		0.145	0.270

### Estructura genética

Estadístico F e índices de fijación. Los índices de fijación encontrados en las tres subpoblaciones estudiadas se muestran en el Cuadro 16. Se nota una pequeña variación entre los sitios y entre los loci. El locus PER- 2 presentó valores negativos de F para las tres subpoblaciones, al igual que el locus ACP-2, estos resultados no fueron significativamente diferentes de cero (Cuadro 14). A excepción de estos dos loci, todos fueron positivos. Los loci ACP-1, PGM-1 y LAP-1, para los sitio uno y dos, mostraron un valor significativo estadísticamente distinto de cero, lo cual indica un exceso de homocigos. Los valores mayores de cero dentro de esta población indican que hay una tendencia a la homocigosis.

Cuadro 16. Índice de fijación de Wright por locus para plantas de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* en el Parque Nacional de Dzibilchaltún. N es el número de plantas ensayadas y K es el número de alelos.

K	Enzima	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3
4	ACP-1	*0.832	*0.465	-0.107
4	ACP-2	-0.057	-0.164	-0.019
5	PER-2	-0.212	-0.273	-0.240
5	PGM-1	*1.000	0.238	0.372
5	PGI-1	-.0255	-0.216	*1.000
5	PGI-2	0.412	-0.133	*1.000
6	LAP-1	*1.000	*0.491	*0.697
	Promedio	0.388	0.058	0.390

Prueba  $\chi^2$  P=0.05 N:20 \* Valores significativos



Los estadísticos F de Wright para plantas ensayadas en *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* pertenecientes a las tres subpoblaciones se presentan en el Cuadro 17. En la población total la mayoría de los loci son positivos a excepción de los loci ACP-2 y PER2, ACP-1, PGM-1 y LAP-1, no fueron significativamente diferentes de cero, solo los loci PGM-1 Y LAP-1 fueron significativamente diferentes de cero.

Los estimados de  $F_{IT}$  mostraron el mismo comportamiento anteriormente citado, la mayoría de los loci fueron positivos a excepción ACP-2 Y PER2; una mayor cantidad de loci fue significativamente diferente de cero mas no así su promedio final (0.286). Lo mismo que el promedio de  $F_{ST}$  (0.062) lo que significa que hay una gran similitud entre las tres subpoblaciones. El valor de Nm (3.78) de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* es cercano al valor de 4.75.

Cuadro 17. Estadístico-F para las tres subpoblaciones de plantas de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* en el Parque Nacional de Dzibilchaltún. N es el tamaño de la muestra.

Alelos	Locus	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$
4	ACP-1	0.368	*0.406	0.060
4	ACP-2	-0.077	-0.058	0.018
5	PER-2	-0.242	-0.229	0.010
5	PGM-1	*0.535	*0.554	0.042
5	PGI-1	0.099	0.174	0.083
5	PGI-2	0.425	*0.460	0.060
6	LAP-1	*0.689	*0.738	*0.158
Promedio		0.239	0.286	0.062
N		20	60	3

Tasa de migración efectiva (Nm) = 3.782

$X^2$  p<0.05 \*valores significativos

### Sistemas enzimáticos de *Tillandsia brachycaulos*

Se ensayaron un total de siete enzimas de las cuales una no presento actividad (GDH). Las 6 enzimas con actividad fueron polimórficas (ACP, PER, MDH, PGM, PGI y LAP), con un total de nueve loci. A continuación se presentan los patrones de bandeo de estas enzimas en los siguientes zimogramas.

Fosfatasa ácida (ACP). El zimograma de la enzima ACP es ilustrado en la figura 13. Se observaron dos loci (Acp-1 y Acp-2) polimórficos, ambos loci presentaron dos bandas en los organismos heterocigos y una sola banda en organismo homocigos esto es debido a que la enzima es monomérica. En estos dos loci se encontraron 4 alelos por población.



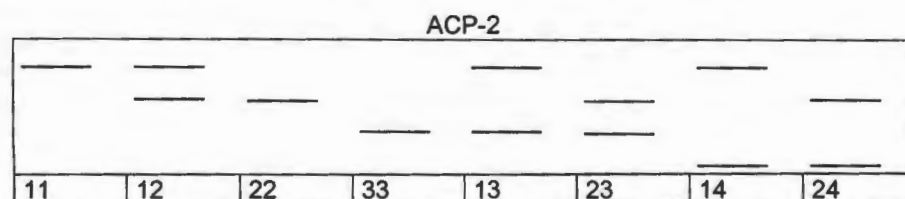
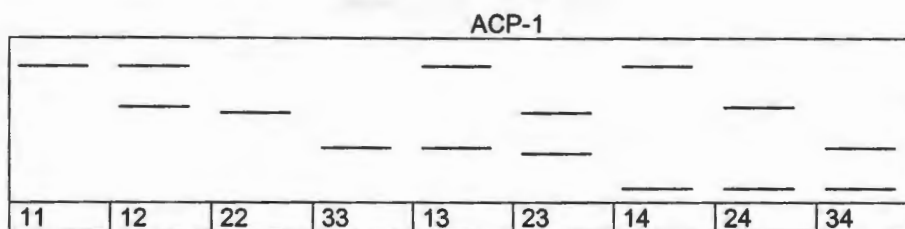


Figura 13. Zimograma de los patrones de variación de la enzima ACP ensayados en 3 poblaciones de *Tillandsia brachycaulos* Schlttdl. en el Parque Nacional de Dzibilchaltún.

Peroxidasa (PER). Esta enzima solo mostró actividad para un locus (Per-2), el cual fue polimórfico, con 5 alelos, nuevamente esta enzima por ser un monómero, los individuos sigue el patrón de bandeado característico de estas enzimas, una banda cuando el individuo es homocigo y dos heterocigo figura 14.

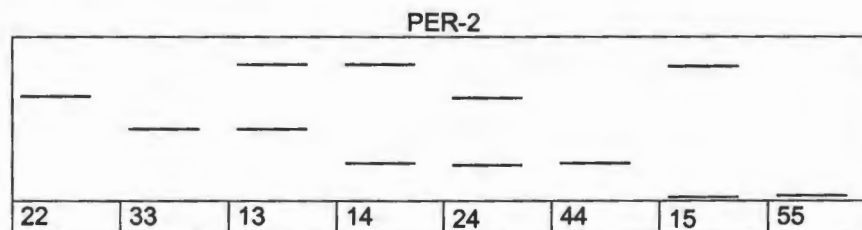
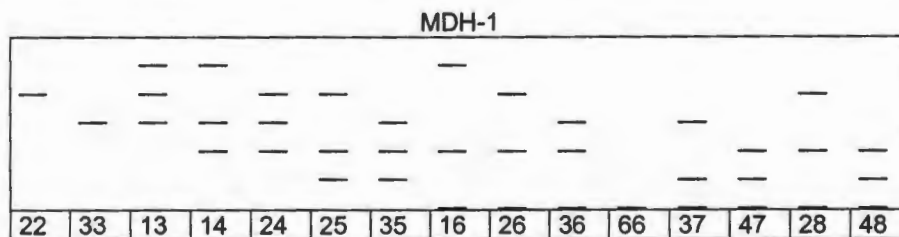


Figura 14. Zimograma de los patrones de variación de la enzima PER ensayada en 3 poblaciones de *Tillandsia brachycaulos* Schlttdl. en el Parque Nacional de Dzibilchaltún.

En la figura 15 se observan los fenotipos encontrados para la isoenzima MDH. Se encontraron 4 locus, de los cuales solo tres presentaron actividad (Mdh-1, Mdh-2 y Mdh3) los dos primero con 8 alelos y Mdh3 con seis. Los tres locus resultaron ser polimórficos. Los individuos heterocigos presentaron tres bandas, estos es debido a que la enzima es un dímero con subunidades idénticas y cuando se encuentran presentes ambos alelos, las cadenas polipeptídicas forman una tercera banda intermedia (Richardson *et al.* 1986, citado por Pérez 1990). Los organismos homocigos presentaron una banda.



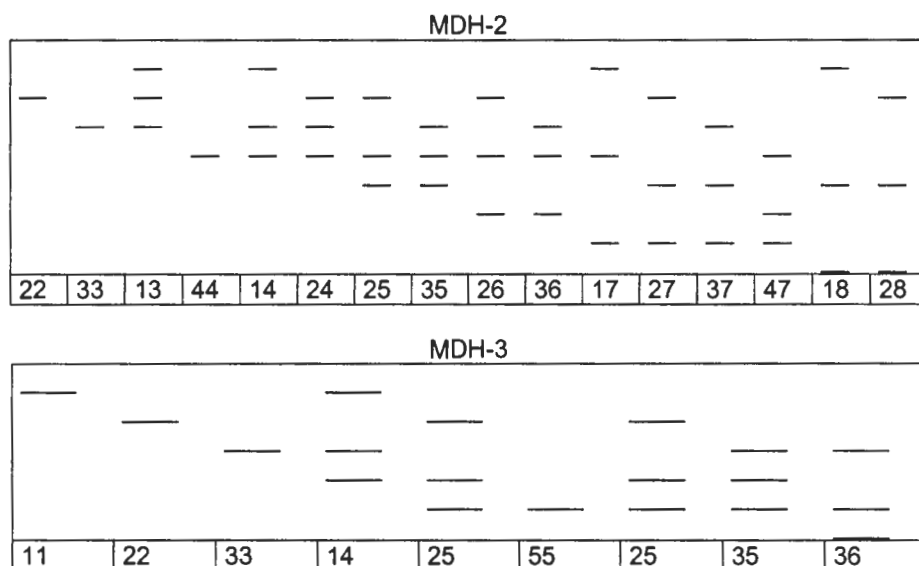


Figura 15. Zimograma de los patrones de variación de la enzima MDH ensayada en 3 poblaciones de *Tillandsia brachycaulos* Schldl en el Parque Nacional de Dzibilchaltún.

Fosfoglucomutasa (PGM). Se presentó un locus polimórfico para esta enzima (Pgm-1) con cuatro alelos. Los tres primeros alelos fueron homocigotos y el tercer alelo heterocigoto. La enzima es monomérica, los heterocigotos mostraron dos bandas y los homocigotos una banda, figura (16).

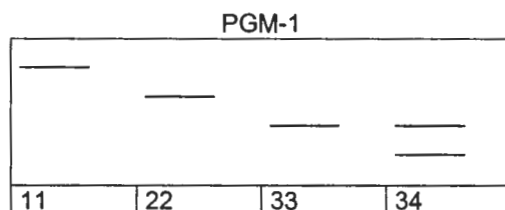


Figura 16. Zimograma de los patrones de variación de la enzima PGM ensayada en 3 poblaciones de *Tillandsia brachycaulos* Schldl. en el parque nacional de Dzibilchaltún.

Fosfoglucoisomerasa (PGI). El zimograma encontrado en esta enzima es mostrado en la figura (17). Se detectó un locus polimórfico (Pgi-1). El locus mostró variación, es decir, fue polimórfico, con cinco alelos todos homocigotos por lo que solo se observó una banda.

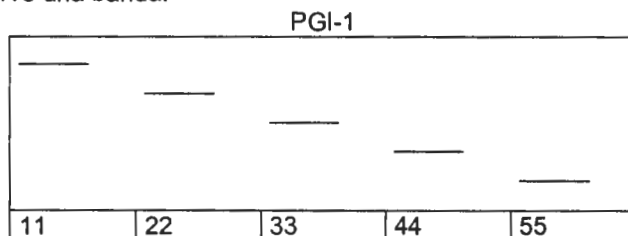


Figura 17. Zimograma de los patrones de variación de la enzima PGI ensayada en 3 poblaciones de *Tillandsia brachycaulos* en el Parque Nacional de Dzibilchaltún.

Leucil aminopeptidasa (LAP). En esta enzima se observa un solo locus polimórfico (Lap-1). En este locus se expresaron seis alelos con el número de bandas típico de una enzima monomérica, donde los individuos homocigos expresan una sola banda y los heterocigos dos. Figura 18.

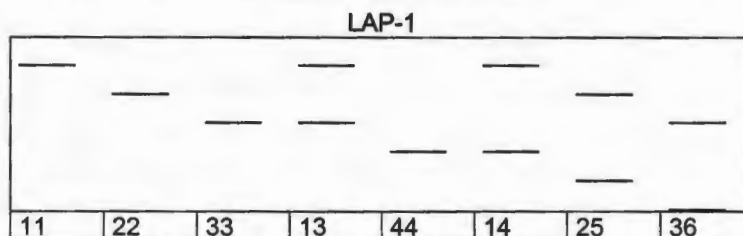


Figura 18. Zimograma de los patrones de variación de la enzima LAP ensayada en 3 poblaciones de *Tillandsia brachycaulos* en el Parque Nacional de Dzibilchaltún.

### Variación genética enzimática en *Tillandsia brachycaulos*

Se detectaron un total de 10 loci, todos fueron polimórficos, con un número máximo de 9 alelos por locus. Cuadro 18 muestra los estimadores de diversidad: Número de alelos por locus, frecuencias alélicas y heterocigosis observada para cada locus y para cada subpoblación estudiada, estos parámetros fueron calculados a partir de estos 10 loci polimórficos. La subpoblación dos (Herradura) presento nueve alelos en el locus Mdh-2. El locus MDH-3 es el que tuvo menos actividad sobre todo en la subpoblación tres.

Cuadro 18. Frecuencias alélicas, número de alelos por loci y heterocigosis observada en plantas de *Tillandsia brachycaulos* en el Parque Nacional de Dzibilchaltún. El número en el paréntesis es la cantidad de plantas ensayadas para cada subpoblación.

Alelo/Loci	ACP-1	ACP-2	PER-2	MDH-1	MDH-2	MDH-3	PGM-1	PGI-1	LAP-1	LAP-2
Población 1 Deme	(20)	(20)	(14)	(19)	(19)	(20)	(18)	(18)	(17)	(20)
1	0.150	0.150	0.214	0.105	0.210	0.200	0.217	0.222	0.147	0.300
2	0.650	0.300	0.393	0.368	0.263	0.650	0.667	0.778	0.324	0.450
3	0.200	0.550	0.214	0.132	0.237	0.150	0.056	0.000	0.029	0.250
4	0.000	0.000	0.179	0.368	0.237	0.000	0.000	0.000	0.265	0.000
5	0.000	0.000	0.000	0.026	0.053	0.000	0.000	0.000	0.206	0.000
6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.029	0.000
H locus/individual	0.528	0.600	0.749	0.718	0.792	0.528	0.489	0.356	0.783	0.662
Alelo/Loci	ACP-1	ACP-2	PER-2	MDH-1	MDH-2	MDH-3	PGM-1	PGI-1	LAP-1	LAP-2
Población 2 Herradura	(20)	(20)	(20)	(20)	(20)	(14)	(15)	(20)	(8)	(20)
1	0.025	0.100	0.000	0.050	0.075	1.000	0.200	0.050	0.250	0.850
2	0.475	0.450	0.100	0.175	0.225	0.000	0.553	0.200	0.250	0.150
3	0.150	0.100	0.300	0.200	0.150	0.000	0.267	0.400	0.500	0.000
4	0.350	0.350	0.500	0.050	0.050	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000
5	0.000	0.000	0.100	0.075	0.025	0.000	0.000	0.300	0.000	0.000

6	000	000	000	0.250	0.075	000	000	000	000	000
7	000	000	000	0.150	0.300	000	000	000	000	000
8	000	000	000	0.050	0.075	000	000	000	000	000
9	000	000	000	000	0.025	000	000	000	000	000
H locus/individual	<b>0.645</b>	<b>0.672</b>	<b>0.656</b>	<b>0.853</b>	<b>0.837</b>	<b>000</b>	<b>0.625</b>	<b>0.723</b>	<b>0.667</b>	<b>0.262</b>
Alelo/Loci	<b>ACP-1</b>	<b>ACP-2</b>	<b>PER-2</b>	<b>MDH-1</b>	<b>MDH-2</b>	<b>MDH-3</b>	<b>PGM-1</b>	<b>PGI-1</b>	<b>LAP-1</b>	<b>LAP-2</b>
Población 3 Museo	<b>(16)</b>	<b>(17)</b>	<b>(20)</b>	<b>(19)</b>	<b>(19)</b>	<b>(19)</b>	<b>(18)</b>	<b>(20)</b>	<b>(11)</b>	<b>(14)</b>
1	0.563	0.118	0.150	0.053	0.053	0.132	0.056	0.156	0.364	0.214
2	0.438	0.559	0.050	0.158	0.395	0.184	0.611	0.350	0.364	0.143
3	000	0.324	0.125	0.184	0.500	0.211	0.178	0.350	0.273	0.071
4	000	000	0.150	0.158	0.053	0.132	0.056	0.150	000	0.571
5	000	000	0.525	0.132	000	0.263	000	000	000	000
6	000	000	000	0.184	000	0.079	000	000	000	000
7	000	000	000	000	000	000	000	000	000	000
8	000	000	000	0.132	000	000	000	000	000	000
H locus/individual	<b>0.508</b>	<b>0.586</b>	<b>0.678</b>	<b>0.868</b>	<b>0.605</b>	<b>0.834</b>	<b>0.559</b>	<b>0.728</b>	<b>0.693</b>	<b>0.624</b>

El Cuadro 19 muestra la variabilidad genética obtenida de 10 loci en tres subpoblaciones de *Tillandsia brachycaulos*, número promedio de alelos por locus, porcentaje de loci polimórficos, heterocigosis observada y esperada.

La heterocigosis observada fue mayor en el sitio uno (0.447) muy similar al obtenido en el sitio dos (0.420), mientras que el valor del sitio tres fue de 0.265, este valor muestra una tendencia clara a cero. El porcentaje de loci polimórfico 0.95 criterio fue de uno para las subpoblaciones uno y dos, y de 0.90 para la población dos, en general para la población total la tendencia es que todos los loci son polimórficos. La subpoblación dos presentó el mayor número de alelos por locus, no encontrando diferencias significativas entre las tres subpoblaciones (Cuadro 17).

Cuadro 19. Variabilidad genética de 10 loci en las tres subpoblaciones de *Tillandsia brachycaulos*.

* Error estándar				Heterocigosis promedio	
Sitio de estudio.	Promedio plantas ensayadas x locus	Promedio de alelos por locus	Porcentaje de loci polimórfico	Directamente observada	Esperada en Hdywbg
<b>1 Deme</b>	18.5	3.7	100.0	<b>0.447</b>	<b>0.620</b>
	*0.6	*0.4		*0.136	*0.046
<b>2 Herra</b>	17.7	4.3	90.0	<b>0.420</b>	<b>0.594</b>
	*1.3	*0.8		*0.136	*0.083
<b>3 Museo</b>	17.3	4.2	100.0	<b>0.265</b>	<b>0.668</b>
	*0.9	*0.5		*0.114	*0.037

## Estructura genética

Los índices de fijación encontrados en las tres subpoblaciones estudiadas se muestran en la tabla 18. Se nota una pequeña variación entre los sitios y entre los loci. La tendencia de la población es hacia valores positivos, de los cuales el sitio uno y tres fueron significativamente diferentes de cero. F toma valores de  $-1$  a  $+1$  donde el valor cero quiere decir que la población está en equilibrio, cuando se aleja este valor hay exceso de heterócigos ( $<0$ ) o de homócigos ( $>0$ ), por lo que la población tiende a la homocigosis.

Cuadro 20. Índice de fijación de Wright por locus para plantas de *Tillandsia brachycaulos* en el Parque Nacional de Dzibilchaltún. N es el número de plantas ensayadas y K es el número de alelos.

K	Enzima	Sitio 1	Sitio 2	Sitio 3
4	ACP-1	0.223	-0.113	*1.000
4	ACP-2	0.231	-0.374	0.483
5	PER-2	-0.088	0.375	0.395
8	MDH-1	-0.430	-0.143	-0.121
9	MDH-2	-0.228	-0.225	*0.911
6	MDH-3	*1.000	000	-0.038
4	PGM-1	*1.000	*1.000	*0.795
5	PGI-1	*1.000)	*1.000	*1.000
6	LAP-1	-0.162	*0.600	*1.000
4	LAP-1	*1.000	*1.000	*1.000
	Promedio	*0.3546	0.312	*0.6425
Prueba $\chi^2$ P=0.05 N:20 *Valores significativos				

Los estadísticos F de Wright de plantas de *Tillandsia brachycaulos* se muestran en el Cuadro 20. En la población total los valores de Fis son positivos a acepción del locus Mdh-1 y solo los loci Pgm-1, Pgi-1 y Lap-2 fueron significativamente diferentes de cero. Nuevamente en esta población el valor de Fis es mayor al de Fst, lo que sugiere que el sistema reproductivo es un proceso importante involucrado en la determinación de la estructura genética de la población (Pérez 1990).

Solo el locus Mdh-1 fue negativo para las estimaciones de Fit. Los loci Acp-1, Per-2, Mdh-3, Pgm-1, Pgi-1, Lap-1, y lap-2 mostraron valores positivos diferentes de 0. El promedio de Fit para todas las enzimas de la población fue significativamente diferente de cero. Los valores obtenidos de Fst en los tres sitios de estudio fueron positivos para todos los loci. El locus Lap-1 fue el único significativamente diferente de cero, el promedio total de la Fst aunque fue positivo no fue significativamente diferente de cero. *Tillandsia brachycaulos* obtuvo un valor de Nm (1.450) cercano a 1.42.

Cuadro 21. Estadístico-F para tres subpoblaciones de plantas de *Tillandsia brachycaulos* Schitdl. en el Parque Nacional de Dzibilchaltún, N es el tamaño de la muestra.

<b>Locus</b>	<b>Alelos</b>	<b><math>F_{IS}</math></b>	<b><math>F_{IT}</math></b>	<b><math>F_{ST}</math></b>
ACP-1	4	0.328	<b>*0.428</b>	<b>*0.149</b>
ACP-2	4	0.091	0.189	<b>*0.108</b>
PER-2	5	0.216	<b>*0.329</b>	<b>*0.144</b>
MDH-1	8	-0.22	-0.148	0.058
MDH-2	9	0.081	0.155	0.080
MDH-3	6	0.365	<b>*0.600</b>	<b>*0.369</b>
PGM-1	4	<b>*0.932</b>	<b>*0.934</b>	0.040
PGI-1	5	<b>*1.000</b>	<b>*1.000</b>	<b>*0.170</b>
LAP-1	6	0.446	<b>*0.499</b>	<b>*0.960</b>
LAP-2	4	<b>*1.000</b>	<b>*1.000</b>	<b>*0.268</b>
Promedio		<b>*0.381</b>	<b>*0.472</b>	<b>*0.147</b>
N		20	60	3
<b>Tasa de migración efectiva (Nm) = 1.45</b>				
X <sup>2</sup> p<0.05 *Valores significativos				

## DISCUSION

Las primeras predicciones sobre la estructura genética de las poblaciones de árboles tropicales surgieron como parte del esfuerzo por explicar la gran diversidad de especies de árboles que caracteriza este tipo de bosques, dichas predicciones se basaron en los resultados obtenidos a partir de la electroforesis de isoenzimas (Nason, 2002). Cabe mencionar que en los árboles de las zonas templadas la dispersión de polen y de semillas se lleva a cabo básicamente a través del viento. En el trópico, en cambio, la mayoría de los árboles dispersan el polen y las semillas (es decir, los genes) a través de vectores animales. De esta forma, la estructura genética de una población de árboles del bosque tropical puede variar según el potencial de dispersión de los polinizadores y los frugívoros y de su respuesta conductual a la densidad de árboles en flor, a las perturbaciones del hábitat y a otros factores ambientales (Murawski & Hamrick, 1991). El grado de estructura genética que presente una población debería, por lo tanto, reflejar los factores ecológicos, tipo de polinizador, tipo de dispersor de semillas y comportamiento fenológico que se relacionan tanto con la deriva genética como el flujo de genes en las diferentes especies de árboles (Nason, 2002).

Algunos de los factores antes citados pueden ejercer presión sobre la estructura genética de las epífitas. Las epífitas deben sobrevivir en los troncos y en las copas de los árboles, ambiente que, sin duda representan un reto considerable. En primer lugar las epífitas crecen aisladas, es decir, sobre un sustrato espacialmente discontinuo en el que muchas veces se observan enormes brechas entre una rama y otra (Zotz & Andrade, 2002). Se trata, además, de un sustrato mudable en el tiempo: puede, o bien experimentar un crecimiento muy lento (según el árbol hospedero de que se trate) o desaparecer repentinamente (al quebrarse una rama o al caer un árbol), y una epífita desprendida del dosel tiene pocas probabilidades de sobrevivir. Este factor podría afectar el flujo genético cuyo efecto sobre las poblaciones naturales depende de interacciones complejas (Hamrick, 1989), en general el movimiento de genes entre poblaciones homogeniza la variación genética contenida en estas (Slatkin et al. 1987). Al igual que en los árboles tropicales, las primeras predicciones sobre la estructura genética de las epífitas se realizó por medio de isoenzimas.

La estructura genética de las poblaciones de árboles del bosque tropical se ha estudiado sobre todo mediante la electroforesis de aloenzimas (variantes físico-químicas de una enzima), misma técnica por nosotros empleada, la técnica permite determinar los diferentes alelos que existen en un locus e identificar el genotipo de un individuo (Pérez 1990, Nason 2002). En general, las plantas leñosas del trópico mantienen una frecuencia de loci polimórficos y un nivel de heterocigosis esperada similar a las de sus homólogas en las zonas templadas. Del mismo modo, tanto las especies del trópico como las de las zonas templadas muestran un estimado de  $G_{st}$  y de  $N_m$  similar, lo que señala una divergencia genética moderadamente baja entre poblaciones (Nason 2002) (Cuadro 22).

En términos generales los árboles de los bosques neotropicales muestran valores de  $H_e$  altos y valores de  $G_{st}$  ( $F_{st}$ ) relativamente bajos, pero es importante resaltar que estos parámetros pueden variar radicalmente de una especie a otra. Se han realizado estudios donde se han identificado especies cuya diversidad aloenzimática es baja a nivel de población (Hamrick & Murawski 1991), estos

mismos autores realizaron evaluaciones en la Isla de Barro Colorado (Panamá), donde en especies de *Faramea occidentalis* (L.) A. Rich. (Rubiaceae), *Quassia amara* L. (Simaroubaceae), *Tachigali versicolor* Standl. & L.O. Williams (Fabaceae) y *Trichilia tuberculata* (Triana & Planch.) C. DC. (Meliaceae) muestran frecuencias de loci polimórficos (P) y de heterocigosis esperada (He) sorprendentemente bajas, tal vez asociados a sus estrategias reproductivas, la distribución espacial o la ecología de la polinización.

Es interesante anotar, sin embargo, que mientras en algunas especies con densidades poblacionales muy reducidas, como especies de *Ficus*, muestran un alto nivel de diversidad genética, por ejemplo en más de 11 especies el promedio de P y de He fue de 0.73 y 0.216, respectivamente (Nason, 2002), el higuérón más común en la parte central de Panamá, *Ficus insipida* (Moraceae), muestra una diversidad genética mucho menor (He= 0.096), pese a tener un proporción de loci polimórficos relativamente alta (P= 0.75). Igualmente, el nivel de diferenciación genética entre las poblaciones de una misma especie puede variar considerablemente en una misma escala espacial, por ejemplo. Loveless & Hamrick 1984) en investigaciones realizadas en la Isla de Barro Colorado, encontraron que 14 especies mostraban un *Gst* estimado menor a 0.1 que indica que hay un bajo grado de diferenciación genética entre poblaciones (Cuadro 22).

Así como la distribución espacial se ve reflejada en la variación genética de las especies, el sistema de apareamiento es de gran importancia para la variación genética de las especies. Por ejemplo, Pérez (1990) encontró niveles de variación genética en *Psychotria faxlucens* Lorence & Owyer similares a los encontrados en otros árboles tropicales. Loveless & Hamrick (1984) reportan para *Psychotria horizontalis* Sw. una proporción de loci polimórfico de 0.5, el cual es ligeramente superior que en *Psychotria faxlucens* (P=0.40), por el contrario, la heterocigosis en *Psychotria horizontalis* fue menor (H=0.152), en *Psychotria faxlucens* fue de 0.198. Pérez (1990) discute que probablemente el alto valor de la heterocigosis se deba a que los alelos de las enzimas polimórficas presentaron frecuencias similares entre ellos. Otra causa de los altos valores de heterocigosis promedio es por la fecundación cruzada, presentan mayor heterocigosis que aquellas que se autofecundan.

La diversidad genética ha sido evaluada en un buen número de especies de árboles tropicales, en la mayoría de los casos la información proviene de una población (o de pocas poblaciones) situadas en un área geográfica específica. Nason (2002) menciona que es muy posible que si se llegara a investigar toda el área de distribución geográfica de una especie, se obtendría una diversidad genética alta (He) y una divergencia genética baja (*Gst* o *Fst*). La forma de crecimiento de una especie puede incidir en la estructura genética de la población. Por ejemplo las especies arbustivas, por tener un porte más pequeño, suelen ser más abundantes, por unidad de área que las especies de porte grande del dosel y esto puede afectar la estructura genética de la población de dos maneras (Nason 2002). Por una parte una densidad de arbustos muy grande puede promover una divergencia genética interpoblacional relativamente baja (dado un determinado nivel de dispersión de genes, por polen o semillas). De otra manera, si bien los arbustos son más abundantes por unidad de área que los árboles de mayor porte, su distribución espacial suele ser menos uniforme (pueden crecer en parches muy densos pero aislados), lo cual podría restringir la dispersión de genes. Si esto



fuera el caso, se podría presentar un nivel alto de endogamia, y esto traería como consecuencia una mayor divergencia interpoblacional.

Cuadro 22. Diversidad genética determinada por aloenzimas en plantas leñosas con características diferentes. La diversidad genética representa la proporción de loci polimórficos (Pp) y de especie (Ps), la diversidad genética (heterocigosis esperada) a nivel de población (Hep) y de especie (Hes), la proporción de la diversidad genética total encontrada (en loci polimórficos) que se reparte en diferentes poblaciones (divergencia genética; Gst), y el número efectivo de emigrantes por generación (Nm). El efecto de la población se midió únicamente en tres especies de la isla de Barro Colorado, Panamá. N es el número de especies analizadas, tomado de Nason (2002).

Categoría	N	Pp <sup>1</sup>	Hep	Ps	Hes	Gst	Nm
Distribución regional (según Hamrick <i>et al.</i> 1992)							
Zona templada	122	49.2 a	0.145 a	63.5 a	0.166 a	0.092 a	0.47 a
Zona templada	38	39.8 a	0.125 a	57.9 a	0.191 a	0.119 a	1.85 a
Sistemas de apareamiento-especies leñosas (según Hamrick <i>et al.</i> 1992)							
Mixto-animal	11	17.2 b	0.035 b	29.9 b	0.075 c	0.122 a	1.80 a
Exogámico-animal	51	47.6 a	0.163 a	63.2 a	0.211 a	0.099 a	2.28 a
Exogámico-viento	128	53.0 a	0.154 a	69.1 a	0.173 b	0.077 a	3.00 a
Dispersión de semilla-especies tropicales (según Loveless 1992)							
Abiótica	~2	37.4 a	0.120 a	-	0.139 a	0.138 a	1.56 b
Blótica	~2	42.4 a	0.146 a	-	0.154 a	0.050 b	4.75 a
Densidad de la población-especie tropicales (según Hamrick <i>et al.</i> 1991; Nason <i>et al.</i> 1996)							
Densidad alta	16	60.9 a	0.211 a	71.9	0.241	0.055	4.23
Densidad baja de higueros estranguladores	11	73.2 a	0.216 a	-	-	-	-
Otras especies	12	33.6 b	0.124 b	-	-	-	-

1 Los estimados, para una columna dada, que aparecen con la misma letra no difieren estadísticamente a un nivel de significancia del 5%

2 El número de taxones es variable; Loveless (1992).

La forma de vida de las especies parece ser importante en la evolución de los sistemas de apareamiento y por ende en la variación genética. En el capítulo uno vimos las condiciones tan extremas a las que están adaptadas las epífitas como, sequías pronunciadas, escasez de nutrientes etc., y en este tipo de medios crecen nuestras dos especies de estudio. *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y *Tillandsia brachycaulos*, presentaron niveles de variación genética con respecto al porcentaje de loci polimórficos de 100% y 96% respectivamente, por lo que consideramos que todos loci son polimórficos para ambas especies; estos valores son más altos que los encontrados en *Aechmea lueddemanniana* (K. Koch) Brongn. ex Mez (65.2%) (Izquierdo 1995) y *Pitcairnia geyskesii* L.B. Sm. (63.3) ambas plantas herbáceas, epífitas, de vida larga, con amplia distribución, autocompatibles, etc.

En el Cuadro 23 se muestran diferentes estimadores de diversidad genética para algunas especies de la familia Bromeliaceae que han sido estudiadas. *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y *Tillandsia brachycaulos*. exhiben los valores más altos en el porcentaje de loci polimórficos y heterocigosis observada (0.501 y 0.377 respectivamente), el valor más bajo para la  $H_o$  (0.007) y  $H_e$  (0) es para *Tillandsia recurvata* L., una planta epífita de amplia distribución, con órganos sexuales insertos en el tubo de la corola. El segundo valor más alto lo presenta *Pitcairnia geyskesii* ( $H_o$  0.185 y  $H_e$  0.183), planta terrestre con semilla de poca vagilidad que tiene la capacidad de autopolinizarse, pero está restringida geográficamente. Los valores de la heterocigosis observada para *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y *T. brachycaulos* son significativamente diferentes de

ceros, lo que indica que las especies tienen un número similar de alelos infinitos por locus, y un probable déficit de heterocigotos o cantidad importante de homocigos.

En general en el Cuadro 23 se puede observar que especies con amplia distribución o endémicas, o con sistemas de autopolinización, no presentaron valores altos para ningún índice, lo que demuestra que no existe una relación clara entre la distribución geográfica de una especie y su variación genética a nivel interpoblacional. Sin embargo, hay evidencias de una correlación significativa entre el tamaño poblacional y el nivel de variabilidad genética, por ejemplo Murawski & Hamrick (1991) encontró que tanto la proporción de loci polimórficos como la diversidad genética eran significativamente menores en 12 especies de árboles de baja densidad poblacional que en 22 especies de árboles de mayor densidad. Opuesto a lo anterior *Tillandsia brachycaulos* a pesar de su gran densidad poblacional en el sitio de estudio tiene un valor menor de variabilidad genética que *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* si, (ver capítulo uno), probablemente influenciada por sus sistemas de entrecruzamiento. En la mayor parte de los loci muestreados se encontraron índices de fijación positivos para ambas especies. Esto significa que hay más homocigos de los que se producen por apareamiento al azar (Pérez 1990). Estos valores positivos dan cabida a la posibilidad que exista endogamia en las subpoblaciones estudiadas, pues se sabe que el sistema de apareamiento y la deriva génica pueden producir índices de

fijación positivos en todos los loci del genoma (Hamrick 1983, cita de Pérez 1990).

izado de la familia

	Referencia
2	Sarthou et al. 2001
5	Soltis et al. 1987.
8	Soltis et al. 1987.
6	Soltis et al. 1987.
9	Soltis et al. 1987.
4	Soltis et al. 1987.
7	Palací 1991
0	Soltis et al. 1987.
0	Palací 1991

Cuadro 23. Estimadores de diversidad genética en los únicos estudios que han realizado en Bromeliaceae.

Taxones	Observaciones	Ap	% P	Ho	He	Nm	G <sub>ST</sub> o F <sub>ST</sub>
<i>Pitcairnia geyskesii</i>	Distribución espacial amplia.	2.2 1	63. 3	0.18 5	0.18 3	0.23 4	0.32 2
<i>Tillandsia friessii</i>	Saxícola, apareamiento desconocido.	1.4 8	33. 8	0.09 0	0.07 8		-0.1
<i>Tillandsia muhrae</i>	Saxícola, apareamiento desconocido.	1.3 9	26. 9	0.05 9	0.08 3		0.28 9
<i>Tillandsia alberti</i>	Saxícola, apareamiento desconocido.	1.4 6	34. 6	0.10 1	0.16 0		0.36 9
<i>Tillandsia guayasayensis</i>	Saxícola, apareamiento desconocido.	1.5 1	46. 1	0.12 8	0.15 9		0.19 5
<i>Tillandsia ionantha</i>	Epífita, menor distribución, órganos sexuales exsertos	1.3 6	16. 7	0.06 9	0.06 4	5.56 3	0.04 3
<i>Tillandsia ionantha</i>	Epífita, fertilización cruzada.	1.4 8	20. 8	0.06 4	0.08 8		0.27 3
<i>Tillandsia recurvata</i>	Epífita, mayor distribución, órganos sexuales insertos, autofertilización	1.0 5	2.6 5	0.00 7	0 5	0.02 5	0.99 6
<i>Tillandsia recurvata</i>	Epífita, autofertilización	1.1 7	3.7 7	0.00 7	0.15 1		1.00 0



<i>Aechmea magdalenae</i>	Herbácea perenne, crecimiento epifito clonal, autopoliniza.	1.3	33	0.09	0.08	0.45	0.35	Murawski & Hamrick 1990
<i>Aechmea mexicana</i>	Epífita, amplia distribución	1.7	48.7	0.054	0.157	0.185	0.656	Izquierdo 1995
<i>Aechmea lueddemanniana</i>	Epífita, amplia distribución	2.2	65.2	0.083	0.243	0.611	0.658	Izquierdo 1995
<i>Aechmea macvaughii</i>	Epífita, poca distribución	2.2	0.80	0.067	0.148		0.547	Izquierdo 1995
<i>Aechmea tuitensis</i>	Epífita, poca distribución	2.2	55.0	0.062	0.155		0.600	Izquierdo 1995
<i>Tillandsia brachycaulos</i>	Órganos sexuales exertos	4.0	96.6	0.376	0.627	1.45	0.143	Este estudio
<i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subrimbicata</i>	Órganos sexuales insertos	4.0	103	0.501	0.678	3.78	0.062	Este estudio

Los valores de  $F_{IS}$  para ambas especies fueron positivos (*Tillandsia elongata* var *subimbricata* 0.239 y *T. brachycaulos* 0.381), aunque solo para *Tillandsia brachycaulos* fue significativamente diferente de cero. Estos valores sugieren exceso de homocigotos debido probablemente al efecto por cruza entre plantas emparentadas y/o a selección a favor de los homocigos, cabe mencionar que *Tillandsia brachycaulos* presenta crecimiento vegetativo y es capaz de formar rametos con varios individuos que florecen, probablemente intercambien polen en el mismo rameto y dispersan semillas al mismo tiempo, todos estos factores reducen la variabilidad genética. Pérez (1990) menciona que valores de  $F_{IS}$  mayores a los de  $F_{st}$ , sugiere que el sistema de apareamiento es el principal factor que esta determinando la estructura genética de una población.

El índice de fijación de los individuos respecto al total de la población ( $F_{IT}$ ), en ambas especies fueron positivos, valores positivos de  $F_{IT}$  indican exceso de homocigos y esto puede ser debido a la deriva génica y/o endogamia.  $F_{IT}$  fue significativamente diferente de cero en *Tillandsia brachycaulos* lo que indica que existe un exceso de homocigos y puede ser debido a la deriva génica y/o endogamia, en nuestro caso la endogamia podría ser el principal factor. .

$F_{ST}$  es el índice que mide la diferenciación genética de las subpoblaciones. Toma valores de positivos que van de 0 a 1. En el Cuadro 23, observamos que el menor valor fue obtenido por *Tillandsia ionantha* (0.043). Esta especie es de distribución amplia, órganos sexuales exertos, es dicogama, en contraste con *T. recurvata* que tiene menor distribución espacial, no hercogama y valor de  $F_{ST}$  más alto (0.906), ambas especies se cultivaron en invernaderos, y por polinización natural solo *Tillandsia recurvata* L. produjo frutos regularmente (Soltis *et al.* 1987). Esto indica que el sistema de apareamiento no es un indicador o no tiene efectos sobre  $F_{ST}$ . Si analizamos los valores de  $F_{ST}$  relacionados con la distribución espacial, observamos que los números fluctúan de: 0.311 a 0.906, en especies de amplia distribución. Nason (2002) menciona que el flujo de semillas y de polen puede traspasar las subpoblaciones y este flujo de genes puede homogeneizar a las subpoblaciones genéticamente, en nuestro caso *Tillandsia elongata* obtuvo valores de  $F_{ST}$  no significativamente diferentes de cero, esto sugiere que las subpoblaciones dentro del Parque son muy parecidas o que hay eficiente flujo genético, ya sea por medio de semillas o de polen, por el contrario los valores de

$F_{ST}$  en *Tillandsia brachycaulos* fueron significativos diferentes de cero. Esto refleja por tanto una estructura genética significativa para *T. brachycaulos* y que el flujo de genes no es una fuerza importante en la evolución del grupo.

En referencia a la tasa de migración efectiva ( $Nm$ ), Izquierdo (1995) obtiene valores por debajo de uno para *Aechmea mexicana* (0.185), *Aechmea lueddemanniana* (0.611), *Aechmea macvaughii* y *Aechmea tuitensis*. Concluye que estos resultados corroboran la idea del escaso flujo génico que hay entre las poblaciones de estas especies. En nuestro caso las dos especies de estudio, presentaron valores por arriba de uno *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* (3.782) y *T. brachycaulos* (1.45), si nos basamos a lo dicho por Nason (2002) *Tillandsia elongata* esta más cerca de 4.75, por lo que el flujo génico en *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* es suficiente para restringir la diferenciación interpoblacional provocado por la endogamia. Por el contrario en *Tillandsia brachycaulos* la migración de 1.45 individuos por polen o semilla, ante el empuje de la deriva génica, el flujo de genes es insuficiente para mantener la cohesión genética entre poblaciones.

Es evidente la importancia que juegan la historia de vida, el patrón de distribución y el sistema de apareamiento de ambas especies, en el resultado de  $Nm$ . Lo controversial es que *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* haya obtenido un valor mayor a *T. brachycaulos*, por que no es visitada por colibríes, o algún otro polinizador en el sitio de estudio que disperse el polen, la explicación a esto puede estar en la distribución de sus semillas por el viento y la distribución de las tres subpoblaciones en el parque. Con respecto a las semillas estamos viendo el efecto, de un exitoso, patrón de dispersión y establecimiento de la especie. La distribución de la especie por subpoblación dentro del Parque es cercana, probablemente estemos observando un efecto fundador, donde no ha ocurrido el tiempo suficiente para que las subpoblaciones empiecen a diferenciarse. En *T. brachycaulos* contrario a lo ocurre la otra especie, esperábamos que  $Nm$  fuera mayor, por que observamos por lo menos dos posibles polinizadores, y eso nos hace pensar en un flujo exitoso del polen, las poblaciones tienen una mayor separación espacial, de hecho por zonas despejadas, y eso podría afectar el patrón de vuelo del polinizador (*Amazilia yucatanensis*) que es territorialista, o que simplemente las poblaciones estén en un proceso de aislamiento y sean selectivas con el polen, recibiendo solo polen completamente externo, lo cual es benéfico para la variabilidad genética.

## BIBLIOGRAFIA

**Benzing, D. H.** 1978. Germination and early establishment of *Tillandsia circinnata* Schlecht. (Bromeliaceae) on some of its hosts and other supports in South Florida. *Selbyana* 5:95-106.

**Brown, A. H. D.** 1979. Enzyme polymorphisms in plant populations. *Theoretical Population Biology* 15: 1-42.

**Futuyma, D. J.** 1986. *Evolutionary Biology*. 2<sup>nd</sup> edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers, USA. 109-143.

**Futuyma, D. J.** 2000. *Evolutionary Biology*. 3<sup>rd</sup> edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers, USA. 365-396.

**Hamrick, J.L.** 1989. Isozymes and analysis of genetic structure of plant populations. Pp: 87-105. En: Soltis, D.E. y P.S. Soltis (Eds.). *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press. Portland, OR.

**Hamrick, J. L., M. J. W. Godt, & S. L. Sherman-Broyles.** 1992. Factors influencing levels of genetics diversity in woody plant species. *New forests* 6: 95-124.

**Hamrick, J. L., M. J. W. Godt, D. A. Murawski and M. D. Loveless.** 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: Implications for conservation biology. pp. 75-86. In Falk, D. and K. Holsinger (eds.) *Genetics and Conservation of Rare Plants*, Oxford Press. London.

**Hamrick J. L., B. Linhart, and J. B. Mitton.** 1981. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10: 173-200.

**Hartl, D. L.** 1988. *A Primer of Population Genetics*, 2nd Ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. Pp. 15-95.

**Hartl, D. L. & A. G. Clark.** 1989. *Principles of populations genetics*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA, Second Edition, p: 3-63.

**Hedrick, P. W.** 1983. *Genetics and population*. Science Books Int. USA.

**Izquierdo, L.** 1995. Estructura y variación genética en 4 especies de *Aechmea* (Bromeliaceae) en México: *A. mexicana* Baker, *A. lueddemanniana* K Koch, *A. macvaughii* L. B. Smith y *A. tuitensis* P. Magaña & E. Lott. Tesis de Doctorado, UNAM. Centro de Ecología UACP Y P-CCH.

**Kress, W. J.; H. E. Luther, and C. S. Roesel.** 1990. Genetic variation in three species of Florida *Tillandsia*. *The Journal of Bromeliad Society*. 40: 59-63.

**Loveless, M. D.** 1992. Isozyme Variation in tropical trees: patterns of genetic organization. *New Forest* 6:67-94.

**Loveless, M. D. and J. L. Hamrick.** 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual. Review of Ecology and Systematics*. 15:65-95.

- Murawski**, A. D. and J. L. Hamrick. 1991. The effect of the density of flowering individuals on the mating systems of nine tropical tree species. *Heredity*: 67: 99-101.
- Murawski**, D. A., J. L. Hamrick, S. P. Hubbell, & R. B. Foster. 1990. Mating systems of two Bombacaceous trees of a neotropical moist forest. *Oecologia*. 82: 501-506.
- Nason**, D. J. 2002. La estructura genética de las poblaciones de árboles. En: Ecología y conservación de Bosques Neotropicales. Guariguata M. R., G. H. Kattan (Edts.). Libro Universitario Regional. Costa Rica. pp 300-322.
- Nason**, J. D., E. A. Herre, & J. L. Hamrick. 1996. Paternity analysis of the breeding structure of strangler fig populations: Evidence for substantial long-distance wasp dispersal. *Journal of Biogeography* 23: 501-512.
- Nei**, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, USA. 196-232.
- Nei**, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America 70: 3321-3323.
- Pérez**, N. 1990. Biología reproductiva y estructura genética de *Psychotria faxlucens* (Rubiaceae) en los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de Maestría. UNAM. Facultad de Ciencias.
- Pérez**, N. & D. Piñero. 1997. Isoenzimas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 77-84.
- Richarson**, B. J., P. R. Baverstock & M. Adams. 1986. Allozyme electrophoresis. A handbook for animal systematic and populations studies. Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publishers. pp. 21-64.
- Slatkin**, M. 1980. The distribution of mutant alleles in a subdivided population. *Genetics* 95: 503- 523.
- Slatkin**, M. & N. H. Barton. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolutions* 43: 1349-1368.
- Soltis, D. E.; A. J. Gilmartin; L. Reiseberg & S. Gardner. 1987. Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia elongata* and *T. recurvata* (Bromeliaceae). *American Journal of Botany*. 74:531-537.
- Wright**, S. 1931 Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159
- Wright**, S. 1951. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Wright**, S. 1978. Evolution and the genetics populations. Vol 4. Variability within natural populations. The University of Chicago Press, Chicago USA.
- Zotz**, G. & J. L. Andrade. 2002. La ecología y la fisiología de las epífitas y las hemiepífitas. En: Ecología y conservación de Bosques Neotropicales, Guariguata, M. R. & G. H. Kattan, editores. Libro Universitario Regional. Costa Rica. p.p. 271-290.

## CAPITULO 4

### DISCUSIÓN GENERAL

El sistema de apareamiento se define como la relación que existe entre el número de frutos y semillas producidas por autofecundación (de una población o especie) y el número de frutos o semillas producidas por polinización cruzada (exogamia). Esta relación entre autofecundación y exogamia depende de factores determinados genética y ambientalmente, por ejemplo: número de individuos en flor, sistema sexual (hermafrodita, monoico, dioico) y mecanismos de autoincompatibilidad reproductiva (Nason, 2002). De esa forma, se obtienen valores a partir de los cuales se define, de manera arbitraria, si el sistema de apareamiento es predominantemente exogámico o autogámico.

La autofecundación no solo restringe el flujo de genes al promover la endogamia y disminuir el entrecruzamiento, reduce también el tamaño efectivo de la población, o sea, su tamaño funcional (número de individuos capaces de aparearse en un momento dado y que casi siempre es menor al tamaño real de la población). Se espera, entonces, que un sistema de apareamiento "cerrado" y básicamente autogámico aumente el efecto perturbador de la deriva génica (proceso que se exagera al disminuir el tamaño de la población) y posiblemente también en la presión selectiva, la cual, a nivel de microhábitat podría llegar a originar diferencias genéticas interpoblacionales (Nason 2002).

Como ya mencionamos anteriormente, la selección natural y la deriva genética, fuerzas evolutivas que dan origen a la diferenciación genética que se observa entre una población y otra y, en última instancia, la especiación, deben hacerle frente al efecto homogeneizante del flujo genético. En teoría, aquellos factores que disminuyen el flujo genético tienden a aumentar la tasa de especiación (por diferenciación genética), y uno de los factores que más influyen en el flujo genético es el sistema de apareamiento (Murcia, 2002).

Tanto *Tillandsia brachycaulos* como *T. elongata* var. *subimbricata* registraron el mismo resultado promedio de azúcares totales (28%) en el néctar, cuyo valor ha sido reportado también para dos especies terrestres en la familia Bromeliaceae, *Dyckia ragoneseii* Castellanos y *Bromelia serra* Griseb. (Bernardello *et al.* 1991). Por otro lado, este resultado fluctúa entre los reportados para la subfamilia Tillandsioideae en especies como: *Tillandsia didisticha* (E. Morr.) Baker (34%), *Tillandsia ixioides* Griseb. (46%), *Tillandsia lorentziana* Griseb (2.6%), *Tillandsia tenuifolia* L. (35%), *Tillandsia xiphioides* Ker-Gawler (37%) y *Vriesea friburgensis* var. *tucumanensis* (Mez) L. B. Smith (25%) (Montogomerie 1984, Bernardello *et al.* 1991). Estas concentraciones de néctar son las preferidas por los colibríes (Gardner 1986). Esto sugiere, que las dos especies producen los recursos que satisfacen las necesidades de un posible polinizador y que calzan dentro del síndrome de polinización de ornitofilia basado en la morfología y biología floral. Cabe mencionar que en *T. elongata* var. *subimbricata* no observamos colibríes, así que tal vez la emisión de néctar solo sea una función ancestral.

En relación con el volumen promedio de producción de néctar, las dos especies produjeron volúmenes bajos (*Tillandsia elongata* var. *subimbricata* 1.05  $\mu$ l y *T. brachycaulos* 4.6  $\mu$ l), cuando los comparamos con especies como: *Abromeitiella brevifolia* (Griseb.) A. Cast. (14.01 $\mu$ l), *Abromeitiella lorentziana* (Mez) A. Cast. (41.61 $\mu$ l), *Dyckia ragonesei* Castell. (74.01 $\mu$ l), especies terrestres con flores mucho mas grandes que las de las especies aquí estudiadas. Cabe destacar que esta producción de néctar en estas tres últimas especies es acumulativa, es decir, que se tomaron las muestras por varios días y periodos de tiempo (Galletto & Bernardello 1992). En *Tillandsia elongata* var. *subimbricata*, el néctar se produce mucho después de la apertura floral y la maduración del polen, y en antesis es cuando hay mayor concentración y volumen de néctar. Lo anterior nos sugiere que desde el momento que termina su desarrollo, cada una de las flores queda expuesta a los diferentes visitantes ofreciendo como recompensa primero polen, completándose horas después con néctar. Por el contrario *Tillandsia brachycaulos*, ofrece el néctar y polen como recompensa al mismo tiempo (Cuadro 24).

Cuadro 24. Cuadro comparativo de los resultados de la biología de la reproducción y de la variación genética de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y *Tillandsia brachycaulos*.

	<i>Tillandsia elongata</i> var. <i>subimbricata</i>	<i>Tillandsia brachycaulos</i>
<b>Biología de la reproducción</b>		
% Azúcares totales del néctar	28	28
Volumen de Néctar ( $\mu$ l)	1.050	4.6
Polinización Automática (%) de frutos	45.72	23.85
AutoFertilización (%)	64.70	19.35
Fertilización Cruzada (%)	7.692	42.85
Eficiencia natural (%) frutos	56.30	49.68
Eficiencia natural óvulos (%)	95.84	81.76
IAFf	5.944	0.556
IAFs	0.991	0.986
IACf	8.411	0.451
IACs	0.978	1.005
IAGf	0.706	1.231
IAGs	0.978	1.981
<b>Variación y estructura genética</b>		
Loci	7	10
Alelos efectivos ( <b>Ae</b> )	4.033	4.066
Heterocigosis Observada ( <b>H<sub>o</sub></b> )	0.501	0.377
Heterocigosis esperada ( <b>H<sub>e</sub></b> )	0.678	0.627
Índices de fijación	0.279	0.436
Fijación de un individuo ( <b>F<sub>IS</sub></b> )	0.239	0.381
Fijación individuo-población ( <b>F<sub>IT</sub></b> )	0.286	0.472
Diferenciación genética de las subpoblaciones ( <b>F<sub>ST</sub></b> )	0.062	0.147
Tasa de migración efectiva ( <b>Nm</b> )	3.782	1.450

En cuanto al sistema de apareamiento, ambas especies produjeron frutos por polinización automática, auto-fertilización y fertilización cruzada (ver capítulo 2). *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* resultó ser autógama y *Tillandsia brachycaulos* parcialmente auto-compatible, cabe destacar que la fertilización cruzada se ve favorecida a través de mecanismos de autoincompatibilidad



genética (Gibbs 1990), pero la endogamia se ve favorecida con la autofertilización (Bennett 1987). *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* es una especie capaz de producir frutos y semillas en ausencia de polinizadores, la especie es altamente autocompatible, además en la especie no existe la depresión por autocruzamiento a pesar de que la especie es totalmente autógama. Por otro lado, *Tillandsia brachycaulos* depende parcialmente de la actividad de polinizadores para la producción de frutos, presenta una autoincompatibilidad parcial y no se observa ningún efecto de la depresión por autocruzamiento (evaluado en la germinación de semillas de frutos producidos por autofertilización).

Las dos especies se autopolinizan y presentan mecanismos que promueven la endogamia. Si observamos los resultados de los análisis aloenzimáticos; podemos ver que hay una estrecha correlación entre estos resultados y la biología reproductiva de ambas especies, por ejemplo, la heterocigosis observada en ambas especies fue menor a la esperada, lo que indica que la endogamia es un factor que ejerce presión.

La variabilidad genética medida es alta si la comparamos con resultados aloenzimáticos encontrados en muchas otras especies de la familia Bromeliaceae, como número de alelos por locus, % de loci polimórfico, heterocigosis observada y esperada, ver cuadro (23). La cantidad y distribución de la diversidad genética tiene que ver con la interacción diferencial entre las fuerzas evolutivas y las características de historia de vida. Izquierdo (1995) menciona que en algunas especies de *Aechmea*, los niveles de diversidad genética y su distribución están directamente relacionados con su forma de crecimiento (hierbas, perennes), su sistema de apareamiento predominantemente (autofertilización), una alta tasa de propagación vegetativa y con las características asociadas a los hábitats donde crecen, los cuales presentan distribución discontinua, y severas restricciones en la disponibilidad de agua y nutrientes, en comparación al suelo. Cabe destacar que varias de estas características se comparten con nuestras especies de estudio. *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y *T. brachycaulos* están restringidas a la disponibilidad de agua y nutrientes, ambas se autopolinizan lo que les asegura la permanencia de las subpoblaciones en el sitio de estudio.

Los índices de estructura genética encontrados en esta investigación indican que *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y *T. brachycaulos* difieren en el grado de endogamia. Valores de  $F$  (exceso de homocigotos),  $F_{IS}$  (deficiencia de heterocigotos),  $F_{IT}$  (excesos de homocigotos) y  $F_{ST}$  significativos (poblaciones distintas genéticamente), siempre fueron mayores en *Tillandsia brachycaulos*, lo cual podría ser ocasionado por la selección a favor de homocigotos, consanguinidad, panmixia o deriva génica (Pérez 1990). Si esto lo relacionamos además con la tasa de migración efectiva baja; poca dispersión de semilla y porcentaje bajo de fecundidad (Mondragón 2002), una serie de restricciones, crecimiento clonal, dependencia parcial de polinizadores, junto con el hábito epifito, etc., podemos inferir el siguiente panorama relacionado con *Tillandsia brachycaulos*: es una especie que forma grandes colonias y que no es muy selectiva de sitios para desarrollarse, crece vegetativamente en la población, y dependiendo poco de los agentes polinizadores, así tendrá mayor posibilidad de dejar descendencia, además *Tillandsia brachycaulos* tiene la capacidad de ingresar variabilidad genética a su pool genético, lo que le confiere una ventaja para eliminar los posibles efectos de la depresión por endogamia. Los valores de  $F_{ST}$ , son significativamente diferentes de cero, lo que indica que hay diferencias

entre las poblaciones, y esto puede ser debido al poco movimiento de polen entre las subpoblaciones por un agente polinizador y al poco movimiento de semillas, lo que puede estar llevando a las poblaciones a un aislamiento espacial y reproductivo, posiblemente provocado por las condiciones del sitio de estudio, donde las poblaciones se encuentran separadas por brechas de más de diez metros de amplitud, y una intensa actividad humana.

Los valores relacionados con la estructura genética de *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* ( $F_{ST}$ ), presentaron resultados bajos comparables con los de *Tillandsia brachycaulos* y aquellos que se han reportado en la literatura para la familia Bromeliaceae, sugiriendo que las tres subpoblaciones son parecidas. Loveless y Hamrick (1984) analizaron correlaciones de  $F_{ST}$  de plantas y encontraron que están correlacionadas con sus sistemas de cruzamiento, es decir, plantas con apareamiento o con fecundación cruzada y, particularmente las polinizadas por viento, presentan valores bajos de  $F_{ST}$ . Los valores de  $F_{ST}$  de *Tillandsia elongata* son muy bajos, lo que reflejaría la existencia de niveles altos de flujo (por semillas) entre las subpoblaciones, disminuyendo los efectos de la deriva génica y la selección natural (Pérez 1990). Esto se confirma con la tasa de migración efectiva encontrado para esta especie, la cual fue alta, solo superada dentro de la familia Bromeliaceae por *Tillandsia ionantha* Planch., la cual es una epífita con poca distribución espacial, órganos sexuales exertos (Palaci 1991). *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* es más eficiente que *Tillandsia brachycaulos* en aspectos reproductivos ver cuadro (24), en el sitio de estudio se observan plantas madres (ya muertas) con varios individuos a su alrededor, posiblemente relacionados genéticamente, es decir, individuos de una misma madre, Olmsted (Com. Pers) mencionaba que anteriormente la población en el sitio de estudio era más abundante, y en la actualidad se notaba una gran disminución, posiblemente provocada por la acción del hombre, en general se nota una alta relación entre estos aspectos y la poca estructura genética para la especie donde la colonización y conquista de nuevos espacios es fundamental para la permanencia de la especie.

## CONCLUSIONES

Las características florales observadas en *Tillandsia brachycaulos* Schldl. y *Tillandsia elongata* (Kunth) var. *subimbricata* (Baker) L.B. Sm concuerdan básicamente con el síndrome de polinización de ornitofilia por colibríes.

*Tillandsia elongata* var. *subimbricata*, no es una planta cleistógama.

*Tillandsia elongata* var. *subimbricata* tiene una baja producción de polen posiblemente relacionado con la carencia de visita de polinizadores en el sitio de estudio, reduciendo de esta manera una gran cantidad de gasto energético en la producción de este recurso, probablemente dirigiendo esta inversión energética al amarre de frutos y alta viabilidad de semillas

*Tillandsia elongata* var. *subimbricata* y *Tillandsia brachycaulos* presentan una floración de 1 a 5 meses, pero es mas concentrada en la segunda y mas distribuida a lo largo de los meses en la primera.

En cuanto a la presencia de visitantes florales en *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* no se observó polinizador alguno, pero para *T. brachycaulos* el único colibrí observado fue *Amazilia yucatanensis* y *Apis mellifera*; ambos hicieron contacto con las anteras y el estigma de las flores.

Las pruebas de polinización realizadas demostraron que las dos especies estudiadas, son totalmente autocompatibles y auto fértiles. Este comportamiento confiere ventajas a las dos especies en el mantenimiento de las poblaciones naturales. *Tillandsia elongata* var. *subimbricata* es una especie autógena, este mecanismo de reproducción favorece al aislamiento reproductivo entre éstas especies simpátricas, ya que la autogamia actúa como barrera de aislamiento reproductivo, entre las dos especies.

*Tillandsia brachycaulos* es una especie con bajos niveles de producción de frutos y en conclusión baja eficiencia reproductiva. Según estos resultados, la estrategia para mantenerse en el tiempo de este taxón no esta basada en la propagación sexual sino en el crecimiento, que permite la permanencia de las poblaciones dentro del sitio de estudio, la producción de frutos y semillas, permite a la planta la colonización de nuevos ecosistemas.

Los valores del índice de fijación y de los estadísticos  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  para ambos taxa sugieren que en ambas poblaciones hay un proceso de endogamia.

Para *Tillandsia brachycaulos* el valor de  $F_{ST}$  indica que existe diferenciación genética significativa entre las tres poblaciones estudiadas, lo que sugiere que el flujo génico no ha sido suficiente para igualar a las subpoblaciones, y esto es debido a la parcial autocompatibilidad de las subpoblaciones, aisladas espacialmente.

*Tillandsia elongata* var. *subimbricata*, presenta poca diferenciación entre sus poblaciones, esta planta tiene niveles muy bajos de fertilización cruzada, por lo que podemos inferir que la endogamia es responsable de esta poca estructura,

pero sobre todo a la dispersión eficiente de las semillas ( $Nm$  alto), para la colonización de nuevos sitios.

*Tillandsia elongata* var. *subimbricata* la fertilización cruzada, para introducir variación genética hacia adentro de su población cuando las condiciones se presentan, no siendo la fertilización cruzada la estrategia más importante para el mantenimiento de sus poblaciones.

## PERSPECTIVAS

Este trabajo de investigación ha generado valiosos conocimientos sobre los procesos reproductivos y genéticos de bromelias epífitas del género *Tillandsia*, usando dos especies como modelos comparativos de historias diferentes que están correlacionadas con los aspectos reproductivos y genéticos de las mismas. Sería interesante ampliar esta investigación con el uso de técnicas moleculares.

El conocimiento de los aspectos reproductivos de las poblaciones genera información básica para establecer planes de manejo y conservación, no solo de las plantas, sino de los polinizadores, con bases biológicas y genéticas sólidas. Esta información es básica y fácil de obtener para realizar propuestas más educadas de planes de manejo y conservación de especies de epífitas en el área de distribución de los taxa.

## BIBLIOGRAFIA

- Bennett, B. C.** 1987. Spatial distribution of *Catopsis* and *Guzmania* (Bromeliaceae) in Southern Florida. *Selbyana* 5:256-263.
- Bernardello, L. M., L. Galletto y H. R. Juliani** 1991. Floral nectar, nectary structure and pollinators in some Argentinean Bromeliaceae. *Annual of Botany* 67:401-411.
- Chuc M. G.** 2002. Dispersión de polen de *Hechtia schottii* Baker ex Hemsley (Bromeliaceae). Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario No 2 Yucatán, México. pp. 7-54.
- Galletto, L. and L. M. Benardello.** 1992. Extrafloral nectaries that attract ants in Bromeliaceae: structure and nectar composition. *Canadian Journal of Botany* 70:1101-1106
- Gardner, C. S.** 1986. Inferences about pollination in *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Selbyana* 9:76-86.
- Gibbs, P.** 1990. Self-compatibility in flowering plants: a neotropical perspective. *Review Brasil of Botany*. 13: 125-136.
- Izquierdo, L.** 1995. Estructura y variación genética en 4 especies de *Aechmea* (Bromeliaceae) en México: *A. mexicana* Baker, *A. lueddemanniana* K Koch, *A. macvaughii* L.B. Smith y *A. tuitensis* P. Magaña & E. Lott. Tesis de Doctorado, UNAM. Centro de Ecología UACP Y P-CCH. pp 4-98.
- Loveless, M. D. and J. L. Hamrick.** 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 15:65-95.
- Mondragón, D. M.** 2001. Dinámica poblacional de *Tillandsia brachycaulos* Schtdl. en el Parque Nacional de Dzibilchaltún, Yucatán. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Yucatán, México. pp 7-81.
- Montogomeric, R. D.** 1984. Nectar extraction by hummingbirds: response to different floral characters. *Oecologia* 63: 29-236.
- Murcia, C.** 2002. Ecología de la polinización. En: Ecología y Conservación de Bosques Neotropicales. Guariguata M. R. Kattan G. H. (eds). Libro Universitario Regional. Costa Rica. pp 493-525.
- Nason, D. J.** 2002. La estructura genética de las poblaciones de árboles. En: Ecología y Conservación de Bosques Neotropicales. Guariguata M. R., G. H. Kattan (eds.). Libro Universitario Regional. Costa Rica pp. 299-323.
- Pérez, N.** 1990. Biología reproductiva y estructura genética de *Psychotria faxlucens* (Rubiaceae) en los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de Maestría. UNAM. Facultad de Ciencias. pp. 5-110

## ANEXO

### 1. Receta para la preparación del buffer de extracción

Tris HCl 0.1M pH7.5 (25ml). Que se mezcla con:

EDTA (0.010gr.) (Tetrasodium SALT) 0.01M

Cloruro de potasio (0.019gr)

PVP 40,000 (2.5gr)

Cloruro de magnesio hexahidratado 0.010M (0.050gr)

Mercaptoetanol (0.025ml)

### 2. Sistemas de corrida.

Los geles de almidón se prepararon con 12 a 14 horas de anticipación, cada uno con los buffer correspondientes para cada tipo de sistema. Los sistemas que utilizamos fueron histidina-citrato y litio-borato. A continuación hacemos una descripción breve de la preparación de los geles utilizando la siguiente receta:

Histidina citrato 1-12 y litio borato 1-3 de la siguiente manera:

Para ambos geles sacarosa al 3.5%

Almidón al 12%

Litio borato: 240 ml. de agua y 120ml del buffer del gel.

Histidina citrato 330 ml de agua y 30 ml del buffer histidina.

Mezclamos las soluciones líquidas (litio borato o histidina citrato) con el almidón dependiendo del tipo de gel que se preparaba y se cocinaba a criterio para posteriormente vaciarlos en las charolas de corrida.

Los geles se refrigeraron aproximadamente 30 minutos antes de su corrida a 2°C, posteriormente hicimos un corte en el gel, en dirección y al principio de la corrida, y en este corte incluimos las muestras iniciales (wicks).

La muestra del individuo No1 se incluyó al principio y al final del carril de corrida. Los papeles filtro que contenían el extracto de las plantas a analizar se colocaron verticalmente, en los geles de almidón y con extremo cuidado cerramos el carril ajustando los papeles entre el gel, posteriormente realizamos un proceso de impregnación de la muestra en el gel, dejando correr el gel durante 30 minutos aproximadamente. Cuando transcurrieron los 30 minutos, los papeles se retiraron y se inició el tiempo de corrida que fue aproximadamente de 4-5 horas. El gel litio borato se corrió a 200 voltios y el gel histidina citrato a 250 voltios.

### 3. Formulaciones para tinciones histoquímicas.

#### Enzima MDH

NAD 1%	1 ml
MTT	1 ml
PMS	0.5 ml
DL Malato 1M pH 7.0	5 ml
Tris HCl 0.1M pH9.1	75 ml

**Enzima PER**

3 Amino 9 Ethil Carbazole	0.1grs
NN Dimetil Formamida	2.5 ml
Acetato de Sodio 0.05M pH 6.5	45 ml
Peroxido de Hidrogeno	200 $\mu$
Cloruro de Calcio 0.1M	1ml

**Enzima GDH**

Ácido L Glutámico SALT Monosodium	1.5 grs
NAD 1%	1 ml
Tris HCl 1M pH 8.0	10 ml
Agua destilada	40 ml
MTT	1.5 ml
PMS	0.5 ml

**Enzima PGM**

D glucosa 1 fosfato	0.075 gms
Tris Hcl 1M pH 8.0	5 ml
Agua destilada	40 ml
Mg CL <sub>2</sub> 1 M	1 ml
NADP 1%	1 ml
MTT	1 ml
PMS	0.3 ml
13 $\mu$ de Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa disuelto en 3 ml de agua.	

**Enzima LAP**

Tris Maleato 0.2M pH 4.9	50 ml
Leucina Naftilamida 2.5 HCl	1 ml
Estos dos ingredientes se mezclan y se añade al gel 30 minutos antes de teñir. Una vez transcurrido este tiempo en 5 ml de agua Se agregan 0.1 grs de Fast Black K Salt	

**Enzima ACP**

Naphthil Acido Phosphate	0.15 grs
Fast Garnet GBC Salt	0.05 grs
Acetato de sodio 0.05M pH 6.0	50 ml
Mg Cl 6H <sub>2</sub> O	0.05 grs

**Enzima PGI**

Tris HCl 0.05M pH 9.0	50 ml
Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa 1000 <sup>u</sup> / <sub>mg</sub> Diluir en 3 ml de agua 15 $\mu$ de la glucosa	
Cl Mg 1M	1 ml
NADP 1%	1 ml
MTT	1 ml
PMS	0.5 ml
Al final agregar D fructuosa 6 fosfato sal disodica	0.025 grs