

00376
3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PATRONES DE ESTERILIDAD MASCULINA ENTRE
POBLACIONES Y MORFOS DE *ERYTHROXYLUM*
HAVANENSE (ERYTHROXYLACEAE).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
(ECOLOGIA Y CIENCIAS AMBIENTALES)
PRESENTA EL BIOL. ;
EDUARDO CUEVAS GARCIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. CESAR A. DOMINGUEZ PEREZ TEJADA

273037

MEXICO, D. F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Quiero hacer patente el reconocimiento por la ayuda que me brindaron de una u otra forma para realizar este trabajo las siguientes personas. Al Dr. César Domínguez le agradezco el apoyo constante a lo largo del desarrollo de este trabajo y su motivación e interés que fueron esenciales para que pudiera terminar este trabajo. Al Dr. Rodolfo Dirzo le quiero dar las gracias por todas las facilidades que recibí en el laboratorio así como por su buena disposición para revisar mi tesis. Al Dr. Francisco Molina quiero expresarle mi más sincero agradecimiento por haberme ayudado tanto en el trabajo de campo como por ser miembro de mi comité tutorial, y sobre todo por ser una gran persona. Al Dr. Luis Eguiarte le agradezco la cuidadosa revisión que hizo a mi tesis, la cual enriqueció mi trabajo en varios aspectos. Al Dr. Carlos Cordero le doy las gracias por haber hecho valiosos comentarios a mi manuscrito. A la Dra. Tere Valverde le agradezco el interés que mostró para ser miembro de mi comité y revisar con cuidado mi tesis, a pesar de que no era el área central de estudio que ella maneja. Al Dr. Arturo Flores le agradezco el haber hecho comentarios que mejoraron la versión final del escrito.

Por otra parte no podría dejar de agradecerles a todos mis compañeros que me ayudaron en el trabajo de campo, a Cristina, Reyna, Rebeca y muy especialmente agradezco a César Abarca y Jose Luis Ibarra el haberse quedado en el campo conmigo hasta el final. Raúl Alcalá revisó y corrigió las primeras versiones del escrito, y me ayudó con la estadística. A Pauline le doy las gracias por corregir la redacción de mi tesis y mejorar la mía.

Resumen

Este trabajo se realizó con *Erythroxylum havanense*, un arbusto distílico en el que los individuos del morfo *Thrum* producen casi dos veces más semillas que los individuos del morfo *Pin*. Esta asimetría no se debe a factores ecológicos, como ocurre en otras especies heterostilicas, sino a la presencia de esterilidad masculina parcial del morfo *Thrum*. Este fenómeno podría ser el resultado de la esterilidad masculina citoplasmática (EMC) asociada al morfo *Thrum*. Como una primera aproximación para poner a prueba esta hipótesis se investigaron los niveles de germinación de los granos de polen y el crecimiento de los tubos polínicos en plantas de cinco poblaciones de la región de Chamela, Jalisco, México. La expectativa era que de estar presente la EMC se encontrarían diferencias en la germinación y crecimiento de los granos de polen entre poblaciones y al interior de las mismas, es decir, entre los morfos; ya que los resultados de un estudio embriológico previo mostraron que los individuos del morfo *Thrum* presentan cuatro veces más anomalías en la producción y desarrollo de los granos de polen que el morfo *Pin*.

Los resultados muestran que las cinco poblaciones de *E. havanense* estudiadas difieren significativamente en el porcentaje de germinación de polen, el cual en dos poblaciones fue cercano a cero y el máximo valor fue de 45%. Además, en las dos poblaciones que se encuentran dentro de la Estación de Biología de la UNAM, se detectó un mayor porcentaje de germinación de polen en el morfo *Pin*. Estas diferencias concuerdan con los resultados del estudio embriológico realizado anteriormente. Con respecto al crecimiento de los tubos polínicos también se detectaron diferencias a nivel poblacional con un ámbito de variación de 0.07 a 0.42 mm. en la población. El menor número promedio del total de granos de polen por flor fue de 87 y el mayor fue de 126.

Debido a que la asimetría en la producción de frutos no parece deberse a factores ecológicos, el único fenómeno que creemos puede producir tales diferencias es la EMC. Por lo que estos datos sugieren que la esterilidad, y probablemente la evolución del sistema reproductivo de esta especie, están determinados por la interacción antagónica entre los genes del núcleo y los de las mitocondrias, fenómeno conocido como Esterilidad Masculina Citoplasmática (EMC). De comprobarse que la esterilidad masculina de esta especie está determinada de manera nucleo-citoplasmática, este hallazgo podría cambiar las concepciones clásicas de cómo procede la evolución de la heterostilia al dioicismo

Indice

Agradecimientos	i
Resumen	ii
Indice	1
<i>I - Introducción</i>	2
Sistemas Reproductivos En Plantas	2
2 - La Heterostilia	4
3.- Vías Evolutivas a Partir de la Heterostilia	6
4 - La Esterilidad Masculina Citoplasmática	9
II.- Objetivos	12
III.- Métodos	12
1.- La Especie de Estudio	12
2.- Sitio de Estudio	14
3.- Trabajo de Campo	15
4.- Análisis Estadísticos	20
IV.- Resultados	21
V.- Discusión	26
VI - Bibliografía	34

INTRODUCCION

1. Sistemas Reproductivos en Plantas

En el sentido más amplio, el sistema reproductivo de una planta incluye todos los aspectos de la expresión sexual que afectan la contribución de los genes de un individuo a la siguiente generación (Wyatt 1983).

Debido a su hábito sésil, las plantas requieren de vectores externos que realicen la transferencia de gametos (polen) entre individuos. Se considera que este hecho es, en parte, el responsable de la gran diversidad de sistemas reproductivos que se observa en la naturaleza. Esto hace de la polinización una de las interacciones más complejas en términos ecológicos, y determina, en gran medida, el éxito reproductivo de los individuos (Bawa 1980). Se ha propuesto que la evolución y diversificación de las Angiospermas se debe, al menos parcialmente, a la interacción con los animales que las polinizan (Bawa 1995, Ricklefs y Renner 1994, Stebbins 1981). Se considera que algunas características florales han inducido a ciertos animales que buscan recompensa, a adoptar formas de vida ligadas al proceso de transferencia y depósito del polen (Waser 1983).

Con la finalidad de facilitar el estudio de los sistemas reproductivos de las plantas se han hecho clasificaciones cualitativas basadas en la variación morfológica de las estructuras reproductivas de los individuos. Dentro del continuo de sistemas reproductivos que presentan las plantas, podemos considerar en un extremo a las plantas hermafroditas, las cuales presentan flores bisexuales. En el otro extremo se encontrarían las plantas dioicas, en donde una planta presenta únicamente flores femeninas o únicamente flores masculinas. Este último sistema reproductivo puede considerarse como el que presenta la mayor separación de las funciones sexuales. Entre estos dos extremos podemos encontrar *prácticamente*

cualquier combinación imaginable en relación a las estructuras reproductivas. Por ejemplo, las especies ginodioicas presentan plantas hermafroditas y plantas hembra, (p.ej., *Plantago lanceolata*, Poot 1997, *Silene acaulis*, Shykoff 1988; *Thymus vulgaris*, Thompson y Maniacci 1998); las androdioicas presentan plantas con flores hermafroditas y plantas con flores macho (p.ej., *Datisca glomerata*, Fritsch y Rieserberg 1992) Por último, especies como *Pachycereus pringlei* presentan poblaciones donde existen plantas hermafroditas, plantas macho y hembra (Fleming *et al.* 1994).

Uno de los inconvenientes de las clasificaciones basadas exclusivamente en descripciones morfológicas es que no dan información acerca de la función sexual real de las plantas. Estudios con plantas hermafroditas demuestran que algunos individuos se comportan principalmente como machos o como hembras (Ross 1990).

De manera alternativa, Lloyd (1979) propuso el concepto de género funcional, el cual se refiere a la adecuación relativa que una planta puede ganar a través de su polen (función macho) o de sus óvulos (función hembra). Así, la sexualidad es descrita a lo largo de un continuo más que en categorías discretas, y establece una medida concreta de la forma en que se reproduce una planta particular.

La mayoría de las clasificaciones se han propuesto bajo la premisa de que los sistemas reproductivos son dinámicos, por lo que pueden sufrir modificaciones en escalas de tiempo ecológico y evolutivo (Barrett y Eckert 1990). Algunas de estas modificaciones han dado lugar a características adaptativas que son el resultado de la selección natural. Tal es el caso de la heterostilía, la cual es un tipo particular de separación espacial de las estructuras reproductivas. Este será el tema central del presente estudio

2. La Heterostilia

El término heterostilia fue empleado por Hildebrand en 1867 para describir el sistema reproductivo de plantas de la misma especie que presentaban dos o tres tipos de flores, las cuales diferían en la relación entre la altura del estilo y el largo de los filamentos que sostienen a las anteras (ver Richards y Barrett 1992). Hildebrand también mencionó que tales diferencias eran un mecanismo para promover el entrecruzamiento por medio de la interacción con los insectos. Posteriormente, Darwin (1877) retomó la terminología de Hildebrand y coincidió en que la heterostilia es un mecanismo que facilita la transferencia preferencial de polen entre morfos distintos. Darwin fue el primero en dar el nombre de *Pin* a las plantas con flores de estilo largo y estambres cortos, y de *Thrum* a las plantas de estilo corto y estambres largos. Asimismo, en 1877, hizo la distinción entre cruzas “legítimas”, que se realizan entre morfos distintos, e “ilegítimas” entre morfos iguales. Además, notó que las cruzas legítimas producían más semillas viables, aunque no pudo explicar el por qué (Darwin 1877).

Actualmente podemos definir a la heterostilia como la presencia de un polimorfismo genético en donde una misma especie puede presentar dos morfos (y se le conoce como distílica) o tres morfos (y se le llama tristílica) que difieren en la longitud relativa de los estambres y el estilo (Ganders 1979). En las plantas distílicas generalmente el polimorfismo va acompañado de un sistema genético de incompatibilidad de tipo esporofítico controlado por un gen con dos alelos, el cual evita tanto las cruzas entre plantas del mismo morfo como la auto polinización (Ganders 1979). Asimismo, existen una serie de características morfológicas secundarias, como el polimorfismo en el largo de las papilas del estigma y el tamaño, número y ornamentación de los granos de polen producido por cada morfo

(Ganders 1979). A partir de cruza experimentales en especies heterostilicas, en especial en especies distilicas del género *Primula*, se planteó que las características de la heterostilia están controladas por un factor genético S, con dos formas alélicas (S y s) (Dowrick 1956). El factor S se hereda de manera mendeliana, y en la mayoría de las especies estudiadas el alelo que especifica estilo corto (*Thrum*, Ss) es dominante sobre el alelo que especifica estilo largo (*Pin*, ss). Las características de cada morfo (haplotipos) segregan de manera conjunta como si estuvieran determinadas por un sólo gen, por lo que se ha propuesto que el factor S es, en realidad, un super gen compuesto por el haplotipo característico de cada morfo (Richards y Barrett 1992).

La heterostilia ha evolucionado de manera independiente en 25 familias de Angiospermas. Las especies heterostilicas presentan características muy similares en todas las familias donde se presentan, por lo que se ha propuesto que este sistema reproductivo ha surgido como una adaptación a presiones selectivas similares (Barrett 1992).

Darwin (1877) fue el primero en darse cuenta de que las familias con especies heterostilicas presentaban, en común, características como la presencia de flores pequeñas y de forma tubular. Además, notó que la heterostilia está ausente en varias familias de Angiospermas que presentan mecanismos desarrollados de entrecruzamiento y que tienen flores de corola irregular, como las Fabaceae, Lamiaceae, Orchidaceae y Scrophulariaceae. También notó que ninguna especie heterostilica se poliniza por viento. Él interpretó esas observaciones en el sentido de que sería poco favorable para tales familias evolucionar hacia la heterostilia, ya que esas familias ya estaban adaptadas para el entrecruzamiento. Posteriormente, Ganders (1979) profundizó en otras correlaciones, dándose cuenta de que la mayoría de las especies heterostilicas eran polinizadas principalmente por insectos o por aves

(colibríes), pero ninguna por murciélagos ni por viento. Observó también que las especies heterostílicas presentaban flores pequeñas de corola actinomorfa, tubular y con pocos estambres

3. Vías Evolutivas a Partir de la Heterostilia

Existe evidencia de que, dependiendo de las condiciones ecológicas, la heterostilia puede perderse (Barrett *et al.* 1989, Opler *et al.* 1975, Vekemans *et al.* 1990) o puede evolucionar hacia el dioicismo (Barrett, 1992, Ornduff 1966, Opler *et al.* 1975, Viullemier 1967).

La evolución al dioicismo a partir de especies heterostílicas se ha descrito, entre otras, en tres especies del género *Cordia*: *C. collococca*, *C. panamensis* y *C. inermis* (Opler *et al.* 1975). Estas especies aún presentan algunas características ancestrales de la heterostilia, como es la separación de anteras y estigmas; aunque funcionalmente el que sería el equivalente al morfo *Thrum*, funciona como macho, ya que no produce frutos, mientras que el equivalente al morfo *Pin* no llega a producir granos de polen. Una característica que han desarrollado *C. collococca* y *C. panamensis* es el dimorfismo en el tamaño y forma de la corola, lo que no ocurre en *C. inermis*

Por otro lado, la disolución de la heterostilia genera una condición monomórfica u homostílica en donde toda la población presenta un sólo morfo. La reversión hacia una condición monomórfica se ha registrado en condiciones marginales de distribución de algunas especies heterostílicas, generalmente asociada a bajas densidades de polinizadores (Baker 1966, Barrett y Shore 1987, Vekemans *et al.* 1990). Otro aspecto que generalmente está asociado a la pérdida de la heterostilia es el incremento de la autofecundación, como lo

muestra el caso de *Eichhornia paniculata*, relacionado con la pérdida del sistema de incompatibilidad (Barrett y Shore 1987).

Para tratar de entender la evolución de la heterostilia al dioicismo se ha empleado la teoría de la asignación sexual, misma que originalmente se planteó para plantas hermafroditas (Casper 1992). Debido a que se sabe muy poco acerca de cómo es la función de adecuación a través de la vía masculina en las plantas heterostilicas, la evidencia de una posible especialización de las funciones sexuales viene de las diferencias en la producción de semillas (Casper 1992). Se ha propuesto que la selección natural favorecería que los morfos asignaran recursos de manera diferente a la producción de polen y de semillas si el flujo de polen fuera asimétrico. Esto, a su vez, provocaría diferencias en la adecuación ganada por cada vía entre los morfos florales. De entre los factores ecológicos que podrían hacer que el flujo de polen entre los morfos de especies heterostilicas fuera asimétrico se involucra, de una u otra forma, a los polinizadores (Beach y Bawa 1980). Una de las hipótesis sugiere que el cambio de la distilia al dioicismo se inicia por un cambio en la biología de la polinización que modifica el flujo de polen complementario entre los morfos, y resulta en un flujo de polen asimétrico hacia alguno de los morfos (Beach y Bawa 1980).

Un caso particular de la posible evolución hacia el dioicismo desde la heterostilia es el que presenta el arbusto *Erythroxylum havanense*. A pesar de que no existen diferencias significativas en la producción de flores entre los morfos (*Pin* 1065 y *Thrum* 861 en promedio, $n=90$, $F=1.29$, $P=0.29$), ni en el tamaño promedio de las plantas *Pin* y *Thrum*, se ha encontrado una diferencia significativa en la producción de frutos en las poblaciones que se encuentran dentro de la Estación de Chamela (Domínguez 1990). Las plantas del morfo *Pin* producen en promedio 75 ± 14 frutos maduros, mientras que las plantas del morfo

Thrum producen 140 ± 24 frutos ($F= 5.7$, $P= 0.018$) es decir, casi el doble (Domínguez 1990). Es de notar que la diferencia en la producción de frutos que se observó entre morfos, es contraria a la que se ha reportado en la mayoría de los estudios con plantas heterostílicas donde generalmente el morfo *Pm* actúa más como hembra que como macho. Otro dato interesante es que esta diferencia no se debe a factores ecológicos asociados con los gremios de polinizadores, las visitas a las flores, o el flujo de polen, ya que aún con cruza controladas se mantiene dicha diferencia (Domínguez *et al.* 1997). Un estudio embriológico de las estructuras reproductivas en estas mismas poblaciones de *E. havanense*, mostró que el androceo de las flores *Thrum* presenta un desarrollo anormal a distintos niveles. El primero está asociado al tejido esporógeno, el cual en la mayoría de las anteras del morfo *Thrum* está colapsado y en consecuencia no hay producción de granos de polen. En segundo lugar, en algunos lóculos de las anteras de las plantas *Thrum*, las células del tapete están bien desarrolladas mientras que en otros ni siquiera existe esta capa (Vázquez-Santana *et al.* 1996). Debido a que el tapete es parcialmente responsable de la síntesis de la exina, su desarrollo anormal en las plantas del morfo *Thrum* podría explicar la ausencia o escasez de la exina, y por lo tanto, la falta de una pared del polen bien desarrollada. Esto, a su vez, podría explicar la presencia de granos de polen con el citoplasma fuera de los límites impuestos por la exina y la presencia de granos de polen vacíos u amorfos (Vázquez-Santana *et al.* 1996) Sin embargo desconocemos qué ocurre en poblaciones que se encuentran fuera de la Estación de Chamela.

Basándose en estos antecedentes se ha planteado la posibilidad de que el fenómeno responsable de la esterilidad parcial del morfo *Thrum* en esta especie sea la esterilidad

masculina citoplasmática (Domínguez 1990, Domínguez *et al.* 1997 y Vázquez-Santana *et al.* 1996).

4. La Esterilidad Masculina Citoplasmática (EMC)

La esterilidad masculina citoplasmática (EMC) es un caso particular de los conflictos genéticos (Saumitou-Laprade *et al.* 1994). Estos conflictos surgen cuando la propagación de un gen crea las condiciones para la propagación de otro gen en el mismo individuo, pero con efectos contrarios al primero (Hurst *et al.* 1996). Se ha propuesto que los conflictos genéticos podrían estar involucrados en eventos evolutivos tan importantes como el origen de la anisogamia, del dioicismo, la recombinación y de la reproducción sexual (Hurst *et al.* 1996). La EMC es el resultado evolutivo de un conflicto entre los genes nucleares y los citoplasmáticos. Esto se debe a que, en la mayoría de las Angiospermas, los genes nucleares se heredan de manera biparental, mientras que los genes citoplasmáticos se heredan únicamente por vía materna (Saumitou-Laprade *et al.* 1994). En presencia de este conflicto la selección natural favorecería la presencia de mutantes citoplasmáticos que provoquen la esterilidad masculina, si al hacerlo confieren una ventaja a la función femenina. A su vez, la selección natural, al actuar sobre los genes nucleares, favorecería la presencia de un gen que restaure la función masculina. En este esquema, el paso del hermafroditismo al dioicismo involucraría un estado intermedio en donde coexisten las plantas hermafroditas y las plantas hembras conocido como ginodioicismo, el cual se ha planteado que puede ser el resultado evolutivo de la EMC (ver Fig 1.).

En todas las especies donde se ha estudiado el fenómeno de la EMC se ha encontrado que los genes responsables de la esterilidad masculina, son el resultado de rearrreglos del ADN mitocondrial (Hanson 1991), mientras que los genes encargados de la restauración de la esterilidad masculina se han encontrado asociados al núcleo. En la mayoría de los casos estos genes son específicos, por lo que sólo pueden restaurar los efectos de un sólo gen de esterilidad.

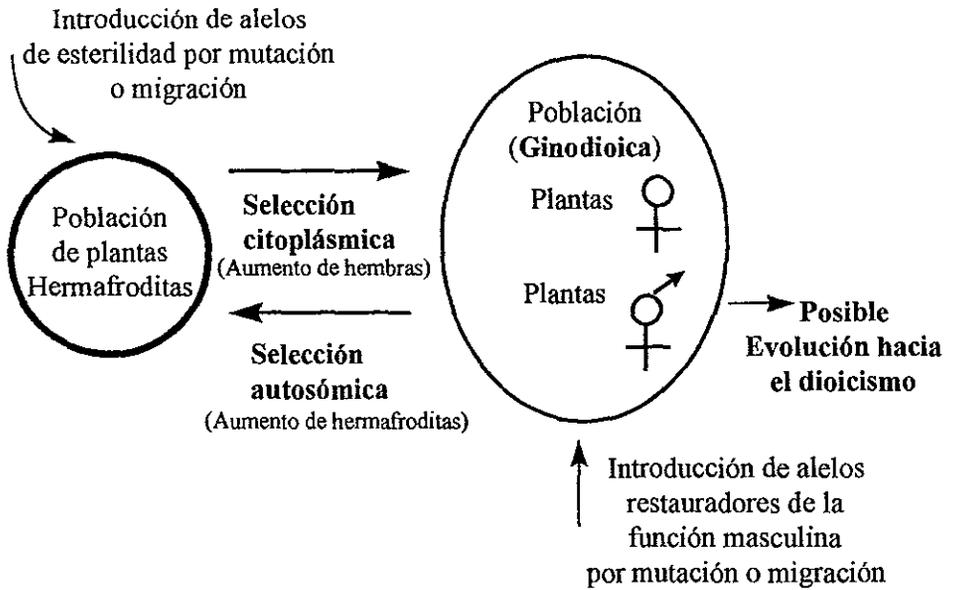


Fig. 1. Diagrama representativo de la dinámica evolutiva de una especie ginodioica basado en un modelo genético (modificado de Domínguez 1995).

Existen algunos modelos teóricos que han tratado de predecir el resultado evolutivo de la dinámica núcleo-citoplasma con la finalidad de saber si la EMC podría conducir hacia el dioicismo o si se trata de una situación evolutivamente estable (Maurice 1992, Maurice *et al* 1994). Los resultados de dichos modelos plantean que la evolución al dioicismo en especies ginodioicas depende del tipo de herencia (Maurice *et al.* 1994). De hecho Maurice (1992) ha mostrado que si el ginodioicismo está controlado por la interacción entre los genes del núcleo y el citoplasma, entonces las condiciones que favorecen la evolución al dioicismo son menos restrictivas que si el control fuera puramente nuclear o citoplasmático.

Se han propuesto cuatro características que deberían estar asociadas a las poblaciones naturales que presenten EMC (Frank 1989):

1.- Presencia de distintos citotipos en cada población, cada uno capaz de producir esterilidad masculina de distinta forma, es decir, cada gen puede actuar a distinto nivel durante la producción del polen.

2.- Polimorfismo en los genes restauradores de la esterilidad. Esto es, cada uno de los genes restauradores debe ser específico para cada gen que cause esterilidad.

3.- Debe existir una diferenciación genética entre poblaciones geográficamente distintas, como resultado de la dinámica entre los genes causantes de la esterilidad y de sus restauradores específicos.

4.- Diversidad fenotípica entre las poblaciones, medida como el porcentaje de individuos estériles para la función macho. Esta diversidad sería el resultado del número de genes causantes de la esterilidad en las poblaciones, y la presencia o no de los genes restauradores.

En este estudio se pretende poner a prueba el supuesto número cuatro, que predice una diferenciación fenotípica en los niveles de esterilidad entre poblaciones (el porcentaje de individuos estériles para la función macho). Este estudio es una primera aproximación para tratar de entender si la esterilidad parcial del morfo *Thrum* en *E. havanense* encontrada en el estudio embriológico, se debe al fenómeno de la EMC. Hasta la fecha se ha reportado este fenómeno en 140 especies de 20 familias, todas ellas hermafroditas, sin embargo no existe una razón teórica que pudiera prevenir su presencia en una especie heterostilica.

Dadas las distintas malformaciones encontradas en el desarrollo de los granos de polen del morfo *Thrum*, esperaríamos encontrar una mayor proporción de germinación y una

tasa de crecimiento más alta en los granos de polen del morfo *Pm*. Por lo tanto, de estar presente la EMC en *Erythroxylum havanense*, no necesariamente tendría los mismos efectos sobre los dos morfos.

II. Objetivo General

El objetivo general de este estudio es determinar los niveles de variación en la esterilidad masculina entre morfos y entre poblaciones de *E. havanense*, así como discutir estos resultados a la luz de lo esperado en especies con EMC.

Objetivo Particular

1.- Medir los niveles de esterilidad masculina, como el porcentaje de germinación de los granos de polen y la longitud de los tubos polínicos, en cinco poblaciones de *E. havanense*.

III. MÉTODOS

1. La Especie de Estudio

Erythroxylum havanense (Erythroxilaceae) es un arbusto perenne, caducifolio, en México se distribuye a lo largo de la Costa del Pacífico, desde el estado de Nayarit hasta el estado de Oaxaca. Es abundante en la región de Chamela, Jalisco, en donde crece formando parches. Su altura máxima en las poblaciones estudiadas es de tres metros (Dominguez 1990). Es un arbusto distilico en el cual es posible distinguir dos tipos de individuos con base en la morfología de sus flores. Los individuos "*Pm*" presentan flores con el estilo por

arriba de las anteras, y los individuos “*Thrum*” donde las anteras están a mayor altura en relación con el estilo.

En la región de Chamela *E. havanense* pierde las hojas durante la temporada de sequía (noviembre a mayo) y su reproducción se restringe a los meses de la época de lluvias (junio a octubre). Florece de manera sincrónica y masiva en un corto periodo que puede ir de una semana a 15 días, después de las primeras lluvias (Dominguez y Dirzo 1995). A escala individual la floración es efímera, ya que cada planta tiene flores aproximadamente durante tres días y alrededor del 70% de las flores de un individuo son producidas en un sólo día (Dominguez y Dirzo 1995). Sus flores miden aproximadamente un centímetro de diámetro, son de color blanco, con cinco sépalos, cinco pétalos y dos grupos de cinco estambres. El pistilo tiene tres estilos cada uno con un estigma capitoso. El ovario es súpero y presenta tres cámaras y generalmente sólo uno de los carpelos es fértil y forma un óvulo que llega a producir una semilla. Las flores duran sólo un día y si no son polinizadas caen de la planta ese mismo día o al siguiente. La antesis ocurre en las primeras horas de la madrugada y poco tiempo después empieza la producción de néctar, la cual no difiere entre los morfos y alcanza un pico de 0.63 μ l/ flor alrededor de las 0700-0730 h (Dominguez 1990).

La exposición del polen en *E. havanense* es un proceso gradual que requiere, en promedio, de 3.5 h para que una flor haya abierto todas sus anteras. Este proceso empieza aproximadamente a las 0630 h y alrededor de las 1000 h todo el polen de una flor ha sido expuesto y después de las 1400 h las flores se han marchitado.

Los polinizadores más importantes son abejas del género *Trigona*, que realizan aproximadamente el 86% de las visitas, y del total de visitas de las abejas del género

Trigona, el 55% se debe a una sola especie, *T. hellwegeri*. Otro grupo importante de polinizadores es el de las abejas *Anthophoridae*, las cuales tienen la capacidad de volar entre parches, por lo que su papel en el movimiento de polen podría ser crucial (Dominguez *et al.* 1997).

E. havanense presenta un sistema de incompatibilidad bien desarrollado en donde las cruces entre individuos de un mismo morfo no producen frutos (Dominguez *et al.* 1997). La fructificación, al igual que la floración, es sincrónica y masiva. Los frutos maduros son pequeñas drupas de color rojo intenso y la planta tiene un síndrome de dispersión por aves. Los tres principales frugívoros que visitan a *E. havanense* son: *Ortalis poliocephala*, *Myiarchus sp.* y *Cyanocompsa parrellina* (Gryj 1990, Gryj y Dominguez 1996). Las plantas *Pin* producen, en promedio, 1065 flores y las *Thrum* 861 en poblaciones que se encuentran dentro de la Estación. Esta diferencia no es estadísticamente significativa ($n=90$, $F=1.29$, $P=0.29$). La eficiencia en la maduración de los frutos tomando en conjunto los dos morfos es muy baja, y sólo el 14.1% de los frutos produce semillas ($n=120$). Este valor es bajo comparado con otras especies del género (Dominguez 1990).

2. Sitio de Estudio

El estudio se realizó en la Estación de Biología de Chamela y sus alrededores (Fig. 2). La Estación pertenece al Instituto de Biología de la UNAM y se localiza cerca de la costa del estado de Jalisco, entre Manzanillo y Puerto Vallarta (19°30'N, 105°03'W). El clima de esta zona es de tipo cálido-húmedo y el 80% de la precipitación se restringe a los meses de julio a octubre. La época de secas se extiende de noviembre a mayo. La vegetación dominante es selva baja caducifolia y la altura del dosel tiene, en promedio, entre 5 y 10

metros La mayoría de las especies arbóreas de este ecosistema pierden las hojas durante la sequía (Bullock y Solís-Magallanes 1990)

3. Trabajo de Campo

Debido a que nos interesaba contar con una medida de la fertilidad masculina, se decidió cuantificar la germinación de los granos de polen a través de uno de los mejores métodos para ello, que es el de cultivo *in vitro* de los granos de polen, ya que esta técnica es una de las más confiables que existen (Kearns y Inouye 1993).

Antes de la floración natural de 1997 se realizó un muestreo piloto con el fin de afinar la técnica de cultivo. El polen, para la prueba piloto, fue obtenido de plantas que fueron inducidas a florecer por medio de riegos experimentales (ver Domínguez 1990 y Domínguez y Dirzo 1995).

Aunque ya se contaba con un medio de crecimiento para tubos polínicos (Avila 1991) hicimos pequeñas modificaciones y evaluamos su efectividad. Asimismo, otro de los objetivos de este ensayo fue homogeneizar la técnica que se emplearía para la germinación de los granos de polen, es decir, preparar a todas las personas que realizarían el muestreo y por lo tanto reducir los errores debidos a la manipulación de las flores. Otro de los propósitos de este muestreo fue determinar la variación en los niveles de germinación existentes dentro de las anteras de una flor, entre flores de una planta y finalmente entre plantas. Esto permitió definir el número de anteras, flores y plantas de ambos morfos que debería incluir el muestreo definitivo. Durante el muestreo piloto también decidí el tiempo que dejaría crecer los tubos polínicos para después detener su crecimiento de manera

uniforme, al poner sobre cada portaobjetos una gota de FAA (Formaldehído 5%, Acido Acético 5%, Etanol 63% y Agua Destilada 27%).

Una vez que la información fue analizada y tomando en cuenta los niveles de variación y las restricciones metodológicas, se decidió que lo más conveniente era elegir diez plantas de cada morfo por población y de cada planta tomar una muestra de cuatro anteras por flor, de cuatro flores por planta (20 plantas x 4 flores x 4 anteras = 320 anteras / Pob x 5= 1600 anteras). Cabe mencionar que una fuerte limitación para la realización de este estudio fue el tiempo que el polen permanece expuesto en la antera antes de que se seque, el cual en la mayoría de los casos no fue mayor de dos horas.

El muestreo definitivo se realizó durante el mes de junio durante la temporada reproductiva de 1997, y se muestrearon un total de cinco poblaciones por restricciones de tiempo. La elección de estas poblaciones se debió a que en ellas se contaba con más de 50 plantas por población con etiquetas que indicaban el número de identidad y el morfo de la planta, y se conocía la localización geográfica de cada población. Dos de las poblaciones se encuentran dentro de la Estación de Biología, en los senderos Ardilla y Tejón, y las otras tres poblaciones se localizan en los alrededores de la Estación (ver Fig 2 y Tabla 1.).

Tabla 1. Distancias entre las poblaciones estudiadas (km).

POBLACIÓN	ARDILLA	TEJÓN	CUITZMALA	LIMÓN
TEJÓN	0.75			
CUITZMALA	14.5	14.75		
LIMÓN	11.25	12	10.5	
RANCHITOS	9.25	9.75	19.75	11.5

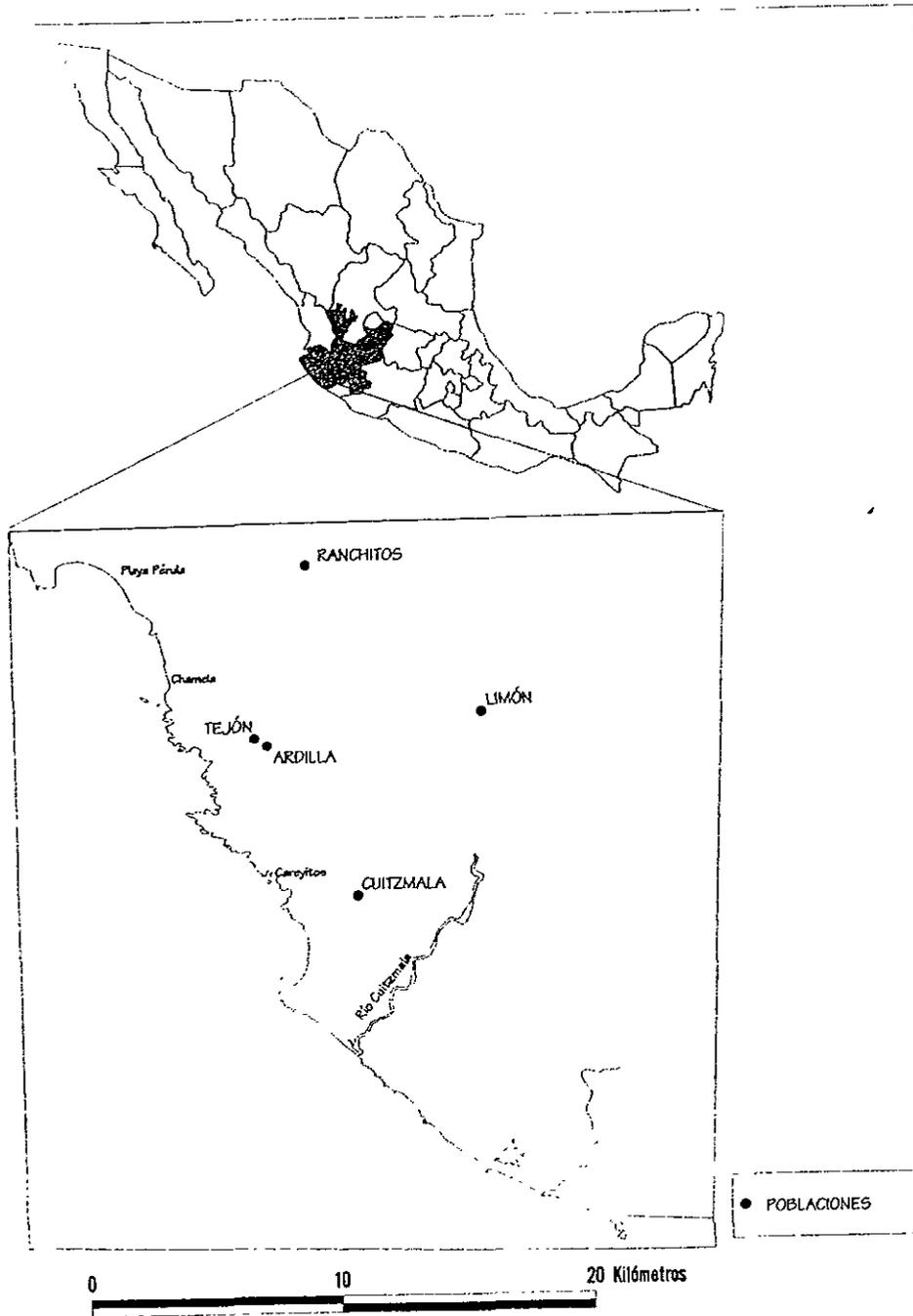


Figura 2. Localización de las poblaciones estudiadas

Las dos poblaciones más cercanas son Tejón y Ardilla, las cuales están separadas por una distancia de 750 m (± 100 m), y las más lejanas son Cuitzmala y Ranchitos, separadas por una distancia de 19 km (± 100 m). La distancia promedio entre poblaciones es de 11.4 km.

A continuación se describe la metodología que se usó para estimar los porcentajes de esterilidad de las plantas en las cinco poblaciones.

Se seleccionaron 20 plantas por población, (diez de cada morfo) que tuvieran suficientes botones florales, sin embargo en algunas poblaciones el número de plantas fue menor debido a limitaciones metodológicas. La tarde anterior a la antesis se embolsó (usando bolsas especiales Pollen-tector, Company of Iowa) una rama por planta para evitar que los polinizadores se llevaran el polen o depositaran el de otra planta. En seguida se colocaba una gota del medio en cada extremo de un porta objetos, que después era almacenado en una caja de Petri de plástico que contenía una hoja de papel filtro húmedo en el fondo. A continuación se colocaba una etiqueta en la caja de Petri en donde se anotaban los siguientes datos: nombre de la población, número de la planta y morfo, número de la flor y de la antera, así como la hora a la que se hacía la preparación, esto último con el fin de poder detener el crecimiento de los tubos polínicos de todas las plantas de una población al mismo tiempo.

Las cajas de Petri se guardaron en cajas de cartón y se transportaron a la población en la cual se emplearían. Los cultivos de polen de cada población se iniciaron en el momento de la antesis ($\approx 10:00$ h). En cada planta se verificó que las anteras tuvieran polen expuesto revisando las flores no embolsadas del mismo individuo. Una vez que esto ocurrió se procedía a quitar la bolsa y a coleccionar cuatro flores por planta, las cuales fueron transportadas en una caja de Petri con papel húmedo al lugar donde se realizarían las

preparaciones. Por lo general se escogió un sitio sombreado para reducir el riesgo de que las flores y las anteras se desecaran.

Cada una de las anteras, fue frotada contra el medio de cultivo de una preparación, provocando que el polen quedara en el centro de la gota y se trasladaron en cajas de Petri a la Estación, donde se colocaron en un laboratorio a temperatura ambiente. Después de 12 horas de cultivo, el crecimiento de los tubos polínicos se detuvo depositando una gota de FAA. Posteriormente, las preparaciones se sellaron con un cubre objetos y barniz de uñas transparente. Las cajas fueron almacenadas en un refrigerador para evitar la contaminación por hongos.

Los cultivos de polen de cada antera fueron fotografiados bajo el microscopio donde se elegía un campo por antera (que tuviera el mayor número de granos de polen) utilizando un objetivo de 10x.

El número total de granos de polen por antera (estimado a partir de los granos que quedaron depositados en el porta objetos), así como el número de granos germinados en cada preparación, fue contado directamente de las fotografías.

Con la finalidad de realizar las mediciones del crecimiento de los tubos polínicos, las fotografías de los cultivos de polen se digitalizaron con una cámara de video. En cada imagen se midió la longitud de los cinco tubos polínicos más largos usando el programa Morpho Sys (Meechan y Duncan 1989). En las anteras donde el número de tubos polínicos fue menor a cinco se midieron todos los tubos que estaban presentes.

El medio de cultivo, el cual trata de semejar las condiciones naturales de germinación de los granos de polen, se preparó el día de la anthesis de cada población, temprano en la mañana. La fórmula usada es una modificación del medio de Brewbaker *et al.* (1961) y

consistió de una mezcla de Agua (42ml), Sacarosa (10 5g), Agar Bacteriológico (0.35g), Nitrato de Calcio (0.015g) y Acido Bórico (0.01g). Todos estos compuestos habían sido pesados desde la ciudad de México y se encontraban en tubos de ensaye, así que lo único que se hacía era agregar el agua destilada y calentarlo por 5 minutos para disolver el agar.

4 Análisis Estadísticos

Se realizó una tabla (Tabla 2) con los principales resultados de este estudio que contiene el número de granos de polen, porcentaje de germinación, y el crecimiento de los tubos polínicos

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) con la finalidad de conocer si existen diferencias en el número promedio de granos de polen entre poblaciones, entre morfos dentro de cada población y entre plantas dentro de cada morfo, los datos se transformaron por medio del logaritmo natural, para ajustarlos a una distribución normal (Tabla 3). Aunque el muestreo no fue diseñado para estimar la producción de granos de polen, la metodología utilizada nos permite hacer una aproximación debido a que el muestreo se realizó de manera comparable en todas las poblaciones. Asimismo, dado que el muestreo se realizó a varios niveles, es decir varias anteras de una flor y varias flores por planta, se decidió que el mejor análisis era un ANDEVA anidado, el cual se empleó en los análisis subsecuentes (PROC GLM, SAS Institute 1987).

La proporción de granos de polen que germinaron, se analizó de manera similar a la del número de granos de polen, es decir, por medio de un ANDEVA anidado que incluyó a las poblaciones, los morfos, las plantas dentro de morfo, y las flores dentro de morfo y planta como variables independientes, los datos se transformaron por medio del logaritmo

natural para ajustarlos a una distribución normal (Tabla 4). Posteriormente se realizó un ANDEVA anidado para cada población con la finalidad de conocer si existen diferencias entre los morfos de una misma población, lo cual es de gran importancia, ya que suponemos que la esterilidad en *E. havanense* está asociada al morfo *Thrum*, los datos se transformaron por medio del arcoseno de la raíz cuadrada para ajustarlos a una distribución normal (Tabla 5). Posteriormente se realizó la partición de varianza con la finalidad de saber qué porcentaje de la misma está asociada a cada nivel (PROC GLM, SAS Institute 1987) (Tabla 6).

IV. RESULTADOS

Los resultados de este estudio muestran que existe un alto grado de variación en los tres componentes de esterilidad masculina, tanto a nivel de poblaciones como en los otros niveles explorados: morfos, plantas y flores (Tabla 2).

La población de *Ardilla* presentó el mayor número de granos con un promedio de 126 granos de polen por flor, así como el mayor porcentaje de germinación con 45% (Tabla 2). La población de *Limón* presentó el menor número de granos con un promedio de 87 granos por flor. El menor porcentaje de germinación se obtuvo en la población de *Ranchitos* y fue del 0.6% (Tabla 2). El número promedio de granos de polen entre las plantas de un mismo morfo fue muy variable. En tres poblaciones el número promedio de granos fue mayor en el morfo *Pin*, y en las otras dos los mayores valores se encontraron en el morfo *Thrum*. Asimismo, se detectó una gran variación en las proporciones de germinación entre los morfos florales. El máximo valor de germinación se encontró en la población de *Ardilla* en el morfo *Pin*, (63%) y el menor se encontró en la población de *Ranchitos* en el morfo *Thrum* y fue de 0.5% (Tabla 2).

La población de Ardilla presentó el mayor crecimiento de los tubos polínicos, tanto a nivel de población con un promedio de 0.42 mm, como a nivel de morfos con 0.43 mm en el morfo *Pin*. El menor crecimiento se encontró en la población de Ranchitos, en donde a nivel de población se obtuvo un valor de 0.09 mm y para el morfo *Pin* un valor de 0.07 mm.

Tabla 2 Número total de granos de polen por flor, porcentaje de germinación, y crecimiento promedio de los tubos polínicos para cada población y morfo (error estándar)

POB	Granos por flor			Germinación (%)			Crecimiento (mm.) Tubos Polínicos		
	POB	Pin	Thru	POB	Pin	Thru	POB	Pin	Thru
ARD	126.45 (14.4)	144.5 (20.6)	108.3 (19.1)	45 (2)	63 (2)	31 (2)	0.42 (0.03)	0.43 (0.05)	0.41 (0.03)
TEJ	118.3 (23.1)	124.7 (38.9)	112 (16)	19 (1)	23 (2)	13 (2)	0.23 (0.05)	0.21 (0.06)	0.28 (0.08)
LIM	87.1 (13.5)	78 (16.9)	107.7 (21.3)	41 (2)	42 (2)	37 (4)	0.40 (0.02)	0.41 (0.02)	0.39 (0.04)
CUI	125.4 (18.6)	107.85 (26.1)	139 (26.6)	5 (5)	6 (1)	5 (1)	0.23 (0.03)	0.30 (0.09)	0.22 (0.04)
RAN	112.3 (10.5)	135.85 (17)	82.87 (13.1)	0.6 (0.1)	0.7 (0.1)	0.5 (0.1)	0.09 (0.03)	0.07 (0.03)	0.1 (0.05)
\bar{X}	113.9	118.1	110	23	27	17	0.27	0.28	0.28

Granos por flor = promedio del número de granos de polen por flor, el cual se calculó a partir del número total de flores por población POB = Población,

Tabla 3. Resultados del ANDEVA anidado realizado con el número total de granos de polen.

Fuente de Variación	G.L.	Cociente de F	P
Población	4	1.8863	0.1109
Morfo	1	0.3503	0.5541
Planta(Morfo)	66	3.0171	<0.0001
Flor(Planta, Morfo)	178	1.1229	0.1537

El análisis mostró que no existen diferencias con respecto al número de granos de polen a nivel de población y de morfo, pero sí un efecto significativo del factor planta dentro de morfo (Tabla 3).

Tabla 4. Resultados del ANDEVA anidado realizado con la proporción de germinación de los granos de polen a nivel de poblaciones, morfos dentro de cada población y plantas y flores con sus respectivas anidaciones.

Fuente de Variación	GL	Cóeficiente de F	P
Población	4	48.89	0.0001
Morfo	1	68.83	0.0001
Planta(Morfo)	66	9.41	0.0001
Flor(Planta, Morfo)	178	1.24	0.0296

El modelo ajustado fue significativo y explica el 77.3 % de la varianza en el porcentaje de germinación. Como se observa en la Tabla 4, todos los niveles analizados resultaron ser significativos. Es decir, existen diferencias entre poblaciones, entre morfos, así como entre plantas del mismo morfo y flores.

Por otra parte, con la excepción de siete plantas en las cuales la proporción de germinación fue cero, se encontró que la variación en la proporción de polen germinado entre las plantas fue continua. Por lo anterior puede inferirse que la esterilidad de *E. havanense* es una esterilidad parcial, es decir, a nivel de plantas se encuentran valores de germinación de cero a uno, pasando por todos los valores intermedios (Fig. 3.).

Únicamente en las poblaciones que se localizan dentro de la Estación, es decir, Tejón y Ardilla, se encontró que hay diferencias significativas entre los morfos (ver Tabla 5. y Fig. 4) Por último, el análisis del crecimiento de los tubos polínicos mostró que existen diferencias entre las poblaciones, plantas y entre flores pero no a nivel de morfo (Tabla 7)

Tabla 5. Resultados del ANDEVA anidado con la proporción de germinación de los granos de polen para cada población. Sólo se presentan las poblaciones donde se encontraron diferencias entre morfos.

Fuente de Variación	G.L.	Cociente de F	P
POB ARDILLA			
Morfo	1	124.6	0.0001
Pla(Mor)	20	14.1	0.0001
Flo(Pla,Mor)	52	0.84	0.77
POB TEJÓN			
Morfo	1	8.7	0.0037
Pla(Mor)	16	8.1	0.0001
Flo(Pla,Mor)	50	1.75	0.0062

Tabla 6. Proporción de la varianza en la proporción de germinación de polen explicada a nivel de morfo, planta y flor para cada población.

POBLACIÓN	MORFO	PLA(MOR)	FLOR (PLA, MOR)
ARDILLA	34.3	36.3	0
TEJÓN	4.1	35.1	12.3

Tabla 7. Resultados del ANDEVA realizado con la longitud de los tubos polínicos

Fuente de Variación	G.L.	Cociente de F	P
Población	4	13.63	0.0001
Morfo	1	2.32	0.1279
Planta(Morfo)	45	10.39	0.0001
Flor(Planta, Morfo)	90	2.94	0.0001

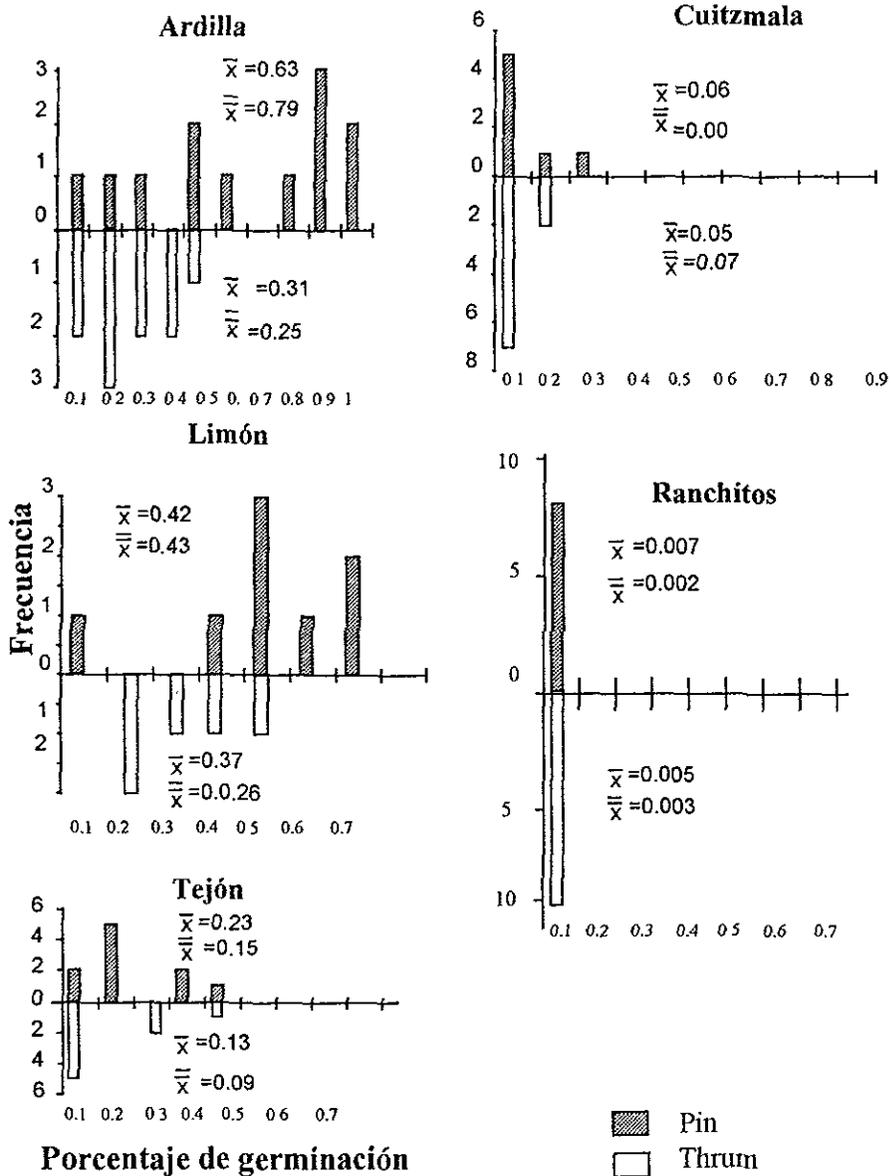


Figura 3. Distribución de la proporción de germinación por planta, para cada morfo de las 5 poblaciones estudiadas. \bar{x} =media \bar{X} =mediana

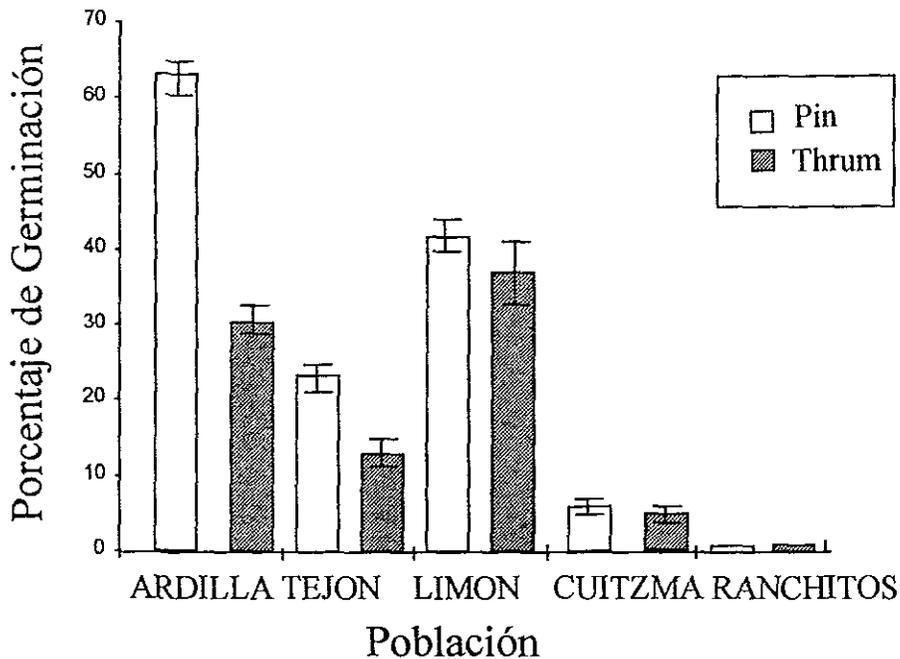


Figura 4. Germinación de los granos de polen por morfo para cada población

V. DISCUSIÓN

Dentro de los resultados más relevantes de este trabajo está el hecho de haber encontrado diferencias en la proporción de germinación de los granos de polen entre poblaciones y plantas, así como diferencias en la proporción de germinación entre los morfos en dos poblaciones (Ardilla y Tejón).

Para interpretar la importancia de las diferencias en la proporción de germinación de los granos de polen entre poblaciones, es necesario recordar que las especies con EMC se caracterizan por presentar diferencias entre poblaciones en los niveles de esterilidad. Dado que los genes causantes de la esterilidad deberían surgir de manera aleatoria en cada

población, la dinámica evolutiva debería ser diferente, o bien estar en una fase distinta, provocando así que los niveles de esterilidad de cada población sean distintos (Frank 1989).

Sin embargo, el hecho de haber encontrado diferencias en la proporción de germinación entre las poblaciones de *E. havanense* no puede interpretarse solo como el resultado directo que confirme la presencia de la EMC. Este resultado puede deberse a las características ambientales propias de cada población. Por ejemplo, estudios realizados en el arroz y el trigo, han demostrado que la presencia de agua es esencial durante la formación de los granos de polen y que la falta de ésta puede inducir fenómenos de esterilidad (Sheoran y Saini 1996, Lalonde, Beebe y Saini 1997). Estos estudios indican que las diferencias en germinación entre poblaciones pueden deberse a variaciones ambientales.

Un resultado inesperado fue la presencia de diferencias en la viabilidad del polen entre las flores de una planta. Es difícil explicar este resultado, ya que supuestamente la esterilidad del polen tiene una base genética y no debería haber diferencias entre las flores de un individuo. Existen al menos dos tipos de explicaciones para este resultado, las relacionadas con errores de muestreo o manipulación, y las relacionadas con la biología de la esterilidad citoplasmática. En primer lugar, es posible que las diferencias en la manipulación de las flores de un individuo, o la hora a la que se iniciaron o finalizaron los cultivos (que estuvo asociada con cambios de temperatura), haya producido suficiente varianza como para producir los resultados que observamos. En segundo lugar, también es posible que la diferencia en la viabilidad se deba al tipo de alelos presentes en los granos de polen. Si la esterilidad de un grano de polen depende de su haplotipo (S o s), entonces este podría ser un probable mecanismo que originara variación entre las flores. No obstante, es difícil explicar cómo este mecanismo produciría variación entre las flores de un individuo

La diferencia en la proporción de germinación entre morfos encontrada en las poblaciones de Ardilla y Tejón, es un resultado relevante ya que en ambas poblaciones la proporción de germinación fue mayor en el morfo *Pin*. Esto concuerda con los resultados del estudio embriológico donde el morfo *Thrum* presentó un mayor número de malformaciones en el desarrollo de los granos de polen en poblaciones de la Estación (Vázquez-Santana 1996). Este resultado podría explicar la diferencia en la producción de frutos a nivel de morfos encontrada en estudios anteriores. Si las fallas en la producción de polen del morfo *Thrum* están relacionadas con una baja tasa de germinación de los granos de polen en el estigma, entonces las plantas *Pin* recibirían polen de baja calidad, lo que probablemente repercutiría en su baja producción de semillas. Se ha mostrado que una reducción en la competencia gametofítica en el estigma reduce la cantidad y calidad de las semillas producidas (Byers 1995, Quesada *et al.* 1993). Otra posibilidad es que exista una especialización de las funciones sexuales y que las plantas *Pin* produzcan menos semillas porque asignan más recursos a la producción de polen en términos de la calidad de los granos de polen.

Es poco probable que la diferencia en la proporción de germinación entre los morfos, se deba a las condiciones ambientales en las que están creciendo las plantas. Dado que las plantas de ambos morfos se distribuyen de manera agregada en cada una de las poblaciones, es poco probable que las diferencias entre las plantas *Pin* y *Thrum* de la Ardilla y el Tejón se deban a efectos del ambiente.

Otro aspecto interesante es que ambas poblaciones son las más cercanas entre sí (de las poblaciones estudiadas), separadas por una distancia menor a 1Km. Esto sugiere que de estar presente la EMC, probablemente surgió en una población y que por medio de la

dispersión de semillas, (ya que los genes de la esterilidad se producen en las mitocondrias, por lo cual sólo se heredan vía materna, es decir únicamente por semillas) estos genes migraron a la otra población. Otra posibilidad es que la EMC haya surgido independientemente en las dos poblaciones de la Estación. Por lo tanto en las poblaciones de la Estación la expresión sexual de las plantas estaría controlada por la interacción del super gen de la heterostilia y los genes nucleo-citoplasmáticos. Bajo este escenario, los loci restauradores estarían ligados al super gen de la heterostilia. Dado que el morfo *Pin* es homogamético y recesivo (*ss*) los alelos restauradores deberían de expresarse en esas plantas si están ligados al haplotipo *Pin* y consecuentemente la función masculina se restauraría. Mientras que las plantas *Thrum* tendrían solo una copia del alelo restaurador debido a que son heterogaméticas (*Ss*) y la esterilidad se expresaría. En contraste, la falta de diferencias entre los morfos en el resto de las poblaciones se podría explicar simplemente por la genética de la heterostilia y las variaciones ambientales de cada población.

Otra posibilidad es que los genes causantes de la esterilidad estén presentes en todas las poblaciones, con la excepción de Limón, y que las poblaciones de la Estación sean las únicas en donde actualmente se encuentran los restauradores de la esterilidad, mientras que en la población de Limón es posible, dado que presentó niveles altos de germinación y sin diferencias entre los morfos, que no se encuentren presentes los genes de la esterilidad. Creemos que esta segunda alternativa es la más probable, ya que al realizar la repetición de la germinación del polen en una de las poblaciones de la Estación al año siguiente (Rosas datos no publicados), se encontró que existe concordancia con los patrones de variación de la esterilidad masculina dentro de la población entre los dos años, lo que sugiere la presencia de un componente genético asociado a la esterilidad masculina al menos en dicha población.

Por otro lado, el haber encontrado una esterilidad parcial puede tener varias explicaciones. Una de ellas es que la esterilidad en *E. havanense* sea el resultado de la acción de varios alelos, que difieren en su capacidad para restaurar la esterilidad masculina (como es el caso de *Plantago lanceolata* Van Dame 1983, y *Helianthus annuus* Vranceanu y Stoenescu 1978). Otra posibilidad es que existan distintos genes de esterilidad como ocurre en *Glycine max* (Stelly y Palmer 1980), donde se ha visto que para que una planta estéril recobre su fertilidad, es necesario la presencia de un mínimo de los alelos en los diferentes genes que intervienen en la restauración. De lo contrario, la planta presenta una esterilidad parcial.

Las longitudes promedio de los tubos polínicos mostraron diferencias entre las distintas poblaciones, lo que sugiere que posiblemente exista variación genética relacionada con el crecimiento de los tubos polínicos a nivel de población, o ser el resultado de la heterogeneidad ambiental. Sin embargo, no se detectaron diferencias en las longitudes de los tubos polínicos entre morfos dentro de una misma población. En otras especies heterostílicas se han encontrado que los tubos polínicos del morfo *Thrum* crecen casi dos veces más rápido en flores *Pin*, comparados con los del morfo *Pin* creciendo en flores *Thrum*. Esta diferencia en las tasas de crecimiento puede deberse a que los granos del morfo *Thrum* deben recorrer una distancia mayor para poder fecundar los óvulos (Mc Kenna 1992).

El hecho de no haber encontrado diferencias en las tasas de crecimiento de los tubos polínicos del polen *Pin* y *Thrum* de *E. havanense* sugiere que las desventajas del morfo *Thrum* van más allá de una menor proporción de germinación en los granos de polen.

El estudio embriológico de *E. havanense* mostró que una de las anomalías en la formación de los granos *Thrum*, está asociada con la célula vegetativa (la cual sintetiza las

reservas que requiere el grano de polen para la germinación y crecimiento del tubo polínico), lo cual puede disminuir la capacidad competitiva de los granos que presenten esta malformación (Vázquez-Santana 1996). Sin embargo debido a que no se tomó una muestra aleatoria representativa de los tubos polínicos, no es posible tomar conclusiones categóricas con respecto al crecimiento de los tubos polínicos

Con la información con que contamos en este momento es posible proponer que el sistema reproductivo de *E. havanense* presenta un grado incipiente de especialización de las funciones sexuales. A diferencia de la mayoría de las especies heterostilicas donde se ha encontrado que el morfo *Pin* funciona mejor como hembra (Tabla 8), en *E. havanense* es el morfo *Thrum* el que estaría actuando como hembra, mientras que el morfo *Pin* funcionaría mejor como macho. Un hecho todavía más significativo es el que esta asimetría no parece estar dada por factores ecológicos, sino ser el resultado de un conflicto genético. Estudios paralelos en los que se ha analizado la estructura genética de las poblaciones de *E. havanense* en Chamela son consistentes con esta hipótesis. Por ejemplo, se ha encontrado que la F_{st} (una medida de diferenciación genética entre poblaciones) estudiada a partir de isoenzimas fue de 0.29 (J.L. Ibarra en prep), mientras que la F_{st} derivada de RAPD's, fue de 0.1 (C. Abarca en prep). Ambos valores son un orden de magnitud más altos que los encontrados en otras especies heterostilicas (Ganders *et al.* 1985, con *Amsinckia spectabilis*, 0.047; Loiselle *et al.* 1995 con *Psychotria officinalis* 0.095, Pérez 1990, con *Psychotria faxlucens* 0.026).

Tabla 8. Estudios donde se ha encontrado algún grado de especialización funcional en especies heterostilicas

Especie	Especialización funcional como $\frac{\text{P}}{\text{T}}$	Forma de Vida (Arbol, Arbusto)	Autor
<i>Cordia collococca</i>	Pin	Arbusto	Opler et al. (1975)
<i>Cordia curassavica</i>	Pin	Arbol	Opler et al. (1975)
<i>Cordia inermis</i>	Pin	Arbusto	Opler et al. (1975)
<i>Cordia panamensis</i>	Pin	Arbol	Opler et al. (1975)
<i>Lithospermum carolinense</i>	Thrum	Arbusto perenne	Levin (1972)
<i>Oldenlandia umbellata</i>	Pin	Anual	Bahadur (1963)
<i>Quinchamalium chilense</i>	Pin	Arbusto	Riveros et al. (1987)
<i>Gaertnera vaginata</i>	Pin	Arbol	Pailler y Thompson (1997)
<i>Paltcourea padifolia</i>	Pin	Arbol	Ree (1997)
<i>Primula sieboldii</i>	Pin	Arbusto	Washitani et al (1994)
<i>Mitchella repens</i>	Thrum	Arbusto	(Hicks et al. 1985)

El alto grado de diferenciación genética que presentan las poblaciones de *E. havanense* podría ser el resultado, al menos parcialmente, de la variación poblacional en genes involucrados en el fenómeno de la EMC. Además, los valores de heterocigosis para las poblaciones de la Estación de Chameña fueron más altos que los de las poblaciones que se localizan fuera de la Estación. Dado que las poblaciones de la Estación fueron las únicas en las que se detectó una diferencia significativa en los niveles de esterilidad entre los morfos florales, las diferencias en la heterocigosis podrían deberse a una disminución en la tasa de endogamia biparental: En una población en la que el morfo *Thrum* es parcialmente estéril para la función masculina, el flujo de polen T→P entre plantas emparentadas es menor que

en poblaciones donde la esterilidad no está presente. Se puede argumentar que uno de los resultados de la reducción de este flujo es una disminución de los individuos homócigos producidos por endogamia biparental y, en consecuencia, un aumento en la heterocigosis

De manera general los resultados sugieren que *E. havanense* presenta cierto grado de especialización de las funciones sexuales, en donde el morfo *Thrum* estaría actuando más como hembra (contrario a lo que se observa en la mayoría de las especies heterostílicas ver Tabla 8) y el *Pm* como macho. Sin embargo es necesario conocer lo que pasa con la producción de frutos, es decir, si realmente las diferencias que encontramos en la germinación de los granos de polen entre morfos, en las poblaciones de la Estación, se ven reflejadas en una asimetría en la producción de frutos. De existir tal asimetría, no resulta fácil proponer cuál podría ser el destino evolutivo de *E. havanense*. Dada la gran cantidad de factores involucrados en la evolución del sistema reproductivo, incluyendo a los depredadores de semillas, los cuales en ciertas circunstancias pueden ejercer una presión de selección proporcional a la capacidad reproductiva de cada morfo, lo que podría disminuir la asimetría en la producción de semillas (Dominguez 1990) entre muchos otros factores involucrados.

VI BIBLIOGRAFIA

- Abarca, C. Estructura genética de *Erythroxylum havanense* basada en RAPD's
Tesis de Licenciatura En prep
- Avila, S. G. 1991. Efectos maternos y paternos sobre la producción de semillas y el desempeño de la progenie del arbusto heterostilico *Erythroxylum havanense*.
Tesis profesional, UNAM, México. 73p.
- Bahadur, B. 1963. Heterostylism in *Oldenlandia umbellata* L. *Journal of Genetics* 58 :429-439.
- Baker, H. 1966. The evolution, functioning and breakdown of heteromorphic incompatibility systems. I. The *Plumbaginaceae*. *Evolution* 18 :507-512.
- Barrett, S.C. 1992. Heterostylous Genetic Polimorphisms : Model systems for evolutionary analysis. pp.1-24. En Barrett. S. (Ed). *Evolution and function of heterostyly*. Springer- Verlag, N.Y.
- Barrett, S. y Shore, J. S. 1987. Variation and evolution of breeding systems in the *Turnera ulmifolia* complex. *Evolution* 41 :340-354.
- Barrett, S., Morgan, M., Husband, B. 1989. The dissolution of a complex genetic polymorphism : the evolution of self fertilization in tristilous *Eichornia paniculata*. *Evolution* 43 :1389-1416.
- Barrett, S.C. y Eckert, J. 1990. Variation and evolution of mating systems in seed plants. pp.229-254. En Kawano (Ed). *Biological approaches and evolutionary trends in plants* Academic Press, N.Y.
- Bawa, K. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11 :15-39.

- Bawa, K. 1995. Pollination, seed dispersal and diversification of angiosperms. Trends in Ecology and Evolution 10: 311-312.
- Beach, J. y Bawa, K. 1980. Role of pollinators in the evolution of dioecy from distyly. Evolution 34 :1138-1143.
- Brewbaker, J.L. y Majumder, S.K. 1961. Cultural studies on the pollen population effect and the self-incompatibility inhibition. American Journal of Botany 48 :457-464.
- Bullock, S.H. y Solís-Magallanes, J. A. 1990. Phenology of canopy trees of a tropical deciduous forest in México. Biotrópica 22 :22-35.
- Byers, D. 1995. Pollen quantity and quality as explanations for seed set in small populations exemplified by *Eupatorium* (Asteraceae). American Journal of Botany 82 :1000-1006.
- Casper, B. 1992 The application of sex allocation theory to heterostylous plants. pp.209-223. En Barrett, S. (Ed) The evolution and function of heterostyly. Springer -Verlag, N.Y.
- Darwin, C. 1877. The different forms of flowers on plants on the same species. John Murray, London,
- Domínguez, C.A.1990. Consecuencias ecológicas y evolutivas del patrón de floración sincrónico y masivo de *Erythroxylum havanense* Jacq. (Erythroxylaceae). Tesis doctoral U.N.A.M, México 167p.
- Domínguez, C.A. 1995. Genetic conflicts of interest in plants Trends in Ecology and Evolution 10:412-416.

- Dominguez, C.A. y Dirzo, R. 1995. Rainfall and flowering synchrony in a tropical shrub: variable selection on the flowering time of *Erythroxylum havanense*. *Evolutionary Ecology* 9:204-216.
- Dominguez, C.A., Avila-Sakar, G., Vázquez-Santana, S. y Márquez-Guzman, J. 1997. Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany* 84: 626-632.
- Dowrick, V. P.J. 1956. Heterostyly and homostyly in *Primula obconica*. *Heredity* 10: 219-236.
- Fleming, T., Maurice, S., Buchmann, S. y Tuttle, M. 1994. Reproductive biology and relative male and female fitness in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 81 : 858-867
- Frank, S. A. 1989. The evolutionary dynamics of cytoplasmic male sterility. *American Naturalist* 133 :345-376.
- Fritsch, P. y Rieseberg, L. 1992. High outcrossing rates maintain male and hermaphrodite individuals in populations of the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature* 359:633-636.
- Ganders, F. R., y Denny, S.K. 1985. Breeding system and genetic variation in *Amsinckia spectabilis* (Boraginaceae) *Canadian Journal of Botany* 66 :533-538.
- Ganders, F. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17 :607-635.

- Domínguez, C.A. y Dirzo, R. 1995. Rainfall and flowering synchrony in a tropical shrub: variable selection on the flowering time of *Erythroxylum havanense*. *Evolutionary Ecology* 9:204-216.
- Domínguez, C.A., Avila-Sakar, G., Vázquez-Santana, S. y Márquez-Guzman, J. 1997. Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany* 84: 626-632.
- Dowrick, V. P.J. 1956. Heterostyly and homostyly in *Primula obconica*. *Heredity* 10: 219-236.
- Fleming, T., Maurice, S., Buchmann, S. y Tuttle, M. 1994. Reproductive biology and relative male and female fitness in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *American Journal of Botany* 81 : 858-867
- Frank, S. A. 1989. The evolutionary dynamics of cytoplasmic male sterility. *American Naturalist* 133 :345-376.
- Fritsch, P. y Rieseberg, L. 1992. High outcrossing rates maintain male and hermaphrodite individuals in populations of the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature* 359:633-636.
- Ganders, F. R., y Denny, S.K. 1985. Breeding system and genetic variation in *Amsinckia spectabilis* (Boraginaceae). *Canadian Journal of Botany* 66 .533-538.
- Ganders, F. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17 :607-635.

- Gryj, E O. 1990. Dispersión de frutos del arbusto *Erythroxylum havanense* Jacq. En Chamela, Jalisco. Tesis profesional, UNAM, México. 78p.
- Gryj, E. y Dominguez, A. 1996. Fruit removal and postdispersal survivorship in the tropical dry forest shrub *Erythroxylum havanense*: ecological and evolutionary implications. *Oecologia* 108: 368-374.
- Hanson, M 1991. Plant mitochondrial mutations and male sterility. *Annual Review of Genetics* 25: 461-486.
- Hicks, D. J. Wyatt, R., Meagher T. R. 1985. Reproductive biology of distylous partridgeberry, *Mitchella repens*. *American Journal of Botany* 72 :1503-1514.
- Hurst, L., Atlan, A y Bengtsson, B. 1996. Genetic conflicts. *Quarterly Review of Biology* 7: 317-364.
- Ibarra, J L. Genética de poblaciones de *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). Una planta hterostilica con esterilidad masculina asociada al morfo "Thrum". Tesis de Licenciatura. En Prep
- Kearns, C. A. y Inouye, D. W. 1993 *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado, 583 p.
- Lalonde, S., Beebe, U y Saini, H 1997. Early signs of disruption of wheat anther development associated with the induction of male sterility by meiotic-stage water deficit. *Sexual Plant Reproduction* 10 :40-48.
- Levin, D. A. 1972. Plant density, cleistogamy, and self-fertilization in natural populations of *Lithospermum caroliniense*. *American Journal of Botany* 59 :71-77.

- Lloyd, D. 1979. Evolution toward dioecy in heterostylous populations. *Plant Systematic Evolution* 131: 71-80
- Loiselle, B., Sork, V., Nason, J; y Graham, C. 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub *Psychotria officinalis*. *American Journal of Botany* 82:1420-1425.
- Maurice, S. 1992. Maintenance of nuclear-cytoplasmic polymorphism under dioecious reproductive systems. *Journal of Theoretical Biology* 154: 239-247.
- Maurice, S., Belhassen, E., Couvet, D., y Gouyon, P. 1994. Evolution of dioecy: can nuclear-cytoplasmic interactions select for maleness? *Heredity* 73: 346-354.
- McKenna, M. A. 1992. Pollen competition in heterostylous plants. pp.225-246. En Barrett (Ed). *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag, N.Y.
- Meachan, C A. y Duncan, T.D. 1989. Morpho Sys ver. 1.26. University herbarium, University of California , Berkeley, U.S.A.
- Opler, P., Baker, H. y Frankie, G. 1975. Reproductive biology of some Costa Rican *Cordia* species (Boraginaceae) *Biotropica* 7: 234-247.
- Ornduff, R. 1966. The origin of dioecism from heterostyly in *Nymphoides*. *Evolution* 20: 309-314.
- Pailler, T y Thompson, J. 1997. Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in *Gaertnera vaginata* (Rubiaceae) endemic to La Reunion Island. *American Journal of Botany* 84 :315-327.
- Perez, N. 1990. Biología reproductiva y estructura genética de *Psychotria faxlucens* (Rubiaceae) en los Tuxtlas Veracruz Tesis de Maestría, UNAM, México.

- Poot, P. 1997. Reproductive allocation and resource compensation in male-sterile and hermaphroditic plants of *Plantago lanceolata*. American Journal of Botany 84:1256-1265.
- Quesada, M., Winsor, J. y Stephenson, A. 1993. Effects of pollen competition on progeny performance in a heterozygous cucurbit. The American Naturalist 142 :694-706.
- Ree, R. 1997. Pollen flow, fecundity, and the adaptive significance of Heterostyly in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). Biotropica 29 :298-308.
- Richards, J. y Barrett, S.C. 1992. The development of heterostyly. pp 85-124. En Barrett.S.C. (Ed). Evolution and function of heterostyly. Springer-Verlag, N.Y.
- Ricklefs, R. y Renner, S. 1994. Species richness within families of flowering plants. Evolution 48: 1619-1636.
- Riveros, M. Arroyo, M. T., Humana, A. M. 1987. An unusual kind of distyly in *Quinchulium chilense* (Santalaceae) on Volcan Casablanca, Southern Chile. American Journal of Botany 74 :313-320.
- Ross, M. 1990. Sexual asymetry in hermaphroditic plants. Trends in Ecology and Evolution 5: 43-47.
- SAS. 1987. SAS/STAT guide for personal computers Version 6 edition. SAS Institute, Cary, NA
- Saumitou-Laprade, P; Cuguen, J y Vernet, P 1994. Cytoplasmic male sterility in plants: molecular evidence and the nucleocytoplasmic conflic. Trends in Ecology and Evolution 9:431-435.

- Sheoran, I y Saini, H. 1996. Drought-induced male sterility in rice: changes in carbohydrate levels and enzyme activities associated with the inhibition of starch accumulation in pollen. *Sex Plant Reproduction* 9 :161-169.
- Shykoff, J. 1988. Maintenance of gynodioecy in *Silene acaulis*: stage specific fecundity and viability selection. *American Journal of Botany* 75: 844-850.
- Stebbins, G.L. 1981. Why are there so many species of flowering plants? *Bioscience* 31 :573-577.
- Stelly, D. y Palmer, R. 1980. A partially male sterile mutant line of soybeans, *Glycine max* *Euphytica* 29 : 295-303.
- Thompson, J. y Maniacci, D. 1998. Thirty-five years of Thyme: A tale of two polymorphisms. *Bioscience* 48: 805-815.
- Van Dame, J. M.M. 1983. Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. II Inheritance of three male sterility types. *Heredity* 50 :253-273.
- Vázquez-Santana, S 1996. Asimetría reproductiva entre los morfos florales de *Erythroxylum havanense* Jacq.(*Erythroxylaceae*). Tesis Doctoral. U.N.A.M., México.65p.
- Vázquez-Santana, S., Domínguez, C.A. y Márquez, J. 1996. Embriología de *Erythroxylum havanense* (*Erythroxylaceae*), una especie heterostilica. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 59 :25-33.
- Vekemans, X., Lefevre, C., Belalia, A y Meerts, P. 1990. The evolution and breakdown of the heteromorphic incompatibility system of *Armoria maritima*. *Evolutionary Trends in Plants* 4:15-23.

- Vranceanu, A. y Stoenescu, F. 1978. Genes for pollen fertility restoration in sunflowers. *Euphytica* 27 :617-627.
- Vuilleumier, B. 1967. The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. *Evolution* 21: 210-226.
- Waser, N.M 1983. The adaptive nature of floral traits: Ideas and evidence, pp. 241-285. En Real, L. (Ed). *Pollination biology*. Academic Press, London.
- Washitani, I., Osawa, R, Nam, H y Uniwa, M 1994. Patterns of female fertility in heterostylous *Primula sieboldii* under severe pollinator limitation. *Journal of Ecology* 82 : 571-579.
- Wyatt, R. 1983. Pollinator-plant interactions and the evolution of breeding systems. En Real (Ed). *Pollination Biology*. Academic Press, N.Y.