



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLOGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

CONSECUENCIAS DEL SISTEMA DE CRUZA  
SOBRE LA VARIACIÓN GENÉTICA EN *DATURA*  
*LANOSA*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

**ILIANA RAMÍREZ KRAUSS**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN**

**MÉXICO, D.F.**

**JUNIO 2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## RECONOCIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT quien me brindó una Beca crédito para los estudios de Maestría durante el periodo de septiembre de 2000 a agosto de 2002 y a la Dirección General de Estudios Profesionales DEGP que me apoyó con una Beca complemento para los estudios de Maestría durante el periodo de septiembre de 2000 a junio de 2002.

La presente investigación fue financiada con fondos del proyecto SEP-CONACyT 42031/A titulado “**Evolución de la autogamia en *Datura stramonium***” otorgado al Dr. Juan Núñez Farfán.

Quiero agradecer particularmente a los miembros de mi comité Tutorial integrado por el Dr. Juan Núñez Farfán, el Dr. Alfonso Octavio Delgado Salinas y la Dra. María del Carmen Mandujano Sánchez; quienes me guiaron y estimularon durante mis estudios de Maestría y colaboraron con gran entusiasmo en la elaboración del presente estudio.

A esa pequeña brisa,  
suave, ligera y refrescante,  
que a pesar de ser tan efímera,  
tiene la fuerza suficiente para aclarar todos  
nuestros pensamientos...



# ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	6
<b>Evolución del sistema de apareamiento</b>	6
<b>Consecuencias de la evolución de la autogamia</b>	9
<b>Variación genética</b>	12
<i>Variación de la secuencia molecular</i>	12
<b>Depresión endogámica</b>	13
<b>Morfología floral</b>	14
<b>Asignación de recursos</b>	15
PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO	16
OBJETIVO	16
<b>Hipótesis</b>	17
MÉTODO	18
<b>Especie de estudio</b>	18
<b>Depresión por endogamia</b>	18
<b>Morfología floral y asignación de recursos a las diferentes estructuras florales</b>	19
<b>Variación genética en loci microsatélites</b>	20
<b>Análisis estadísticos</b>	21
RESULTADOS	22
<b>Variación entre familias en la producción de semillas por fruto</b>	22
<b>Variación entre tipos de cruza en la producción de semillas por fruto</b>	22
<b>Variación entre plantas en el tamaño de las flores y sus partes</b>	24
<b>Correlación entre atributos florales</b>	26
<b>Asignación de biomasa a diferentes atributos florales</b>	26
<b>Asignación polen:óvulos</b>	29
<b>Variación genética en loci microsatélites en <i>Datura lanosa</i> y tasa de entrecruzamiento</b>	30
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES	34
AGRADECIMIENTOS	35
LITERATURA CITADA	36
ANEXO 1: CONTEO DE POLEN Y ÓVULOS	43
ANEXO 2: EXTRACCIÓN DE ADN	43
ANEXO 3: REACCIONES DE AMPLIFICACIÓN	44
ANEXO 4: TÉCNICA DE MICROSATÉLITES	45



## RESUMEN

En el presente estudio se caracterizó el sistema de apareamiento de *Datura lanosa* a través de la estimación de la magnitud de la depresión endogámica, su variación genética y su asignación de biomasa a las diferentes estructuras florales. También se analizó la variación fenotípica de la morfología floral y la relación polen/óvulos como una medida descriptiva del sistema de apareamiento en las flores de la población de *Datura lanosa* de Batopilas, Chihuahua. Para determinar el sistema de apareamiento, se estudió la variación genética de la población usando dos loci microsatélites, obteniéndose la tasa de entrecruzamiento y experimentalmente se estimó la depresión endogámica y su relación con atributos fenotípicos florales y la producción de semillas. Los resultados mostraron que existe un efecto de la cruce sobre la producción de semillas por fruto, encontrándose una depresión endogámica del 21.6%. Existe variación en el tamaño de los atributos florales (cáliz, corola, androceo, gineceo, diámetro de la flor y hercogamia). Se encontraron elevadas correlaciones entre las estructuras florales medidas, indicando una alta integración fenotípica en los caracteres florales de *D. lanosa*, sin embargo, no se encontró una relación entre la producción de semillas y los caracteres florales. Los análisis de asignación de biomasa, sugirieron que *D. lanosa* es una planta *xenógama obligada*, sin embargo los análisis de la relación polen/óvulos indican que es *xenógama facultativa*. La tasa de entrecruzamiento promedio encontrada por medio de los loci de microsatélites fue del 84%, lo que indica que *D. lanosa* presenta un sistema de apareamiento mixto. Los resultados encontrados en *D. lanosa* son consistentes con los estudios previos en el género *Datura* que indican que las especies de flores pequeñas han evolucionado hacia la autogamia.

## INTRODUCCIÓN

En las plantas hermafroditas o cosexuales, existe la posibilidad de autofertilizarse (autogamia) y entrecruzarse (alogamia) (Wilson 1983). El *sistema de apareamiento* en plantas describe el origen genético de la progenie, es decir, el porcentaje de la progenie derivado de autofertilización (Sakai y Wesneat 2001, Barret 2002). La autofertilización y la fertilización cruzada entre individuos genéticamente distintos constituyen los extremos de los sistemas de apareamiento en plantas (Schemske y Lande 1985). La evidencia indica que la autogamia ha evolucionado de manera independiente en distintos linajes de plantas a partir de antepasados con entrecruzamiento. La evolución de la autogamia afecta la estructura y diversidad genética de las poblaciones y permite establecer varias predicciones sobre el resultado de la evolución del sistema de cruce. En primera instancia, (1) las especies o poblaciones con autogamia presentarán tamaños efectivos reducidos, menos genotipos a nivel local, y mayor diferenciación entre poblaciones que las especies o poblaciones con entrecruzamiento (Hedrick 2000). Asimismo, las mutaciones deletéreas pueden fijarse con mayor probabilidad en poblaciones endógamas y esto, aunado a la pérdida de diversidad genética, (2) reduce la adaptabilidad de las poblaciones. Por lo tanto, es de esperarse que la evolución de la autogamia (3) sea irreversible, y que los linajes a nivel intraespecífico con autogamia se estén produciendo (y extinguiendo) a partir de poblaciones con entrecruzamiento (Stebbins 1970).

Debido a que los individuos que se entrecruzan no contribuyen genéticamente a las progenes derivadas de autofertilización, y a que los individuos que se autofertilizan sí pueden contribuir tanto a las progenes derivadas de entrecruzamiento como de autofertilización (teniendo así una ventaja en la transmisión de genes a la siguiente generación), ocurre el llamado *costo del entrecruzamiento*. Aunado a esto, en condiciones de baja densidad de parejas o ausencia de polinizadores, sólo los individuos que se autofertilizan podrán dejar descendencia, lo que se conoce como “*garantía reproductiva*”. Estos dos fenómenos dan origen a la predicción de que (4) los individuos derivados de autogamia estarán sobrerrepresentados en las poblaciones locales, a menos que (5) los individuos derivados de entrecruzamiento sean superiores en *adecuación* que los derivados de endogamia (*depresión endogámica*).

El presente estudio forma parte integral del proyecto “Evolución de la endogamia en el género *Datura*” (CONACyT 2004), que pretende poner a prueba la hipótesis sobre la evolución del sistema de apareamiento en el género con un enfoque intra e interespecífico. Por lo anterior, en este estudio se presenta información sobre la magnitud de la depresión endogámica, diversidad genética y tasa de entrecruzamiento usando loci hipervariables (microsatélites), y variación en atributos florales (largo y diámetro de la corola, tamaños de cáliz, androceo, gineceo y hercogamia), y de asignación sexual de la especie *Datura lanosa* Barclay ex Bye.

### ANTECEDENTES

El sistema de apareamiento en plantas con flor (angiospermas) describe los patrones de polinización, fertilización y aborto de semillas (Wilson 1983), e involucra aquellos atributos de un organismo que determinan la manera en que los genes se transmiten a la siguiente generación. En plantas existen básicamente tres sistemas de apareamiento: **autogamia** (cuando el cigoto se forma por la unión de óvulos y polen del mismo individuo), **entrecruzamiento** (cuando un cigoto se forma por la unión de óvulos y polen de individuos genéticamente diferentes), y **mixto** (cuando la proporción de cigotos producidos por autogamia y entrecruzamiento es intermedia, es decir, valores de entrecruzamiento del 20% al 80% (Schemske y Lande 1985). Datos empíricos recientes muestran que casi la mitad ( $\approx 49\%$ ) de las angiospermas con polinización mediada por animales presentan sistemas de apareamiento mixto (Vogler y Kalisz 2001). A pesar de que en los últimos años se han hecho avances teóricos importantes para explicar la existencia y mantenimiento de sistemas de apareamiento mixtos en las poblaciones naturales, la evidencia experimental es aún escasa para apoyar las predicciones teóricas (Herlihy y Eckert 2002). La mayoría de los estudios disponibles han estimado sólo alguno de los parámetros relevantes del sistema de apareamiento. Por lo tanto, la validación de los modelos no ha sido posible.

### Evolución del sistema de apareamiento

Los modelos teóricos predicen que la autogamia se incrementará rápidamente en las poblaciones si, y solo si, los individuos que se autofertilizan también se entrecruzan. Es decir, acumulan una ganancia extra (aportada por la autofertilización) en la producción de

progenie comparados con aquellas plantas que sólo se entrecruzan (Fisher 1941). Esta ventaja de los autógamos, no obstante, desaparece si las progenies derivadas de entrecruzamiento tienen una adecuación (*i.e.*, éxito reproductivo, supervivencia) de más del doble de la adecuación de las progenies derivadas de endogamia (Maynard-Smith 1977, Schemske y Lande 1985, Uyenoyama *et al.* 1993). La reducción en la adecuación de los individuos producidos por autogamia puede ocurrir por la expresión de genes deletéreos o letales en alguna de las etapas del ciclo de vida, y se conoce como *depresión endogámica* (Husband y Schemske 1996). Se ha considerado que la depresión por endogamia es la única causa que controla la evolución del sistema de apareamiento en plantas, el modelo de Lande y Schemske (1985) predice que los sistemas evolutivamente estables (*i.e.*, aquéllos que no pueden ser desplazados de la población si ciertas condiciones se cumplen) son precisamente los sistemas extremos: *entrecruzamiento obligado* (*outcrossing*) y *autogamia* (*selfing*); los sistemas *mixtos* aparecen, bajo este modelo, como una transición en la evolución hacia uno u otro extremo. Sin embargo, la existencia de muchas poblaciones con sistema de apareamiento mixto (Vogler y Kalisz 2001), ha llevado a cuestionar el modelo descrito y a la construcción de modelos dinámicos que predicen sistemas de apareamiento mixto evolutivamente estables (Holsinger 1991, Uyenoyama 1986, Lloyd y Schoen 1992, Yahara 1992, Chang y Rausher 1999). Sin embargo, los supuestos y predicciones de tales modelos no han sido completamente validados de manera experimental. Actualmente se reconocen varios parámetros importantes en los estudios teóricos que podrían afectar la evolución del sistema de apareamiento o cruza: la depresión endogámica ( $\delta$ ), tasa de entrecruzamiento ( $t$ ), tasa de autofertilización ( $s$ ), el costo del entrecruzamiento ( $c$ ), y la garantía reproductiva (Lloyd y Schoen 1992, Chang y Rausher 1999).

La posibilidad de variación intraespecífica en la presión selectiva mediada por polinizadores es explícitamente incorporada en el modelo de evolución de los sistemas de apareamiento de Schoen y Lloyd (1992), bajo el nombre de “*garantía reproductiva*”. La garantía reproductiva es la capacidad de asegurar la producción de semillas por medio de la autopolinización en ausencia de polinizadores y/o parejas potenciales. En este contexto, si existe garantía reproductiva el sistema de apareamiento de autopolinización se verá favorecido, y por lo tanto la variación en los sistemas de apareamiento en poblaciones naturales puede deberse a diferencias en los escenarios ecológicos (ausencia de

polinizadores). A pesar del reconocimiento, al menos teórico, de la garantía reproductiva en la evolución de los sistemas de apareamiento, pocos estudios experimentales la han evaluado (Schoen *et al.* 1996, Herlihy y Eckert 2002). Dado que la garantía reproductiva (las plantas que se autofertilizan proporcionan suficiente polen para producir semillas) no requiere de la presencia de polinizadores, se espera que todas aquellas estructuras reproductivas de atracción o recompensa para los polinizadores, que representen un costo para la planta, evolucionen (es decir, se *reduzcan o desaparezcan*), siempre y cuando no existan restricciones genéticas (*i.e.*, ausencia de variación genética o correlaciones genética elevadas entre caracteres) (Busch 2005). Existe evidencia de que la pérdida de *auto-compatibilidad* en algunas poblaciones se correlaciona con cambios en el tamaño de las estructuras florales y asignación sexual, así como reducción en la variación genética (Busch 2005, Caruso *et al.* 2003).

Varios estudios indican que el número y tamaño de las flores favorecen el entrecruzamiento. Estructuras florales grandes favorecen el entrecruzamiento si incrementan la tasa de visita de polinizadores (Bell 1985) y la exportación de polen. Por lo tanto, la inversión en la función en estructuras de atracción como la corola debería *decrecer* conforme la tasa de autogamia se incrementa (Schoen 1982, Charnov 1982, Morgan y Barrett 1989). De esta forma, los estudios sobre el sistema de apareamiento debieran incluir el análisis de la inversión sexual ante el componente masculino como al componente femenino, así como de la recompensa para los polinizadores y estructuras de atracción (Cohen y Shmida 1993).

El costo energético en la producción e incremento en el tamaño de la flor podría reducir los beneficios en adecuación obtenidos por entrecruzamiento (Robertson y Lloyd 1991; Orzack 2001). Sin embargo, la evidencia sugiere que no existen costos asociados a la inversión en caracteres florales (Andersson 1996). Por ello es necesario estimar la magnitud y el efecto de la selección sobre caracteres reproductivos en poblaciones con valores constantes de estas características, para afirmar su valor adaptativo. Debido a que la interacción con polinizadores puede incrementar el costo de la reproducción, es necesario evaluar el costo de los atributos florales de atracción (Mothershead y Marquis 2000, Steets y Ashman 2004). Hasta ahora pocos estudios han evaluado el valor adaptativo del tamaño de la flor y su relación con el ambiente biótico (interacción planta-polinizador). Estos

estudios permitirían determinar el costo y beneficio del entrecruzamiento y su relación con atributos reproductivos (*e.g.*, hercogamia, tamaño floral, despliegue floral, asignación a la función macho y hembra en individuos hermafroditas), en términos de adecuación cuando los ambientes varían en su disponibilidad de polinizadores.

### **Consecuencias de la evolución de la autogamia**

Cualquiera que sea el factor que favorezca la evolución de la autogamia en una población, la teoría de la genética de poblaciones predice que ésta tendrá las siguientes consecuencias a nivel poblacional:

1. *Reducción de la heterocigocis.* La autofertilización incrementa la frecuencia de individuos homocigotos para todos los loci, a expensas de una reducción en la frecuencia de heterocigotos ( $H$ ) que es un estimador de la diversidad genética de las poblaciones. En consecuencia, se espera una reducción en los niveles de heterocigosis en las poblaciones con mayor nivel de autogamia (Hedrick 2000).

2. *Reducción en el tamaño efectivo de la población.* El tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ) es el número de individuos que se reproducen en una población. Cuando existe endogamia, el tamaño efectivo de la población se reduce conforme a la siguiente ecuación (Hedrick 2000):

$$N_e = N/1+f$$

Donde:  $N_e$  = Tamaño efectivo de la población

$N$  = Tamaño poblacional

$f$  = Coeficiente de endogamia

Por ejemplo, cuando el coeficiente de endogamia es 1, el tamaño efectivo de la población se reduce a la mitad ( $1/2N_e$ ). En otras palabras, conforme el coeficiente de endogamia incrementa la varianza genética se reduce, lo que incrementa la probabilidad de que dos individuos que se aparean sean genéticamente similares, por lo tanto, al incrementarse la frecuencia de los homocigotos se reduce el número de genotipos totales en la población. Aún cuando ecológicamente el entrecruzamiento sea común, genéticamente podría no tener consecuencias sobre la adecuación si la población posee una historia de endogamia.

3. *Diferenciación entre poblaciones.* Con la fijación de distintas variantes alélicas entre poblaciones por autogamia, la diferenciación genética entre ellas se incrementará y cada población contendrá un acervo genético particular.

4. *Fijación de alelos deletéreos.* La endogamia hace factible que mutantes nocivos alcancen frecuencias altas en las poblaciones, lo que puede reducir la viabilidad de las poblaciones. No obstante, la “*purga*” de genes tendería a reducir la magnitud de los efectos nocivos a través del tiempo (Barrett y Charlesworth 1991, Byers y Waller 1999).

5. *Pérdida de respuesta a cambios ambientales.* La reducción en la varianza genética aditiva en rasgos del sistema de apareamiento y en otros asociados a la adecuación, reducen la capacidad de respuesta a la selección natural de las poblaciones ante cambios en el ambiente (Falconer y Mackey 1989).

6. *Irreversibilidad de la autogamia.* La varianza fenotípica de una población se divide en varianza genotípica ( $V_G$ ) y la varianza ambiental ( $V_E$ ) (Falconer y Mackey 1989, Maynard-Smith 1998).

$$V_P = V_G + V_E$$

$$V_G = V_A + V_D + V_I$$

Donde:  $V_G$ = Varianza Genética

$V_A$ = Varianza genética aditiva (suma de los efectos de los genes)

$V_D$ = Varianza de dominancia (resultado de los efectos de genes dominantes)

$V_I$ = Varianza de la Interacción o varianza de epistasis (las interacciones epistáticas son aquellas en las cuales el fenotipo o la adecuación de un genotipo en un locus depende del genotipo de uno o mas loci distintos)

La varianza genética aditiva es el componente de la varianza que provoca un efecto aditivo en el fenotipo (suma de los alelos que provocan un cambio fenotípico en la progenie) y por lo tanto es la varianza sobre la cual actúa la selección. En una población endógama la varianza genética aditiva se reduce debido a la fijación de alelos que resultan en una poza génica homogénea y son idénticos por descendencia, como resultado, los

heterocigotos se reducen o se pierden, disminuyendo así el efecto aditivo de los alelos que los componen. La ausencia de variación genética aditiva en los atributos florales relacionados al sistema de apareamiento evita que el entrecruzamiento pueda evolucionar de poblaciones con autogamia (Sttebins 1954), es decir, en poblaciones bajo autogamia se espera que se reduzcan los heterocigotos, se fijen los genes, y se reduzca la varianza genética aditiva, incluyendo aquellos de atributos florales relacionados al sistema de apareamiento, por lo que no habría posibilidad de combinaciones genéticas distintas de atributos florales relacionados a la entrecruza y su posterior selección.

La teoría del sistema de apareamiento y la evidencia morfológica sugieren que la evolución de especies con autopolinización a partir de ancestros con entrecruzamiento es una transición evolutiva frecuente y rápida en las plantas (Holsinger 2000, Takebayashi y Morrell 2001). Debido a la ventaja automática (Jain 1976) y a la existencia de la garantía reproductiva en ausencia de polinizadores o parejas potenciales (Schoen y Lloyd 1992), la evolución de la autogamia es común en distintos linajes de plantas, como entre distintas poblaciones de una especie, particularmente en especies hermafroditas que ocupan hábitats contrastantes (*cf.* Busch 2005). En la ventaja automática, los alelos que fomentan la autofertilización tienen una ventaja de transmisión de 3 copias de genes de 2 en relación con uno que promueve la fertilización cruzada es decir, las plantas hermafroditas que se autopolinizan y entrecruzan transmiten tres copias de genes a la siguiente generación, dos al entrecruzarse (una por vía materna y otra por vía paterna) y otra copia de genes paternos al fecundar sus propios óvulos. En cambio, las plantas que solo se entrecruzan transmiten dos copias de genes (una por vía materna y otra por vía paterna) (Fisher 1941).

Sin embargo, pocos estudios han abordado desde una perspectiva (i) experimental el estudio de la evolución del sistema de apareamiento analizando los distintos parámetros ecológicos y genéticos, y (ii) filogenético, considerando la variación intraespecífica y las relaciones genealógicas entre las poblaciones.

El presente estudio analiza el sistema de apareamiento de *Datura lanosa*, a través de la variación en los caracteres morfológicos florales, la diversidad genética, la asignación sexual y la magnitud de la depresión endogámica. Debido a que estos componentes, que definen el sistema de apareamiento, muestran variación, las presiones selectivas que actúan

sobre dicha variación pueden llevar a muchos cambios evolutivos y por lo tanto, asumir un gradiente en los sistemas de apareamiento, que puede ir desde la autofecundación hasta la entrecruza, pasando por sistemas intermedios (mixtos) dependiendo del escenario ecológico, y que pueden ser considerados como evolutivamente estables (Lande y Schemske 1985, Holsinger 1991). Así, entender la ecología evolutiva del sistema de apareamiento puede ayudar a interpretar el significado de esta variación y proveer nuevas ideas relacionadas a este fenómeno.

### **Variación genética**

La estructura genética de una especie comprende la identidad y frecuencia de los genotipos en las poblaciones y su distribución. El *sistema reproductivo* se considera como una fuerza predominante en conformar la estructura genética en especies de plantas, pues afecta el sistema de apareamiento (Hamrick y Godt 1990). Las especies de plantas herbáceas son predominantemente autógamas o de sistema mixtos, mientras que las plantas perennes son generalmente de entrecruzamiento. Esto tiene como consecuencia que las poblaciones de plantas herbáceas posean niveles elevados de diferenciación genética entre poblaciones y endogamia local. A pesar de que las plantas poseen mecanismos que fomentan el entrecruzamiento (como la depresión por endogamia, la hercogamia, los genes de autoincompatibilidad), las plantas autocompatibles se autopolinizan, y por lo tanto la endogamia puede evolucionar bajo ciertas circunstancias ecológicas (Baker 1965, Stebbins 1970). La evolución de los sistemas de autofertilización a partir de ancestros de entrecruzamiento es una de las transiciones evolutivas más comunes entre las plantas con flores (Lloyd 1965, Stebbins 1970, Wyatt 1983, Hill y Lord 1990).

### ***Variación en la secuencia molecular***

Aunque se han realizado estudios en el género *Datura* para determinar la cantidad de variación genética en poblaciones de especies con autofecundación y entrecruzamiento utilizando como marcador genético a loci isoenzimáticos, los resultados no han sido satisfactorios debido a que este método no es lo suficientemente fino y no logra detectar la variación existente a nivel de ADN (Núñez-Farfán 1991, cf. Jiao *et al.* 2002). Se ha visto que los loci de microsatélites son un tipo de marcador genético altamente polimórfico y es

apropiado para detectar variación genética entre poblaciones, debido a que poseen más alelos y heterocigocidad. Una ventaja de los microsatélites es que al poder obtener la heterocigocidad individual promedio y su relación con el nivel de endogamia, se puede calcular la tasa de entrecruzamiento poblacional o la tasa de autogamia (Goldstein y Scholötterer 1999).

### **Depresión endogámica ( $\delta$ )**

Desde Darwin (1859) sugiere que la progenie producida por cruza entre individuos emparentados o por autopolinización es generalmente menos vigorosa y fecunda que aquella producida por individuos genéticamente distintos; este fenómeno se conoce como la *Ley de Darwin-Knight* o bien *Depresión endogámica*. La depresión endogámica se define como la reducción en la viabilidad y la fertilidad de la progenie resultante de endogamia ( $W_S$ ) comparada con la progenie resultante de entruzamiento ( $W_O$ ) (Barret 2002, Sakai y Wesneat 2001) y es expresada de la siguiente manera:

$$(\delta) = 1 - (W_S/W_O).$$

Se puede medir comparando un componente de adecuación (por ejemplo, producción de semillas) de la progenie derivada de cruza endógamas (entre parientes o autopolinización) con la progenie derivada de entruzamiento (Lande y Schemske 1985, Charlesworth y Charlesworth 1987). La depresión endogámica puede tomar valores desde 1 ( $W_S = 0$ ) a números negativos ( $W_S > W_O$ ) (Lande y Schemske 1985).

Cuando ocurre la depresión endogámica, los caracteres que son componentes de la adecuación muestran una reducción en el promedio fenotípico bajo endogamia, mientras que los caracteres que no están estrechamente ligados con la aptitud muestran poco o ningún cambio (Solbrig 1976).

La depresión endogámica puede ser explicada por dos hipótesis: 1) Debido a que genes recesivos deletéreos en condición homóciga se manifiestan fenotípicamente en la muerte de los embriones o de los individuos, o bien porque éstos no alcanzan la fase reproductiva o tienen fecundidad baja (*hipótesis de la dominancia*). 2) Debido a la pérdida de las ventajas del “*vigor híbrido*” o *heterosis* en genotipos asociados con la adecuación; cuando hay heterosis, los individuos heterocigotos manifiestan un valor fenotípico superior al de los individuos homocigotos (*hipótesis de la sobredominancia*). Se ha observado que

las líneas altamente endogámicas reducen su adecuación, pero la cruce entre líneas altamente endogámicas produce híbridos con valores fenotípicos superiores al de los progenitores endógamos. Por lo tanto, en ausencia de variación intralocus, algunas especies pueden perder las ventajas potenciales que confiere la heterosis cuando ocurre la endogamia (Wright 1977, Barrett y Charlesworth 1991).

En el contexto de selección a corto plazo, la depresión endogámica es el resultado de homocigocisis en alelos letales o deletéreos y es un factor importante en mantener el entrecruzamiento en poblaciones naturales (Lande y Schemske 1985). Sin embargo, la depresión endogámica evoluciona en las poblaciones, y su magnitud es resultado de la composición genética de la población y la selección sobre ésta; por lo tanto cualquier factor que reduzca la depresión endogámica favorece la evolución de la autogamia, por ejemplo, en el caso de escasez de polinizadores (Cuguen y Acheroy 1989). La hipótesis de la sobredominancia supone que el funcionamiento de los heterocigotos es superior al de los homocigotos. Desde esta perspectiva, la depresión endogámica es el resultado de que la endogamia disminuya la frecuencia de genotipos heterocigotos y por lo tanto, influye en promedio poblacional de caracteres métricos (Falconer y Mackay 1999)

### **Morfología floral**

La arquitectura floral, la posición de los órganos sexuales dentro de la flor y el tiempo de maduración de polen y óvulos, influyen en el éxito de apareamiento de un individuo. Existen algunos mecanismos florales que evitan la autofecundación, como la *hercogamia* y *dicogamia*. La dicogamia es la separación temporal de las funciones masculinas y femeninas en una misma flor. La hercogamia se refiere a la separación espacial de la función femenina y masculina en una flor perfecta. Estas dos características de la morfología floral influyen en la frecuencia de la autopolinización (Motten y Stone 2000). Las relaciones espaciales entre anteras y estigmas pueden afectar la eficiencia de la transferencia de polen durante la visita de los polinizadores (Dafni 1992). Aunque la hercogamia como tal está relacionada con el grado de entrecruza, no evita que la autofertilización ocurra (Belaousoff y Shore 1995). Webb y Lloyd (1986) describen los tipos de hercogamia que se encuentran en plantas. El tipo de hercogamia (denominado hercogamia positiva) donde el estigma sobresale más allá de la flor y generalmente se pone

en contacto con los polinizadores antes que las anteras, tiene una menor probabilidad de autopolinización. Cuando el estigma está por debajo de las anteras se conoce como hercogamia negativa. En estudios hechos con *D. stramonium* L. (Solanaceae) se ha encontrado que la tasa de entrecruzamiento se incrementa cuando aumenta la proyección del estigma sobre las anteras (Motten y Stone 2000).

### **Asignación de recursos**

La teoría de asignación de recursos predice que existe una cantidad de recursos finita para asignar a la reproducción, mantenimiento y crecimiento. Bajo esta teoría, la selección natural debería moldear las proporciones óptimas de asignación a la reproducción en cada población, si no hubiera restricciones genéticas y ecológicas (Shoen 1982). Esto se conoce como el principio de asignación. Las demandas que entran en conflicto producen las disyuntivas o “trade-offs” entre diferentes funciones: una planta puede usar un meristemo o un gramo de carbono para producir una flor o una hoja, pero no ambos simultáneamente. La mayoría de las proporciones invertidas en las plantas hermafroditas son significativamente distintas de 1:1 en las especies que se autopolinizan y se entrecruzan. Una dificultad particular en el contexto de las explicaciones de prueba para la evolución del hermafroditismo es saber como distinguir principalmente entre el reparto de energía de un sexo con respecto a otro partiendo de que ambos residen en el mismo individuo. (Roff *et al.* 2001)

Existen dos tipos de *trade-offs* que son virtualmente universales. 1) la disyuntiva entre reproducción y otras funciones, que se manifiesta por sí mismo en el costo de la reproducción. Las plantas que generalmente se autofertilizan característicamente invierten menos recursos en caracteres florales, como pétalos grandes y nectarios que aquellas que se entrecruzan (Ornduff 1969); y 2) una disyuntiva entre el tamaño y el número de la progenie (Brunet 1992, Silverstow 1993). Cualquier variable ambiental que cambie la relación entre la inversión para la progenie y la adecuación de la progenie podría cambiar también el tamaño óptimo de la progenie en una población (Fox *et al.* 2001). Por ejemplo, en poblaciones de trigo que han crecido en diferentes densidades, el número de espiga por planta varía 56 veces, el número de semillas de la planta varía 833 veces, y el número de granos por espiga 1.43 veces. Pero el peso medio por grano varía solo 1.04 veces. (Stearns

1992). La teoría de historia de vida predice que el número y el tamaño de la progenie producida en un simple evento reproductivo ha sido ajustada por la evolución para optimizar la adecuación individual, la selección natural favorece a los genotipos con un fenotipo que optimice la mayor diferencia entre beneficios y costos para lograr una mayor adecuación. Hipotéticamente, la diversidad de historias de vida en plantas podría ser el resultado de que el fenotipo óptimo varía dependiendo de las diferencias en las condiciones ecológicas entre ambientes, es decir, a partir de diferentes escenarios ecológicos, la asignación a los atributos florales pueden inclinarse hacia la función masculina o femenina en la planta (Bell 1985, Stearns 1992).

## PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

El motivo del presente estudio es caracterizar el sistema de apareamiento de *Datura lanosa* a través de estimar la magnitud de la depresión endogámica, su variación genética y su asignación sexual. También se describe el sistema de apareamiento a través analizar la variación fenotípica en la morfología floral y la asignación de recursos a los caracteres florales en la población de *D. lanosa* proveniente de Batopilas, Chihuahua, México.

La variación genética de la población se estimó usando dos loci microsatélites y experimentalmente se estimó la depresión endogámica y su relación con atributos fenotípicos florales, para determinar el sistema de apareamiento de esta especie de las Barrancas del Cobre en Chihuahua.

## OBJETIVO

Caracterizar el sistema de apareamiento en *Datura lanosa*, a través de los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estimar la magnitud de la depresión endogámica en la producción de semillas.
- 2) Determinar la asignación de recursos a diferentes estructuras florales, la morfología floral y la hercogamia de *D. lanosa* como evidencia correlativa para caracterizar el sistema de apareamiento.
- 3) Determinar la variación genética y tasa de entrecruzamiento poblacional en *D. lanosa*, suponiendo que toda la endogamia es por autofertilización.

## Hipótesis

Las flores de *D. lanosa* son visitadas por esfíngidos (Sphingidae: Lepidoptera) y su antesis es crepuscular y producen néctar. Éstos atributos florales están relacionados al sistema de apareamiento por entrecruzamiento debido a que su función es atraer a polinizadores, y aunque en esta especie no se ha evaluado explícitamente la relación de los atributos florales con la tasa de visita por los polinizadores, existe evidencia en otras especies del género que demuestra que ciertos atributo florales están relacionados a la visita por esfíngidos (Grant y Grant 1983, Barrett y Harder 1996, Guereinstein *et al* 2003, Thom *et al* 2004). Los estudios en el género *Datura* L. (Solanaceae) indican que la mayoría de las trece especies reconocidas (Barclay 1959, J. Núñez-Farfán, com. pers.), poseen flores

tubulares de tamaño grande, por lo que se espera un incremento en la asignación en atributos florales en especies con entrecruzamiento.

Asimismo, se ha encontrado variación en la magnitud de la depresión endogámica entre las especies (Zamudio 1999, Cruz-Escalante 1999) y en particular, dentro de poblaciones de *Datura stramonium* (Núñez-Farfán *et al.* 1996, Sosenski 2004), y donde generalmente las especies con flores grandes exhiben depresión por endogamia. Dado que la especie *Datura lanosa* Barclay ex Bye posee flores grandes, es de suponer que es una especie con entrecruzamiento y con depresión endogámica potencialmente alta.

Como la diversidad genética disminuye en poblaciones con endogamia, se espera que la magnitud de la depresión por endogamia disminuya en poblaciones con autopolinización (Charlesworth y Charlesworth 1987), por lo tanto, de acuerdo con las características morfológicas de *D. lanosa*, se espera encontrar un valor positivo de  $\delta$  (depresión endogámica).



## MÉTODO

### Especie de estudio

*Datura lanosa* Barclay ex Bye fue descrita por primera vez por Barclay en su tesis doctoral (1959) quien la coloca como una subespecie de *Datura inoxia*. Barclay consideró que existen tres subespecies de *D. inoxia*: *D. inoxia subsp. inoxia*, *D. inoxia subsp. quincuspida* y *D. inoxia subsp. lanosa* (hoy éstas son consideradas como tres especies distintas: *Datura inoxia*, *Datura wrightii* y *Datura lanosa*, respectivamente). Barclay consideró que las razones para considerarlas subespecies son la alta similitud morfológica y la compatibilidad exhibida en experimentos de cruzamiento. Las únicas diferencias tienen que ver con la presencia de tricomas en el envés de la hoja y la amplitud de la corola (más ancha en *D. wrightii* y *D. lanosa*. Curiosamente, la misma clave que usó Barclay (1959, p. 159-160) para diferenciar a las subespecies de *D. inoxia*, fue usada por Bye (1986, p. 206) para separar a las tres especies de *Datura*.

*Datura lanosa* crece en sitios abiertos, perturbados cerca de arroyos y depresiones del drenaje del bosque espinoso y el bosque tropical deciduo del noroeste de México. Se distribuye desde Sonora hasta Nayarit y en el suroeste en altitudes de 0 a 1000 msnm en el piemonte de la Sierra Madre Occidental (Bye, 1986). Esta especie es reemplazada en el norte por *D. wrightii* y en el este por *D. inoxia*.

El material empleado en el presente estudio fue colectado la región de Batopilas Chihuahua en 1995 (Colectores Roberto Cabrales Vargas, Eduardo Cuevas García y Eduardo Rendón Salinas). Se colectaron frutos de más de cuarenta individuos y las semillas guardaron por separado manteniendo la identidad de cada planta (progenies naturales). Semillas de cada individuo fueron usadas para obtener por lo menos un individuo por planta y realizar los experimentos de cruce.

### Depresión por endogamia

Las semillas de 32 individuos de *Datura lanosa* colectados en campo fueron puestas a germinar en el invernadero del Instituto de Ecología, UNAM en el año 2000. Una vez germinadas las semillas de un individuo, se conservó una plántula de ese individuo por maceta, se le marcó con un número y el resto fueron eliminadas. Las plantas fueron regadas diariamente. Una vez que comenzaron a producir flores se procedió a realizar las cruces

controladas para generar progenies por autopolinización y por entrecruzamiento. En cada planta individual (familia) se produjeron al menos dos frutos por **autopolinización** y dos por **entrecruzamiento**. En el caso de la autopolinización, las flores fueron cubiertas con bolsas de tul fino el día anterior a la apertura de la flor. Al día siguiente, el polen de las anteras de la misma flor fue depositado *ad libitum* en el estigma receptivo. Una vez concluida la polinización, la flor se marcó con un alambre de color para indicar el tipo de cruce del fruto resultante. En el caso de las cruces de entrecruzamiento, a partir de la apertura de una flor, ésta se polinizó eligiendo aleatoriamente al donador de polen. Sólo se empleó un donador de polen para cada flor que se entrecruzó (aunque los donadores fueron distintos para cada flor). La asignación de una flor como donadora de polen de otra planta se hizo de manera aleatoria. Para cada cruce, de ambos tipos, se registró el día de la polinización, el orden de ramificación dentro de la planta donde estaba la flor, y la fecha de apertura del fruto.

Una vez maduras las semillas de cada tipo de cruce en cada planta, se obtuvo el número total de semillas así como de semillas abortadas (semillas con desarrollo detenido). Se realizaron cinco pruebas de germinación de las semillas abortadas para corroborar que no se tratara de semillas viables. En ningún caso hubo germinación.

### **Morfología floral y asignación de recursos a las diferentes estructuras florales**

En las plantas donde se completaron las cruces, se colectaron de dos a tres flores por planta con el propósito de obtener la biomasa de cada estructura floral. Para ello, cada flor fue disecada y las partes envueltas en papel aluminio. Éstas fueron secadas en un horno a 45 °C por una semana. Posteriormente fueron pesadas en una balanza analítica (OHAUS), para conocer la biomasa y obtener las proporciones relativas de cada estructura.

A cada flor se le tomaron las siguientes mediciones: longitudes del cáliz, corola, androceo, gineceo, diámetro de la boca de la corola y la distancia hercogámica.

De 36 flores colectadas de diferentes individuos de *D. lanosa*, se obtuvieron las anteras sin abrir para obtener el número de granos de polen por antera y por flor. Asimismo, se obtuvo el número de óvulos por flor. Se obtuvo la proporción de polen/óvulos mediante el protocolo de estimación de nivel de entrecruzamiento (Dafni 1992). [Anexo 1]

## Variación genética en *loci* de microsatélites

De cada individuo de *Datura lanosa* empleado en las cruizas, se colectaron hojas para extraer el ADN total. Para ello, se empleó el protocolo de extracción del género *Pinus*, modificado para esta especie (Anexo 2). Una vez obtenido el ADN total de cada planta se realizaron pruebas de amplificación mediante PCR (Polimerase Chain Reaction: Reacción en cadena de la Polimerasa) para los *primers* de loci microsatélites desarrollados para *Lycopersicum esculentum* Mill. (Solanaceae) (Smulders *et al.* 1997). Se seleccionaron cinco primers X13437 (152 pb), X53043 (131 pb), M96549 (254 pb), X60441 (170 pb) y X14041 (195 pb) (Anexos 3 y 4).

De cinco *primers* ensayados, dos amplificaron adecuadamente y fueron polimórficos. Se obtuvieron los genotipos para cada locus y se obtuvieron los estimados de heterocigosis observada ( $H_o$ ), heterocigosis esperada ( $H_e$ ), y desequilibrio de ligamiento entre loci ( $D$ ). Las estimaciones se realizaron empleando el programa ARLEQUIN (Schneider *et al.*, 2000).

Debido a que la endogamia reduce la heterocigosis, con los valores de  $H_o$  y  $H_e$ , se calculó el coeficiente de endogamia local ( $F_{is}$ ). Posteriormente empleando la fórmula de Wright (1965) se estimó la tasa de autogamia ( $s$ ), suponiendo que toda la endogamia se debe a autopolinización:

$$F_{is} = 1 - [H_o/H_e] \quad (1)$$

$F_{is}$  se relaciona con la tasa de autogamia como:

$$F_{is} = s/(2-s) \quad (2)$$

Por lo tanto,

$$s = 2F_{is} / (1 + F_{is}) \quad (3)$$

La tasa de autogamia es un parámetro crítico para determinar el sistema de apareamiento de las poblaciones, ya que se relaciona con la tasa de entrecruzamiento (Hedrick 1999) como

$$t = (1 - F_{is}) / (1 + F_{is})$$

Se obtuvo el valor de  $t$  para cada locus, así como el valor promedio.

## **Análisis estadísticos**

Para determinar si existen diferencias entre individuos en la producción promedio de semillas por fruto se ejecutó un análisis de la varianza entre individuos (se obtuvo un promedio de semillas por individuo). Un análisis similar se realizó para el número de semillas abortadas.

Para determinar el efecto del tipo de cruzamiento en la producción de semillas o semillas abortadas, se hizo una comparación empleando un análisis de varianza. Antes del análisis, los datos fueron transformados a  $\log(y_i + 1)$ , donde  $y_i$  es un valor observado del número de semillas, para mejorar la distribución de errores. No obstante, los valores obtenidos se presentan en su escala natural para facilitar su interpretación.

El coeficiente de depresión por endogamia ( $\delta$ ) se calculó de manera análoga a otros estudios (Schemske y Lande 1985; Núñez-Farfán *et al.* 1996, Husband y Schemske 1999):

$$\delta = 1 - \{w_s/w_o\}$$

donde  $w_s$  es la adecuación promedio (*i.e.*, número de semillas) de las cruzas derivadas de autogamia y  $w_o$ , es la adecuación promedio de las cruzas derivadas de entrecruzamiento. Valores positivos de  $\delta$  indican una disminución en el número de semillas por fruto debido a depresión por endogamia.

Para determinar si existen diferencias fenotípicas entre individuos en el promedio de distintos caracteres florales, se realizó un análisis de varianza para cada caracter métrico.

Se obtuvieron los valores promedio para cada caracter floral por individuo y se realizaron correlaciones (Producto-Momento de Pearson; Sokal y Rohlf 1999) entre los caracteres para determinar el grado de integración fenotípica. Las correlaciones entre atributos se hicieron para flores con todas las medidas, es decir, se excluyeron las flores en donde faltaba alguna medida. Para determinar la significancia de las correlaciones se ejecutó una corrección de Bonferroni (Sokal y Rohlf 1995).

En el caso de la asignación de biomasa a las distintas partes florales, se obtuvieron los valores absolutos en gramos y la proporción que representa de la masa total de la flor. Asimismo, se obtuvo el cociente polen/óvulos como una medida descriptiva del sistema de apareamiento (Cruden y Lyon 1985).

---

## RESULTADOS

### Variación entre familias en la producción de semillas por fruto

No se observaron diferencias entre individuos en la producción promedio de semillas por fruto de *Datura lanosa* (ANOVA:  $F_{(25, 106)} = 0.359$ ,  $P = 0.977$ ). De la misma forma, el número de semillas abortadas por fruto, no difirió entre plantas de *D. lanosa* (ANOVA:  $F_{(25, 103)} = 0.241$ ,  $P = 0.970$ ). Estos resultados no son inesperados debido a que existe una varianza muy grande en semillas y semillas abortadas en los frutos derivados de autopolinización y entrecruzamiento dentro de cada planta.

### Variación entre tipos de cruce en la producción de semillas por fruto

Se encontró un efecto significativo del tipo de cruce en la producción de semillas por fruto. Los frutos derivados de entrecruzamiento, produjeron más semillas que los derivados de autopolinización ( $\bar{x} = 351.428$ ,  $EE = 11.287$  vs.  $\bar{x} = 275.289$ ,  $EE = 16.725$ , respectivamente; Tabla 1, Fig. 1). De manera análoga, el número de semillas abortadas fue mayor en las frutos derivados de autopolinización ( $\bar{x} = 35.426$   $EE = 6.59$  vs.  $\bar{x} = 6.107$   $EE = 0.522$ , respectivamente; Tabla 2, Fig. 2). El valor de  $\delta$  fue de 0.216 (Fig. 1).

Tabla 1. Análisis de la varianza del número de semillas por fruto en relación al tipo de cruce en *Datura lanosa*. Los análisis se realizaron usando datos transformados:  $\log(y_i+1)$ .

Fuente de Variación	G.L.	Suma de Cuadrados	F	P
Tipo de Cruza	1	3.8867882	11.4792	0.0009
Error	130	44.017353		
Total	131	47.904140		

Tabla 2. Análisis de la varianza del número de semillas abortadas por fruto en relación al tipo de cruce en *Datura lanosa*. Los análisis se realizaron usando datos transformados:  $\log(y_i+1)$ .

Fuente de Variación	G.L.	Suma de Cuadrados	F	P
Tipo de Cruza	1	5.239968	25.2272	0.0001
Error	127	26.379281		
Total	128	31.619249		

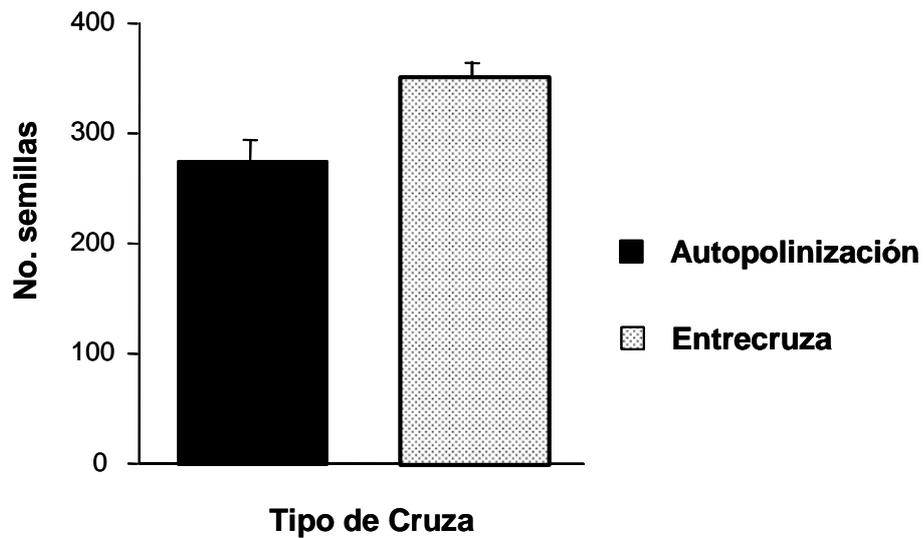


Figura 1: Promedios y EE del número de semillas por tipo de cruza ( $\delta= 0.216$ )

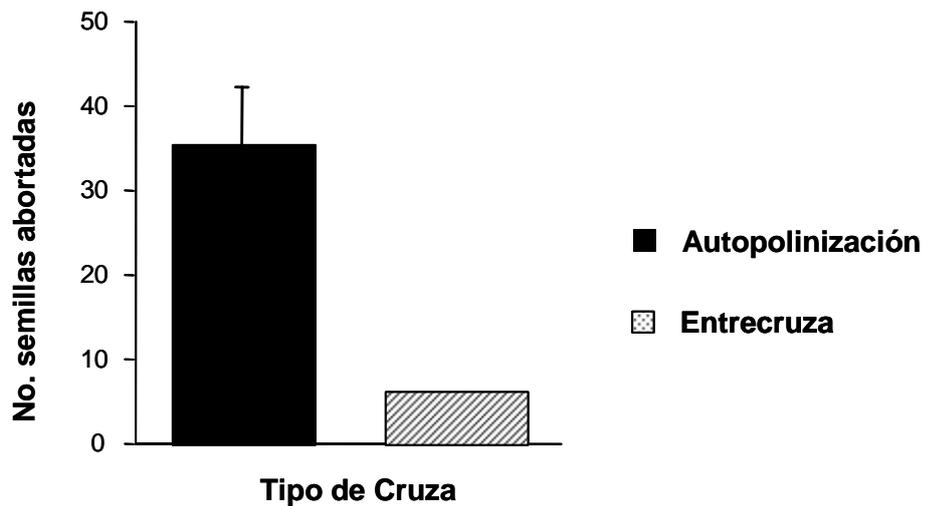


Figura 2: Promedios y EE del número de semillas abortadas por tipo de cruza

### Variación entre plantas en el tamaño de las flores y sus partes

Para cada planta individual se midieron varias flores y sus partes: cáliz, corola, androceo, gineceo, diámetro de la flor en la parte distal y hercogamia (Tabla 3, Fig. 3). El análisis de la varianza entre individuos para cada caracter indica diferencias significativas en todos los casos (Tabla 4). La variación explicada por las diferencias entre individuos en todos los caracteres supera el 28%.

Tabla 3. Medias y error estándar (en mm) para los caracteres florales por individuo

Caracter	Media	EE
Corola	189.52	1.9807
Cáliz	100.46	1.7744

Androceo	159.82	1.5480
Gineceo	149.65	2.4168
Diámetro	91.07	1.3987
Hercogamia	-9.68	1.7480

Tabla 4. Análisis de varianza de las dimensiones de las diferentes partes florales entre individuos de *Datura lanosa*.

Caracter Fuente de variación	G.L.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	P	R <sup>2</sup>
<b>Corola</b>						
Individuo	29	20200.721	696.577	3.4898	0.0001	0.284039
Error	153	30539.486	199.604			
<b>Cáliz</b>						
Individuo	29	21278.4	733.738	6.3005	0.0001	0.457875
Error	153	17817.819	116.456			
<b>Androceo</b>						
Individuo	29	16002.03	551.794	5.3387	0.0001	0.408747
Error	153	15813.817	103.358			
<b>Gineceo</b>						
Individuo	29	39598.977	1365.48	6.519	0.0001	0.467914
Error	153	32047.821	209.46			
<b>Diámetro</b>						
Individuo	29	32047.821	369.203	3.9564	0.0001	0.320226
Error	153	14277.56	93.317			
<b>Hercogamia</b>						
Individuo	29	16282.105	561.452	6.0892	0.0001	0.447795
Error	153	14107.223	92.204			

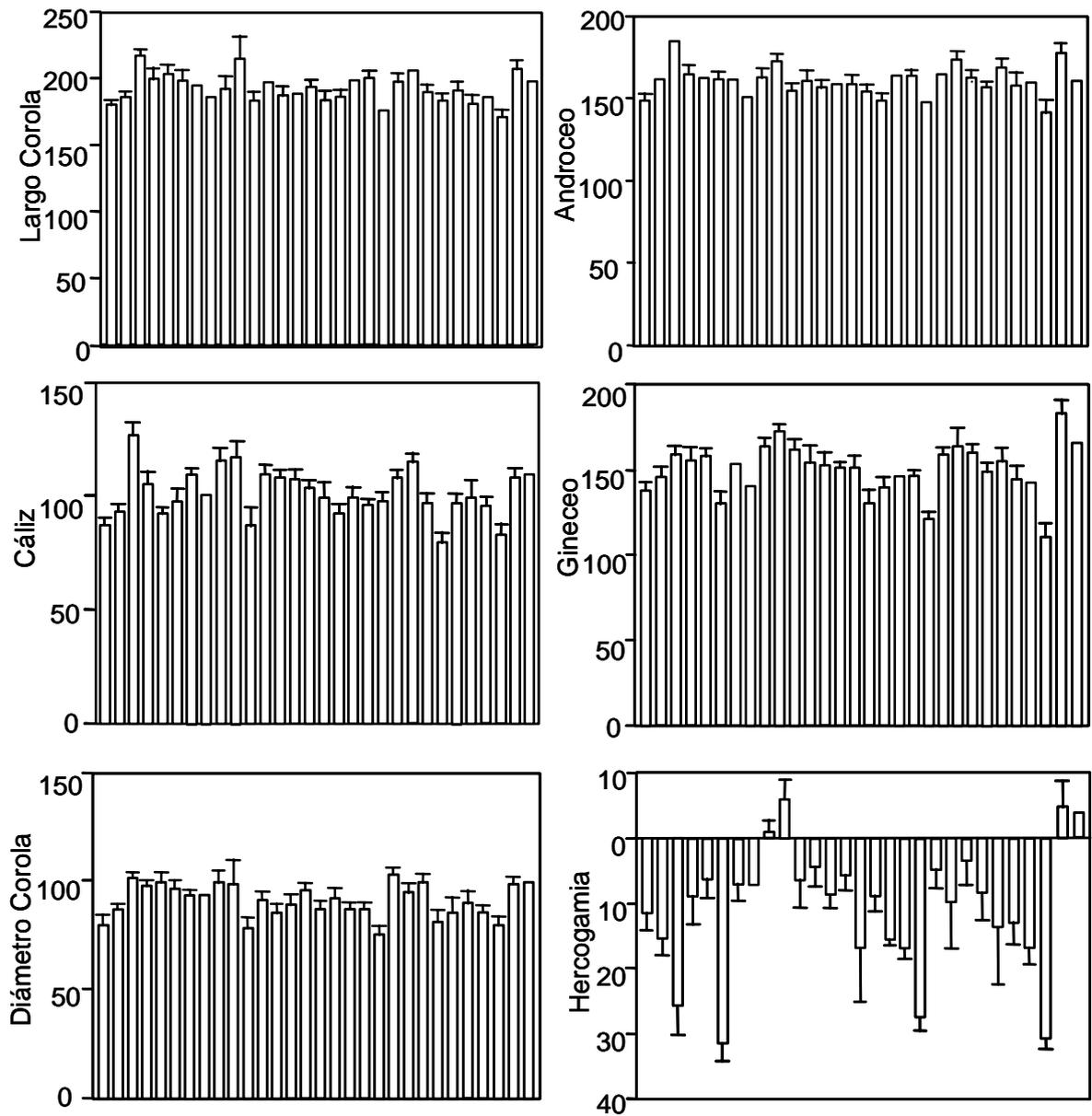


Figura 3: Variación en los valores promedio (+ 1EE) en los atributos florales para 30 familias de *Datura lanosa*. Largo de la Corola, Cáliz, Androceo, Gineceo, Diámetro de Corola y Hercogamia.

### Correlación entre atributos florales

Los análisis de correlación entre caracteres florales de *Datura lanosa* indican una alta integración fenotípica. Todos los caracteres muestran correlaciones elevadas y positivas entre sí ( $0.55 \leq r \leq 0.88$ ), con excepción de la hercogamia (Tabla 5). La hercogamia sólo muestra correlación positiva significativa alta con el tamaño del gineceo ( $r = 0.76$ ). Por el contrario, el tamaño de las estructuras masculinas (androceo) están íntimamente asociados con el tamaño de la corola.

Tabla 5. Correlaciones de Pearson entre los caracteres florales por individuo (flores con todas las medidas). Las correlaciones en negritas son significativas.

Caracter 1	Caracter 2	<i>r</i>	N	<i>P</i>
Cáliz	Corola	0.7136	30	<b>0.0000</b>
Androceo	Corola	0.8893	30	<b>0.0000</b>
Androceo	Cáliz	0.7222	30	<b>0.0000</b>
Gineceo	Corola	0.6647	30	<b>0.0001</b>
Gineceo	Cáliz	0.5521	30	<b>0.0016</b>
Gineceo	Androceo	0.7243	30	<b>0.0000</b>
Diámetro	Corola	0.6771	30	<b>0.0000</b>
Diámetro	Cáliz	0.6726	30	<b>0.0000</b>
Diámetro	Androceo	0.6390	30	<b>0.0001</b>
Diámetro	Gineceo	0.6305	30	<b>0.0002</b>
Hercogamia	Corola	0.1454	30	0.4433
Hercogamia	Cáliz	0.1565	30	0.4087
Hercogamia	Androceo	0.1317	30	0.4879
Hercogamia	Gineceo	0.7684	30	<b>0.0000</b>
Hercogamia	Diámetro	0.3611	30	<b>0.0499</b>

### Asignación de biomasa a diferentes atributos florales

Se obtuvieron los promedios de biomasa para cada caracter floral (Tabla 6). Se observó que la mayor proporción de masa está asignada a la corola 39.68%, lo que podría estar relacionado con la atracción a polinizadores. La asignación de recursos al cáliz es de 24.44%, para el androceo es de 18.18% y para el gineceo es de 17.70% (Figura 4).

Tabla 6. Peso promedio de los caracteres florales de *Datura lanosa* por flor y por planta (A), y el porcentaje de biomasa (B) por flor.

(A)

---

Caracter	Flor			Planta		
	Peso (g)	EE.	N	Peso (g)	EE.	N
Corola	0.16358	0.00664	89	0.1560	0.0092	24
Cáliz	0.09884	0.03739	90	0.0947	0.0068	24
Androceo	0.07182	0.00221	90	0.0707	0.0032	24
Gineceo	0.06963	0.00191	90	0.0688	0.0029	24

(B)

Caracter	Porcentaje	EE
Corola	39.681	0.0073
Cáliz	24.443	0.0060
Androceo	18.180	0.0044
Gineceo	17.696	0.0043

Según el criterio de Cruden y Lyon (1985) los porcentajes de asignación de recursos en los caracteres florales sugiere que *D. lanosa* es un tipo de planta *xenógama obligada*.

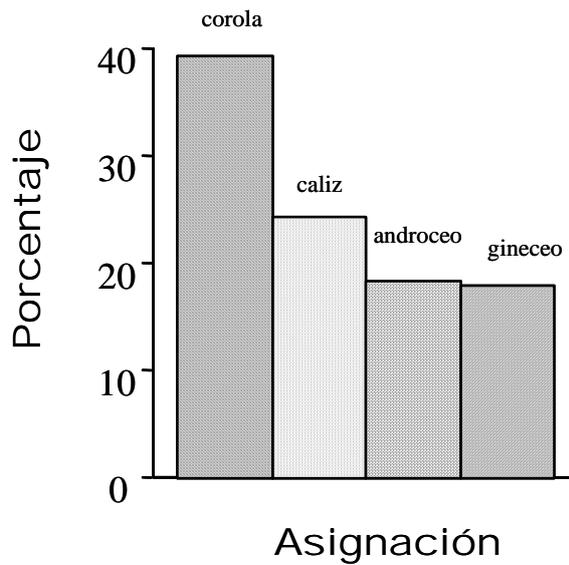


Figura 4: Fracción de biomasa (%) asignada a cada estructura (EE).

Al comparar la fracción de biomasa asignada a las diferentes partes florales en ocho especies de *Datura* (Cruz, 1999; Zamudio, 1999) estudiadas bajo las mismas condiciones experimentales como en el presente estudio, se puede observar que *D. lanosa* al igual que otras especies de corola grande, asigna una fracción elevada a la corola (Tabla 7). No obstante, es la especie estrechamente emparentada *D. inoxia* la que asigna la mayor proporción (65%) a la corola (ver Métodos). Puede observarse que *D. lanosa* es la especie que asigna mayor proporción de biomasa al cáliz y al androceo. Las especies de flor grande (*D. inoxia*, *D. lanosa* y *D. discolor*) asignan al gineceo menos del 20% de la biomasa de la flor. Estos resultados sugieren que éstas especies podrían ser principalmente de entrecruzamiento.

Tabla 7. Asignación relativa (%) de biomasa a las distintas partes florales en ocho especies de género *Datura*. (Cruz, 1999; Zamudio, 1999)

Especie	Corola	Cáliz	Androceo	Gineceo
<i>D. innoxia</i>	<b>65.95</b>	13.66	11.86	8.52
<i>D. kimatocarpa</i>	55.60	14.14	9.22	21.03
<i>D. discolor</i>	47.51	18.8	14.71	18.99
<i>D. ferox</i>	13.44	15.2	13.44	39.24
<i>D. lanosa</i>	39.68	<b>24.44</b>	<b>18.18</b>	17.7
<i>D. pruinosa</i>	28.4	18.57	10.44	<b>42.57</b>
<i>D. quercifolia</i>	37.58	14.88	12.88	33.20
<i>D. stramonium</i>	41.74	14.26	17.8	26.8

Las negritas denotan las especies que asignan mayor porcentaje de recursos a cada una de las estructuras florales.

### Asignación polen:óvulos

De las 36 muestras de polen se obtuvo el promedio de granos de polen por antera, se multiplicó por el número de anteras (cinco) y se obtuvo el número total de granos de polen por flor. Por otra parte, el número de óvulos se obtuvo de la suma semillas sanas más número de semillas abortadas. El índice de P:O obtenido fue de 651.053, que según el índice de Cruden y Lyon (1985) corresponde a una especie *xenógama facultativa* (Tabla 8).

Tabla 8. Relación polen:óvulos en flores de *Datura lanosa*. N = 36 flores.

	Granos de Polen	Óvulos	Relación P:O
Promedio	215240.97	349.28	651.052292
Error estándar	14739.968	15.526	49.640279

Según el criterio de Cruden y Lyon (1985) dependiendo del carácter floral, el sistema de apareamiento puede variar de las especies dependiendo de la fracción de biomasa asignada a cada carácter floral. Siguiendo este criterio, en el caso de *D. lanosa*, la asignación a corola (39.681%) sugiere que es *xenógama obligada*; la asignación al cáliz (24.44%) que es *xenógama obligada*, el androceo (18.18%) que es de *xenógama facultativa* y al gineceo (17.70) que está entre *xenógama facultativa* y *autógama facultativa*.

## Variación genética en loci de microsatélites en *Datura lanosa* y tasa de entrecruzamiento

De los cuatro *primers* derivados de *Lycopersicon esculentum* analizados, dos fueron amplificados y polimórficos en *Datura lanosa*, uno con dos alelos (locus X13437; 152 pb) y otro con tres (locus X60441; 170 pb).

En el caso del locus X60441, se encontró que las frecuencias genotípicas se encuentran en las proporciones esperadas bajo apareamiento aleatorio ( $\chi^2_{\text{cal}} = 3.13$ , g.l. = 2,  $\chi^2_{\text{tab}} = 7.81$   $P < 0.05$ , Tabla 9). Al contrario, las frecuencias para el locus X13437, difieren de las esperadas en equilibrio Hardy-Weinberg ( $\chi^2_{\text{cal}} = 11.0842$ , g.l. = 1,  $\chi^2_{\text{tab}} = 3.84$   $P > 0.05$  Tabla 10).

Tabla 9. Frecuencias observadas de genotipos para el locus X60441 170 pb en *Datura lanosa*.

Genotipo	163/163	163/160	160/160	160/154	154/154	163/154
No. Individuos observados	0	3	15	0	0	12
Frecuencias genotípicas observadas	0.0	0.1	0.5	0.0	0.0	0.4

Tabla 10. Frecuencias observadas de genotipos del locus X13437 152 pb.

Genotipo	152/152	150/152	150/150
No. De individuos observados	3	3	24
Frecuencias Genotípicas observadas	0.1	0.1	0.8

La diversidad genética (heterocigosis esperada promedio) es elevada en *Datura lanosa* (Tabla 11). Como se aprecia en la tabla 10 existe un número elevado de heterocigotos con respecto a los homocigotos. No obstante, la estimación del índice de fijación por locus ( $F$ ), indica que el nivel de endogamia es elevado para el locus X13437. De acuerdo con esto, la tasa de entrecruzamiento estimada para los dos loci es diferente. La tasa de entrecruzamiento ( $t$ ) promedio para *D. lanosa* es de 0.84, lo cual la posiciona como una especie con un sistema de apareamiento mixto (Tabla 12).

Tabla 11. Variación genética en dos loci de microsatélites en *Datura lanosa* de Batopilas, Chihuahua. N = 30.

<b>Análisis</b>	<b>Resultado</b>
Diversidad génica	0.3305
Número de heterocigotos	18
Número de homocigotos	12
Heterocigocidad observada	0.3
Heterocigocidad esperada	0.3305
<i>F<sub>IS</sub> promedio</i>	0.09228
<i>S</i>	0.1689
<i>t promedio</i>	0.8448

Tabla 12. Endogamia y tasa de entrecruzamiento promedio en dos loci en una población de *Datura lanosa*.

<b>Locus</b>	<b>Individuos</b>	<b>HeterObs</b>	<b>HeterEsp</b>
1	30	0.5000	0.4017
2	30	0.1000	0.2593

Lo anterior señala que sólo el 84.48% de los individuos se está entrecruzando en esta población.

## DISCUSIÓN

A partir de los resultados encontrados (Tabla 13) se puede deducir que sí hay un efecto negativo de la endogamia en la población de *Datura lanosa*, lo que se puede observar por el valor de depresión endogámica de más del 20%. De acuerdo con el criterio de Lande y Schemske (1985), la población evolucionaría hacia la autopolinización, sin embargo otros modelos predicen que con estos niveles de depresión endogámica se pueden encontrar sistemas de apareamiento mixtos (Yahara 1992, Holsinger 1991). Con respecto a la morfología floral ésta es de atracción a polinizadores (entrecruza), lo que también se ha observado en otras especies donde se visto que tamaños florales grandes y vistosos o poblaciones con un número mayor de inflorescencias atraen un mayor número de polinizadores (*Fragaria virginiana*, *Chrysanthemum leucanthemum* L. e *Impatiens capensis*, Bell 1985), sin embargo el índice de Cruden y Lyon (1985) indica que la morfología floral sugiere un sistema de apareamiento mixto para esta especie. Aunque la presencia de estructuras florales que atraigan a polinizadores sea primordialmente de entrecruza, los sistemas de apareamiento mixtos pueden fluctuar entre sistemas autogamos y de entrecruza dependiendo del escenario ecológico y la historia de vida y ser evolutivamente estables (Holsinger 1991; Barrett y Eckert 1990), esto, es consistente con la hercogamia (separación entre anteras y estigma) que muestra un sistema de apareamiento autógeno.

En cuanto a la asignación de recursos a las partes florales se describe un sistema mixto (Cruden y Lyon 1985), debido a que se asigna un mayor porcentaje a la función masculina, lo que se ha reportado también en otras especies diferentes al género *Datura* como *Lamium amplexicaule* y *Malva neglecta* (Cruden y Lyon 1985), es decir, es concuerda con el modelo propuesto por Charlesworth y Charlesworth de la asignación de recursos a la función masculina y femenina (1981). Todo lo anterior, es consistente con la tasa de entrecruzamiento estimada y con la relación polen:óvulos que también presentan un sistema de apareamiento mixto.

Tabla 13. Caracterización del sistema de apareamiento en *Datura lanosa*

Componentes	Sistema propuesto
Depresión endogámica ( $\delta$ )	Autogamo (Lande y Schemske 1985)
Morfología floral	Entrecruzamiento (Schoen1982)
	Mixto (Xenógama Obligada y Facultativa)

	Cruden y Lyons 1985)
Hercogamia	Autogamo (Webb y Lloyd 1986)
Asignación de Recursos	Mixto (Xenógama obligada Cruden y Lyons 1985)
Relación P:O	Xenógama Facultativa Cruden y Lyons 1985)
Tasa de Entrecruzamiento	Hacia el apareamiento mixto (Lande y Schemske 1985)
Filogenia de <i>Datura</i>	Tendencia hacia la autogamia

En cuanto a la filogenia de *Datura*, comparativamente con otras especies, observamos que la depresión endogámica de *D. lanosa* es muy parecida a la de *D. inoxia* (0.239) (Cruz-Escalante, 1999), la cual también presenta el tamaño de los caracteres florales en el rango de *D. lanosa*, y de hecho se considera que están cercanamente emparentadas. Lo mismo ocurre con los valores reportados para *D. wrightii*, la cual también muestra depresión por endogamia (Elle y Hare 2002) y también comparte características fenotípicas con *D. lanosa* (Barclay, 1959). Por lo tanto, el patrón de morfología floral y de depresión endogámica es consistente en el género *Datura*: especies de flores pequeñas presentan niveles bajos de depresión endogámica, mientras que especies con flores grandes tienen niveles de depresión endogámica positivos (Núñez-Farfán et al. 1996, Zamudio 1999, Cruz-Escalante 1998, Elle y Hare 2002, Sosenski, 2004). Si suponemos que el tamaño de la corola implica un costo energético (ya sea porque es una estructura de atracción para los polinizadores, porque está relacionada con la recompensa para insectos o bien, porque selecciona a los polinizadores efectivos), el sistema de entrecruzamiento se mantendrá siempre y cuando tenga un retorno en términos de adecuación (Bell 1986). Así se esperaría que en las poblaciones donde los polinizadores son escasos o bien donde los retornos en términos de adecuación por entrecruzamiento sean equivalentes a los derivados de autogamia, se espera que la asignación a estructuras de atracción y recompensa se reduzcan. Este escenario evolutivo podría estar involucrado en la especiación del género. *Brugmansia*, el grupo hermano de *Datura*, posee flores grandes y sistemas de autocompatibilidad, de tal forma que el sistema de cruzamiento alógamo puede considerarse anterior al autógeno. Esto es apoyado por estudios filogenéticos donde las

especies de corola pequeña son derivados de linajes de corola grande (Mace *et al.* 1999, Jiao *et al.* 2002, R. Cabrales-Vargas, datos no publicados).

No se encontró en este estudio una relación entre la producción de semillas y los caracteres florales, contrario a lo encontrado en *D. wrightii* (Elle y Hare, 2002), donde existe una correlación significativa entre la hercogamia y la producción de semillas; sin embargo, debe recordarse que el experimento se realizó en el invernadero, donde el valor de la hercogamia es nulo, así como el de la variación en caracteres florales.

Con respecto a la asignación de recursos, un gran porcentaje (40%) es asignado a la función masculina, lo cual vuelve a indicar un sistema de apareamiento por entrecruza, y esto se corrobora al compararlos con los índices en la revisión de Cruden y Lyon (1985) que la ubican como xenógama obligada. *Datura lanosa* en comparación con *D. stramonium*, tiene un porcentaje de asignación menor en la corola, pero para los demás caracteres la asignación es mayor y en *D. quercifolia* Kunth hay una asignación mayor hacia el gineceo que en *D. lanosa*, lo que sugeriría un tipo de asignación de recursos hacia la autofecundación.

Por último, los resultados de diversidad genética indican que la tasa de entrecruzamiento es del 84%, es decir, *Datura lanosa* posee un sistema mixto. La diversidad genética en los loci que son neutros (es decir que no están sujetos a selección) están influidos por el tipo de cruce y es posible deducir la tasa de entrecruzamiento a través de los estimados de la diversidad genética. En *Datura stramonium*, se ha encontrado variación entre poblaciones en (Motten y Antonovics 1992; Cuevas 1996) y que el tamaño de la corola es heredable y sujeto a selección (López-Velázquez 2003). Dados los resultados obtenidos, es relevante investigar las causas genéticas de la diversidad fenotípica en *D. lanosa*, así como las presiones selectivas que la afectan. En particular, es relevante el análisis geográfico que incluya a las poblaciones de otras especies cercanamente emparentadas como *D. inoxia* y *D. wrightii*.

## CONCLUSIONES

El presente estudio demostró que *Datura lanosa*, una especie con una morfología floral aparentemente adaptada a la polinización por insectos, tiene un sistema de apareamiento mixto.

Se encontró depresión endogámica positiva para la producción de semillas, lo que indica que la endogamia es nociva y que probablemente se debe a la expresión temprana de alelos letales (Núñez-Farfán et al. 1996).

Se encontró que la asignación a estructuras de atracción (corola) es elevada lo cual sugiere que posiblemente está relacionada con la cantidad de recompensa (néctar) para los polinizadores.

Se logró montar el sistema de dos microsatélites para *Datura lanosa* derivados de aquellos de *Lycopersicon esculentum*, lo cual es de gran utilidad para el estudio de la evolución del sistema de apareamiento en el género *Datura*.

Los resultados encontrados en *Datura lanosa* son consistentes con los estudios previos en el género *Datura* que indican que las especies de flores pequeñas han evolucionado hacia la autogamia.

## AGRADECIMIENTOS

La presente investigación fue financiada con fondos del proyectos SEP-CONACyT 42031/A titulado “**Evolución de la autogamia en *Datura stramonium***” otorgado al Dr. Juan Núñez Farfán.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT quien me brindó una Beca crédito para los estudios de Maestría y a la Dirección General de Estudios Profesionales DEGP que me apoyó con una Beca complemento para los estudios de Maestría

Agradezco al Dr. Juan Núñez Farfán por todo el apoyo que me brindó durante la elaboración de la presente Tesis, en especial por su forma de guiarme y enseñarme cosas nuevas, por marcar a tiempo mis errores y mis aciertos.

Agradezco al Dr. Daniel Piñero Dalmau por todo su apoyo brindado al permitirme usar las instalaciones del Laboratorio de Genética y Evolución en la elaboración del presente estudio y por la aportación de sus valiosos comentarios. Agradezco el apoyo brindado por Patricia Delgado Valerio, Miroslava Rentería y Rodolfo Salas para el montaje de la Técnica de Microsatélites. Agradezco al Dr. Juan Fornoni por su apoyo en las correcciones de Bonferroni para los análisis de correlación.

Quiero agradecer particularmente a todas las personas que integran el Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución, al Biól. Armando López Velázquez por su apoyo en la depuración de las bases de datos, en la corrección de los análisis estadísticos y por la lectura final de la tesis, a la Dra. Eneida Montesinos, Maria Borbolla, en especial a la Biól. Judith Zamudio Pérez y al Biól. Rafael Bello Bedoy, quienes me ayudaron en la definición y corrección del presente estudio, a Jesús Vargas por toda su disponibilidad y apoyo técnico brindado.

A la Universidad del Valle de México por brindarme el curso “Coaching para obtener el Grado” y a la Psic. María Luisa Aguilar, por su gran apoyo y guía. A la Lic. Adriana Molina Acuña y a Lic. María del Carmen Cruz Chávez, por todas las facilidades otorgadas para el término de este estudio. Al Prof. Pedro Hernández quien me hizo valiosos comentarios, y en general a todos mis compañeros docentes que integran el Bachillerato de

la Universidad del Valle de México Campus Tlalpan, quienes de alguna manera u otra me apoyaron y estimularon.

A todas esas personas que han estado conmigo durante todo este tiempo y que también se han preocupado y desvelado junto conmigo, mi familia. Mi mamá Patricia Krauss, Alfredo Paz y mi abuelita, a mis hermanos Armando y Alfredo y a ti Vladimir que también te involucraste conmigo en todos esos días de desvelo y trabajo.

## LITERATURA CITADA

- Aldrich, P. R. , J. L. Hamrick, P. Chavarriaga y G. Kocher. 1998. Microsatellite analysis of demographic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology* 7: 933-944.
- Andersson, S. 1996. Floral variation in *Saxifragata granulata*: phenotypic selection, quantitative genetics and predicted response to selection. *Heredity* 77: 217-223
- Arroyo, M. T. 1975. The influence of wind and animal pollination on variation in outcrossing rates, *Evolution* 40: 434-435.
- Baker, H. G. 1965. Characteristics and made of origin of weeds. En Baker, H. G. Stebbins, G. L. *The Genetics of Colonizing Species*. Academic Press. New York. pp. 147-152
- Barclay, A. S. 1959. Studies in the genus *Datura* (Solanaceae), I. Taxonomy of the subgenus *Datura*. Ph. D. Dissertation, Harvard University, Cambridge, Massachussetts.
- Barrett, S. C. H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature*. 3:274-284
- Barrett, S. C. H y D. Charlesworth. 1991. Effects of a change in the level of inbreeding on the genetic load. *Nature* 352:522-524.
- Barrett, S. C. y C. G. Eckert, 1990. Variation and evolution of mating systems in seed plants. *In Biological approaches and evolutionary trends in plants*. D. Kawano, (ed.), pp. 229-254. Academic Press New York.
- Barrett, S. C. H y L. D. Harder. 1996. Ecology and evolution of plant mating. *Trends in Ecology and Evolution*. 11: 73-79
- Barret, S. C. H y M. T. Morgan. 1989. The dissolution of a complex genetic polimorphysm: The evolution of self-fertilization in tristylous *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Evolution*. 43(7): 1398-1416.
- Bateson, P. P. G. 1983. Optimal outbreeding. In *Mate Choice*, de P.P.G. Bateson (ed.), pp. 257-277. Cambridge University Press
- Bawa, K. S. y J.H. Beach. 1981. Evolution of sexual systems in flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68:254-274.
- Beaumont, M. A. y M. W. Bruford. 1999. Microsatellites in conservation genetics. *In Microsatellites. Evolution and Applications*. D. B. Goldstein y C. Schlötterer (eds.), pp. 165-197. Oxford University Press.
- Becerra, J. X. y D. G. Lloyd. 1992. Competition dependent abscission of self-pollinated flowers of *Phormium tenax* (Agavaceae) a second action of self-incompatibility at whole flower level. *Evolution* 46:458-459.
- Belaoussoff , S. y J. S. Shore. 1995. Floral correlates and fitness consequences of mating-system variation in *Turnera ulmifolia*. *Evolution* 49: 545-556

- Bell, G. 1985. On the function of flowers. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*. 24 (1235): 223-265.
- Brunet, J. 1992. Sex allocation in hermaphroditic plants. *Trends in Ecology and Evolution*. 7(3)
- Busch, J. W. 2005. The evolution of self-compatibility in geographically peripheral, populations of *Leavenworthia alabamica* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 92: 1503-1512.
- Bye, R. A. 1986. *Datura lanosa*, a new species of *Datura* from Mexico. *Phytologia* 6: 204-206.
- Byers, D. L. y D. M. Waller. 1999. Do plant populations purge their genetic load? Effects of population size and mating history on inbreeding depression. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30:479-513
- Caruso, C. M., S. B. Peterson y C. E. Ridley. 2003. Nature of selection of floral traits of *Lobelia* (Lobeliaceae): spatial and temporal variation. *American Journal of Botany* 90:1333-1340
- Chang, S. M. y M. D. Rausher. 1999. The role of inbreeding depression in maintaining the mixed mating system of the common morning glory, *Ipomoea purpurea*. *Evolution* 53:1366-1376.
- Charlesworth, D. y B. Charlesworth. 1981. Allocation of resources to male and female functions in hermaphrodites. *Biological Journal of the Linnean Society*. 15: 57-74
- Charlesworth, D. y B. Charlesworth. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 237-268.
- Charlesworth, D. y M. T. Morgan, 1991. Allocation of resources to sex functions in flowering plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 332; 91-102
- Charnov, E.L. 1982. *The theory of sex allocation*. Princeton, N.J. Princeton Univ. Press.
- Cohen, D. y A. Shmida. 1993. The evolution of flower display and reward. En: Hecht, M. K., R. J. MacIntyre y M. T. Clegg (eds). *Evolutionary Biology* Vol. 27: 197-243 Springer, Verlag. Berlin.
- Cuevas, G. E. 1996. Tasa de entrecruzamiento, vecindario genético y tamaño efectivo de la población en *Datura stramonium* L. (Solanaceae). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Cruden R. W. y D. L. Lyon. 1985. Patterns of biomass allocation to male and female functions in plants with different mating systems. *Oecologia* 66:299-306
- Cruz, E. A. L. 1999. Evolución del sistema de apareamiento en *Datura*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Cuguen, J. 1989. Breeding system differentiation in *Arhenaterium elatius* populations evolution toward selfing?. *Evolutionary trends in plants* 3(1):17-24.
- Dafni, A. 1992. *Pollination Ecology. A practical Approach*. Oxford University Press, Oxford.

- Darwin, C. R. 1859. The origin of species by means of Natural Selection on the preservation of favored races in the struggle for Life. John Murray, London.
- Elle, E. y D. Hare. 2002. Environmentally induced variation in floral traits affects the mating system in *Datura wrightii*. *Functional Ecology* 16:79-88
- Endler, E. J. 1986. *Natural Selection in the wild*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Falconer, D. S. 1981. *Introduction to quantitative genetics*. London Longman. 340p.
- Falconer, D. S. y T. F. C. McKay 1989. *Introduction to quantitative genetics* Ed. Longman North Caroline State University. U. S. A. 464pp.
- Fisher, R. A. 1941. Average excess and average effect of a gene substitution. *Annals of Eugenetics* 11: 53-63.
- Fisher, R. A. 1985. *The genetical theory of Natural Selection*. 2<sup>nd</sup>. Ed., Dover New York. 214 pp
- Goldstein, D. B. y C. Schlötterer. 1999. *Microsatellites Evolution and Applications*. Oxford University Press.
- Goldman, D. A. y M. F. Wilson, 1986. Sex allocation in functionally hermaphroditic plants: A Review and critique. *Botanical Review* 52: 157-194.
- Grant, V. 1954. Genetic and taxonomic studies in *Gilia*. IV *Gilia achilleaefolia*. *Aliso* 3: 3-134.
- Grant, V. y K. A. Grant. 1983. Behavior of Hawkmoths on flowers of *Datura meteloides*. *Botanical Gazette* 144:280-284
- Guerenstein, P. G., Yepes, E. A., Van Haren, J., Williams, D. G. y J. G. Hildebran. 2004. Floral CO<sub>2</sub> emission may indicate food abundance to nectar-feeding moths. *Naturwissenschaften* 91:329-333
- Hamrick, J. L. y M. J. W. Godt, 1990. Allozyme diversity in plant species. In *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. A. D. H. Brown, M.T. Clegg, A. L. Kahlen y B. S. Weir. (eds.), pp. 43-63. Sinauer, Sunderland. Mass.
- Hedrick, P. W. 1990. Mating systems and evolutionary genetics. In *Population Biology: Ecological and Evolutionary Viewpoints*. K. Woehrmann and E. Jain (eds.), pp 83-14. Springer-Verlag. Berlin.
- Hedrick, P. W. 1999. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53: 313-318.
- Hedrick, P. W. 2000. *Genetic of populations*. 2a Edition. Science Book International, Boston 533p.
- Herlihy, H. R y C. G. Eckert. 2002. Genetic cost of reproductive assurance in a self-fertilizing plant. *Nature*. 416 (6878): 320-323
- Hill, J. P. y E. M. Lord. 1990. The role of developmental timing in the evolution of floral form. *Developmental Biology*. 1: 281-287.

- Holsinger, K. E. 1991. Mass-action models of plant mating systems: The evolutionary stability of mixed mating-systems. *American Naturalist*. 138(3): 606-622.
- Holsinger, K. E. 2000. Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*. 97: 7037-7042.
- Husband, B. C y D. W. Schemske. 1996. Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution*. 50(1): 54-70.
- Jain, S. K. 1976. The evolution of inbreeding in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 7:469-495
- Jiao, M., M. Luna-Cavazos y R. Bye. 2002. Allozyme variation in Mexican species and classification of *Datura* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution* 232: 155-166.
- Lande, R y D. W. Schemske. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic Models. *Evolution* 39:24-40
- López-Velázquez, A. 2003. Garantía reproductiva de la autopolinización en *Datura stramonium*: variación genética y selección natural del tamaño floral y la hercogamia. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Lloyd, D. G. 1965. Evolution of self-incompatibility and racial differentiation in *Leavenworthia* (Cruciferae). *Contributions of the Gray Herbarium, Harvard University*. 195:3-134.
- Lloyd, D. G. 1992. Self- and cross- fertilization in plants. II. The selection of self fertilization. *International Journal Plant Science* 153(3): 370-380
- Lloyd D. G. y D. J. Schoen. 1992. Self and cross-fertilization in plants I. Functional dimensions. *International Journal Plant Sciences* 153:(3) 358-369.
- Lloyd D. G. y D. J. Schoen. 1992. Self and cross-fertilization in plants III. Functional dimensions. *International Journal Plant Sciences* 153:(3) 381-393.
- Mynard-Smith, J. 1977. The sex habitat in plants and animals. En *Measuring Selection Natural Population*, ed. F. B. Christiansen and T. M. Fenchel, 315-331. Berlin Springer Verlag
- Mynard-Smith, J. 1998. *Evolutionary Genetics*. Oxford University Press. New York. 330 pp
- Mace, E. S., C. G. Gebhardt. y R.N. Lester. 1999. AFLP analysis of genetics relationships in the tribe Datureae (Solanaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 99:634-641.
- Mothershead, K. y R. J. Marquis. 2000. Fitness impacts of herbivory through indirect effects on plant pollination interactions on *Oenothera macrocarpa*. *Ecology* 81(1): 30-40
- Motten, A. F. y J. Antonovics. 1992. Determinants of outcrossing rate in predominantly self-fertilizing weed, *Datura stramonium* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 79: 419-427.

- Motten, A y J. Stone. 2000. Heritability of stigma position and the effect of stigma-anther separation on outcrossing in a predominantly self-fertilizing weed, *Datura stramonium* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 87: 339-347.
- Núñez-Farfán, J. S. 1991. Biología evolutiva de *Datura stramonium* L. en el centro de México: selección natural de la resistencia a los herbívoros, sistema de cruzamiento y variación genética intra e interpoblacional. Tesis Doctoral. Centro de Ecología-UACP Y P/CCH, Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F.
- Núñez-Farfán, J. S, 1995. Ecología evolutiva de *Datura stramonium* (toloache) en México. *Ciencia* 46:197-214
- Núñez-Farfán, J., R. A. Cabrales-Vargas y R. Dirzo. 1996. Mating system consequences on resistance to herbivory an life history traits in *Datura stramonium*. *American Journal of Botany* 83: 1041-1049
- Ornuff, R. 1969. Reproductive biology in relative systematics. *Taxon* 18:121-133
- Orzack, S, H. 2001. En: Capitulo 13. Sex ratios and sex allocation. *Evolutionary ecology. Concepts and case studies..* Editado por: Fox, C. W, Roff, D. A. y D. J. Fairbairn. Oxford University Press. New York. 424 pp.
- Parker, G, A. Snow A, M. D. Schug, G. C. Booton, y P. A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361-382.
- Robertson, A. W y D. G. Lloyd. 1991. Hercogamy, dichogamy and self-pollination in six species of *Myosotis* (Boraginaceae). *Evolutionary trends in plants* 5(1): 53-63
- Rollins, R. C. 1963. The evolution and systematics of *Leavenworthia* (Cruciferaceae). *Contrib. Contributions of the Gray Herbarium, Harvard University* 192: 3-98
- Sakai, A. N. y D. F. Wesneat 2001. En: Capitulo 15. Mating systems. *Evolutionary ecology. Concepts and case studies..* Editado por: Fox, C. W, Roff, D. A. y D. J. Fairbairn. Oxford University Press. New York. 424 pp.
- Schneider, S., D. Roessli, y L. Excoffier. 2000. *Arlequin*. Ver. 2000. A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. University of Genova. Switzerland.
- Schemske D. W. y R. Lande. 1985. The evolution of self, fertilizing and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. *Evolution* 39(1): 41-52
- Schoen, D. J. 1982. Male reproductive effort and breeding system in an hermaphroditic plant. *Oecologia* 53: 255-257.
- Schoen, D. J. y D. G. Lloyd. 1984. The selection of cleistogamy and heteromorphic diaspores. *Biological Journal of the Linnean Society* 23(4): 303-322.
- Schoen, D. J. y D. G. Lloyd. 1992. Self and cross-fertilization in plants. III. Methods for studying modes and functional aspects of self-fertilization. *International Journal Plant Science*. 153(3): 381-393.

- Schoen, D. J., Morgan, M. y T. Bataillon. 1996. How does self pollination evolve? Inferences from floral Ecology and Molecular genetic variation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B*. 1279-1290.
- Silverstow, J. W., y J. Lovett-Doust, 1993. *Introduction to plant Population Biology*. Blackwell Scientific Publication. Oxford. London 210 pp
- Smulders, M. J. M., Bredemeijer, G., Rus-Kortekaas, W., Arens, P y Vosman, B. 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor. Appl. Genet.* 97:264-272.
- Sokal, R. R. y F. J. Rohlf. 1995. *Biometry: the principles of statistics in biological research*. 3ra edición. W. H. Freeman and Company. New York.
- Solbrig, O. T. 1976. On the relative advantages of cross and self-fertilization. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 63: 262-276.
- Sosenski, C. P. 2004. Variación geográfica del sistema de apareamiento en *Datura stramonium*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- Stebbins, G.L. 1970. Adaptative radiation of reproductive characteristics in angiosperms. 1: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* 42: 307-326.
- Stephenson, A. G. 1981. Flower and fruit abortion proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 12: 253-279.
- Steets, J. y T.-L. Ashman. 2004. Herbivory alters the expression of a mixed-mating system. *American Journal of Botany* 91: 1046-1051.
- Takebayashi, N. y Delf, L. F. 2000. An association between a floral traits an inbreeding depression. *Evolution* 54: 840-846.
- Takebayashi, N. y P. L. Morrell. 2001. Is self-fertilization and evolutionary dead end? Revisiting an old hypothesis with genetic theories and macroevolutionary approach. *American Journal of Botany* 88(7): 1143-1150.
- Thom, C., Guerenstein P. G. Mechaber, W. L. y Hildebran J. H. 2004. Floral CO<sub>2</sub> reveals flower profitability to moths *Journal of Chemical Ecology* 30(6):1285-1288
- Uyenoyama, M. K. 1986. On the evolution of genetic incompatibility systems III. Introduction of weak gametophytic self-incompatibility under partial inbreeding. *Theoretical Population Biology* 34(1): 47-91.
- Uyenoyama, M. K. y D. M Waller. 1993. Ecological genetics factors directing evolution of self fertilization. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* 9: 327-381.
- Vogler D. W. S. Kaliz. 2001. Sex among the flowers: The distribution of mating systems. *Evolution* 55 (1): 202-224.

- Webb, C. J. y D. G. Lloyd. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. II. Hecogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24: 163-178.
- Wilson, M. F. 1983. *Plant reproductive ecology*. Wiley, New York, 282p
- Wright, S. 1977. *Evolution and the genetics of populations. Vol. 3. Experimental Results and Evolutionary Deductions*. University of Chicago Press, Chicago.
- Wyatt, R. 1983. Pollinator-plant interactions and the evolution of breeding systems. In *Pollination Biology*. Real, L. (ed.), pp. 51-95. Academic Press, New York.
- Yahara, T. 1992. Graphical analysis of mating system evolution in plants. *Evolution* 46(2): 557-561.
- Zamudio, J. 1999. Morfología floral y sistema de apareamiento de cuatro especies del género *Datura* (Solanaceae). Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM. México.



## ANEXO 1: **Técnica de tinción y conteo de polen/óvulos (Dafni 1992)**

- Se obtuvieron 36 muestras de polen de toda la población, de los individuos para los cuales ya se conocía la cantidad de óvulos producidos. Se obtuvo la proporción de polen/óvulos mediante el protocolo de estimación de nivel de entrecruzamiento (Dafni 1992).
- Se les hizo un *squash* a las anteras y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se aplicaron 0.9 ml de etanol al 70% + 3 gotas de azul de metileno + 4 gotas de detergente líquido, cuidando de enjuagar las pinzas en esta solución para evitar la pérdida de material.
- Se agitó la mezcla perfectamente bien por un minuto.
- Luego se hicieron 6 preparaciones separadas de 1  $\mu$ l en un hemocitómetro y se contó la cantidad de granos de polen.
- Para obtener el número total se calcula el número granos de polen promedio por antera basado en el factor de dilución (en este caso 1 ml).

## ANEXO 2: Extracción de ADN

Con el protocolo *Mini PREP* para *Pinus* modificado por Vázquez-Lobo y Delgado-Valerio (sin publicar), el DNA se obtuvo como se describe a continuación.

1. Moler en un micromortero 1 g de tejido con nitrógeno líquido.
2. Agregar a 0.2 g de tejido 1 ml de Buffer CTAB 2X (Tris-HCl 100 mM pH 8.0, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2% y  $\beta$ -ME 0.3%)
3. Recuperar todo en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y centrifugar a 10 000 rpm durante 8 min a 4 ° C.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600  $\mu$ l de buffer CTAB 2X. Incubar en un baño a 60 °C durante 10 min.
5. Agregar a cada tubo 600  $\mu$ l de cloroformo-octanol 24:1, agitar hasta homogenizar y centrifugar a 7000 rpm durante 12 min a 4 °C (o 15 min hasta que el sobrenadante quede transparente).
6. Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo y precipitar el ADN con 2/3 del volumen final (500  $\mu$ l aproximadamente). Dejar reposar 12 horas a -20 °C.
7. Centrifugar a 9000 rpm por 8 minutos a 4 °C. Eliminar el sobrenadante.
8. El *pellet* obtenido debe limpiarse con 1 ml de etanol al 70%, frío, y centrifugar a 7000 rpm durante 5 min.
9. Eliminar el sobrenadante y resuspender el *pellet* con 200  $\mu$ l de ddH<sub>2</sub>O

### ANEXO 3: Reacciones de amplificación

De acuerdo con el protocolo obtenido para microsatélites en Solanáceas (Smulders *et al.* 1997) se realizaron las pruebas de Amplificación (PCR) con cinco *primers* seleccionados de este mismo protocolo.

Se obtuvieron las concentraciones para cada reactivo, a fin de obtener una *mix-master* con soluciones *stock*. Se realizaron diferentes pruebas para PCR, un PCR directo del protocolo para *Lycopersicon* modificado de Smulders *et al.* (1997), en un volumen de 25  $\mu$ l a las siguientes concentraciones:

0.32 mM de cada *Primer*

4 mM de desoxirribonucleótidos (dNTPs)

50 mM de KCl

20 mM de Tris HCL pH 8.4

1.5 mM MgCl<sub>2</sub>

0.5 u de Taq DNA polimerasa

Las reacciones de amplificación fueron desarrolladas en tubos de microfuga usando un Termociclador (Gradient Cycler) y las condiciones utilizadas básicamente fueron: 1 ciclo de 94 °C por 3 minutos, 30 ciclos de 55 °C por 45 seg., 72 °C por 1 min. 45 seg. y 94 °C por 45 seg. Después del ciclo final, un ciclo de 55 °C por 45 seg. y 72 °C por 3 min.

Se realizó un PCR directo del protocolo en un volumen de 20  $\mu$ l. Posteriormente se realizó un PCR modificando la concentración de los oligonucleótidos (dNTPs) en volúmenes de 25  $\mu$ l y 12  $\mu$ l, y por último se realizó un PCR con el protocolo de HAIR-PINE para *Pinus* (12  $\mu$ l). A cada uno de éstos PCR se les modificó la cantidad de ADN (3  $\mu$ l y 1.5  $\mu$ l).

Se encontró que donde mejor amplificaba era cuando se modificaba la concentración de dNTPs en un volumen de 12  $\mu$ l para el protocolo directo de Solanáceas con un volumen de 3 $\mu$ l de DNA. Posteriormente se aumentó la Taq DNA polimerasa a 1 $\mu$ l por reacción. Sin embargo, aún con todas estas modificaciones, el amplificado no fue el óptimo, por lo cual se incrementaron los ciclos de alargamiento de 30 a 35 y la temperatura se bajó de 55 °C a 50 °C. Por último se realizó una curva de Mg para obtener la concentración idónea para que la banda del amplificado fuera lo más clara posible.

Se encontró que el mejor amplificado para 4 *primers* es con una concentración de Mg de 2.0 mM. Una vez ajustado el PCR se procedió a continuar con la técnica de microsatélites.

#### ANEXO 4: Técnica de microsatélites

Para la elaboración del gel de acrilamida, se prepara Acrilamida al 40% y se le agrega bis-acrilamida al 2%. Se filtra. Se prepara TBE 10X.

La cámara de corrimientos para los Microsatélites tiene dos láminas de vidrio, una más pequeña que la otra. En la pequeña queda adherido el gel que se teñirá posteriormente con nitrato de plata.

##### **Lámina de vidrio pequeña**

Se lava perfectamente con agua caliente, se removi6 el exceso de gel existente en la misma. Se us6 un raspador de pl6stico. Posteriormente se volvi6 a enjuagar con agua caliente, para que no quedara ning6n residuo de detergente, porque de lo contrario se manchar6 el gel cuando se ti6nera con la plata.

Se coloca en una superficie plana y se sec6 con una toalla de papel y con otro trozo de toalla de papel se limpia con alcohol al 70%.

En un tubo eppendorf se prepar6 una mezcla (*stick*) que consta de 990  $\mu$ l de alcohol et6lico absoluto, 5  $\mu$ l de 6cido ac6tico, y 3  $\mu$ l de bind-sileno. Esta mezcla se aplica cuidadosamente sobre la l6mina con una toalla de papel peque6na frotando de arriba hacia abajo evitando pasar dos veces sobre el mismo lugar, hasta asegurarse de una aplicaci6n completa. Se deja secar. Una vez seca la l6mina de vidrio se le aplica agua caliente y se seca perfectamente con una toalla de papel con cuidado de no quitar el *stick*, y se le aplican 2.0 ml de Alcohol et6lico al 96%, y se limpia perfectamente por el lado que no est6 el pegamento.

##### **L6mina de vidrio grande**

Se enjuaga perfectamente con agua caliente, se seca con una toalla de papel y se limpia con alcohol al 70%.

Se le aplican 300  $\mu$ l de RAIN-X con un trozo de papel de arriba hacia abajo, solamente por el lado que se va a trabajar, asegur6ndose que quede perfectamente cubierto. Se deja secar por 5 minutos. Esto se hace para que no se pegue la superficie de esta l6mina de vidrio al gel.

Se enjuag6 con agua caliente y se sec6 cuidadosamente con una toalla de papel.

##### **Montaje de las placas con el gel de poliacrilamida**

Se colocan las l6minas una contra otra y se agrega acrilamida preparada al 60% (60 ml de acrilamida al 40%, 5  $\mu$ l de APS y 5  $\mu$ l de Temed). Se espera a que polimerice perfectamente, de 45 min. a 12 h. Una vez polimerizada la acrilamida, las placas se lavan por fuera con alcohol et6lico al 70% para que no queden residuos de acrilamida. Se colocan en la c6mara de corrida, se les coloca el peine entre una y otra, apenas tocando el gel de acrilamida. Se le agrega TBE 0.5X (1000 ml) a la c6mara de corrida.

Las muestras de amplificado se desnaturalizan a 94  $^{\circ}$ C por 5 min. junto con el marcador de 10 pb.

Se procede a cargar las muestras de amplificado 6  $\mu$ l en cada pozo, al inicio y al final de las muestras se coloca marcador de 10 pb. Se corre con un voltaje de 60 watts, una temperatura de 49  $^{\circ}$ C y el tiempo de corrida depende del tama6o del *primer* a analizar.

### **Tinción del gel de acrilamida**

Una vez que sale el gel, se despegan las dos láminas de vidrio con una espátula, el gel debe quedar sobre la lámina pequeña. Se coloca en un recipiente y se le agrega ácido acético al 10%. Se agita durante 40 min o toda la noche.

El gel se coloca en un recipiente con agua destilada fría durante un minuto para enjuagar, y antes de que se acabe el minuto, se le tira el agua y se le vuelve a poner agua fría, se enjuaga otra vez por un minuto. Antes de que se acabe el minuto se le tira el agua y se vuelve a enjuagar por 2 minutos.

Aparte, se prepara en 1000 ml de agua 1.5 g de nitrato de plata y 1.5 ml de formaldehído al 37%.

Se saca el gel y se coloca en un recipiente limpio, se le agrega el formaldehído con el nitrato de plata, se agita por 30 min.

Se prepara la solución de impregnación formaldehído con la plata.

Se colocan 1000 ml de agua destilada fría en un vaso de precipitados, se agregan 30 g de carbonato de sodio y durante 30 min. se agita. Una vez disuelto se le agregan 1 ml de tiosulfato y 1.5 ml de formaldehído.

Se prepara un recipiente con agua destilada fría y otro con la solución de impregnación.

Posteriormente se coloca el gel en el recipiente con agua 4 segundos y se saca para colocarse en el otro recipiente con la solución de impregnación agitándose aproximadamente 20 minutos (puede variar) hasta que comiencen a teñir las bandas. Se revisa en luz blanca. Una vez obtenidas las bandas, el gel se coloca en ácido acético al 10 % para neutralizar la tinción y fijar el gel, aproximadamente 20 minutos.

Se enjuaga con agua de la llave y se deja secar.