

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

ESTERILIDAD MASCULINA EN *Kallstroemia grandiflora*  
Y SUS CONSECUENCIAS EN COMPONENTES REPRODUCTIVOS  
Y EN LA ESTRUCTURA GENÉTICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

EDUARDO CUEVAS GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS: DR. FRANCISCO MOLINA FREANER  
MÉXICO, D. F.



DICIEMBRE 2005

COORDINACIÓN

0349946



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo ~~receptonal~~.

NOMBRE: Eduardo Cuevas García

FECHA: 15/XI/05

FIRMA: Eduardo Cuevas G.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
 Director General de Administración Escolar, UNAM  
 Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de mayo del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno **CUEVAS GARCÍA EDUARDO** con número de cuenta 86213758 , con la tesis titulada: "**Esterilidad masculina en Kallstroemia grandiflora y sus consecuencias en componentes reproductivos y en la estructura genética**", bajo la dirección del Dr. Francisco E. Molina Freaner.

Presidente:	Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán
Vocal:	Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa
Vocal:	Dr. Mauricio Quesada Avendaño
Vocal:	Dr. Jorge Alejandro López-Portillo Guzmán
Secretario:	Dr. Francisco Molina Freaner
Suplente:	Dr. Juan Fornoni Agnelli
Suplente:	Dr. César A. Domínguez Pérez Tejeda

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
 Ciudad Universitaria D.F., a 9 de noviembre del 2005

  
 Dr. Juan Núñez Falfán  
 Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado



**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
COORDINACION**

Ciudad Universitaria, D.F. a 1 de junio del 2005.

**CUEVAS GARCÍA EDUARDO**

No. de cuenta: **86213758**

No. de exp: **3971168**

Presente.

Por medio de la presente me permito informar a usted que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su reunión ordinaria del 30 de mayo del 2005, aprobó el Jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **Doctor en Ciencias** del Posgrado en Ciencias Biológicas, con el título de tesis "**Esterilidad masculina en Kallstroemia grandiflora y sus consecuencias en componentes reproductivos y en la estructura genética**" integrado de la siguiente manera:

Presidente: **Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán**  
Vocal: **Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa**  
Vocal: **Dr. Mauricio Quesada Avendaño**  
Vocal: **Dr. Jorge Alejandro López-Portillo Guzmán**  
Secretario: **Dr. Francisco Molina Freaner**  
Suplente: **Dr. Juan Fornoni Agnelli**  
Suplente: **Dr. César A. Domínguez Pérez Tejada**

Sin más por el momento, me despido.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Dr. Juan José Morrone Lupi  
Coordinador del Programa

C. c. p. Miembros del Jurado.  
C. c. p. Expediente del Alumno.

## Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Francisco Molina quien ha sido para mí además de un excelente maestro un amigo de excepcional calidad humana. A la Dra. Judith Márquez quiero agradecerle el haberme introducido al interesante mundo de la Embriología y el haberme brindado todas las facilidades durante el tiempo que trabajé en su laboratorio. Al Dr. César Domínguez por estar siempre dispuesto a escucharme y haberme ayudado durante toda la realización de esta tesis. Al Dr. Juan Fornoni le agradezco sus valiosos comentarios y el interés que mostró para revisar esta tesis. Al Dr. Mauricio Quesada le estoy muy agradecido por sus sugerencias que me hicieron reflexionar sobre varios puntos de este trabajo. Al Dr. Jorge A. López-Portillo su gran disponibilidad para formar parte del jurado y su buena disposición en todo momento.

A mi amigo Raúl Alcalá quien sin ser sinodal, leyó prácticamente toda mi tesis, le hizo valiosas aportaciones y me ayudó con la estadística. A Néstor Mariano, por las varias consultas y discusiones siempre enriquecedoras. A La Dra. Dulce Ma. Arias por haberme facilitado el uso del laboratorio y dado todas las facilidades durante mi permanencia en el CEAMISH. A mis amigos de Hermosillo, José Martínez (el Jechu) quien me ayudó con la mejor disposición durante varios años, a Oscar Romero por haberme dado asilo en tierras sonorenses. A Maria Jesús por todo el apoyo técnico durante mis estancias en Hermosillo.

A Ricardo Wong por haberme enseñado las técnicas básicas de la embriología. A Sonia Vásquez le agradezco el haberme orientado con su gran experiencia en la Embriología. A Silvia Espinosa le estoy muy agradecido por las fotos de gran calidad que tomo de mis muestras. A la Dra. Margarita Collazo su buena disposición y amabilidad en todo momento. En general a todo el laboratorio de Desarrollo en Plantas por hacer un ambiente agradable para trabajar y convivir.

Gumersindo Sanchez me enseñó la técnica de las isoenzimas y otras técnicas, gracias Gume.

A Pauline por su apoyo en todo momento y sobre todo por su amor.

Con todo mi cariño y afecto para mis padres

A Tania y Emilio

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	1
ABSTRACT .....	3
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	5
SISTEMA DE ESTUDIO.....	9
<b>OBJETIVOS</b> .....	10
<b>CAPÍTULO I. DESARROLLO EMBRIOLÓGICO Y BIOLOGÍA REPRODUCTIVA</b>	11
EVIDENCE OF GYNODIOECY IN <i>KALLSTROEMIA GRANDIFLORA</i> (ZYGOPHYLLACEAE): MICROSPOROGENESIS IN HERMAPHRODITE AND FEMALE PLANTS AND LACK OF REPRODUCTIVE COMPENSATION .....	12
<b>CAPÍTULO II. ESTRUCTURA GENÉTICA</b> .....	23
THE GENETIC STRUCTURE OF THE GYNODIOECIOUS <i>KALLSTROEMIA</i> <i>GRANDIFLORA</i> (ZYGOPHYLLACEAE): THE ROLE OF MALE STERILITY AND COLONIZATION HISTORY.....	24
<b>CAPÍTULO III. LAS PROPORCIONES SEXUALES, SU ADECUACIÓN Y LOS POLINIZADORES</b> .....	36
INFLUENCIA DE LAS PROPORCIONES SEXUALES EN VARIOS COMPONENTES DE LA ADECUACIÓN Y LAS TASAS DE VISITA DE LOS POLINIZADORES EN <i>KALLSTROEMIA GRANDIFLORA</i> .....	37
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	49
<b>CONCLUSIONES</b> .....	54
<b>BIBLIOGRAFÍA GENERAL</b> .....	55

## RESUMEN

*Kallstroemia grandiflora* es una especie anual donde recientemente se ha detectado la presencia de plantas hermafroditas y hembras en la misma población, lo que se conoce como ginodioicismo. En México *Kallstroemia grandiflora* se distribuye desde el norte del estado de Sonora hasta el sur de Michoacán. En este estudio, inicialmente se describen aspectos básicos de la biología reproductiva y de la embriología de las anteras y los granos de polen de plantas hermafroditas y hembras de *K. grandiflora*. Además, el sistema reproductivo de *K. grandiflora* nos permitió explorar algunas hipótesis acerca del mantenimiento de las hembras, su distribución en las poblaciones y su influencia en la estructura genética. Por último, se evaluó el papel de los polinizadores en la adecuación de ambos morfos florales en condiciones naturales y en poblaciones experimentales con distinta frecuencia de hermafroditas. Las plantas hermafroditas son autocompatibles, pueden realizar la polinización automática y en un año se detectó limitación por polen en las hembras. El estudio embriológico mostró que en la mayoría de las anteras la aborción del polen ocurre en las primeras etapas de su formación. No detectamos evidencia de compensación en las plantas hembra en términos de frutos o semillas y la frecuencia de esterilidad en las poblaciones varió de 0 a 44%. En relación a los polinizadores, estos visitaron más a las flores hermafroditas y por más tiempo en la población natural. Además, conforme aumenta la frecuencia de hembras en las poblaciones experimentales, disminuyeron las visitas a las flores hermafroditas. La estructura genética muestra una diversidad genética relativamente alta ( $H_e = 0.26$ ) con una moderada deficiencia de heterocigos ( $F_{is} = 0.24$ ) y una alta diferenciación genética ( $F_{st} = 0.23$ ). Los parámetros de diversidad genética ( $H_e$  y  $A$ ) mostraron una asociación negativa con la latitud. Además, detectamos que conforme aumenta la frecuencia de hembras en las poblaciones disminuye la  $F_{is}$  general y la de las hermafroditas. Uno de los principales aportes de este trabajo fue demostrar el efecto de la frecuencia de hembras en la



estructura genética de una especie ginodioica. Sin embargo para entender el mantenimiento de las hembras en las poblaciones, se requiere estimar la tasa de entrecruza y los posibles efectos de la depresión por endogamia.

## ABSTRACT

*Kallstroemia grandiflora* is an annual herb where we have recently discovered the presence of hermaphrodite and female plants in the same population (gynodioecy). In Mexico its distribution ranges from northern Sonora to Michoacan. Initially, some basic aspects of the reproductive biology and the embryology of anthers and pollen grains of female and hermaphrodite plants are described. In addition, the reproductive system of *K. grandiflora* allows us to explore some hypothesis about the maintenance of female plants, and its influence on the genetic structure of populations. Furthermore, the role of pollinators on several fitness components under natural and experimental populations with different frequency of hermaphrodites was investigated. Hermaphrodite plants were self-compatible and capable of performing automatic self-pollination. Pollen limitation was detected during one year in female plants. The embryological study showed that in most anthers of pistillate flowers, abortion of pollen grains occurs during the first developmental stages. Female frequency ranged from 0 to 44% with greater levels of male sterility in northern México. No evidence of compensation in female plants (in terms of fruits or seeds per fruit) was detected. The genetic structure showed a relatively high genetic diversity ( $H_e = 0.26$ ) with slight deficiency of heterozygotes ( $F_{is} = 0.242$ ) and high genetic differentiation ( $F_{st} = 0.23$ ). The genetic diversity parameters ( $H_e$  and  $A$ ) showed a negative association with latitude. In addition, as female frequency increases in populations the overall population  $F_{is}$  and  $F_{is}$  values of hermaphrodites decrease. In a natural population, pollinators preferred to visit hermaphrodite flowers and for longer periods of time, whereas in artificial populations as the frequency of pistillate flowers increase, visitation to hermaphrodite flowers decrease. One of the striking results of this study was the clear effect of female frequency on the genetic structure of a gynodioecious species. Nevertheless, to properly understand the mechanism that maintains

females in populations it is necessary an estimation of the outcrossing rate and the magnitude of the inbreeding depression.

## INTRODUCCION GENERAL

La gran mayoría de las especies de angiospermas son hermafroditas; sin embargo, son los sistemas reproductivos menos frecuentes los que permiten poner a prueba algunas de las hipótesis acerca de la evolución de los sistemas reproductivos. Uno de tales sistemas es el ginodioicismo que es un polimorfismo en donde coexisten y se aparean plantas hermafroditas y hembras. El ginodioicismo ha sido reportado en más de 500 especies que incluyen al menos 71 familias de angiospermas (Dem'yanova 1985, Kaul 1988). Las plantas hembra, o estériles para la función macho, no producen polen y forzosamente deben entrecruzarse con las hermafroditas. En contraste, los hermafroditas de especies autocompatibles pueden autofecundarse o exportar su polen hacia otras plantas. Las plantas hembra se encuentran en una desventaja reproductiva en comparación a las hermafroditas, debido a la pérdida en adecuación por la función masculina. Esta situación ha motivado que una de las preguntas centrales en el estudio de este sistema reproductivo, sea entender cuáles son las fuerzas selectivas que mantienen este polimorfismo. Se ha postulado que las hembras podrían producir una mayor cantidad y/o calidad de semillas, respecto a las hermafroditas (ventaja compensatoria). La idea de la compensación plantea que una planta hembra, al dejar de asignar recursos a la producción de polen, podría reasignar esos recursos a la función femenina y producir un mayor número de semillas o de mejor calidad que una planta hermafrodita. Esta situación se ha encontrado en muchas de las especies ginodioicas (Shykoff et al. 2003). Sin embargo en otras especies, aún con alta frecuencia de hembras, no se ha encontrado evidencia de compensación (Uno 1982, Alonso y Herrera 2001), por lo que en estos casos es probable que uno de los factores involucrados en el mantenimiento de las hembras sea la depresión endogámica de las hermafroditas. Tal es el caso de *Schiedea salicaria* en donde no se detectó compensación en las hembras y sin embargo, se ha propuesto que la depresión endogámica y la tasa de autofecundación fueron suficientemente altas para mantener a las

hembras en las poblaciones (Weller y Sakai, 2005). Existen diversos modelos que han tratado de predecir los valores de compensación necesarios para la permanencia de las hembras en las poblaciones, y las predicciones teóricas sugieren que la magnitud de la compensación depende principalmente del tipo de herencia de la esterilidad masculina. Los primeros modelos que exploraron los efectos de la herencia nuclear de la esterilidad, encontraron que las hembras requieren una fertilidad, en relación con las hermafroditas, del doble para poder permanecer en las poblaciones (Lewis 1941). Además, si la herencia es nuclear se esperaría que el porcentaje de hembras en las poblaciones no fuera mayor al 50%. En cambio, con una herencia citoplasmática de la esterilidad, incluso una pequeña ventaja en la fertilidad por parte de las hembras, permite que éstas no solo permanezcan sino que incluso alcancen un porcentaje muy alto en las poblaciones (Lewis 1941). Posteriormente, al incorporar en los modelos nucleares los efectos de la depresión por endogamia y la autofecundación, se encontró que aún sin una ventaja reproductiva por parte de las hembras, estas pueden permanecer en las poblaciones si existe una alta tasa de autofecundación y de depresión endogámica (Charlesworth y Charlesworth 1978). En la actualidad, la mayoría de los estudios en especies ginodioicas, sugieren que la esterilidad masculina de tipo Núcleo-Citoplasmática (N-C) es la más común (Belhassen et al. 1991; Charlesworth y Laporte 1998, Dudle et al. 2001). Bajo este tipo de herencia, los genes citoplasmáticos (mitocondriales) son los responsables de la esterilidad y los restauradores de la fertilidad masculina se encuentran en el núcleo (Frank 1989). Debido a que en la mayoría de las angiospermas las mitocondrias se transmiten sólo por la vía materna, los genes de esterilidad se heredan únicamente a través de las semillas (Mogensen 1996). Por el contrario, los genes que restauran la fertilidad pueden transmitirse por medio del polen y las semillas (Schnable y Wise 1998). Una vez establecido el polimorfismo núcleo-citoplasmático se ha propuesto que su dinámica dependerá de la migración o surgimiento de alelos esterilizadores y sus respectivos

restauradores (Frank 1989). La aparición de un alelo esterilizador hará que la frecuencia de hembras aumente hasta que se vean limitadas por polen o se encuentre en la población su respectivo restaurador de la fertilidad. Esta situación provocará una disminución en la frecuencia de hembras hasta que aparezca un nuevo alelo esterilizador para el cual no haya restaurador (Frank 1989). Para que esta dinámica pueda mantenerse, es necesario incluir en los modelos los costos de la restauración, que se definen como la disminución en la adecuación de las hermafroditas que llevan un restaurador que puede o no ser el encargado de restaurar la función masculina (Couvét et al. 1986). Otra posibilidad para el mantenimiento de esta dinámica es la propuesta por los modelos metapoblacionales, los cuales no requieren de los costos de la restauración. Una metapoblación está formada por pequeñas poblaciones locales que pueden extinguirse o fundarse por procesos de recolonización o migración (Couvét et al. 1998). Dichos modelos son capaces de mantener la dinámica N-C con una alta frecuencia de hembras, incorporando la extinción local y el flujo génico restringido (Couvét et al. 1998).

Por otro lado, la esterilidad masculina muestra una gran variación en la expresión fenotípica de los estambres maduros en las flores pistiladas, (desde estambres bien desarrollados, reminiscencias de estos o su ausencia), la cual se considera evidencia de las transiciones evolutivas. Esta variación puede estar relacionada con los efectos de los genes de la esterilidad, los cuales se han encontrado que pueden actuar prácticamente durante todas las etapas de la producción de los granos de polen (Schnable y Wise 1998, Laser y Lester 1972). La mayoría de los estudios del desarrollo de los granos de polen se han hecho en especies con esterilidad masculina citoplasmática de importancia económica como el maíz, sorgo, frijol, etc. En estas especies la esterilidad masculina se ha manifestado como resultado de cruces entre especies del mismo o distinto género, por lo que algunos autores han propuesto que la esterilidad puede ser el resultado de la incompatibilidad entre genes del núcleo y el citoplasma (Hanson y Conde 1985,

Frank y Barr 2003). De todos los tejidos que conforman la antera, el tejido del tapete es particularmente importante durante la formación de los granos de polen. No es extraño por tanto, que en la gran mayoría de estudios se haya detectado algún tipo de malformación relacionada con este tejido, e incluso, se ha propuesto una relación entre los problemas funcionales de este tejido y la esterilidad masculina N-C (Frank y Barr 2003). Sin embargo, en especies silvestres existen pocos estudios embriológicos, los cuales podrían compararse con los de especies con esterilidad masculina N-C, y ser usados para tener una aproximación del tipo de herencia de la esterilidad masculina. Además, es relevante determinar si existe relación entre el momento de la aborción del polen y la evidencia o no de compensación. Por lo tanto, esperaríamos que entre más temprano se detenga la producción del polen en las hembras, existan mayores posibilidades de compensación.

Uno de los factores ecológicos más importante por su relación con la compensación es el papel de los polinizadores. En algunas especies ginodioicas se ha observado que las flores pistiladas son menos visitadas que las hermafroditas (Ashman y Stanton 1991, Williams et al. 2000). Esta situación puede deberse a que en la mayoría de las especies ginodioicas el tamaño de las flores pistiladas es menor (Delph 1996) y a la falta de una de las principales recompensas (polen) para los polinizadores. Por lo que si los polinizadores discriminan a las flores pistiladas, aunque exista el potencial de compensación en términos de reasignación de recursos, ésta no ocurrirá bajo estas condiciones.

Por último, el sistema de apareamiento juega un papel determinante en la estructura genética de las plantas, que a su vez depende de las características del sistema reproductivo de las especies. En especies hermafroditas autocompatibles que no presentan ningún mecanismo de separación de las estructuras reproductivas (espacial o temporal) esperaríamos niveles altos de autofecundación que disminuirían los niveles de variación genética. En el otro extremo estarían

las especies de entrecruza obligada (i.e dioicas o hermafroditas autoincompatibles) en las que esperaríamos niveles relativamente altos de variación genética. En las especies ginodioicas, se ha propuesto que debido a los diferentes patrones de apareamiento de las hembras y hermafroditas, la frecuencia de hembras debería tener un papel relevante en la estructura genética (Gouyon y Vernet 1982). En concreto esperaríamos que la deficiencia de heterócigos de las hembras fuera menor que el de las hermafroditas y que conforme aumente la frecuencia de plantas estériles en las poblaciones aumente la diversidad genética de las mismas (Gouyon y Couvet 1987). A pesar de lo sencillas que pueden ser las predicciones anteriores, existen muy pocos estudios empíricos al respecto (Tarayre y Thompson 1997, Medrano et al. 2005), por lo que es relevante contar con más estudios que exploren dichas hipótesis.

### **Sistema de estudio**

*Kallstroemia grandiflora* Torr ex Gray pertenece a la familia Zygophyllaceae y el género *Kallstroemia* está compuesto por 17 especies que se distribuyen desde América del norte hasta sudamérica. *K. grandiflora* es una planta anual que en México se distribuye desde el estado de Sonora, donde es particularmente frecuente y se comporta como una planta anual de verano, hasta el norte del estado de Guerrero a lo largo de toda la costa del Pacífico (Porter 1969). Sus flores son solitarias, pentámeras, con cinco nectarios y 10 estambres (Porter 1969). Además del dimorfismo sexual, presenta varios polimorfismos florales, como una gran variación en el color de los pétalos y al menos dos colores de granos de polen.

*Kallstroemia grandiflora* es una especie que presenta un dimorfismo sexual, (plantas hermafroditas y hembras en la misma población), una amplia distribución en nuestro país y gran variación en la frecuencia de hembras entre sus poblaciones (0 a 44%). Por estas razones se consideró un sujeto ideal para examinar los factores que podrían explicar el mantenimiento de las hembras en las poblaciones, estudiar aspectos del desarrollo embriológico, la estructura genética



y la biología reproductiva. Por lo tanto en el presente estudio nos planteamos los siguientes objetivos:

### **OBJETIVOS:**

- Describir el desarrollo de las anteras y granos de polen en ambos morfos.
- Explorar si existe algún mecanismo de compensación reproductiva en las hembras.
- Explorar la relación entre la frecuencia de hembras y la estructura genética de las poblaciones.
- Estudiar la relación entre la frecuencia relativa de ambos morfos y sus componentes de adecuación y las visitas de los polinizadores.

En el primer capítulo se presentan los resultados del estudio comparativo del desarrollo de las anteras y los granos de polen de ambos morfos. Además, se presenta evidencia sobre la asignación de biomasa a las distintas estructuras florales en ambos morfos y los resultados de algunos componentes reproductivos evaluados en poblaciones naturales como producción de flores, frutos y semillas. Finalmente, en este capítulo se muestran los resultados de cruzas controladas realizadas para conocer, si *K. grandiflora* es una especie autocompatible y si hay evidencia de limitación por polen.

En el segundo capítulo, se presentan datos sobre la variación y la distribución de la esterilidad masculina. Además, se muestran los resultados del estudio de genética de poblaciones realizado con isoenzimas en 15 poblaciones de *K. grandiflora* a lo largo del gradiente latitudinal de su distribución.

Finalmente en el tercer capítulo se muestran resultados sobre la tasa de visita de los polinizadores, y algunos componentes de la adecuación evaluados en poblaciones experimentales bajo distintas frecuencias de hermafroditas.

y la biología reproductiva. Por lo tanto en el presente estudio nos planteamos los siguientes objetivos:

### **OBJETIVOS:**

- Describir el desarrollo de las anteras y granos de polen en ambos morfos.
- Explorar si existe algún mecanismo de compensación reproductiva en las hembras.
- Explorar la relación entre la frecuencia de hembras y la estructura genética de las poblaciones.
- Estudiar la relación entre la frecuencia relativa de ambos morfos y sus componentes de adecuación y las visitas de los polinizadores.

En el primer capítulo se presentan los resultados del estudio comparativo del desarrollo de las anteras y los granos de polen de ambos morfos. Además, se presenta evidencia sobre la asignación de biomasa a las distintas estructuras florales en ambos morfos y los resultados de algunos componentes reproductivos evaluados en poblaciones naturales como producción de flores, frutos y semillas. Finalmente, en este capítulo se muestran los resultados de cruzas controladas realizadas para conocer, si *K. grandiflora* es una especie autocompatible y si hay evidencia de limitación por polen.

En el segundo capítulo, se presentan datos sobre la variación y la distribución de la esterilidad masculina. Además, se muestran los resultados del estudio de genética de poblaciones realizado con isoenzimas en 15 poblaciones de *K. grandiflora* a lo largo del gradiente latitudinal de su distribución.

Finalmente en el tercer capítulo se muestran resultados sobre la tasa de visita de los polinizadores, y algunos componentes de la adecuación evaluados en poblaciones experimentales bajo distintas frecuencias de hermafroditas.

## CAPITULO I

# Desarrollo Embriológico y Biología Reproductiva

Inr. J. Plant Sci. 166(3): 481–491. 2005.  
 © 2005 by The University of Chicago. All rights reserved.  
 1058-5893/2005/16603-0010\$15.00

## EVIDENCE OF GYNODIOECY IN *KALLSTROEMIA GRANDIFLORA* (ZYGOPHYLLACEAE): MICROSPOROGENESIS IN HERMAPHRODITE AND FEMALE PLANTS AND LACK OF REPRODUCTIVE COMPENSATION

Eduardo Cuevas García,<sup>1,\*</sup> Judith Márquez G.,<sup>†</sup> César A. Domínguez,<sup>‡</sup> and Francisco Molina-Freaner<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Instituto de Ecología and Departamento de Ecología de la Biodiversidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 1354, Hermosillo, Sonora 83000, México; <sup>†</sup>Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-356, México, Distrito Federal 04510, México; <sup>‡</sup>Instituto de Ecología and Departamento de Ecología Evolutiva, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, México, Distrito Federal 04510, México

Understanding mechanisms involved in the maintenance of gynodioecy in natural populations requires evidence concerning the phenotypic expression and reproductive consequences of male sterility. We have recently discovered male sterility in populations of *Kallstroemia grandiflora* from northwestern Mexico. Here we describe the development of anther and pollen grains in hermaphrodite and female plants and explore whether females experience any compensatory advantage over hermaphrodites. The major difference in anther development between morphs was the early disintegration of tapetal cells in anthers of pistillate flowers. Abnormalities in developing pollen grains in pistillate flowers were seen in the microspore mother cells, microspore tetrads, and young and mature pollen grains. Biomass allocation to flowers, petals, and stamens were larger in hermaphrodites, while both sexes had the same number of ovules per flower. Hermaphrodite flowers were self-compatible. Pollination experiments revealed evidence of pollinator limitation for female plants but not for hermaphrodites. No evidence of reproductive compensation was detected, as flower and fruit production were similar for both sexes in two populations of *K. grandiflora*. We suggest alternative mechanisms that could maintain male sterility in natural populations of *K. grandiflora*.

**Keywords:** male sterility, pollen development, pollen limitation, self-compatibility, Sonoran Desert.

### Introduction

Male sterility in plants is the result of the suppression of the male function in hermaphrodite flowers. The phenotypic expression may range from indehiscent anthers that contain viable pollen to the absence of male reproductive organs in flowers (Kaul 1988). Male sterility may be an inherited trait that arises spontaneously, or it may be induced by environmental stress (Kaul 1988). Embryological studies of sporogenous male sterility in plants have detected that pollen abortion usually occurs during or after the tetrad stage and is often associated with problems in the tapetum layer (Raghavan 1997). Male sterility has arisen independently in at least 71 angiosperm families, as spontaneous mutants in natural populations or as products of inter- or intraspecific crosses among agricultural plants (Laser and Lersten 1972; Dem'yanova 1985; Kaul 1988). The incidence of male steriles in crosses of agricultural species has led some authors to suggest that it is the result of incompatibility between nuclear and cytoplasmic genes (Hanson and Conde 1985; Frank and Barr 2003). Studies on the inheritance of male sterility in wild and agricultural plants have demonstrated that the transmission of this trait is nucleocytoplasmic, where cytoplasmic genes

induce sterility while nuclear genes act as restorers of the male function (Charlesworth and Laporte 1998; Budar et al. 2003).

Male sterility has played an important role in the evolution of plant breeding systems such as gynodioecy and dioecy (Charlesworth and Charlesworth 1978; Maurice et al. 1993; Schultz 1994). The origin, spread, and maintenance of male sterility in gynodioecious populations have been problems of great interest to plant population biologists. Male sterility may occur with very low frequency (6%; Williams and Fenster 1998), or it may reach high frequency (99%; Manicacci et al. 1998) in gynodioecious populations, depending on the mechanism driving the evolutionary dynamics. Theoretical models have identified a variety of mechanisms that could be involved in the maintenance and evolutionary dynamics of male sterility (Frank 1989; Gouyon et al. 1991; Jacobs and Wade 2003). As models have identified parameters such as the compensatory advantage of females or the restoration cost as critical, empirical studies have focused on the estimation of those variables in natural populations. Female plants usually have a compensatory advantage over hermaphrodites, producing more (smaller) flowers and greater fruit set, especially among species with many ovules per flower (Shykoff et al. 2003). However, although the fecundity advantage may be a sufficient condition for maintenance, it is not a necessary condition, as compensation has not been detected in species with high frequency of male steriles (Alonso and Herrera

<sup>1</sup> Author for correspondence; e-mail [ecuevas@ecologia.unam.mx](mailto:ecuevas@ecologia.unam.mx).

2001). In those plants, other mechanisms might be involved in the maintenance of male sterility. The first steps toward understanding the maintenance of gynodioecy in wild populations usually require empirical evidence on the phenotypic expression and reproductive consequences of male sterility. Thus, the discovery of male sterility in new taxa often raises questions about how it is expressed and whether females achieve a fitness advantage over hermaphrodites.

We have recently discovered male sterility in populations of *Kallstroemia grandiflora* Torr ex Gray (Zygophyllaceae) from northwestern Mexico. As male sterility has not been previously described in this family (Dem'yanova 1985; Kaul 1988), we start by describing the development of anthers and pollen grains in hermaphrodite and pistillate flowers of this species. In addition, we explore whether female plants experience any compensatory advantage over hermaphrodites by comparing several reproductive traits. Thus, here we use a combination of embryological and ecological evidence to explore the developmental basis and the mechanism that could maintain male sterility in *K. grandiflora*.

## Material and Methods

### Studied Species

The Zygophyllaceae is a relatively small family composed of 25 genera and 250 species, distributed mostly in the arid tropics and subtropics (Porter 1969; Sheahan and Chase 1996). The family is currently positioned in the Eurosoid I clade (APG II 2003). *Kallstroemia* is a large genus with 17 taxa distributed in the New World that belong to the tribuloid (Tribuloidae) clade (Porter 1969; Sheahan and Chase 2000). The distribution of *Kallstroemia grandiflora* ranges from the Sonoran and Chihuahuan Deserts of North America to the tropical dry forest of the state of Guerrero in Mexico (Porter 1969). We have detected male sterility in the Sonoran Desert, where *K. grandiflora* is a summer annual that flowers from July to October, depending on water availability (Dimmitt 2000).

The flowers last 1 d and are solitary and pentamerous, with five petals, five sepals, and two whorls of five stamens. The gynoecium has 10 locules and a single ovule per locule. Pollen release and stigma receptivity are simultaneous, and apparently flowers are self-compatible (Porter 1969). Throughout its range, flowers are visited by more than 40 species of insects, mainly bees and wasps (Cazier and Linsley 1974, 1975; Osorio-Berstein et al. 1997). From the behavior of flower visitors, at least 10 species could be considered effective pollinators (Cazier and Linsley 1974, 1975).

### Study Area

The frequency of females has been estimated using line transects and sampling of at least 200 plants per population. Female plants are easily detected by their reduced stamens and white anthers. Although some forms of partial male sterility have been detected (i.e., pistillate and perfect flowers in the same plant), their frequency was low (<1%). The frequency of male sterility among populations ranges from 0% to 44% throughout the Sonoran Desert (F. Molina-Freaner

et al., unpublished data). We selected two populations in Sonora to study the development of pollen grains and explore whether compensatory advantages occur in female plants. One population (La Colorada) is located east of Hermosillo along Highway 16 (28°45.68'N, 110°28.64'W), and the other one (San Juanero) is located west of Hermosillo (28°58.55'N, 111°13.11'W). The frequency of females at La Colorada was 20%, while at San Juanero the frequency was 32% during 2001. Both populations were large, i.e., thousands of plants, and are located within the Plains of Sonora vegetational subdivision of the Sonoran Desert (Shreve 1964).

### Embryology

During August 2001, a random sample of 20 hermaphrodite and 20 female plants were transplanted from each population into a shadehouse located at the Instituto de Ecología in Hermosillo. Plants were grown in 10-cm pots containing soil from each site, were watered every day, and were fertilized with Osmocote (NPK) every 15 d. After an acclimation period in the shadehouse, buds at several stages of development, as well as open flowers, were collected from female and hermaphrodite plants, fixed in FAA (63% ethanol, 5% glacial acetic acid, 5% formaldehyde, and 27% distilled water), and dehydrated in a graded ethanol series. We collected 200 samples from both morphs, and 50 random samples were processed and analyzed per morph (five plants per morph, two samples per stage, five stages). Two-thirds of the samples were embedded in LR-W (London resin white), cut at 1–2  $\mu\text{m}$ , and stained with 1% toluidine blue, while the rest of the samples were embedded in Paraplast, sectioned at 9  $\mu\text{m}$ , and stained with safranin and fast green.

Forty samples were processed for scanning electron microscopy (SEM; model JSM-5310LV, JEOL, Peabody, MA). These samples were dehydrated in absolute ethyl alcohol and critical-point dried, glued with silver paste to SEM stubs, blown with air to remove dust, coated with a layer of gold, and viewed at 15 kV.

### Flower Allocation

We used a sample of 10 hermaphrodite and 10 female plants transplanted to the shadehouse from La Colorada to measure flower allocation. After the plants acclimated to the shadehouse, three recently opened flowers were collected from each plant early in the morning and immediately weighed to determine their fresh mass to the closest milligram. Flowers were then carefully dissected and dried, and the dry mass of petals, sepals, stamens, and pistil were obtained. In addition, we estimated flower diameter and the number of ovules per ovary, using flowers from the same plants. We explored whether females and hermaphrodites differ in flower allocation through a nested ANOVA (gender, plants nested within gender) on log-transformed data, using JMP software, version 3.1 (SAS Institute 1997).

### Pollination Treatments

We explored whether hermaphrodites are self-compatible and whether plants experience pollinator limitation by performing pollination treatments at La Colorada. Four flowers

from each of 10 hermaphrodite and 10 female plants were used for each pollination treatment. Flowers were bagged the day before flowering and subjected to manual outcrossing (MOC), manual self-pollination (MSP; hermaphrodites only), and a control open pollination treatment (CON) once they opened. For outcrossing, the stigmas were rubbed with a fresh anther from a random hermaphrodite in the population. Stigmas of hermaphrodites were rubbed with an anther of the same flower for the self-pollination treatment. Flowers were bagged after the treatment to prevent access to pollinators and predators. Flowers in the control treatment were available to any visitor. Fruit set was scored one week later, mature fruits were collected 15 d after the pollination treatments, and the number of seeds per fruit was counted. We explored whether females and hermaphrodites differ in response to the same pollination treatments (MOC, CON) and whether significant differences were detected between pollination treatments in each gender. Fruit set (arcsine-transformed) and number of seeds (log-transformed) were analyzed through a split-plot ANOVA model using JMP software, version 3.1 (SAS Institute 1997).

#### *Reproductive Compensation*

We explored whether female plants experience any compensatory advantage by measuring lifetime flower and fruit production in both populations during 2001. At the beginning of the flowering season (early August), we tagged a random sample of 20 female and 20 hermaphrodite plants in each population. Each week, we counted the number of open flowers and the number of developing or mature fruits on each plant. We calculated overall flower and fruit production by averaging weekly data for individuals of each gender in each population. We explored whether females and hermaphrodites differ in flower and fruit production (both log-transformed) through a nested ANOVA (population, plants nested within gender), using JMP software, version 3.1 (SAS Institute 1997). At La Colorada we estimated the mean number of seeds and seed mass per fruit, and at the end of the season we harvested a sample of 20 female and 20 hermaphrodite plants in which we estimated fruit production by counting the number of fruit scars from each plant.

## Results

### *Embryology*

The stamens of perfect flowers are larger than stamens of pistillate flowers (fig. 1A, 1B). Early in anther development, the four microsporangia are formed. The anther wall consists of two different layers: epidermis and two or three parietal strata surrounding the sporogenous cells (fig. 1C, 1D). At this stage of anther development, we do not detect any major difference between anthers of perfect and pistillate flowers.

At the microspore mother cells developmental stage, the middle layers are more evident in anthers of perfect flowers (fig. 2A). The other layers of the anther wall look quite similar between sexes (fig. 2A, 2B). However, the microspore mother cells in developing anthers of perfect flowers are round and occupy all the locular space (fig. 2A). In contrast, microspore mother cells in pistillate flowers are half-moon-

shaped and adhere to the tapetal cells, leaving an empty area in the locular space (fig. 2B). Meiosis takes place in anthers of both morphs, and it is possible to observe tetrads of haploid microspores with an incipient exine enclosed in a callose wall (fig. 2C, 2D). However, even though we analyzed the same number of samples of both sexes, microspore tetrads in pistillate flowers were rarely observed. In addition, microspore tetrads of perfect flowers show round microspores (fig. 2C), contrasting with microspores of pistillate flowers that show the half-moon shape observed in a previous stage (fig. 2D).

Once the microspores are released from the tetrads, major differences appear. While the anther wall of hermaphrodite flowers maintains tapetal cells, these cells disappear in pistillate flower anthers of the same stage (fig. 3A, 3B). In addition, the anthers of perfect flowers show round-shaped pollen grains (fig. 3A), whereas ca. 30% of the locules of anthers from pistillate flowers usually possess a few elongated, empty pollen grains, because the nucleus and cytoplasm have degenerated (fig. 3B). At this stage pollen grains of hermaphrodite plants show a regular exine pattern that contrasts with the abnormal exine deposition in pollen grains of female plants (fig. 3A, 3B).

In hermaphrodite flowers during anther dehiscence, the middle wall layers and tapetum disappear. The only layers of the anther wall remaining are the epidermis and the enlarged endothelial cells, and it is also possible to observe the stomium region (fig. 3C). In contrast, in pistillate flowers, the anther undergoes a striking cell death program, and the septum region is still present (fig. 3D). However, in some pistillate flowers, anther breakage takes place at the stomium region within the epidermal layer (fig. 4A). Mature pollen grains from hermaphrodite flowers reach equatorial diameters of  $61.9 \pm 1.72 \mu\text{m}$  (mean  $\pm 1$  SD here and hereafter), with the exine fully developed (fig. 4B), while in pistillate flowers, pollen grains are smaller ( $23.1 \pm 2.45 \mu\text{m}$ ), with an abnormal exine (fig. 4C).

### *Flower Allocation*

The number of ovules per flower was invariant, with 10 ovules per ovary for both female and hermaphrodite plants ( $n = 30$ ). In contrast, the diameter of hermaphrodite flowers ( $4.4 \pm 0.54$  cm) was significantly larger ( $t = 13.42$ ,  $df = 78$ ,  $P < 0.0001$ ) than that of pistillate flowers ( $2.8 \pm 0.51$  cm) ( $n = 80$ ). In addition, the fresh ( $F = 84.9$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.0001$ ) and dry ( $F = 53.8$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.0001$ ) masses of flowers and the dry mass allocation to petals ( $F = 75.0$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.0001$ ), stamens ( $F = 44.6$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.0001$ ), and sepals ( $F = 11.6$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ) were greater in hermaphrodite flowers (fig. 5). In contrast, no significant differences were detected for pistil dry mass between sexes ( $F = 1.0$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.32$ ).

### *Pollination Treatments*

Hermaphrodite plants were self-compatible (fig. 6). No significant differences were detected in fruit set between female and hermaphrodite plants ( $F = 1.08$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.30$ ). However, significant differences were detected between pollination treatments (gender;  $F = 8.06$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.0014$ ).

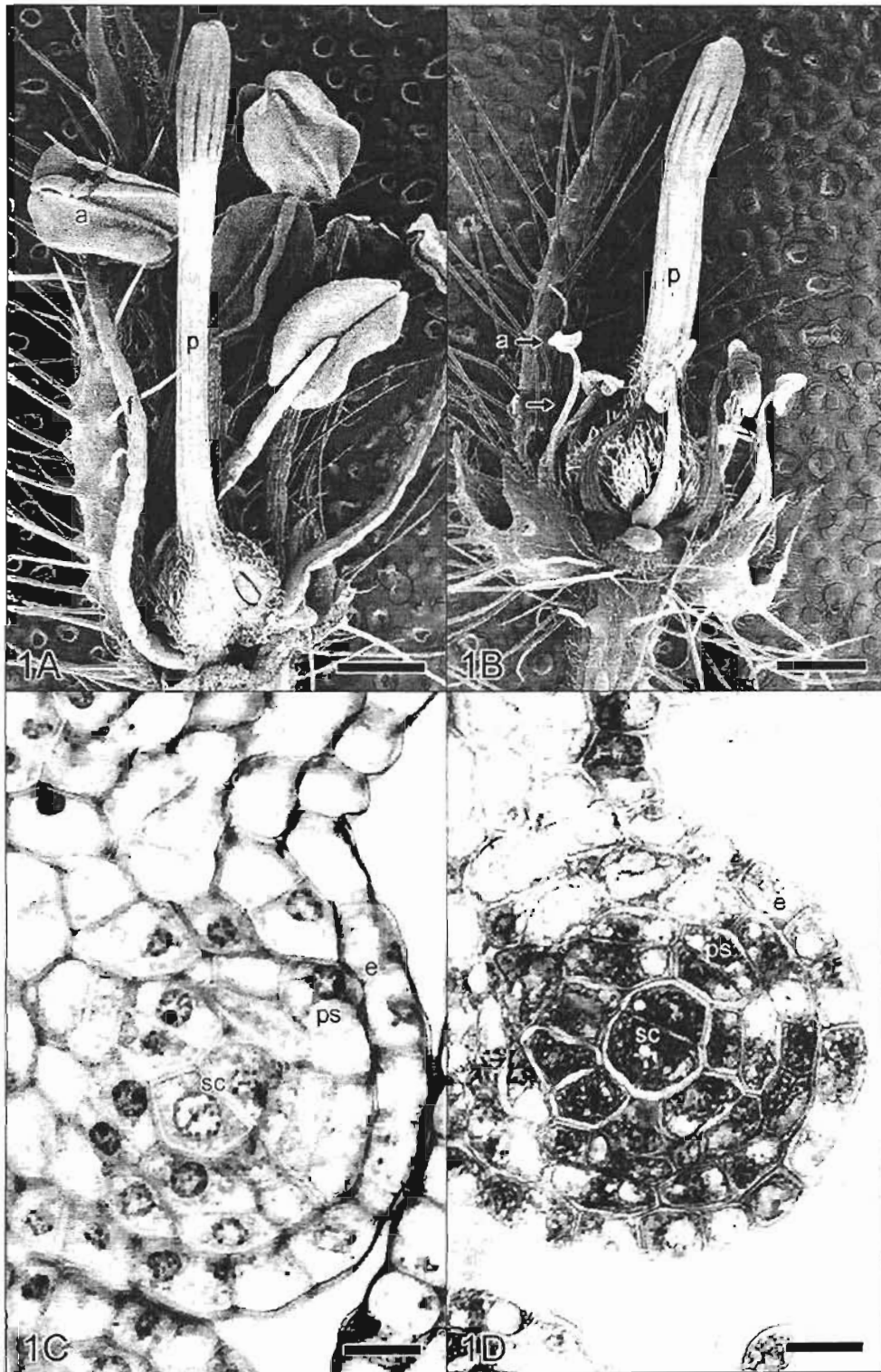


Fig. 1 Flowers of hermaphrodite and female plants and microsporangia of perfect and pistillate flowers. A, Hermaphrodite flower showing the normal stamens at dehiscence; bar = 1000  $\mu\text{m}$ . B, Pistillate flower showing the reduced stamens; bar = 1000  $\mu\text{m}$ . C, Cross section of a young hermaphrodite microsporangium (light field); bar = 10  $\mu\text{m}$ . D, Cross section of a young pistillate microsporangium (phase contrast); bar = 10  $\mu\text{m}$ . a = anther; f = filament; p = pistil; e = epidermis; ps = parietal stratus; sc = sporogenous cells.

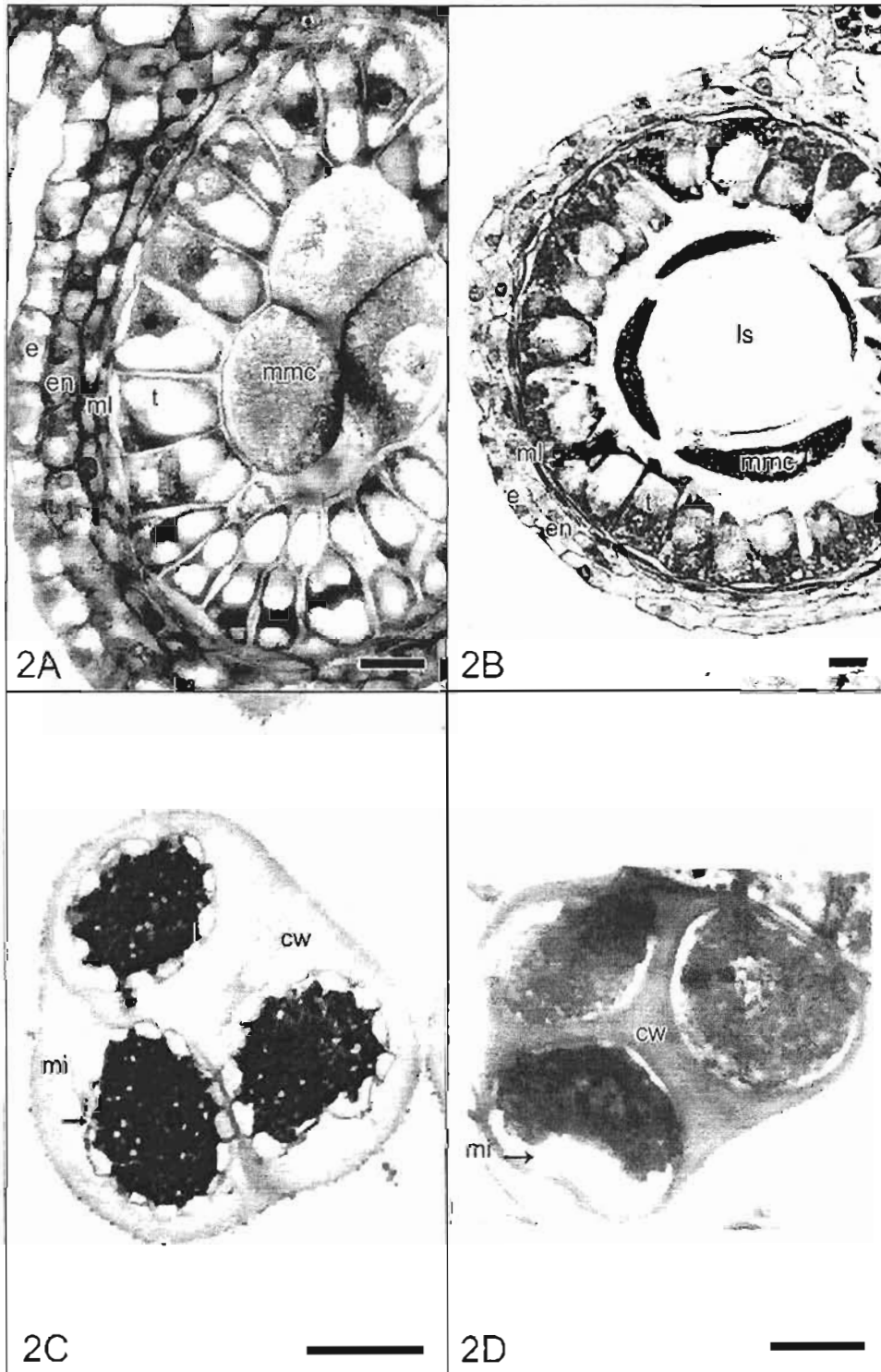


Fig. 2 Microsporangia and tetrads of hermaphrodite and pistillate flowers. A, Cross section of a hermaphrodite microsporangium, showing normal microspore mother cells; bar = 10  $\mu$ m. B, Cross section of a pistillate microsporangium, showing degenerating microspore mother cells and the locular space; bar = 10  $\mu$ m. C, Tetrad with callose wall and normal microspores from hermaphrodite anther; bar = 10  $\mu$ m. D, Tetrad with the half-moon-shaped microspores and the callose wall from a pistillate anther; bar = 10  $\mu$ m. *e* = epidermis; *en* = endothecium; *ml* = middle layer; *t* = tapetum; *mmc* = microspore mother cell; *ls* = locular space; *mi* = microspore; *cw* = callose wall.



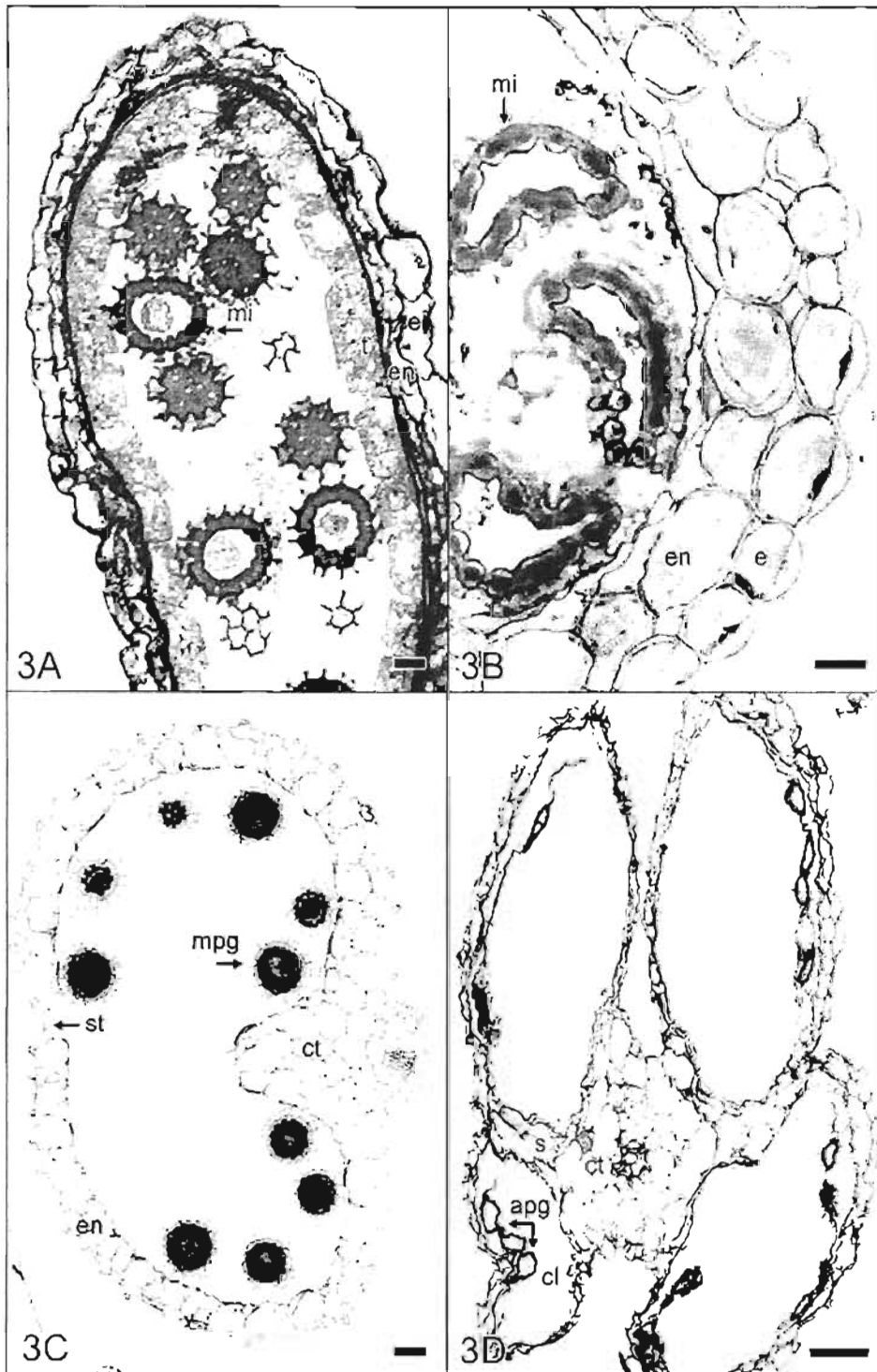


Fig. 3 Anther sections. A, Longitudinal section of hermaphrodite anther at the young microspore stage, showing the tapetal cells and the microspores with a thick wall cell; bar = 10  $\mu$ m. B, Cross section of a pistillate anther at the young microspore stage, lacking rapetum but having empty microspores with abnormal exine deposition; bar = 10  $\mu$ m. C, Hermaphrodite anther at dehiscence, showing the stomium and mature pollen grains; bar = 10  $\mu$ m. D, Pistillate mature anther, showing a collapsed locule and degenerated anther wall with some abnormal pollen grains; bar = 10  $\mu$ m. *mi* = microspore; *e* = epidermis; *en* = endothecium; *t* = rapetum; *st* = stomium; *mpg* = mature pollen grain; *apg* = abnormal pollen grain; *s* = septum; *cl* = collapsed locule; *ct* = connective tissue.

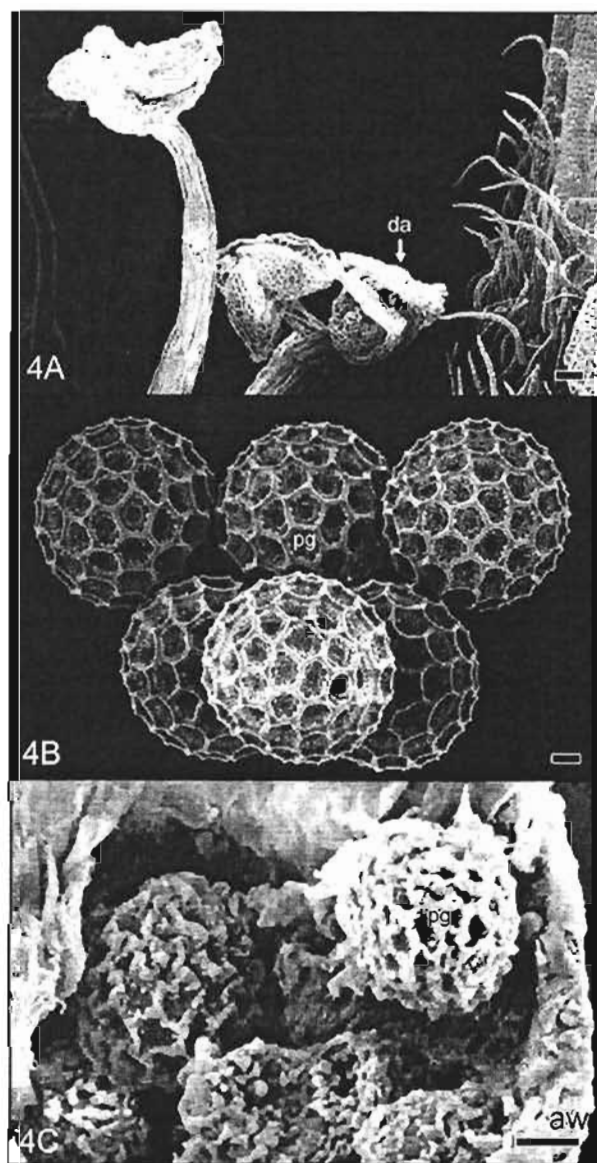


Fig. 4 Anthers and pollen grains from hermaphrodite and pistillate flowers. A, Mature pistillate flower anther at dehiscence; bar = 100  $\mu\text{m}$ . B, Mature pollen grains from a hermaphrodite flower anther with normal exine pattern; bar = 10  $\mu\text{m}$ . C, Abnormal pollen grains from mature pistillate flower anther; bar = 10  $\mu\text{m}$ . da = dehiscent anther; pg = pollen grains; aw = anther wall.

Contrast tests showed significant differences only in females ( $t = 4.01$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.0003$ ), indicating pollinator limitation. No significant differences were detected in number of seeds for pollination treatments between sexes ( $F = 0.25$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.61$ ) or among pollination treatments (gender;  $F = 0.38$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.68$ ).

#### Reproductive Compensation

We did not detect significant differences in lifetime flower ( $F = 1.49$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.23$ ) and fruit production ( $F = 1.65$ ,

$df = 2$ ,  $P = 0.19$ ) between sexes during 2001. We did, however, detect significant differences in fruit production between populations ( $F = 48.6$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.001$ ; fig. 7). At La Colorado, no significant differences were detected in number of seeds per fruit (for hermaphrodites,  $9.7 \pm 0.9$ , females,  $9.4 \pm 0.8$ ;  $t = -1.16$ ,  $df = 48$ ,  $P > 0.25$ ), seed mass (for hermaphrodites,  $0.057 \pm 0.008$  g, for females,  $0.053 \pm 0.007$  g;  $t = -1.49$ ,  $df = 48$ ,  $P > 0.142$ ), or total number of fruits per plant, estimated as the number of fruit scars (for hermaphrodites,  $80.9 \pm 10.9$ ; for females,  $76.5 \pm 10.8$ ;  $t = -0.11$ ,  $df = 32$ ,  $P > 0.90$ ).

#### Discussion

As far as we know, this is the first report of male sterility in the Zygophyllaceae. Most members of this family have hermaphroditic flowers, and only *Neoluederitzia* has unisexual flowers (Porter 1969; Sheahan and Chase 1996). The embryological study of *Kallstroemia grandiflora* showed abnormalities in the anthers of pistillate flowers in the microspore mother cells, tetrad formation, and the young and mature pollen grain stages. In particular, the early degeneration found in the rapetal cells of pistillate flowers in *Kallstroemia* has some resemblance to the pattern of cytoplasmic male sterility of some other species. Our data revealed no evidence of reproductive compensation in female plants. The apparent lack of compensation and the retention of reduced stamens with low quantities of nonfunctional pollen in anthers of pistillate flowers could be interpreted as evidence of a relatively recent evolutionary origin of gynodioecy in *Kallstroemia*.

The embryological study showed at least four different developmental stages in which abnormalities were detected in anthers of pistillate flowers. The first abnormalities were found early in development, at the premeiotic stage in the microspore mother cells, indicating that the effects of male sterility are expressed early in the development of pollen

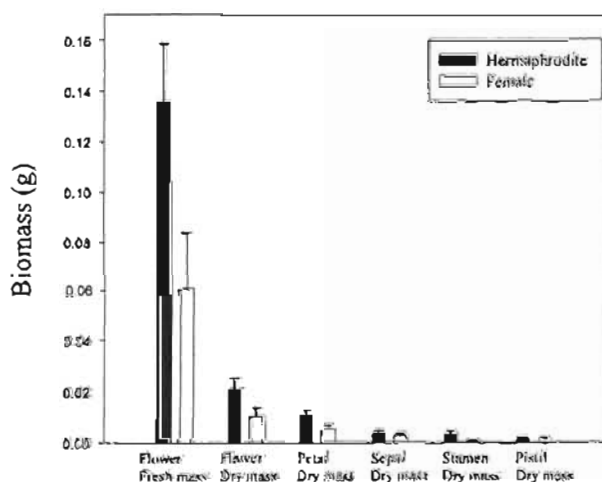


Fig. 5 Biomass allocation in hermaphrodite and pistillate flowers of *Kallstroemia grandiflora*. Values are means  $\pm$  1 SD of flower, petal, sepal, stamen, and pistil biomass.

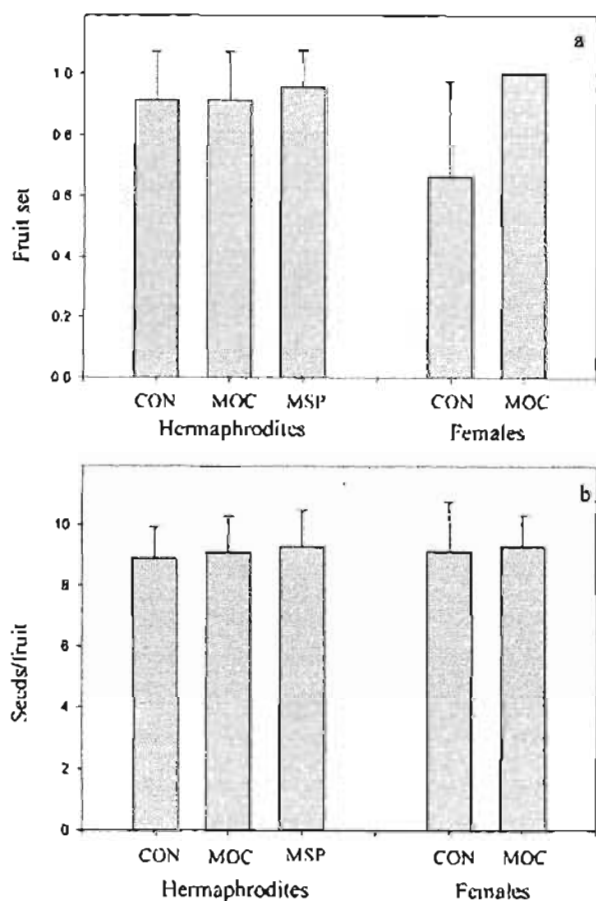


Fig. 6 Fruit set (a) and seeds per fruit (b) for pollination treatments in hermaphrodites and females of *Kallstroemia grandiflora*. Values are means  $\pm$  1 SD. CON = control; MOC = manual outcrossing; MSP = manual self-pollination.

grains. Furthermore, the low frequency of tetrads in pistillate flowers shows that the degeneration of microspore mother cells has taken place in stages previous to meiosis. At meiosis, abnormal tetrads were seen. Finally, early disintegration of tapetal cells and abnormal pollen grains were seen at the young pollen grain stage.

The abortion of microspores in different developmental stages within the same species had been reported in other species (Lee et al. 1979; Domínguez et al. 1997; Smith et al. 2002), but the abortion of premeiotic microspore mother cells found in *Kallstroemia* is not a common phenomenon in species with male sterility (Raghavan 1997). Most studies report abortion during meiosis (Laser and Lersten 1972; Horner and Rogers 1974; Horner 1977; Grant and Beversdorf 1986; Conley et al. 1994; Raghavan 1997) or later in development (Laser and Lersten 1972; Horner 1977; Lee et al. 1979; Halldén et al. 1991; Smith et al. 2002). The early degeneration of tapetal cells observed in anthers of female plants of *K. grandiflora* has been observed in other species with cytoplasmic male sterility (Laser and Lersten 1972; Horner 1977; Smith et al. 2002). Because tapetal activity

must synchronize with the development of the microspores for efficient transfer of nutrients, early disintegration deprives the microspores of certain unique substances at a time when they are most needed (Raghavan 1997). In fact, given the importance of the tapetum, a relationship has been proposed between the functional problems of this tissue, such as degeneration, permanence, or proliferation, and cytoplasmic male sterility (Frank and Barr 2003).

The developmental similarities of male sterility in *Kallstroemia* to that in other species with cytoplasmic male sterility might indicate a similar genetic basis. Nuclear male sterility is unlikely unless a combination of reproductive compensation and inbreeding depression balances the loss of male function in females (Charlesworth and Charlesworth 1978). In contrast, cytoplasmic male sterility is more likely, considering the embryological data and the theoretical constraints on relative fecundity of the two sexes. However, a formal genetic analysis involving intra- and interpopulational reciprocal crosses is needed in order to infer the inheritance of male sterility in *Kallstroemia*.

Several hypotheses might account for the substantial variability in the stage at which pollen degeneration occurs in *Kallstroemia*. One mechanism could be the expression of partial male sterility genes (Van Damme and Van Delden 1982) or different sterility genes with complex interactions (Charlesworth and Laporte 1998). Another mechanism could involve incompatibility between cytoplasmic sterility genes and nuclear restorers in hybrid zones (Barr 2004). This mechanism could affect the normal process of programmed cell death, causing tapetal abnormalities, other developmental aberrations, and finally male sterility (Frank and Barr 2003). Under this scenario, it is possible that all the observed abnormalities during development of pollen grains of *Kallstroemia* could be related to the functional problems of the tapetum.

Female plants in *Kallstroemia* allocate fewer resources to flowers and floral organs, which is a prerequisite for fecundity compensation. Hermaphrodite flowers were larger than pistillate flowers, as has been reported for the great majority of gynodioecious species (Delph 1996; Shykoff et al. 2003). In *Kallstroemia*, hermaphrodite flowers were 1.6 times larger than pistillate flowers, which is slightly larger than the reported average of 1.3 (Delph 1996). Nevertheless, we did not find any evidence of reproductive compensation (fig. 7), although clear differences were detected in resource allocation between sexes. Embryological evidence indicates that some pistillate flowers invest some resources in the partial production of pollen. Reproductive compensation requires the reallocation of resources not used in pollen in order to produce more and/or better seeds in female plants. Thus, it is possible that reallocation in females might be prevented by partial pollen production and could be at least partially responsible for the lack of reproductive compensation found in *Kallstroemia*.

Given the invariant number of ovules per flower in *Kallstroemia*, compensation effects could be expected in seed mass or total seed production (Shykoff et al. 2003). However, our data showed similar values of seed mass and seed production between sexes. It is possible that the progeny of females may outperform the outcrossed progeny of

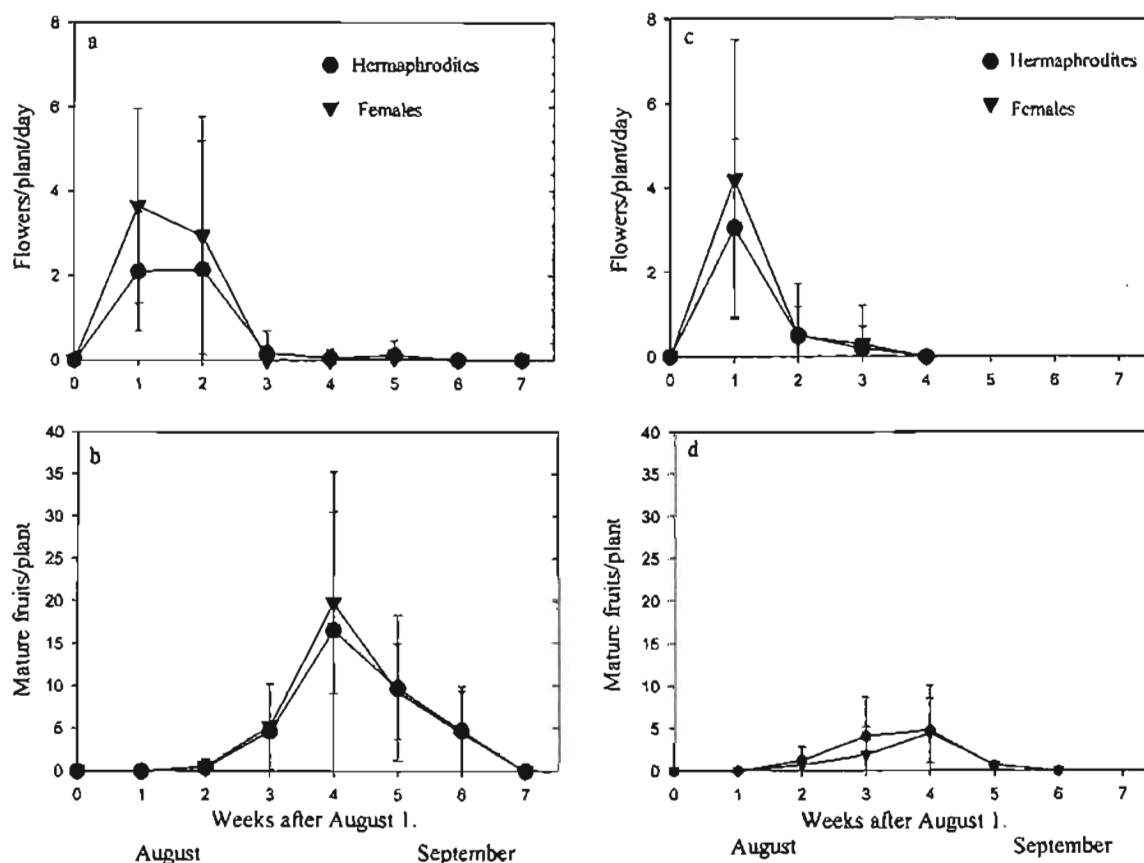
CUEVAS GARCÍA ET AL.—GYNODIOECY IN *KALLSTROEMIA GRANDIFLORA*

Fig. 7 Flower and fruit production in hermaphrodites and females of *Kallstroemia grandiflora* at La Colorada (a, b) and San Juanero (c, d) during 2001.

hermaphrodites even if seed mass of female plants is either equal to or smaller than that of hermaphrodites (Delph et al. 1999). Thus, future studies should address the relative performance of seeds from female and hermaphrodite plants in order to explore the role of postgermination compensation. Unfortunately, we have been unable to germinate seeds of *Kallstroemia* to explore this issue.

Our data revealed evidence of pollinator limitation in females but not in hermaphrodites. However, given that no differences were detected in overall seed production between sexes, pollinator limitation in females may occur during brief periods of time. Because the available evidence indicates that flowers attract a large number of insect visitors (Cazier and Linsley 1974, 1975; Osorio-Beristain et al. 1997), spatiotemporal variation in pollinator availability could affect the pollination success of female plants. Future studies of pollinator activity and pollen deposition in morphs under contrasting frequencies are required to explore the role of pollinators in the dynamics of male sterility in *K. grandiflora*.

As in other members of Zygophyllaceae, *K. grandiflora* is self-compatible (Porter 1969; Simpson et al. 1977; Debandi et al. 2002). However, it is unclear whether hermaphrodites are capable of autonomous self-pollination. It is also unclear whether inbreeding depression is expressed in the progeny of

selfed hermaphrodites. Thus, future studies should explore the ability of hermaphrodites to self in the absence of pollinators, the actual levels of outcrossing rates, and the possible role of inbreeding depression in the maintenance of male sterility.

Currently, we do not know what mechanism maintains male sterility in *K. grandiflora*. Several processes could be involved. It is possible that compensation occurs after germination either because seeds from females are better provisioned or through inbreeding effects in hermaphrodites. In addition, once females are established in populations, it is likely that seed dormancy and the persistent seed bank could be involved in delaying their elimination independently of any possible compensation. Desert annuals usually possess a persistent seed bank that buffers changes to rapidly growing individuals of the population (Venable and Lawlor 1980; Moriuchi et al. 2000). Because populations of *K. grandiflora* can be maintained even after several years without new seed input, their seeds have remarkable longevity under desert conditions (Cazier and Linsley 1975; E. Cuevas García, personal observation). Therefore, female plants could persist in populations for several years without exhibiting major compensatory advantages. Finally, if male sterility is nucleocytoplasmic, gynodioecy in *K. grandiflora* could be maintained

by the dynamics imposed by the interaction between cytoplasmic and nuclear restorer alleles (Frank 1989).

### Acknowledgments

We thank Sonia Vázquez, Raul Alcalá, and two anonymous reviewers for critical comments on earlier versions

of the manuscript; Silvia Espinoza for help with the electron microscope; Alejandro Martínez, Alfredo Gamboa, and Ricardo Wong for technical support; José Martínez and Reyna Castillo for field assistance; and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (grant 34889-V) for financial support and a scholarship to E. Cuevas García.

### Literature Cited

- Alonso C, CM Herrera 2001 Neither vegetative nor reproductive advantages account for high frequency of male-steriles in southern Spanish gynodioecious *Daphne laureola* (Thymelaeaceae). *Am J Bot* 88:1016–1024.
- APG II (Angiosperm Phylogeny Group) 2003 An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Bot J Linn Soc* 141:399–436.
- Barr CM 2004 Hybridization and regional sex ratios in *Nemophila menziesii*. *J Evol Biol* 17:786–794.
- Budar F, P Touzet, R De Paepe 2003 The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterility revisited. *Genetica* 117:3–16.
- Cazier MA, EG Linsley 1974 Foraging behavior of some bees and wasps at *Kallstroemia grandiflora* flowers in southern Arizona and New Mexico. *Am Mus Novit* 2546:1–20.
- 1975 Bee and wasp visitors to *Kallstroemia grandiflora* after two years of drought. *Pan-Pac Entomol* 51:248–253.
- Charlesworth B, D Charlesworth 1978 A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *Am Nat* 112:975–997.
- Charlesworth D, V Laporte 1998 The male-sterility polymorphism of *Silene vulgaris*: analysis of genetic data from two populations and comparison with *Thymus vulgaris*. *Genetics* 150:1267–1282.
- Conley C, V Parthasarathy, M Hanson 1994 Effects of *Petunia* cytoplasmic male sterile cytoplasm on the development of sterile and fertility-restored *P. parodii* anthers. *Am J Bot* 81:630–640.
- Debandi G, B Rossi, J Aranibar, JA Ambrosetti, IE Peralta 2002 Breeding system of *Bubnesia retama* (Gillier ex Hook & Arn) Gris. (Zygophyllaceae) in the central Monte Desert (Mendoza, Argentina). *J Arid Environ* 51:141–152.
- Delph LF 1996 Flower size dimorphism in plants with unisexual flowers. Pages 217–237 in DG Loyd, SCH Barrett, eds. *Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants*. Chapman & Hall, New York.
- Delph LF, M Bailey, L Marr 1999 Seed provisioning in gynodioecious *Silene acaulis* (Caryophyllaceae). *Am J Bot* 86:140–144.
- Dem'yanova AE 1985 Distribution of gynodioecy in flowering plants. *Bot Zh* 70:1289–1301.
- Dimmitt MA 2000 Zygophyllaceae. Pages 261–264 in SJ Phillips, P Wentworth, eds. *A natural history of the Sonoran Desert*. Arizona-Sonora Desert Museum, Tucson, AZ.
- Dominguez CA, G Avila, S Vázquez-Santana, J Márquez-Guzmán 1997 Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *Am J Bot* 84:626–632.
- Frank SA 1989 The evolutionary dynamics of cytoplasmic male sterility. *Am Nat* 133:345–376.
- Frank SA, CM Barr 2003 Programmed cell death and hybrid incompatibility. *J Hered* 94:181–183.
- Gouyon PH, F Vichot, JMM Van Damme 1991 Nucleo-cytoplasmic male sterility: single-point equilibria versus limit cycles. *Am Nat* 137:498–514.
- Grant L, W Beversdorf 1986 A comparative light and electron-microscopic study of microspore and tapetal development in male fertile and cytoplasmic male sterile oilseed rape (*Brassica napus*). *Can J Bot* 64:1055–1068.
- Halldén C, G Karlsson, C Lind, I Moller, W Heneen 1991 Microsporogenesis and tapetal development in fertile and cytoplasmic male-sterile sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Sex Plant Reprod* 4: 215–225.
- Hanson M, M Conde 1985 Functioning and variation of cytoplasmic genomes: lessons from cytoplasmic-nuclear interactions affecting male fertility in plants. *Int Rev Cytol* 94:213–267.
- Homer HT 1977 A comparative light and electron-microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile sunflower (*Helianthus annuus*). *Am J Bot* 64:745–759.
- Homer HT, M Rogers 1974 A comparative light and electron-microscopic study of microsporogenesis in male-fertile and cytoplasmic male-sterile pepper (*Capsicum annuum*). *Can J Bot* 3:435–441.
- Jacobs MS, MJ Wade 2003 A synthetic review of the theory of gynodioecy. *Am Nat* 161:837–851.
- Kaul MLH 1988 Male sterility in higher plants. Springer, Berlin.
- Laser K, N Lersten 1972 Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male sterile angiosperms. *Bot Rev* 38:425–454.
- Lee S, V Gracen, E Earle 1979 The cytology of pollen abortion in c-cytoplasmic male-sterile corn anthers. *Am J Bot* 66:656–667.
- Manicacci D, A Adian, JAE Rosello, D Couvet 1998 Gynodioecy and reproductive trait variation in three *Thymus* species (Lamiaceae). *Int J Plant Sci* 159:948–957.
- Maurice S, D Charlesworth, C Desfeux, D Couvet, PH Gouyon 1993 The evolution of gender in hermaphrodites of gynodioecious populations with nucleo-cytoplasmic male-sterility. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 251:253–261.
- Moriuchi KS, DL Venable, E Pake, T Lange 2000 Direct measure of the seed bank age structure of a Sonoran Desert annual plant. *Ecology* 81:1133–1138.
- Osorio-Beristain M, CA Domínguez, LE Eguarte, B Beurey 1997 Pollination efficiency of native and invading Africanized bees in the tropical dry forest annual plant, *Kallstroemia grandiflora* Torr ex Gray. *Apidologie* 28:11–16.
- Porter D 1969 The genus *Kallstroemia* (Zygophyllaceae). *Contrib Gray Herb Harv Univ* 198:41–153.
- Raghavan V 1997 Molecular embryology of flowering plants. Cambridge University Press, Cambridge.
- SAS Institute 1997 JMP statistical software package, version 3.1. SAS Institute, Cary, NC.
- Schultz ST 1994 Nucleo-cytoplasmic male sterility and alternatives routes to dioecy. *Evolution* 48:1933–1945.
- Sheahan MC, MW Chase 1996 A phylogenetic analysis of Zygophyllaceae R.Br. based on morphological, anatomical and *rbcL* DNA sequence data. *Bot J Linn Soc* 122:279–300.
- 2000 Phylogenetic relationships within Zygophyllaceae based on DNA sequences of three plastid regions, with special emphasis on Zygophylloideae. *Syst Bot* 25:371–384.
- Shreve F 1964 Vegetation of the Sonoran Desert. Pages 9–186 in F Shreve, IL Wiggins, eds. *Vegetation and flora of the Sonoran Desert*. Stanford University Press, Stanford, CA.
- Shykoff JA, SO Kolokotronis, CL Collin, M Lopez-Villavicencio 2003 Effects of male sterility on reproductive traits in gynodioecious plants: a meta-analysis. *Oecologia* 135:1–9.

CUEVAS GARCÍA ET AL.—GYNODIOECY IN *KALLSTROEMIA GRANDIFLORA*

---

- Simpson BB, LL Neff, AR Moldenke 1977 Reproductive systems of *Larrea*. Pages 92–114 in TJ Mabry, JH Hunziker, DR DiFeo, eds. Creosote bush: biology and chemistry of *Larrea* in New World deserts. Dowden, Hutchinson & Ross, Stroudsburg, PA.
- Smith M, RG Palmer, HT Horner 2002 Microscopy of a cytoplasmic male-sterile soybean from an interspecific cross between *Glycine max* and *G. soja* (Leguminosae). *Am J Bot* 89:417–426.
- Van Damme JMM, W Van Delden 1982 Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. L. Polymorphism for plasmon type. *Heredity* 49: 303–318.
- Venable DL, L Lawlor 1980 Delayed germination in desert annuals: escape in space and time. *Oecologia* 46:272–280.
- Williams HL, CB Fenster 1998 Ecological and genetic factors contributing to the low frequency of male sterility in *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae). *Am J Bot* 85:1243–1250.

## CAPITULO II

# Estructura Genética

**The genetic structure of the gynodioecious *Kallstroemia grandiflora* (Zygophyllaceae): the role of male sterility and colonization history. (enviado a Herdity 04/09/2005)**

**Eduardo Cuevas García<sup>2</sup>, Dulce M. Arias<sup>3</sup>, César A. Domínguez<sup>4</sup>, Reyna A. Castillo<sup>5</sup> and Francisco Molina-Freaner<sup>2</sup>**

2: Instituto de Ecología UNAM, Departamento de Ecología de la Biodiversidad, Apartado Postal 1354, Hermosillo, Sonora C.P. 83000 MEXICO.

3: Centro de Educación Ambiental e Investigación Sierra de Huautla, UAEM, Cuernavaca, Morelos C.P. 62210 MEXICO.

4: Instituto de Ecología UNAM, Departamento de Ecología Evolutiva, Apartado Postal 70-275, México D.F. C.P. 04510 MEXICO.

5: Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Sonora, Apartado Postal 1819, Hermosillo, Sonora C.P. 83000 MEXICO.

**Abstract**

In self-compatible gynodioecious populations, hermaphrodite plants are capable of selfing whereas female plants are obligated outcrossers. In these populations the frequency of females is expected to have a strong influence on the contemporary genetic structure of populations. Historical patterns of range contraction and expansion are also known to influence the genetic diversity of plant populations. In this paper, we use allozymes to explore the effect of male sterility and colonization history on the genetic diversity of 15 populations of *Kallstroemia grandiflora* along the Pacific of México. We estimated the frequency of male sterility and its geographic distribution. Female frequencies ranged from 0 to 30 % along the latitudinal distribution, with greater levels of male sterility in the Sonoran Desert. The average number of alleles per locus ( $A$ ) was 1.92, while the expected heterozygosity ( $H_e$ ) was 0.26. Slight deficiency of heterozygotes ( $F_{is} = 0.24$ ) and high genetic differentiation ( $F_{st} = 0.23$ ) were detected. Both, the overall population  $F_{is}$  and  $F_{is}$  values of hermaphrodites showed a negative relationship with the frequency of females. The overall population  $F_{is}$  and  $F_{is}$  values of hermaphrodites decreases as female frequency increases. Genetic diversity declined with latitude as  $H_e$  and  $A$  showed a negative association with latitude. Thus, our results provide strong evidence that female has a significant effect on the genetic structure as predicted by theoretical models. In addition our results provide support for the hypothesis that historical processes have modified the genetic structure of *K. grandiflora*.

**Key words:** Genetic structure, Gynodioecy, *Kallstroemia*, Male sterility, Sonoran Desert.



## Introduction

Current and historical processes are known to influence the contemporary genetic structure of plant populations. Given that the generational transition of genotypic frequencies is strongly influenced by the mating system, major features of the breeding system are critical determinants of the genetic structure of plants. With complete self-fertilization heterozygosity is expected to rapidly decline, whereas with random outcrossing heterozygosity is maintained in populations (Hedrick, 2000). Populations of self-compatible gynodioecious species are composed by hermaphrodite plants that are capable of selfing and by obligated outcrossers female plants. Gouyon and Couvet (1987) proposed that because of the different patterns of mating exhibited by female and hermaphrodite plants of gynodioecious species, the frequency of females should have a strong influence on the genetic structure of populations. If hermaphrodite plants are predominantly selfers, heterozygote deficiency for females, hermaphrodites and the whole population are expected to decline as female frequency increases and as a consequence overall heterozygosity levels increases with male sterility (Gouyon and Vernet, 1982). In addition, if there is maternal inheritance of sex (i.e. if female plants have higher probability to have female progeny than hermaphrodites), females are expected to be more heterozygous than hermaphrodite plants (Gouyon and Couvet, 1987). The few studies that have explored these

predictions for self-compatible gynodioecious species have failed to find empirical support (Tarayre and Thompson, 1997; but see Medrano *et al.*, 2005). It is clear, however, that further studies are needed in order to establish if those predictions have empirical support.

Historical patterns of gene flow are also known to influence the genetic structure and phylogeography of plant populations (Soltis *et al.*, 1997; Nason *et al.*, 2002). The geographic distribution of many plant species has been subject to range expansion and contraction in response to climatic changes (i.e. glaciations, Comes and Kadereit, 1998). If these cycles have been associated with bottlenecks in population size and recolonization from a southern refugial source, range expansion is expected to generate a genetic structure in which genetic diversity declines with increasing latitude (Hewitt, 1996; Nason *et al.*, 2002).

Paleobotanical studies based on packrat middens have provided evidence about the history of the vegetation of North American deserts and migration of several plant species (Van Devender, 1990, 2002). The paleobotanical evidence indicates that the geographic range of many North American desert plants have been subject to expansion and contraction in response to climatic change (Van Devender, 1990, 2002). Few studies, have explored whether North American desert plants show evidence of declining genetic diversity with increasing latitude. Two columnar cacti from Baja California show such a trend, apparently as a

consequence of repeated cycles of range expansion and contraction from southern refuges (Nason *et al*, 2002; Clark-Tapia and Molina-Freaner, 2003). Very few studies, however, have explored this issue on mainland Mexico (Silva-Montellano and Eguiarte, 2003).

*Kallstroemia grandiflora* is an annual, self-compatible gynodioecious species with a range of variation in male sterility from 0 to 44% among populations (Cuevas E. pers. obs). The anthers of pistillate flowers of *K. grandiflora* show an early degeneration of tapetal cells during pollen grain development. This fact, along with the lack of female reproductive compensation observed in populations (Cuevas *et al*, 2005), suggests a maternal component of inheritance. It is thus a suitable system to explore the influence of male sterility on the genetic structure of its populations. In addition, it has a wide latitudinal distribution in North American arid regions, from the Sonoran and Chihuahuan deserts to the tropical dry forests in central México (Porter, 1969), offering an excellent opportunity to explore the relationship between genetic diversity and latitude. In this paper, we describe the geographic distribution of male sterility in populations of *K. grandiflora* from México and test whether female frequencies have any effect on the genetic structure. Finally, we explore whether genetic diversity declines with latitude through the distribution range of *K. grandiflora* along the Pacific coast of México.

## Material and Methods

### Studied species.-

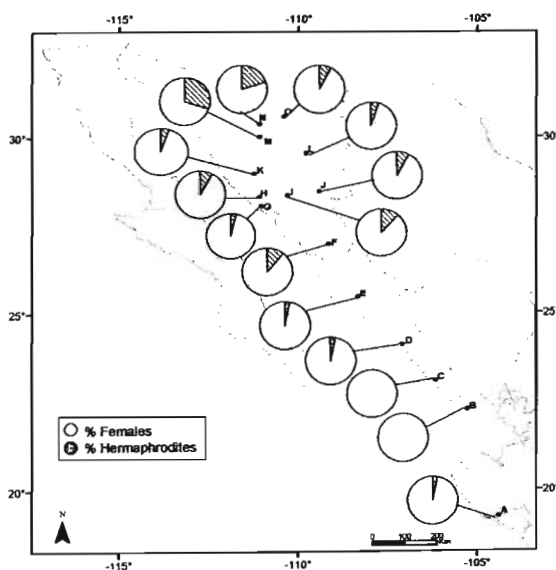
*Kallstroemia grandiflora* belongs to the Zygophyllaceae, a small family composed of 25 genera and 250 species, distributed mostly in the arid tropics and subtropics (Porter, 1969; Sheahan and Chase, 1996). The distribution of *K. grandiflora* ranges from the Sonoran and Chihuahuan deserts of North America to the semiarid west coast of México along the limits of the states of Guerrero and Michoacán (Porter, 1969). Pistillate flowers from females have white reduced anthers and smaller corollas ( $2.8 \pm 0.51$  cm; mean  $\pm$  1 SD here and hereafter) than the perfect flowers of hermaphrodites ( $4.4$  cm  $\pm$  0.54; Cuevas *et al*, 2005). Pollen release and stigma receptivity are simultaneous and hermaphrodite flowers are self-compatible (Porter, 1969; Cuevas *et al*, 2005). Throughout its range, flowers are visited by more than 40 species of insects, mainly bees and wasps (Cazier and Linsley, 1974; Cazier and Linsley, 1975; Osorio-Beristain *et al*, 1997). Based on the behavior of flower visitors, at least 10 species could be considered as effective pollinators (Cazier and Linsley, 1974; Cazier and Linsley, 1975).

### Sampling and estimation of male sterility

During August 2002 we estimated the frequency of male sterility in 15 populations of *K. grandiflora* located along a latitudinal gradient. We tried to cover the entire range of distribution

of this species in México and the range of variation in male sterility (Fig. 1, Table 1). In each population we used line transects to sample at least 200 plants, and the sex-morph of each plant was recorded using three or more open flowers. In each of the 15 populations, mature leaf samples from forty individuals separated at least 5-10 m from each other were collected for genetic analyses. Female and hermaphrodite plants were sampled in proportion to their frequency in each population. Samples were immediately stored in liquid nitrogen and once in the lab they were kept frozen in an ultracold freezer at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

sucrose gels. Three buffer systems were used to assay eight enzyme systems and 14 loci. Enzyme systems were selected on the basis of resolution and reproducibility. Buffer 8 from Soltis *et al*, (1983) was used to assay malic enzyme (ME), phosphoglucoisomerase (PGI), leucine aminopeptidase (LAP), oxaloacetate transaminase (GOT) and anodic peroxidase (APX). Buffer 9 from Soltis *et al*, (1983) was used to assay phosphoglucomutase (PGM) and shikimate dehydrogenase (SDH). Buffer D of Wendel and Stuber (1984) was used to assay malate dehydrogenase (MDH).



### Electrophoretic procedures

Each sample was ground in a cold mortar with 2-3 drops of the Tris-HCL extraction buffer (Weeden and Wendel, 1989). Extracts were absorbed in 1.5 x 10 mm paper wicks. Allozymes were run in 11.5 % starch and 5%

Loci and alleles were designated by relative protein mobility, with lower numbers assigned to those farther from the origin. Staining procedures correspond to those of Wendel and Weeden (1989) for LAP, MDH, ME, PGM,

APX, PGI, SDH and Murphy *et al.*, (1990) for GOT.

#### Data analysis

Genetic diversity measures were obtained using POPGENE (Yeh and Yang, 1999). These measures include the percentage of polymorphic loci ( $P$ ), mean number of alleles per locus ( $A$ ), observed ( $H_o$ ) and expected heterozygosity ( $H_e$ ). Wright's  $F$  statistics ( $F_{is}$ ,  $F_{st}$  and  $F_{it}$ ) were obtained and their 95% confidence intervals were estimated following the methods of Weir and Cockerham (1984). Standard deviations of the estimates were obtained by jackknifing over loci and confidence intervals by bootstrapping over loci (Yeh and Yang, 1999). Nei's (1972) genetic distances were estimated between all pairs of populations and used to generate a neighbor-joining phenogram using PHYLIP, version 3.6 (Felsenstein, 2004). A total of 1000 bootstrap samples over loci were used to estimate the confidence of the branch points. A Mantel test of association (1000 permutations) was used to test the model of isolation by distance using the genetic and geographic (straight-line) distance for pairs of populations. Regression analyses were used to explore the influence of female frequency on heterozygote deficiency ( $F_{is}$ ), and the expected and observed heterozygosity ( $H_e$  and  $H_o$ ) for females, hermaphrodites and overall population values. In addition, given that historical processes are expected to influence the latitudinal distribution of male sterility, we statistically removed the influence of latitude on female frequency. To

that end, we calculated the residuals resulting from the regression between female frequency and latitude. The residual values represent the fraction of the variance in female frequency not explained by latitude. Therefore, we also explore the influence of the residual values (i.e. the contemporary effect of female frequency) on  $F_{is}$ ,  $H_e$  and  $H_o$  for females, hermaphrodites and overall population values. Finally, we used regression analyses to explore if  $A$ ,  $H_o$  and  $H_e$  decline with increasing latitude. Hermaphrodite and female mean values of ( $F_{is}$ ) were compared through a one-way ANOVA. All statistical analyses were done using JMP version 3.2 (SAS Institute, 1997).

### **Results**

#### Geographic variation of male sterility

Male sterility ranged from zero in Acaponeta and Mazatlán to 30% in Benjamin Hill, along the Pacific of México (Fig. 1, Table 1). We found a significant positive association between the frequency of females and latitude along the distribution range in México ( $F = 6.79$ ,  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.34$ , Fig. 2).

#### Genetic diversity and structure

Ten out of 14 loci were polymorphic (71.4%). MDH, ME, LAP-1 and GOT-1 were monomorphic in all populations. The average number of alleles per locus ( $A$ ) was 1.92. Overall genetic diversity ( $H_e$ ) was 0.26, a relatively high value for an annual plant. The average observed heterozygosity ( $H_o$ ) was 0.20 (Table 1). Given the difference between  $H_e$  and  $H_o$ ,  $F_{is}$  was

positive for all populations (Table 1) indicating a deficiency of heterozygotes.

Mean estimates of Wright's  $F$  statistics ( $\pm 1SD$ ) were 0.42 ( $\pm 0.05$ ) for  $F_{ib}$ , 0.242 ( $\pm 0.09$ ) for  $F_{is}$  and 0.23 ( $\pm 0.03$ ) for  $F_{st}$ .

Table 1. Measures of genetic diversity in populations of *K. grandiflora* from western México.

Population	Latitude °N	Longitude °W	A	$H_o$	$H_e$	$F_{is}$	% Male sterility
A-Melaque	19°13'47''	104°42'33''	2.0	0.223	0.275	0.189	3.0
B-Acaponeta	22°32'29''	105°28'21''	2.0	0.176	0.293	0.399	0
C-Mazatlán	23°09'47''	106°05'40''	2.0	0.197	0.273	0.278	0
D-Culiacán	24°20'39''	107°05'55''	1.9	0.211	0.272	0.224	3.0
E-Mochis	25°42'23''	108°42'41''	2.1	0.249	0.320	0.221	3.5
F-Alamos	27°05'51''	109°11'26''	2.1	0.222	0.291	0.237	11.0
G-Guaymas	28°12'08''	111°00'47''	2.0	0.159	0.303	0.475	4.0
H-La Paloma	28°29'40''	111°02'64''	1.9	0.203	0.254	0.2	8.0
I-La Colorada	28°45'68''	110°28'64''	1.9	0.184	0.225	0.182	12.0
J-Las Guásimas	28°53'71''	109°53'03''	1.9	0.194	0.253	0.233	8.0
K-El Tonuco	29°08'24''	111°23'25''	1.7	0.208	0.262	0.206	5.0
L-Ures	29°30'00''	110°50'00''	1.8	0.169	0.261	0.352	5.0
M-Benjamin Hill	30°13'58''	111°05'47''	1.8	0.23	0.263	0.125	30.0
N-Santa Ana	30°35'50''	111°02'16''	1.9	0.201	0.248	0.189	20.0
O- Cananea	30°59'37''	110°33'38''	1.8	0.195	0.223	0.125	8.0
<b>Mean</b>			<b>1.92</b>	<b>0.201</b>	<b>0.267</b>	<b>0.242</b>	<b>8.0</b>
<b>SD</b>			0.114		0.026	0.097	7.95

A, mean number of alleles per locus;  $H_o$ , observed heterozygosity;  $H_e$ , expected heterozygosity;  $F_{is}$ , measures deviation from Hardy-Weinberg proportions; % Male sterility, percentage of male sterility. SD is the standard deviation.

The 95% confidence interval for  $F_{it}$  (0.28-0.52),  $F_{is}$  (0.09-0.37) and  $F_{st}$  (0.16-0.29) indicated that these parameters are significantly different from zero.

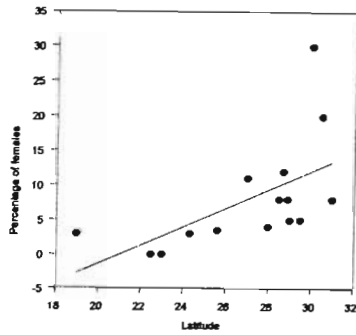


Figure. 2. Male sterility in 15 populations of *K. grandiflora* as a function of latitude along the Pacific coast of México.

#### Influence of male sterility

Linear regression analyses showed that female frequency had a significant effect upon the genetic structure of *K. grandiflora*.

The frequency of females showed a significant association with both, the overall population ( $F = 4.99$ ,  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.27$ ) and hermaphrodite  $F_{is}$  values ( $F = 7.99$ ,  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.38$ , Fig. 3) but not with female  $F_{is}$  values ( $F = 0.33$ ,  $P = 0.57$ ).

Female frequency had no effect on population heterozygosity as the relationship with  $H_e$  and  $H_o$  was not significant ( $F = 1.99$ ,  $P = 0.18$  for  $H_e$  and  $F = 1.06$ ,  $P = 0.32$  for  $H_o$ ), neither for females ( $F = 0.69$ ,  $P = 0.42$  for  $H_e$  and  $F = 0.83$ ,  $P = 0.38$  for  $H_o$ ) nor for hermaphrodites ( $F = 0.67$ ,  $P = 0.42$  for  $H_e$  and  $F = 2.87$ ,  $P = 0.11$  for  $H_o$ ). However, after removing the effect of latitude, the adjusted

female frequency showed a significant association with  $F_{is}$  ( $F = 4.89$ ,  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.27$ ) and  $H_o$  ( $F = 5.95$ ,  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.31$ , Fig. 4) values of hermaphrodites but just marginal significance with population  $H_o$  values ( $F = 3.99$ ,  $P = 0.06$ ).

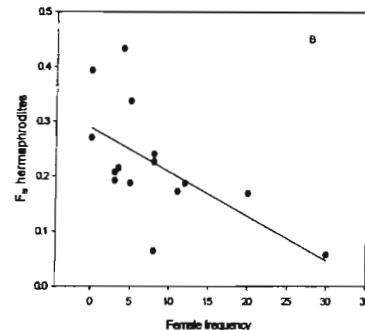
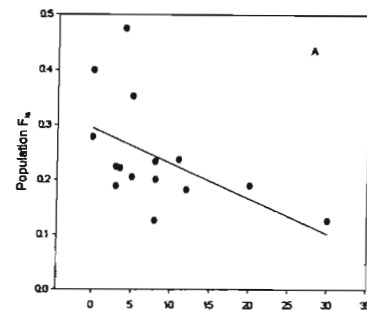


Figure. 3. Heterozygote deficiency ( $F_{is}$ ) as a function of female frequency for the overall population (a) and for hermaphrodites (b).

As predicted, the  $F_{is}$  mean value for hermaphrodites was significantly greater than that of females (0.223 and -0.09 respectively;  $F = 9.95$ ,  $P < 0.01$ ), but no differences were detected for the expected ( $F = 3.28$ ,  $P = 0.75$ ) and observed heterozygosity ( $F = 0.09$ ,  $P = 0.08$ ) between morphs.

Association with latitude and genetic distances between populations

Linear regression analyses indicated that genetic diversity is significantly associated with latitude (Fig 5). Expected heterozygosity ( $H_e$ ,  $F = 4.96$ ,  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.27$ ) and the mean number of alleles per locus ( $A$ ,  $F = 6.09$ ,  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.31$ ) were negatively associated with latitude (Fig. 5).

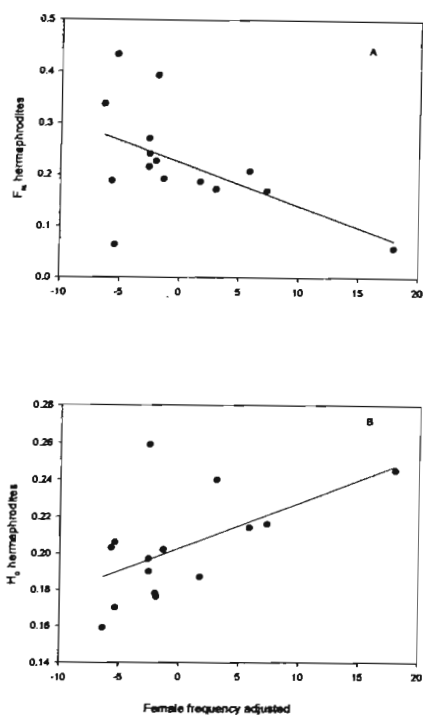


Figure. 4. Heterozygote deficiency ( $F_{is}$ ) for the overall population (a) and (b) observed heterozygosity ( $H_o$ ) for hermaphrodites as a function of the residual values of the regression of female frequency and latitude

However,  $H_o$  showed no association with latitude ( $F = 1.11$ ,  $P = 0.31$ ) while the proportion of polymorphic loci remained constant throughout the latitudinal range (71.4%). Genetic distances ranged from 0.0047 to 0.3 among populations with a mean value of 0.12.

Under the hypothesis of unidirectional range expansion from a southern refuge, ancestral populations are expected to occupy the base of the phenogram while derived populations are expected to occupy terminal positions and be serially nested from ancestral ones (Nason *et al*, 2002, see Fig. 7).

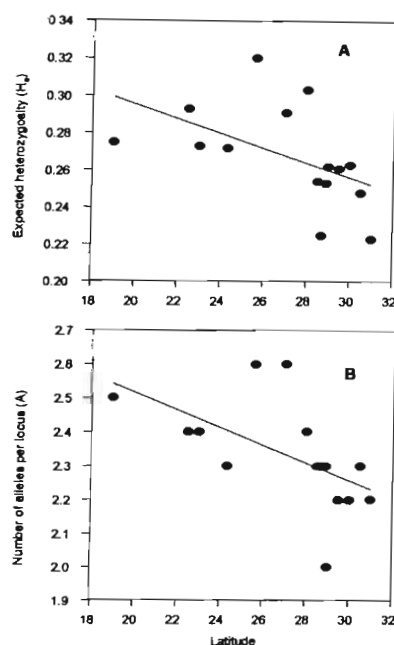


Figure. 5. Genetic diversity as a function of latitude in populations of *K. grandiflora*: (a) expected heterozygosity as a function of latitude and (b) average number of alleles per locus as a function of latitude

In the neighbor-joining phenogram based on genetic distances, some southern (B, C, A) and northern (O, N, L) populations occupy, respectively, the base and the top of the phenogram (Fig. 6). In addition we found a significant positive rank correlation between the neighbor-joining phenogram and the expected tree topology ( $N = 15$ ,  $Z = 2.32$ ,  $P < 0.05$ , see Fig. 7).

Finally, the Mantel test showed evidence of isolation by distance (Mantel test,  $r = 0.33$ , one-tailed  $P < 0.05$ ).

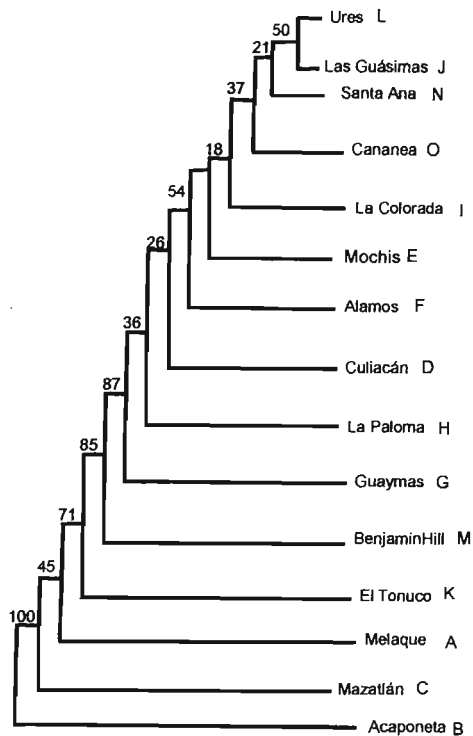


Figure. 6. Neighbor-joining phenogram based on Nei's (1972) genetic distances (D) among the 15 populations of *K. grandiflora*. Numbers represent the percentage of bootstrap values (1000 replicates) supporting the branch.

## Discussion

In this paper we have shown that both male sterility and latitude influence the genetic structure of *Kallstroemia grandiflora*. As far as we know, this is the first well-supported case of female frequency influencing heterozygote deficiency across the range of a gynodioecious species. Remarkably, the influence of male sterility is maintained even after the latitudinal effect is removed. Moreover,

our data also show that genetic diversity declines with latitude as expected under cycles of range contraction and recolonization from a single refugial source.

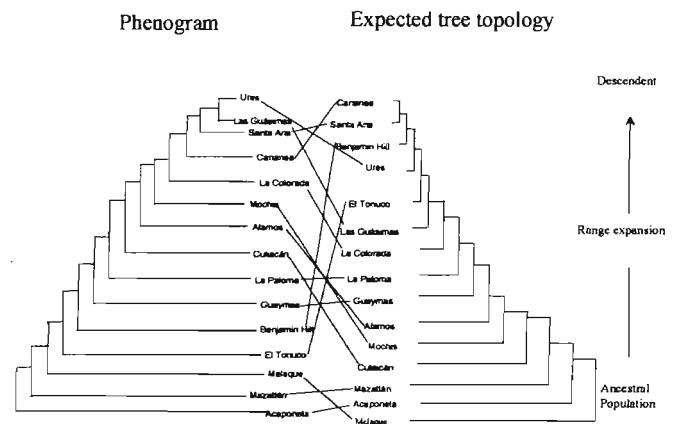


Figure. 7. Neighbor-joining phenogram and expected tree topology for populations of *K. grandiflora* under the hypothesis of unidirectional range expansion from southern ancestral population

### Influence of male sterility on the genetic structure.

Under nucleo-cytoplasmic inheritance, females are expected to influence the genetic structure of gynodioecious species by two mechanisms. If hermaphrodites are predominantly selfers and female are obligate outcrossers, hermaphrodite plants are expected to show greater levels of heterozygote deficiency than females. In addition, heterozygote deficiency in hermaphrodites is expected to decline as females increase in frequency (Gouyon and Vernet, 1982; Gouyon and Couvet, 1987). Our data on *K. grandiflora* support both predictions as significant differences in  $F_{is}$  were detected between sexes and female frequency had a significant effect on  $F_{is}$  of hermaphrodites and population  $F_{is}$  values. Our data showed that



even after removing the latitudinal effect, female frequency has an effect on  $H_o$  and  $F_{is}$  values of hermaphrodites, supporting the hypothesis that male sterility has an important influence on the contemporary genetic structure.

Female frequency is also expected to influence the overall heterozygosity of gynodioecious plants (Gouyon and Couvet, 1987). However, our data provided partial support for this prediction as female frequency did have a significant effect on  $H_o$  values of hermaphrodites when the latitudinal influence is removed. There are several factors that may modify the predicted relationships. First, the historical pattern of range contraction and expansion may have generated a latitudinal decline in  $H_e$  and given that male sterility is concentrated in northern México, high levels of female frequency occur in areas of reduced  $H_e$ . Thus, the expected relationship between female frequency and  $H_e$  may have been modified due to the genetic signature left by historical patterns of recolonization. The model of Gouyon and Vernet (1982) assumes that hermaphrodites are predominantly selfers and some variation in outcrossing rates may modify the predicted relationship between male sterility and  $H_o$ . Thus, although our results support the prediction that male sterility influences heterozygote deficiency, our data show evidence of a significant effect on the observed heterozygosity of hermaphrodites only when we removed the effect of latitude on female frequency.

Colonization history.- Another striking result from this study is the association between genetic diversity and latitude. This pattern of declining diversity is expected under recurrent cycles of range contraction and recolonization from a single refugial source (Hewitt, 1996; Nason *et al*, 2002). In addition, the significant positive rank correlation between the neighbor-joining phenogram and the expected tree topology support the range expansion hypothesis. Thus, our results suggest that *K. grandiflora* has been subject to recurrent cycles of range contraction and expansion in response to climatic change and that these cycles have had a major influence on its genetic structure. Under this scenario, southern populations functioned as refuges and recolonization events involved bottlenecks that caused significant differences in genetic diversity between southern and northern populations. Finally, we found significant evidence of isolation by distance among populations as expected under the hypothesis of colonization from a southern refuge. However, future studies employing more powerful molecular markers are needed in order to explore in detail the history of colonization and the phylogeographic structure of *K. grandiflora*.

Comparison with other gynodioecious species.- The level of genetic diversity observed in *K. grandiflora* is greater than mean values detected in annual plants (Hamrick and Godt, 1996), but fall within the range observed for other gynodioecious species or members of the Zygophyllaceae (Cortes and Hunziker, 1997;

Tarayre and Thompson, 1997; Laporte *et al*, 2001). Similarly, genetic differentiation in *K. grandiflora* is lower than mean values for annual plants (Hamrick and Godt, 1996) but within the range observed for other gynodioecious taxa (Tarayre and Thompson, 1997; Mc Cauley, 1998; Laporte *et al*, 2001).  $F_{is}$  values in populations of *Kallstroemia* are similar to the mean  $F_{is}$  observed in populations of the gynodioecious *S. vulgaris* (Mc Cauley, 1998), but lower than the reported for one population in *Chionographis japonica* (Maki, 1992). The observed  $F_{is}$  values in *K. grandiflora* could be partially generated by some degree of self-fertilization in hermaphrodites and/or biparental inbreeding in females given the short inter-plant distances and the low capacity for seed dispersal (Porter, 1969). Thus, future studies should explore the temporal and geographic variation in multiloci outcrossing rate in hermaphrodite and female plants in order to know their role generating deviations from Hardy-Weinberg.

#### Acknowledgements

We would like to thank Luis Eguiarte and Raúl Alcalá for critical comments on previous versions of the manuscript, Gumersindo Sánchez and José Martínez for Lab and Field assistance and CONACYT (34889-V) for financial support and a scholarship to EC.

#### References

- Cazier MA, Linsley EG (1974). Foraging behavior of some bees and wasps at *Kallstroemia grandiflora* flowers in southern Arizona and New Mexico. *American Museum Novitates* **2546**: 1-20.
- Cazier MA, Linsley EG (1975). Bee and wasp visitors to *Kallstroemia grandiflora* after two years of drought. *The Pan-Pacific Entomologist* **51**: 248-253.
- Clark-Tapia R, Molina-Freaner F (2003). The genetic structure of a columnar cactus with a disjunct distribution: *Stenocereus gummosus* in the Sonoran desert. *Heredity* **90**: 443-450.
- Comes HP, Kadereit JW (1998). The effect of Quaternary climatic change on plant distribution and evolution. *Trends Plants Sci.* **3**: 432-438.
- Cortes MC, Hunziker J (1997). Isozymes in *Larrea divaricata* and *Larrea tridentata* (Zygophyllaceae): A study of two amphitropical vicariants and autopolyploids. *Genetica* **101**: 115-124.
- Cuevas E, Márquez-Guzmán J, Domínguez CA, Molina-Freaner F (2005). Evidence of gynodioecy in *Kallstroemia grandiflora* (Zygophyllaceae): microsporogenesis in hermaphrodite and female plants and lack of reproductive compensation. *Int. J. Plant Sci.* **166**: 481-491.
- Felsenstein J (2004). PHYLIP (Phylogenetic Inference Package) version 3.6. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA, USA.
- Gouyon H, Vernet P (1982). The consequences of gynodioecy in natural populations of *Thymus vulgaris* L. *Theor. Appl. Genet.* **61**:315-320
- Gouyon PH, Couvet D (1987). A conflict between two sexes, females and hermaphrodites. In: Stearns SC (ed) *The evolution of sex and its consequences*, Birkhauser Verlag Basel: Boston. pp 245-261.
- Hamrick JL, Godt MJ (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plants. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **351**: 1291-1298.
- Hedrick WP (2000). Genetics of populations. Jones and Bartlett publishers, Sudbury, Massachusetts.
- Hewitt GM (1996). Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* **58**: 247-276.
- Laporte V, Viardi F, Bena G, Valero M, Fuguen J (2001). The spatial structure of sexual and cytonuclear polymorphism in the gynodioecious *Beta vulgaris* spp. *maritima*: I/ at a Local Scale. *Genetics* **157**: 1699-1710.

- Maki M (1992). Fixation indices and genetic diversity in hermaphroditic and gynodioecious populations of Japanese *Chionographis* (Liliaceae). *Heredity* **68**: 329-336.
- McCauley D (1998). The genetic structure of a gynodioecious plant: nuclear and cytoplasmic genes. *Evolution* **52**:255-260.
- Medrano M, Alonso C, Herrera CM (2005). Mating system, sex ratio and the persistence of females in the gynodioecious shrub *Daphne laureola* L. (Thymelaceae). *Heredity* **94**: 37-43.
- Murphy RW, Sites JW, Buth D, Haufler CH (1990). Proteins: Isozyme Electrophoresis. In: Hills D, Moritz C, Mable B (eds) *Molecular Systematics* Sinauer Associates, Sunderland. pp: 53-120
- Nason JD, Hamrick JL, Fleming TH (2002). Historical vicariance and postglacial colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereus*, a Sonoran desert columnar cactus. *Evolution* **56**: 2214-2226.
- Nei M (1972). Genetic distance between populations. *Am. Nat.* **106**: 283-292.
- Osorio-Beristain M, Domínguez CA, Eguiarte LE, Benrey B (1997). Pollination efficiency of native and invading africanized bees in the tropical dry forest annual plant, *Kallstroemia grandiflora* Torr ex Gray. *Apidologie* **28**: 11-16.
- Porter D (1969). The genus *Kallstroemia* (Zygophyllaceae). *Contrib. Gray Herbarium, Harvard Univ.* **198**: 41-153.
- SAS Institute (1997). *JMP Statistical Software Package*, version 3.2 edition, SAS Institute inc: Cary, NC.
- Sheahan MC, Chase MW (1996). A phylogenetic analysis of Zygophyllaceae R.Br. based on morphological, anatomical and rbcL sequence data. *Bot J Linn Soc* **122**: 279-300.
- Silva-Montellano A, Eguiarte EL (2003). Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. II. Genetic variation, differentiation and inbreeding estimates. *Am. J. Bot.* **90**: 700-706.
- Soltis DE, Haufler CH, Darrow D, Gastony G (1983). Starch gel electrophoresis of Ferns: A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Am. Fern J.* **73**: 9-27.
- Soltis DE, Gitzendanner MA, Strenge DD, Soltis PS (1997). Chloroplast DNA intraspecific phylogeography of plants from the Pacific Northwest of North America. *Plant Syst. Evol.* **206**: 353-373.
- Tarayre M, Thompson JD (1997). Population genetic structure of the gynodioecious *Thymus vulgaris* L. (Labiatae) in southern France. *J. Evol. Biol.* **10**: 157-174.
- Van Devender TR (1990). Late quaternary vegetation and climate of Sonoran Desert, United States and Mexico. In: Betancourt JL, Van Devender TR, Martin PS (eds) *Packrat middens: the last 40,000 years of biotic change*. University of Arizona Press: Tucson, AZ. pp. 134-164.
- Van Devender TR (2002). Environmental history of the Sonoran desert. In: Fleming TH, Valiente-Banuet A (eds) *Evolution, Ecology and Conservation of columnar cacti and their mutualists* University of Arizona Press: Tucson, AZ. pp. 3-24.
- Weeden NF, Wenden JF (1989). Genetics of plant isozymes. In: Soltis DE, Soltis PS (eds) *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides Press: Portland, OR. pp. 46-72.
- Weir BS, Cockerham CC (1984). Estimating F-statistic for the analysis of population structure. *Evolution* **38**: 1358-1370
- Wendel JF, Stuber CW (1984). Plant isozymes: Enzymes studied and buffer systems for their electrophoretic resolution in starch gels. *Isozyme Bulletin* **17**: 4-11.
- Yeh F, Yang R (1999). POPGENE version 1.31. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis.

## CAPITULO III

# Las Proporciones Sexuales, su Adecuación y los Polinizadores

### Capítulo III

#### Influencia de las proporciones sexuales en varios componentes de la adecuación y las tasas de visita de los polinizadores en *Kallstroemia grandiflora*.

Eduardo Cuevas García<sup>1</sup> y Francisco Molina-Freaner<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ecología UNAM, Departamento de Ecología de la Biodiversidad, Apartado Postal 1354, Hermosillo, Sonora C.P. 83000 MEXICO.

#### Resumen

Las hembras de especies ginodioicas dependen de la producción de polen de los hermafroditas para producir frutos. La disponibilidad local de polen puede limitar la adecuación de las hembras y por tanto modificar las proporciones sexuales. *Kallstroemia grandiflora* es una especie ginodioica autocompatible polinizada por insectos. En este capítulo se describen las visitas de los polinizadores y la influencia de la variación en las proporciones sexuales (medida como la proporción de hembras respecto al total, hembras más hermafroditas) en algunos componentes de adecuación evaluados en ambos morfos. Además, se estimó el tamaño de las flores y el número de granos de polen depositados en el estigma. Se realizaron cruces controladas para conocer si existe limitación por polen en las hembras y si las flores

hermafroditas pueden autofecundarse sin la mediación de polinizadores. Los resultados de este estudio muestran que las flores hermafroditas son más grandes y los polinizadores las visitan más. Además las flores hermafroditas reciben más granos de polen y pueden autofecundarse sin la mediación de los polinizadores. Sin embargo, no encontramos limitación por polen en las plantas hembra ni que la adecuación de los morfos varíe en relación a la frecuencia relativa de las flores pistiladas. Dentro de los factores que pudieron contribuir a estos resultados se encuentran la escala a la que se realizó el experimento, el gran movimiento que tuvieron los polinizadores, la presencia de néctar en las flores pistiladas y la calidad del polen que reciben las flores pistiladas. Por lo que la selección dependiente de la frecuencia puede estar actuando en *K. grandiflora* a una escala distinta de la evaluada.

## Introducción

Uno de los fenómenos responsables del mantenimiento y la evolución de las proporciones sexuales es la selección dependiente de la frecuencia, (SDF, de aquí en adelante). Bajo este escenario la adecuación de un genotipo o fenotipo depende de su frecuencia en la población y de la frecuencia de los genotipos/fenotipos alternativos (Fisher 1958). Se ha propuesto que la SDF está implicada en el mantenimiento de los polimorfismos genéticos (Heuch 1979). En las poblaciones ginodioicas donde coexisten hembras y hermafroditas, las hembras dependen de la producción de polen de los hermafroditas y su posterior transporte para producir sus frutos. Por lo que se espera que conforme aumente la frecuencia local de hembras, aumente la limitación por polen y disminuya su adecuación (Lloyd 1974, Mc Cauley y Taylor 1997). Sin embargo, para que la limitación por polen sea un factor importante dentro de las poblaciones, el flujo genético entre las mismas debe ser mínimo.

Algunos estudios han detectado limitación por polen en las hembras de especies ginodioicas (Widén 1992, Ramsey y Vaughton 2002). Por el contrario, cuando algunos gremios de polinizadores visitan de

manera similar a los dos morfos no se ha detectado este fenómeno (Delph y Lively 1992). Por otra parte, dos componentes cruciales en el mantenimiento y la evolución de las proporciones sexuales, son las diferencias en las recompensas ofrecidas por los morfos sexuales y el comportamiento de los polinizadores (Castillo et al. 2002). En algunos casos, los polinizadores pueden preferir las flores hermafroditas, ya sea por su mayor tamaño (Eckhart 1992), la presencia de estambres (Ashman et al. 2000), su aroma (Ashman et al. 2005) o el tipo de recompensas que estas ofrecen, (Ashman y Stanton 1991) situación que puede disminuir el éxito reproductivo de las hembras.

Hasta ahora, los estudios que han encontrado evidencias de que la adecuación de los morfos depende de su frecuencia relativa en las poblaciones se han realizado en especies ginodioicas donde el flujo genético es limitado y las flores pistiladas no ofrecen ningún tipo de recompensa (Mc Cauley y Brock 1998, Williams et al. 2000). En *Silene vulgaris* se demostró experimentalmente que la proporción de flores que formaron frutos (fruit set) en las hembras y el número de semillas por fruto (seed set) de las hermafroditas estuvieron

positivamente relacionadas con la frecuencia de flores hermafroditas en las poblaciones (McCauley y Brock 1998). En *Geranium richardsonii* se detectó una correlación negativa entre el éxito de polinización de las flores pistiladas y su frecuencia relativa en la población (Williams et al. 2000). Sin embargo, en especies donde las flores pistiladas ofrecen néctar como recompensa, se ha encontrado que la relación entre la SDF y la adecuación de los componentes reproductivos puede variar temporalmente (Graff 1999). Tal es el caso de *Sidalcea malviflora malviflora* en donde el número de semillas por fruto de las hembras y hermafroditas, estuvo positivamente relacionado con la frecuencia de hermafroditas en el vecindario únicamente en uno de los dos años estudiados (Graff 1999). Por tanto, en especies donde las hembras ofrecen recompensa, la abundancia y el comportamiento de los polinizadores puede modificar la escala y el umbral al que actúa la SDF. *Kallstroemia grandiflora* es una especie donde coexisten plantas hembra y hermafroditas. Es una especie autocompatible en la cual las flores de ambos morfos producen néctar. Estas características hacen que *K. grandiflora* represente un sistema adecuado para

explorar los efectos de las proporciones sexuales en la adecuación de sus morfos.

El objetivo de este estudio fue evaluar experimentalmente el efecto de las proporciones sexuales locales en los componentes de adecuación de los morfos florales de *K. grandiflora* y si la SDF es uno de los mecanismos responsables de regular la dinámica de la frecuencia de los sexos en las poblaciones. Además se hicieron observaciones de las visitas de los polinizadores y se estimó el número de granos de polen que son depositados en el estigma de ambos morfos. Por último exploramos si existe limitación por polen en las hembras mediante tratamientos de polinización.

#### Especie de estudio

*K. grandiflora* se distribuye en México, desde los desiertos de Sonora y Chihuahua hasta los límites de los estados de Guerrero y Michoacán (Porter 1969). Sus flores permanecen abiertas por un día, son autocompatibles y la receptividad del estigma y la liberación del polen ocurren simultáneamente (Porter 1969, Cuevas et al. 2005). Las flores de las plantas hembra presentan anteras blancas reducidas y una

corola de menor tamaño ( $2.8 \pm 0.51$  cm promedio  $\pm 1$  D. E. de aquí en adelante) que la de las hermafroditas ( $4.4$  cm  $\pm 0.54$ ) (Cuevas et al. 2005). La frecuencia de hembras en las poblaciones puede ir de 0 a 44 % (E. Cuevas, Observación Personal). La producción de flores, frutos y semillas por fruto no difiere entre morfos en poblaciones naturales (Cuevas et al. 2005). Cada flor presenta cinco nectarios localizados entre los sépalos y los pétalos (Porter 1969). El ovario presenta diez lóculos con un sólo óvulo por lóculo. Sus flores son visitadas por más de 40 especies de insectos, principalmente abejas y avispas (Cazier y Linsley 1974, 1975, Osorio-Beristain et al. 1997). Por el comportamiento de los visitantes florales al menos diez especies de insectos pueden considerarse como polinizadores efectivos (Cazier y Linsley 1974, 1975).

### **Material y Métodos**

Este estudio se desarrolló durante el mes de septiembre del 2004 en una población natural localizada al oeste de la ciudad de Hermosillo, que se encuentra en las Planicies de Sonora (Shreve 1964). La frecuencia de hembras en esta población es de 25%. Aledaño a la población natural (500m) se formaron seis poblaciones experimentales, cada una en un área de 2 m de diámetro. Las poblaciones se formaron transplantando

plantas del morfo deseado a los sitios asignados a las poblaciones experimentales. La distancia entre poblaciones fue de 100 m, para minimizar la posible transferencia de polen entre éstas. Dada la gran variación entre plantas en la producción de flores (Cuevas et al. 2005) decidimos fijar el número de flores por población experimental para asegurarnos que las proporciones sexuales fueran exactas (además de evitar un efecto de la densidad de flores por parche). De lo contrario, la variación en la producción de flores a nivel de planta o morfo puede modificar las proporciones sexuales deseadas en el experimento. Cada población consistió de 20 flores por día, dado que en las poblaciones naturales es frecuente observar pequeños parches de plantas con abundancias similares (E. Cuevas, observación personal). Cada día durante el transcurso del experimento se mantuvo la proporción sexual de cada población, se marcaron individualmente las flores de las seis poblaciones y se cortaron las sobrantes. Las proporciones sexuales de las poblaciones se modificaron desde el 100% de hembras hasta el 100% de hermafroditas en intervalos de 20%. Debido a la falta de lluvias al inicio de la temporada reproductiva, las plantas de todas las poblaciones se regaron cada tercer día para



asegurar la sobrevivencia de las plantas y la producción de flores durante el transcurso del experimento. La falta de humedad en el suelo provocó que la mayoría de las plantas que estaban fuera de las seis poblaciones mantenidas bajo riego murieran.

#### Visitas de polinizadores

Estimamos la tasa de visitas de los polinizadores en la población natural y en las seis poblaciones experimentales. Las observaciones de los polinizadores se hicieron entre las 9:00 y las 12:00 h. del día cuando estos eran más activos. En todos los casos los periodos de observación fueron de 20 minutos cada uno. En la población natural se eligieron pares de plantas de sexo opuesto y se observó una flor por planta, mientras que en las poblaciones experimentales se observaron todas las flores. Las observaciones se realizaron por tres días con un total de 12 h efectivas de observación. Durante cada periodo de observación registramos el tipo de polinizador, el número de visitas, el morfo de la flor visitada, y el tiempo que duraron las visitas. Analizamos si el promedio de visitas totales fue distinto entre morfos para la población natural por medio de un análisis de varianza (ANOVA).

#### Depósito de granos de polen por visita

En la población natural antes mencionada, estimamos el número de granos de polen que se depositan en el estigma por visita del polinizador. Para esto, se usaron cinco plantas por morfo y cuatro flores por planta. Primero se embolsaron los botones maduros y cuando las flores abrían, se quitaba la bolsa y se revisaba que el estigma estuviera sin polen. En el caso de las flores hermafroditas la mitad de los botones utilizados se emascularon, para evitar el depósito de los granos de la misma flor. Después de una sola visita, la flor se cortaba y se contaban los granos de polen en el estigma con una lupa lo cual fue posible dado el tamaño relativamente grande de los granos de polen de *K. grandiflora* (Cuevas et al. 2005). Por medio de un análisis de varianza (ANOVA) comparamos si el número promedio de granos de polen depositados en flores hermafroditas y en flores hembra difirió. De manera similar analizamos en las flores hermafroditas, si el promedio de granos de polen depositado en flores sin emascular y emasculadas difirió.

#### Tratamientos de polinización

Evaluamos si las flores hermafroditas son capaces de autopolinizarse sin la mediación de polinizadores. Además, exploramos si existe limitación por polen en las hembras.

En el tratamiento de autopolinización automática, las flores hermafroditas se mantuvieron embolsadas para evitar la entrada de polinizadores. Mientras que las flores que se usaron como control, únicamente se marcaron y se dejaron expuestas a los polinizadores. En las hembras se realizó el tratamiento de adición manual de polen y su respectivo control. El tratamiento de adición manual de polen, consistió en frotar el estigma con polen fresco de una antera de una flor hermafrodita de otra planta tomada al azar, mientras que las flores de los controles estuvieron expuestas a los polinizadores. En cada tratamiento se usaron cuatro flores por planta (10 plantas por morfo) de la población natural, que fueron embolsadas un día antes de la antesis. Posteriormente se evaluó la proporción de flores que produjeron fruto y se colectaron los frutos maduros para contar las semillas por fruto y tomar su peso. Para evaluar la limitación por polen se comparó el tratamiento de adición manual de polen y el control por medio de un análisis de varianza (ANOVA) en donde los valores de la proporción de frutos se transformaron por medio del arco seno de la raíz cuadrada y el número y peso de semillas por medio del logaritmo natural.

### Manipulación de las proporciones sexuales

Para explorar los efectos de la variación en las proporciones sexuales en las visitas de los polinizadores, producción de frutos, el número y peso de semillas por fruto de *K. grandiflora*, usamos las seis poblaciones experimentales antes mencionadas. El experimento se siguió por ocho días, durante los cuales se mantuvo la proporción sexual de cada población. Una semana después se estimó la proporción de flores que produjeron fruto. Los frutos maduros se embolsaron para evitar la depredación y/o la pérdida de semillas y se colectaron una semana después. Con la finalidad de detectar el efecto de la selección dependiente de la frecuencia se hicieron regresiones lineales, de los diferentes valores de adecuación obtenidos bajo las distintas proporciones sexuales, para cada morfo contra la frecuencia de hembras por población.

Por último, debido a la importancia del tamaño de las flores en las visitas de los polinizadores, medimos el diámetro de la corola de las flores para lo cual usamos 10 plantas por morfo (cuatro flores por planta) de la población natural.

### **Resultados**

#### Tasa de visita de los polinizadores

En la población natural el 97.6 % de las visitas registradas fueron hechas por abejas

del género *Melissodes*, el 0.77% por lepidópteros y el 1.5% por dípteros. En las poblaciones experimentales el 91.1% de las visitas fueron realizadas por abejas del mismo género *Melissodes*. El 7.1% de las visitas fueron por lepidópteros, y el 1.7% por dípteros. En la población natural la tasa de visita por flor por periodo de 20 min. a flores hermafroditas ( $10 \pm 3.3$ ) fue significativamente mayor ( $F_{1,32} = 5.5$ ,  $p = 0.02$ ) que el promedio de visitas a flores pistiladas ( $7.1 \pm 3.1$  fig 1). Asimismo, la duración de las visitas a las flores hermafroditas ( $6.2 \pm 3.12$  s) también fue significativamente mayor ( $F_{1,30} = 7.34$ ,  $p = 0.007$ ) que la de las hembras ( $5.23 \pm 3.12$  s, fig 1).

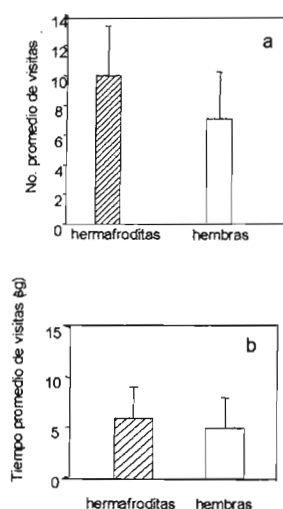


Figura 1. Número y tiempo promedio de visitas en ambos morfos en la población natural. a) número de visitas, b) tiempo promedio de las visitas. Los valores son los promedios  $\pm$  1DE

El tamaño promedio de las corolas de flores hermafroditas ( $3.15\text{cm} \pm 0.58$ ) fue

significativamente mayor que el de las pistiladas ( $2.05 \pm 0.36$ ) ( $F_{1,58} = 76.58$ ,  $p = 0.0001$ ).

#### Depósito de granos de polen por visita

El promedio de granos depositado por visita en el estigma de flores hermafroditas fue mayor  $30.08 \pm 19.88$  que el promedio de granos en flores pistiladas  $10.95 \pm 9.62$  y ambos promedios fueron distintos ( $F_{1,43} = 16.62$ ,  $p = 0.0002$ , fig. 2). El promedio de granos depositados en las flores hermafroditas sin emascular,  $33.33 \pm 18.77$  no difirió del de las flores hermafroditas emasculadas  $26.54 \pm 21.35$  ( $F_{1,21} = 0.658$ ,  $p = 0.426$ , fig. 2).

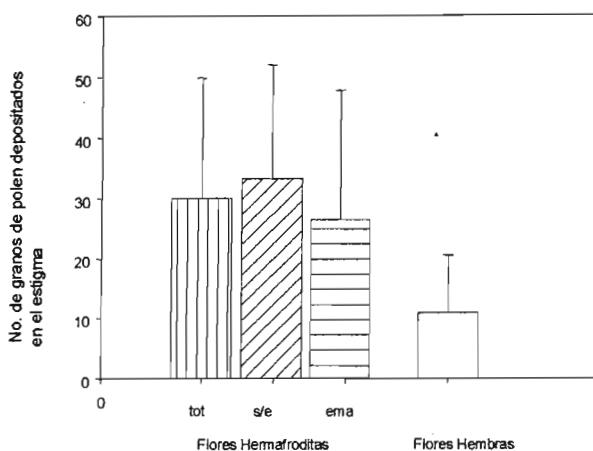


Figura 2. Número de granos de polen depositados en el estigma por visita del polinizador en ambos morfos. Los valores son los promedios  $\pm$  1DE. tot = flores hermafroditas totales, que es el promedio de las flores hermafroditas emasculadas y sin emascular; s/e = flores hermafroditas sin emascular, ema = flores hermafroditas emasculadas

### Tratamientos de polinización

Encontramos que las flores hermafroditas son capaces de autofecundarse en la ausencia de polinizadores (fruit set  $0.43 \pm 0.2$ , fig. 3). El promedio de la proporción de flores que formaron frutos en el control de los hermafroditas fue de ( $0.65 \pm 0.2$ ) y ambos promedios fueron marginalmente distintos ( $F_{1,17} = 4.4$ ,  $p = 0.05$ ). Sin embargo, el promedio de semillas por fruto del tratamiento de autofecundación automática ( $8.2 \pm 1.92$ ) y el control ( $9.1 \pm 1.1$ ) no difirieron significativamente ( $F_{1,31} = 3.13$ ,  $p = 0.08$ ). Al comparar la proporción de flores que formaron fruto en el tratamiento de adición manual de polen ( $0.95 \pm 0.15$ ) y el control de flores hembra ( $0.85 \pm 0.21$ ), no encontramos diferencias significativas ( $F_{1,18} = 1.82$ ,  $p = 0.19$ ) lo que sugiere que no hay limitación por polen.

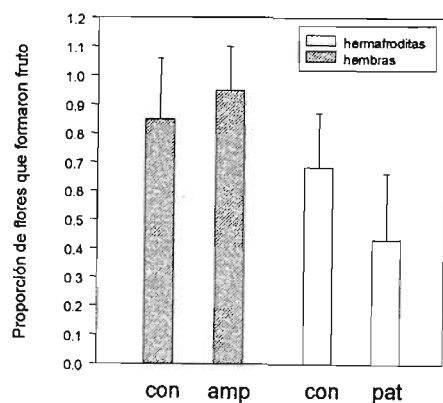


Figura 3. Proporción de flores que formaron fruto en los tratamientos de polinización realizados en *K. grandiflora*. Los valores son los promedios  $\pm$  1 DE. *con* = control; *amp* = adición manual de polen; *pat* = polinización automática.

Por último, al comparar el número promedio de semillas por fruto del control ( $7.63 \pm 2$ ) y adición manual de polen ( $8.05 \pm 2$ ) de las hembras tampoco encontramos diferencias significativas ( $F_{1,70} = 0.45$ ,  $p = 0.5$ ).

### Manipulación de las proporciones sexuales

La proporción de flores que produjo frutos en las poblaciones experimentales fue bastante alta, ya que de las 877 flores marcadas, 602 produjeron fruto (0.68). De 436 flores hermafroditas, 262 produjeron fruto (0.6), y de 441 flores pistiladas 340 produjeron fruto (0.77), sin que detectáramos diferencias entre ambas proporciones ( $F_{1,8} = 1.81$ ,  $p = 0.18$ ).

Encontramos que las visitas a las flores hermafroditas disminuyen significativamente conforme aumenta la frecuencia de flores pistiladas en las poblaciones ( $F_{1,30} = 3.94$ ,  $R^2 = 0.11$ ,  $p = 0.05$ ). Por el contrario, el número de visitas a las flores pistiladas no tienen relación con la frecuencia de flores pistiladas en las poblaciones ( $F_{1,25} = 50.19$ ,  $R^2 = 0.0$ ,  $p = 0.6$ ) (Fig 4).

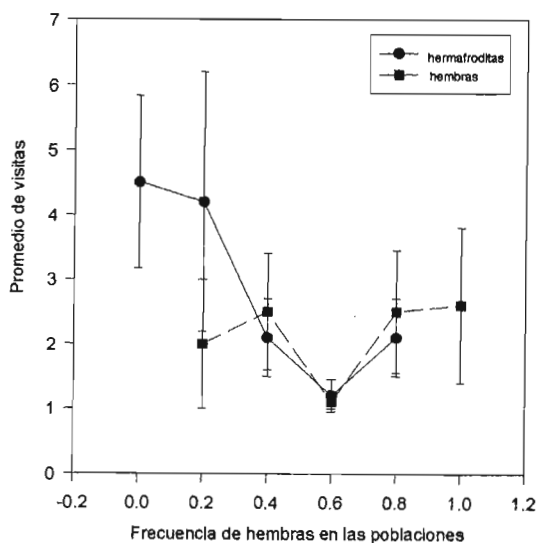


Figura 4. Número promedio de visitas ( $\pm 1$  DE) a flores hermafroditas y pistiladas en función de la frecuencia de flores pistiladas en las poblaciones.

Los demás componentes reproductivos estimados en las distintas poblaciones no mostraron relación con respecto a la frecuencia de flores pistiladas, en términos de la proporción de flores que produjeron fruto ( $F_{1,3} = 0.60$ ,  $R^2 = 0.09$ ,  $p = 0.605$ , en hermafroditas y  $F_{1,3} = 1.02$ ,  $R^2 = 0.25$ ,  $p = 0.386$  en hembras) número de semillas por fruto ( $F_{1,3} = 1.17$ ,  $R^2 = 0.28$ ,  $p = 0.358$ , en hermafroditas, y  $F_{1,3} = 1.01$ ,  $r^2 = 0.25$ ,  $p = 0.387$  en hembras) o su peso ( $F_{1,3} = 0.001$ ,  $R^2 = 0.0005$ ,  $p = 0.969$ , en hermafroditas y  $F_{1,3} = 1.1$ ,  $R^2 = 0.26$ ,  $p = 0.371$  en hembras), ya que la pendiente de las regresiones no fue significativamente distinta de cero en ningún caso.

## Discusión

En *K. grandiflora*, las flores hermafroditas son más grandes, más visitadas y por más tiempo que las flores pistiladas. Además, reciben en promedio tres veces más granos de polen por visita que las flores pistiladas y pueden realizar la autofecundación en ausencia de los polinizadores. Estas características concuerdan con la falta de compensación reproductiva que hemos detectado en las hembras (Cuevas et al. 2005). Sin embargo, contrario a las predicciones teóricas no encontramos limitación por polen en las hembras ni que su adecuación variara de acuerdo a la proporción de flores hermafroditas.

El número mayor de visitas en la población natural a las flores hermafroditas de *K. grandiflora* puede deberse al tamaño mayor de sus corolas, ya que es sabido que éste es uno de los factores más importantes en la atracción de los polinizadores (Ashman y Stanton 1991, Williams et al 2000). Es poco probable que los polinizadores se hayan visto atraídos por un mayor despliegue floral de los hermafroditas, debido a que no hemos encontrado diferencias significativas en la producción de flores entre morfos (Cuevas et al. 2005). Uno de los factores que pudo influir en la

mayor duración de las visitas es la presencia de polen en las flores hermafroditas (Harder 1990). Además, es sabido que en varias especies ginodioicas las flores hermafroditas producen una mayor cantidad de néctar o concentración de azúcares en su néctar, lo que puede aumentar el tiempo y número de visitas a las flores hermafroditas (Ashman y Stanton 1991, Delph y Lively 1992, Delph 1996). En el futuro, se requiere estimar la producción y composición del néctar en ambos morfos de *K. grandiflora* para conocer el posible papel que puede jugar el néctar en la atracción de los polinizadores.

El no haber detectado limitación por polen en las hembras ni relación entre la frecuencia relativa de los morfos y su adecuación puede deberse a varios factores. Por un lado, el flujo genético no parece estar limitado a una escala local ya que los polinizadores fueron capaces de desplazarse entre las poblaciones experimentales (100 m) y visitar a las flores pistiladas. Es probable que la presencia de néctar, aumentara las visitas a las flores pistiladas. Por el contrario, en *Silene vulgaris* en donde se ha detectado la acción de la SDF, a una escala similar a la utilizada en este experimento, la falta de recompensas en las flores pistiladas pudo disminuir las

visitas a dichas flores (McCauley y Brock 1998).

El hecho de que la polinización de las hembras de *K. grandiflora* sea menos exitosa cuantitativamente, concuerda con la falta de compensación detectada durante 2001 en dos poblaciones naturales (Cuevas et al. 2005). Sin embargo, aunque el número de granos de polen por visita que recibe una flor pistilada es menor, es probable que sean de una mayor calidad “genética” al venir forzosamente de una o más plantas. Por el contrario, las flores hermafroditas al poder autofecundarse sin la mediación de polinizadores y dado que una planta puede tener varias flores abiertas por día (Cuevas et al. 2005), sugiere muy probablemente que la autofecundación estricta o por geitonogamia es un evento común. Por lo tanto, es probable que las ventajas reproductivas de las hembras en *K. grandiflora* se presenten durante la sobrevivencia de las plántulas. Estudios posteriores requieren estimar la tasa de autofecundación y la sobrevivencia de la progenie producto de cruza controladas para entender el mantenimiento de las hembras en las poblaciones de *K. grandiflora*.

La posibilidad de que las hembras recibieran granos de polen de una mejor

“calidad genética”, aunado al número reducido de óvulos por flor (diez) pudo contribuir a que las flores pistiladas que se encontraban en poblaciones con una alta frecuencia de hembras produjeran una cantidad similar de frutos que los hermafroditas. Una situación similar se reportó en *Daphne laureola*, donde las plantas que se encontraban en poblaciones con la máxima frecuencia de hembras tuvieron el mayor éxito reproductivo. En *Daphne laureola* se propone que la diferencia entre poblaciones en cantidad de recursos o la temperatura, pudo limitar más la producción total relativa de frutos por morfo que las diferencias de los polinizadores (Alonso 2005). En *K. grandiflora*, la SDF podría actuar a una escala mayor a la utilizada en el experimento, como serían los extremos de la distribución natural de *K. grandiflora* donde las probabilidades de que las hembras se encuentren aisladas de los polinizadores son mayores. Esta situación podría explicar las bajas frecuencias de hembras que hemos detectado en el límite sur de la distribución de *K. grandiflora* ( ver Capítulo II). Finalmente, es probable que la escala a la que se desarrolló el experimento, las recompensas de las flores pistiladas, el gran movimiento de los polinizadores y la calidad

del polen que reciben las hembras, hayan encubierto el efecto de la SDF.

### Agradecimientos

Queremos expresar nuestro sincero agradecimiento a José Martínez quien colaboró en el trabajo de campo durante el desarrollo de este trabajo. Anabel Martínez, Ma. de los Angeles Quintana y Ricardo Gutiérrez por su colaboración en las observaciones de los polinizadores.

### Literatura citada

- Alonso, C. 2005. Pollination success across an elevation and sex ratio gradient in gynodioecious *Daphne laureola*. *Am. J. Bot.* 92: 1264-1269.
- Ashman, T. y M. Stanton. 1991. Seasonal variation in pollination dynamics of sexually dimorphic *Sidalcea oregana* spp. *spicata* (Malvaceae). *Ecology* 72: 993-1003.
- Ashman, T., Swetz, J y Shivitz, S. 2000. Understanding the basis of pollinator selectivity in sexually dimorphic *Fragaria virginiana*. *Oikos* 90: 347-356.
- Ashman, T., Bradburn, M., Cole, D., Blaney, B. y Raguso, R. 2005. The scent of a male: the role of floral volatiles in pollination of a gender dimorphic plant. *Ecology* 86: 2099-2105
- Castillo, R. A; Cordero, C. y Domínguez, C.A. 2002. Are reward polymorphisms subject to frequency and density dependent selection? Evidence from a monoecious species pollinated by deceit. *J. Evol. Biol.* 15: 544-552.
- Cazier M. y E. Linsley. 1974. Foraging behavior of some bees and wasps at *Kallstroemia grandiflora* flowers in southern Arizona and New Mexico. *American Museum Novitates* 2546: 1-20.
- Cazier M. y E. Linsley. 1975. Bee and wasp visitors to *Kallstroemia grandiflora* after two years of drought. *The Pan-Pacific Entomologist* 51:248-253.
- Cuevas, E., Márquez-Guzmán, J., Domínguez, C.A, y Molina-Freaner, F. 2005. Evidence of gynodioecy in *Kallstroemia grandiflora* (Zygophyllaceae): microsporogenesis in hermaphrodite and female plants and lack of reproductive compensation. *Internacional Journal of Plant Sciences* 166:481-491.
- Delph L.F. 1996. Flower size dimorphism in plants with unisexual flowers. Pages 217-237 en

- DG Lloyd, SCH Barrett, eds. *Floral Biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants*. Chapman and Hall, New York, USA.
- Delph, L. y C. Lively. 1992. Pollinator visitation, floral display and nectar production of the sexual morphs of a gynodioecious shrub. *Oikos* 63: 161-170.
- Eckhart, V. 1992. Spatio-temporal variation in abundance and variation in foraging behavior of the pollinators of gynodioecious *Phacelia linearis* (Hydrophyllaceae). *Oikos* 64: 573-586.
- Fisher, R.A 1958. *The genetical theory of natural selection*, Oxford university press.
- Graff, A. 1999. Population sex structure and reproductive fitness in gynodioecious *Sidalcea malviflora malviflora* (Malvaceae). *Evolution* 53: 1714-1722.
- Harder, L. 1990. Behavioral responses by bumble bees to variation in pollen availability. *Oecologia* 85: 41-47.
- Heuch, I. 1979. Equilibrium populations of heterostylous plants. *Theoret. Pop. Biol.* 15: 43-57.
- Lloyd, D. 1974. Theoretical sex ratios of dioecious and gynodioecious angiosperms. *Heredity* 32: 11-34.
- McCauley, D y D. Taylor. 1997. Local population structure and sex ratio: evolution in gynodioecious plants. *Am. Nat.* 150: 406-419.
- McCauley, D y M. Brock 1998. Frequency-dependent fitness in *Silene vulgaris*, a gynodioecious plant. *Evolution* 52: 30-36.
- Osorio-Beristain M, C.A Domínguez, L.E Eguiarte, y B. Benrey 1997. Pollination efficiency of native and invading africanized bees in the tropical dry forest annual plant, *Kallstroemia grandiflora* Torr ex Gray. *Apidologie* 28: 11-16.
- Porter, D. 1969. The genus *Kallstroemia* (Zygophyllaceae). *Contrib. Gray Herbarium, Harvard Univ.* 198: 41-153.
- Ramsey, M. y G. Vaughton. 2002. Maintenance of gynodioecy in *Wurmbea biglandulosa* (Colchicaceae): gender difference in seed production and progeny success. *Plant Systematics and Evolution.* 232: 189-200.
- Shreve, F 1964. Vegetation of the Sonoran desert. Pages 9-186 in F Shreve, IL Wiggins, eds. *Vegetation and flora of the Sonoran desert*. Stanford University Press, Stanford, California, USA.
- Widén, M. 1992. Sexual reproduction in a clonal, gynodioecious herb *Glechoma hederaceae* *Oikos* 63: 430-438.
- Williams, C., Kuchenreuther, A y Drew A. 2000. Floral dimorphism, pollination, and self-fertilization in gynodioecious *Geranium richardsonii* (Geraniaceae). *Am.J Bot.* 87: 661-669.



## DISCUSIÓN GENERAL

Uno de los principales determinantes de la estructura genética de las poblaciones de plantas es el sistema de apareamiento (Brown 1989). A diferencia de las especies hermafroditas donde se ha demostrado el efecto de éste en la estructura genética (Schoen 1982, Hamrick y Godt 1996), en las especies ginodioicas no existe prácticamente evidencia del efecto de la frecuencia de hembras en la estructura genética. Por lo tanto, una de las principales aportaciones del presente trabajo fue el haber encontrado que la frecuencia de hembras tiene una clara influencia en la estructura genética de las poblaciones de *K. grandiflora*. Principalmente en términos de la disminución de la deficiencia de heterócigos, lo que concuerda con las predicciones teóricas. Además, la deficiencia de heterócigos fue menor en las hembras que en las hermafroditas, como se esperaría si la herencia de la esterilidad masculina fuera N-C (Tarayre y Thompson 1997). Finalmente a pesar de que el objetivo central no fue inferir la filogeografía de las poblaciones, pudimos explorar algunas hipótesis relacionadas con los eventos históricos de colonización, dada la amplia distribución latitudinal que presenta *K. grandiflora*. Estos resultados concuerdan con las hipótesis históricas con relación a los eventos de colonización a partir de un refugio sureño. Sin embargo se requiere de estudios posteriores que utilicen marcadores moleculares que nos den mayor poder de inferencia sobre la colonización y la filogeografía de las poblaciones de *K. grandiflora*.

### Herencia de la esterilidad masculina

Uno de los aspectos fundamentales para entender el mantenimiento de las hembras de una especie ginodioica, consiste en determinar la forma en que se transmite la esterilidad masculina. Al inicio de esta investigación, se comenzó un estudio para inferir la herencia de la esterilidad masculina en *K. grandiflora*. Sin embargo, no fue posible concluirlo por las dificultades relacionadas con la germinación de las semillas. A pesar de que se realizaron prácticamente todos

los tratamientos conocidos para romper la latencia de las semillas (escarificaciones físicas y químicas, variaciones de temperatura, luz, etc.) no fue posible conseguir que germinaran. Por lo tanto, las aproximaciones que tenemos acerca de la herencia de la esterilidad masculina son correlativas. No obstante, los datos que tenemos hasta ahora sugieren que la herencia de la esterilidad masculina de *K. grandiflora* es núcleo-citoplasmática. En primer lugar, el estudio embriológico mostró que las anormalidades en el tejido del tapete de las anteras de flores pistiladas de *K. grandiflora*, son similares a las reportadas en especies con esterilidad masculina N-C. En segundo lugar, no encontramos evidencia de compensación reproductiva (Capítulo I y III) a pesar de lo cual hemos detectado una alta frecuencia de hembras en algunas poblaciones. Estos resultados se aproximan más a las predicciones de los modelos N-C, los cuales presentan situaciones menos restrictivas para el mantenimiento de las hembras que los modelos nucleares de la esterilidad masculina. Por último, la deficiencia de heterócigos ( $F_{is}$ ) de las hembras fue menor que la de hermafroditas, como se esperaría si la herencia de la esterilidad tuviera un componente materno, en donde las probabilidades de que una hembra deje hembras en su descendencia son mayores.

### **Mantenimiento de hembras y compensación reproductiva**

Se ha propuesto que las hembras podrían mantenerse en las poblaciones produciendo más semillas y/o de una mejor calidad que las de las hermafroditas. Esta situación se podría alcanzar a través de la compensación reproductiva mediante la reasignación de recursos y/o al reducir la probabilidad de que se expresen los efectos de la depresión endogámica. En términos generales los modelos que incluyen un componente materno en la herencia de la esterilidad masculina, presentan situaciones menos restrictivas que los modelos nucleares respecto al mantenimiento de las hembras. Es decir, bajo los modelos N-C, las hembras no requieren tener una fertilidad relativa tan elevada ni las hermafroditas una tasa de autofecundación y de depresión endogámica

tan alta. En *K. grandiflora* no detectamos ninguna evidencia de compensación en términos de la producción de semillas, o su peso (Capítulo I y III). Sin embargo pueden estar presentes otros mecanismos compensatorios relacionados con la sobre vivencia de las plántulas. De ser así, es muy probable que lo que favorezca la permanencia de las hembras en las poblaciones de *K. grandiflora* sea la combinación de la tasa de autofecundación y de depresión endogámica de las hermafroditas como se ha reportado en otras especies ginodioicas (Molina-Freaner y Jain 1993, Medrano et al. 2005, Weller y Sakai 2005). Un dato que apoya esta propuesta, son los valores de deficiencia de heterócigos ( $F_{is}$ ) los cuales sugieren que existe cierto grado de endogamia en todas las poblaciones estudiadas, posiblemente como resultado de eventos de autofecundación (Capítulo II). Sin embargo, se requiere estimar la tasa de autofecundación de poblaciones naturales analizando la progenie de plantas hermafroditas de poblaciones con distinta frecuencia de hembras. A su vez, con los valores de la tasa de autofecundación, podríamos tener una estimación indirecta de los valores de la depresión endogámica (Kohn y Biardi, 1995, Medrano et al. 2005). Posteriormente, asumiendo que no hay compensación podríamos calcular si con los valores de la tasa de autofecundación y de depresión endogámica son suficientes para mantener a las hembras suponiendo una herencia N-C. Con estos datos estaremos más cercanos a entender los factores que mantienen a las hembras en las poblaciones de *K. grandiflora*.

### **Distribución de la frecuencia de hembras**

En este trabajo encontramos que la frecuencia de hembras tiene una relación positiva con la latitud. En algunas especies ginodioicas se ha reportado una mayor frecuencia de hembras en ambientes más secos o sitios más pobres. Existe una hipótesis que plantea que en estos sitios, la limitación de recursos puede afectar la capacidad de mantener la función femenina de las hermafroditas, por lo que su adecuación en relación con la de las hembras puede ser menor (Alonso y Herrera 2001, Asikainen y Mutikainen 2003). En el caso de *K. grandiflora* en términos generales las poblaciones del norte se encuentran en un ambiente más seco y posiblemente con un mayor estrés ambiental. Sin embargo, no hemos detectado que las hembras tengan una mayor ventaja en fecundidad como se esperaría bajo esta hipótesis. Otra posible explicación es que debido a que las poblaciones nortefías presentan una menor variación genética (Capítulo II), los efectos de la depresión endogámica en las plantas hermafroditas de estas poblaciones sean mayores. Por el contrario, las hembras al tener forzosamente que entrecruzarse, su adecuación estaría libre de tales efectos. Para poner a prueba esta hipótesis necesitaríamos una estimación de los niveles de depresión endogámica en las poblaciones del norte y sur del país.

Por otro lado, el estudio en el futuro de las poblaciones que se encuentran en el límite norte de la distribución de *K. grandiflora* (al sur de los Estados Unidos), puede ayudarnos a entender si la frecuencia de hembras sigue aumentando o si disminuye. En el caso de que la frecuencia de hembras disminuya en Arizona, es posible que las poblaciones del norte de México, donde hemos encontrado la frecuencia más alta de hembras, formen parte de una zona híbrida como se ha propuesto en *Nemophila menziesii* (Barr 2004). Además, al incluir las poblaciones de Arizona sabremos si la disminución de la heterocigosis esperada ( $H_e$ ), que hemos detectado conforme aumenta la latitud, se mantiene y por lo tanto se robustece la hipótesis de la colonización a partir de un refugio sureño.

Por último, una de las características más notables de las poblaciones norteñas de *K. grandiflora* es la presencia de varios polimorfismos florales, principalmente en el color de corolas, anteras y granos de polen y el tamaño de los estambres de las flores pistiladas. En el futuro, se puede explorar si existe alguna relación entre dichos polimorfismos florales, las visitas de los polinizadores y el éxito reproductivo de las plantas.

### **Los polinizadores y la frecuencia relativa de los morfos**

A diferencia de otras especies ginodioicas donde los polinizadores discriminan a las flores hembras, las de *K. grandiflora* fueron visitadas regularmente como lo muestra la tasa de visitas (Capítulo III), lo que se tradujo en una alta producción de frutos. Por otra parte el no haber encontrado un efecto claro de la frecuencia relativa local de los morfos y los componentes reproductivos evaluados, puede estar relacionado con el gran movimiento que presentan los polinizadores, lo que hace suponer que no existe una limitación local de polen. Por lo tanto, es probable que la selección dependiente de la frecuencia actúe a una escala mayor como podrían ser los límites de la distribución de *K. grandiflora*. De ser así esto podría ayudar a explicar la baja frecuencia de hembras que hemos detectado en estas poblaciones (Capítulo II).

## CONCLUSIONES

Con base en las similitudes embriológicas de *K. grandiflora* con especies con esterilidad N-C, la falta de compensación reproductiva detectada en las poblaciones y la menor deficiencia de heterócigos en las hembras, es muy probable que la herencia de la esterilidad masculina de *K. grandiflora* sea N-C. Los resultados del estudio embriológico muestran que en general la esterilidad masculina en *K. grandiflora* se presenta durante las primeras etapas del desarrollo de los granos de polen, aunque en ocasiones se pueden observar algunos granos no funcionales en etapas finales del desarrollo. Con relación al mantenimiento de las hembras hasta ahora no hemos encontrado evidencia de que exista algún mecanismo de compensación reproductiva y de existir, es posible que se presente durante la sobrevivencia y establecimiento de las plántulas. Por lo que en el futuro se requiere estimar la tasa de autofecundación y la depresión endogámica de las hermafroditas, por ser los mecanismos que probablemente mantienen a las hembras en las poblaciones. Por otro lado, este estudio mostró el claro efecto que tienen las hembras en la determinación de la estructura genética de las poblaciones de *K. grandiflora*. Además, encontramos que esta no depende únicamente del sistema reproductivo y que se requieren explorar hipótesis de tipo histórico. Finalmente, la variación local en la frecuencia relativa de los morfos no parece tener una influencia directa en los componentes de adecuación evaluados

## Bibliografía

- Asikainen, E. y Mutikainen, P. 2003. Female frequency and the relative fitness of females and hermaphrodites in gynodioecious *Geranium sylvaticum* (Geraneaceae). *Am. J. Bot.* 90: 226-234.
- Bellhassen, E., Dommée, B., Atlan, A., Gouyon, H. P., Pomente, P., Assouad, M. W y Couvet, D. 1991. Complex determination of male sterility in *Thymus vulgaris* genetical and molecular analysis. *Theor. Appl. Gen.* 82: 137-143.
- Brown A. 1989. Genetic characterization of plant mating systems En: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS. (eds). *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. Pp:145-162.
- Couvet, D., Bonnemaïson, F. y Gouyon, H.P. 1986. The maintenance of females among hermaphrodites: the importance of nuclear-cytoplasmic interactions. *Heredity* 57: 325-330.
- Couvet, D., Ronce, O. y Gliddon, C. 1998. The maintenance of nucleocytoplasmatic polymorphism in a metapopulation: The case of gynodioecy. *Am. Nat.* 152: 59-70.
- Dudle, D. A, Mutikainen, P. y Delph, L. 2001. Genetics of sex determination in the gynodioecious species *Lobelia siphilitica*: evidence from two populations. *Heredity* 86: 265-276.
- Hamrick, J. L y Godt, M. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*:1291-1298.
- Kohn, J. y Biardi, J. 1995. Outcrossing rates and inferred levels of inbreeding depression in gynodioecious *Cucurbita foetidissima* (Cucurbitaceae). *Heredity* 75: 77-83.
- Lewis, D. 1941. Male sterility in natural populations of hermaphrodite plants. *New Phytol.* 40: 56-63.

- Mogensen, H. 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. *Am J. Bot.* 83: 383-404.
- Molina-Freaner, F y Jain, S.K. 1993. Inbreeding effects in a gynodioecious population of the colonizing species *Trifolium hirtum* All. *Evolution* 47: 1472-1479.
- Schnable, P. y Wise, R. 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *TREE* 3 : 175-180.
- Schoen, D. 1982. Genetic variation and breeding system of *Gilia achilleifolia*. *Evolution* 36: 361-370.
- Uno, G. 1982. Comparative reproductive biology of hermaphroditic and male sterile *Iris douglasiana* herb. (Iridaceae). *Am. J. Bot* 69: 818-823.
- Weller, S. G. y Sakai, A. 2005. Selfing and resource allocation in *Schiedea salicaria* (Caryophyllaceae), a gynodioecious species. *J. Evol. Biol.* 18: 301-308.