



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIFERENCIACIÓN ADAPTATIVA DEL FENOTIPO FLORAL DE *Datura*
stramonium: VARIANZA GENÉTICA DEL NÉCTAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

PRESENTA:

JORGE OCTAVIO JUÁREZ RAMÍREZ



DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedico esta tesis a mis papás,
sin cuyo apoyo jamás habría
llegado a este punto de la vida.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Juan Núñez Farfán por abrirme las puertas de su laboratorio, por enseñarme a trabajar y alentarme a no claudicar en los proyectos difíciles pero que valen la pena. Agradezco a mis sinodales, el Dr. Erick de la Barrera Montppellier, Dr. Luis Eguiarte Fruns, Dr. Juan Fornoni Agnelli y el Dr. César Domínguez Pérez-Tejada por sus valiosísimos comentarios y sugerencias, los cuales no sólo me permitieron darle forma a mi tesis, sino también me enseñaron varias sutilezas de este oficio.

Agradezco especialmente al Biól. Armando López Velázquez, quien además de ser un gran amigo, resultó ser un maestro para mí como pocos tuve. Sin su apoyo, observaciones y enseñanzas me habría sido muy difícil realizar este trabajo.

Al Biól. Rafael Bello Bedoy por ayudarme siempre que lo necesité, tanto en mano de obra como en las explicaciones que le requerí.

Al M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez por aconsejarme y poner a mi disposición sus recursos para realizar los análisis del néctar.

A la M. en C. Carmen Márquez Alonso y a la Química Eréndira García Ríos por su invaluable ayuda en los análisis cuantitativos del néctar, pues el trabajo no fue poco y la calidad de los datos proporcionados fue insuperable.

A mis padres, Verónica Deyanira Ramírez Téllez y Jorge Octavio Juárez Liévanos, que a pesar de las dificultades, nunca me retiraron su apoyo y cariño. Les debo tanto que unas líneas en este escrito no alcanzan para expresar lo que siento.

A mis amigos que alguna o muchas veces me ayudaron a medir flores: Carmen Nájera, Berenice Sánchez, Isaín Picazo.

A Ruth Esther Rodríguez Taboada por hacerme el favor de dibujar las ilustraciones de la flor, ayudarme a medir y, en general, por ser gran parte de mi felicidad en esta etapa.

A los chicos del laboratorio, Diego, Jonathan, Etzel y Laura Lorena, por hacerme sentir como parte del grupo y darme un ambiente agradable en el cual trabajar.

Agradezco a mi casa de estudios, la UNAM, a la Facultad de Ciencias, y a CONACYT (proyecto "Evolución de la autogamia en *Datura stramonium*" Clave 42031-Q) por proporcionarme los recursos necesarios.

Finalmente, agradezco al Instituto de Ecología de la UNAM, donde nació este trabajo y mi amor por la Ecología.

“The great tragedy of Science - the slaying of a beautiful hypothesis by an ugly
fact.”

(La gran tragedia de la Ciencia – el asesinato de una bella hipótesis por parte de una
fea evidencia)

Thomas H. Huxley

Índice

Resumen	3
Abstract	4
Introducción	
<i>Las Flores</i>	5
<i>Evolución Fenotípica</i>	6
<i>El Néctar de las Flores</i>	10
Hipótesis	14
Objetivos	15
Materiales y Método	
<i>Sistema de Estudio</i>	15
<i>Descripción de los Sitios de Estudio</i>	16
<i>Diseño Experimental</i>	
<u>Trabajo en Invernadero</u>	17
<u>Análisis de los Carbohidratos</u>	20
<i>Análisis Estadístico</i>	
<u>ANOVA</u>	21
<u>Diferenciación Poblacional</u>	21
<u>Variación Genética y Heredabilidad</u>	22
<u>Correlación</u>	24
Resultados	
<i>Diferenciación Poblacional</i>	25
<i>Heredabilidad</i>	26

<i>Correlación</i>	26
Discusión	36
Conclusiones	40
Apéndice	41
Bibliografía	42

Diferenciación adaptativa del fenotipo floral de *Datura stramonium*: varianza genética del néctar

Resumen

Si dos poblaciones de *Datura stramonium* en el centro de México difieren en intensidad de selección ejercida por los polinizadores (ausencia de esfíngidos en Teotihuacán, y presencia en Ticumán) sobre los caracteres florales y del néctar, pueden surgir diferencias en variación genética y promedios. También pueden surgir correlaciones favorecidas por selección, si el tamaño de la flor y el néctar se seleccionan conjuntamente. Los caracteres del néctar, como volumen y composición de carbohidratos, pueden reflejar su relación con la selección por esfíngidos. Un experimento en invernadero, donde 125 plantas de cada una de las poblaciones se germinaron y arreglaron en un diseño de familias de hermanos completos, reveló que los valores promedio fueron más altos en Ticumán que en Teotihuacán, y que la sacarosa es el azúcar predominante del néctar en todos los casos, siendo la diferencia entre la sacarosa y los otros azúcares más marcada en Ticumán. Hay muchas heredabilidades significativas, y aquellas relacionadas con tamaño floral y recompensa fueron más altas en Teotihuacán. La menor integración de la flor en Ticumán puede reflejar restricciones estructurales. El néctar y tamaño floral están correlacionados en ambas poblaciones.

Las diferencias en tamaño floral y recompensa pueden estar relacionadas con la ausencia y presencia de los polinizadores en cada población. El porcentaje de sacarosa encontrado en ambas poblaciones es consistente con el síndrome de polinización por esfíngidos, y las mayores concentraciones en Ticumán nos llevan a pensar que el atributo ha sido seleccionado ahí. Aunque algo de variación pudo haber sido erosionada por la selección, los caracteres florales y del néctar pueden evolucionar en Ticumán.

Abstract

Floral traits, whose main function is the attraction of pollinators, are subject to selective pressures. If two populations in central Mexico of *Datura stramonium* differ in intensity of selection exerted by pollinators on floral traits (absence of sphingids in Teotihuacán, State of Mexico, and presence in Ticumán, Morelos), we expect this shall result in differentiation among floral traits means, variation, and ultimately in population differentiation at the genetic level. Also, correlations among floral and nectar traits can arise if flowers traits are selected jointly. Furthermore, nectar traits such as volume and carbohydrate composition may reflect their relationship with natural selection by sphingids. To assess this, we conducted a greenhouse experiment, where 125 plants of each of two populations were grown and arranged in 20 full-sib families. 8 morphological floral traits related to flower size, and nectar volume and composition were measured. We obtained means, correlations and heritabilities for all traits. The experiment revealed that average values were higher in Ticumán than in Teotihuacán, and sucrose is the predominant sugar in the nectar in all cases, being the differences between sucrose and other sugars more marked in Ticumán. Most traits had significant heritabilities in one or both populations, and those related to flower size and nectar reward were higher in Teotihuacán. Differences in correlations between populations may reflect a structural restriction for integration in bigger flowers, though nectar and flower size still correlate in big flowers in both populations. Differences in flower size and nectar reward are consistent with the selection hypothesis, and enforce evidence found by other researchers in our group. Sucrose percentage in nectar agrees with hawkmoth pollination syndrome, and even higher concentrations in Ticumán lead to think that this trait has been selected there. Heritabilities tell that all these attributes are potentially selectable, and while some variation could have been eroded by selection, traits related to flower size and nectar still have potential to evolve in Ticumán.

Introducción

Las Flores

La flor es una estructura compleja que desempeña un papel importante en la reproducción de las plantas, al fungir como mediadora con los polinizadores (Bell, 1985). Su función primordial es realizar la reproducción. Tal es la importancia de las flores que al aumentar la eficiencia reproductiva, esta adaptación se extendió y diversificó hasta lo que existe hoy en día, teniéndose clasificadas unas 260,000 especies de plantas con flores (Schiebinger, 1996; Judd *et al.* 2002). Existen estudios que sugieren que los caracteres florales tienen una relación más crítica con la exportación del polen (función masculina) que con la fertilización de los óvulos (función femenina), pues esta última se ve satisfecha con un mínimo de visitas por polinizadores (Bell, 1985).

Las flores ofrecen distintos tipos de recompensas a los polinizadores potenciales, ya sea en el néctar (carbohidratos, aceites, aminoácidos, metabolitos secundarios) o el pólen. Elementos como el color, la forma de las flores, el tamaño de las estructuras, el aroma y el ciclo de apertura tienen valor adaptativo. Fungen como atrayentes para los polinizadores y, dependiendo de las capacidades sensoriales e historia de vida de éstos, los polinizadores pueden seleccionar diferentes tipos de estructuras florales (Gegear, 2001). Por ejemplo, Bell (1985) realizó una serie de experimentos que comprobaron la relación del tamaño de las flores con el número de visitas de los polinizadores, lo cual sugiere una preferencia de éstos últimos hacia flores más grandes. En el género *Datura* hay trabajos que abordan la interacción planta-polinizador. En *Datura wrightii*, con el mismo polinizador (*M. sexta*), se realizó un experimento que mostró la preferencia de los esfíngidos por flores más grandes y olorosas, incluso si las flores eran artificiales (Raguso y Willis, 2005). En otro estudio con *Datura wrightii* se sugiere que la emisión floral de CO₂ es un indicador que podría estar relacionado con la cantidad de néctar presente (Guerenstein *et al.*, 2004; Thom *et al.*,

2004). Por otro lado, existe al menos un estudio que sugiere una relación entre la atracción por polinizadores y el herbivorismo por parte de sus larvas (Adler & Bronstein, 2003).

Las adaptaciones que presentan las flores dependen del tipo de polinizadores con los que ha interactuado a largo de su historia evolutiva. Ésto ha llevado a eventos de evolución convergente y ha dado lugar a la aparición de “síndromes de polinización” (Faegri y van der Pijl, 1979; Proctor *et al.* 1996). Los síndromes de polinización son un conjunto de caracteres florales, cuya función primordial es la atracción de un tipo de polinizador. Plantas filogenéticamente alejadas pueden llegar a presentar un conjunto de características florales semejantes si se han adaptado al mismo tipo de polinizador, lo cual además genera correlación entre los caracteres (Godin, 2004). En un estudio con especies del género *Nicotiana* se encontró que muchos caracteres del néctar están relacionados con el polinizador dominante y, en ocasiones, con el sistema de apareamiento de cada especie (Kaczorowski *et al.* 2005). Sin embargo, las restricciones filogenéticas y presiones selectivas variables pueden llevar a que no se presente el síndrome de polinización esperado para varias especies. Por ejemplo, *Jaborosa integrifolia*, *Lycium vimineum* y *Petunia axillaris* tienen porcentajes diferentes a los esperados para los esfíngidos (tabla 1). En la última década han surgido críticas hacia el concepto de síndrome de polinización (Waser *et al.* 1996). Sin embargo, se ha demostrado que es muy útil agrupar las plantas por grupos de polinizadores funcionales. (Fenster *et al.* 2004).

Evolución Fenotípica

La evolución de los atributos florales y el desarrollo de correlaciones entre caracteres producidas por selección natural requieren que exista variación heredable en la población (Falconer & MacKay, 1996). Desde la década de los cuarenta existen estudios importantes que pretendían demostrar la base genética de la diferenciación poblacional en plantas para atributos florales y vegetativos (Clausen, *et al.* 1940). La variación directamente medible en los organismos, la variación fenotípica, tiene varios componentes:

$$V_P = V_A + V_D + V_E + V_I$$

Donde V_A es la varianza genética aditiva, V_D la varianza debida a la dominancia, V_E la varianza puramente ambiental y V_I la que se debe a la interacción entre los genes (epistática) (Falconer & MacKey, 1996). Para que la variación pueda ser sujeta a selección, el componente genético (heredable) debe ser lo suficientemente importante con respecto a los ambientales. Esta relación puede medirse por medio de la heredabilidad (H^2):

$$H^2 = V_G / V_P, \text{ donde } V_G = V_A + V_D$$

Cuando una especie se encuentra distribuida en poblaciones separadas, éstas en ocasiones difieren en la magnitud de su variación y promedios fenotípicos (Futuyma, 2005). El estudio de estas diferencias ha provisto de un mejor entendimiento de los mecanismos evolutivos. La asociación de patrones de variación fenotípica poblacional con la variación ambiental de la localidad aporta evidencias de variación geográfica adaptativa debida a la selección natural (Futuyma, 2005). Por ejemplo, un estudio de caracteres florales métricos en tres poblaciones de *Nicotiana glauca* sugiere que la variación en estos caracteres está relacionada con la presencia y abundancia de sus polinizadores (colibríes) (Nattero & Cocucci, 2007).

Diferentes estudios han demostrado que en muchos casos, los atributos florales tienen un alto grado de variación genética (Mitchell, 1993). Además existen diferentes intensidades de selección entre poblaciones, en relación a la presencia y tipo de polinizadores en cada lugar. Si la variación en los atributos florales tiene consecuencias en el éxito reproductivo, se espera que las poblaciones naturales presenten valores fenotípicos promedio que maximicen la adecuación; acordes al tipo, abundancia y efectividad del polinizador (Hamrick, 1982). Por ejemplo, en una población donde no existen presiones selectivas hacia el tamaño de la flor existirá mayor variación, al no importar la existencia de un valor promedio óptimo. En otra población donde la selección haya sido intensa a favor del tamaño, la variación se verá disminuida debido a la reproducción diferencial de individuos con ciertos valores (Herrera, 2004). Otros caracteres pueden evolucionar con diferentes presiones impuestas por los polinizadores. La hercogamia es la separación espacial de los

órganos masculinos y femeninos en las flores perfectas, y la magnitud de esta separación favorece el entrecruzamiento. Por ésto, en una población con presencia de polinizadores se esperarían flores con hercogamia más pronunciada, ya que el entrecruzamiento disminuye la depresión endogámica y ésto podría tener efectos positivos en la adecuación. En una población sin polinizadores se espera que las flores posean una hercogamia menor, pues la autopolinización es el principal método de reproducción en este tipo de poblaciones (Barret, 2002). En este caso existen presiones selectivas diferentes que “llevan” a promedios diferentes de hercogamia, dependiendo de la presencia o ausencia de los polinizadores, así como a reducir los costos que conlleva producir estructuras de atracción sin beneficio.

La selección natural también modificar el grado de asociación (correlación) entre los caracteres florales. Si ciertas combinaciones de carecteres brindan beneficio en la adecuación, la selección natural favorecerá el ligamiento entre esos loci; los caracteres también pueden correlacionarse por estar afectados por los mismos genes (Conner 2000). La correlación genética negativa puede ser una restricción para la evolución si existe evolución antagonista. Sin embargo, una presión selectiva lo suficientemente fuerte en un largo periodo de tiempo puede modificar esta relación.

Tabla 1. Porcentaje de azúcares en el néctar de varias especies de solanáceas y sus principales polinizadores. (¹Bernardello, 1986; Voss *et al.* 1980; ²Kaczorowski *et al.* 2005; ³Galetto, 1993; ⁴Vesprini y Galetto, 2000; ⁵Galetto *et al.* 1998 ; ⁶Galetto, 1991; ⁷Galetto *et al.* 1999; ⁸Freeman *et al.* 1985 ; ⁹Goldblatt y Manning, 2002; ¹⁰Freeman *et al.* 1991)

Planta (Familia <i>Solanaceae</i>)	%sacarosa	%glucosa	%fructosa	Principal polinizador
<i>Cestrum parqui</i>	28.90	34	37	Esfíngidos ³
<i>Jaborosa integrifolia</i>	0	48.70	51.30	Esfíngidos ⁴
<i>Lycium vimineum</i>	2.10	67.70	30.1	Esfíngidos ⁵
<i>Nicotiana alata</i>	69.56	13.04	17.39	Esfíngidos ²
<i>Nicotiana longiflora</i>	41.50	34.10	24.30	Esfíngidos ⁶
<i>Petunia axillaris</i>	10	49.80	39	Esfíngidos ³
<i>Ipomopsis australis</i>	82.6	7.9	9.4	Esfíngidos ⁸
<i>Ipomopsis longiflora</i>	84.5	8.5	6.7	Esfíngidos ⁸
<i>Gladiolus liliaceus</i>	96.5	2.5	1	Esfíngidos ⁹
<i>Gladiolus recurvus</i>	82	11	7	Esfíngidos ⁹
<i>Cerbera manghans</i>	84.4	3.7	11.9	Esfíngidos ¹⁰
<i>Lycium cestroides</i>	8.21	57.38	34.39	Mariposas ¹
<i>Lycium gilliesianum</i>	2.90	60.10	37	Mariposas ⁵
<i>Lycium infaustum</i>	0.20	66.60	33.10	Abejas ⁵
<i>Lycium nodosum</i>	1.50	50.50	47.90	Abejas ⁵
<i>Lycium ciliatum</i>	0.50	60.90	38.50	Abejas ⁵
<i>Lycium chilense</i>	1.20	59.90	38.90	Abejas ⁵
<i>Lycium elongatum</i>	0.10	71.30	28.50	Abejas ⁵
<i>Salpichroa origaniflora</i>	56.20	20.20	23.60	Abejas ⁷
<i>Markea neurantha</i>	0	39.80	60.20	Murciélagos ⁵
<i>Nicotiana forgetiana</i>	73.07	7.6	19.23	Colibríes ²
<i>Nicotiana mutabilis</i>	61.53	17.94	20.51	Colibríes ²

El Néctar de las Flores

Las visitas a las flores son eventos energéticamente costosos para los polinizadores, por lo que se espera que éstos últimos obtengan beneficios al visitarlas. Al ser la una función del néctar “atraer” y “recompensar” a los polinizadores, sus características ejercen impacto directo en la adecuación.

En general, el néctar es una mezcla simple de azúcares (los más comunes, sacarosa y sus componentes monosacáridos: glucosa y fructosa), y en ocasiones contiene algunos metabolitos secundarios. Un estudio de la ultraestructura de los nectarios ha sugerido la forma en que se produce el néctar de manera general. Se piensa que el néctar viene directamente de la solución del floema, se traslada a las células del tejido nectarífero por vía simplasto, donde el retículo endoplásmico y el aparato de golgi participan, así como la enzima invertasa en la membrana celular. El néctar es entonces secretado por pinocitosis reversa hacia el nectario (Fahn, 1979)

La invertasa (también llamada “sacarasa”) es la enzima que cataliza la hidrólisis de la sacarosa en fructosa y glucosa.

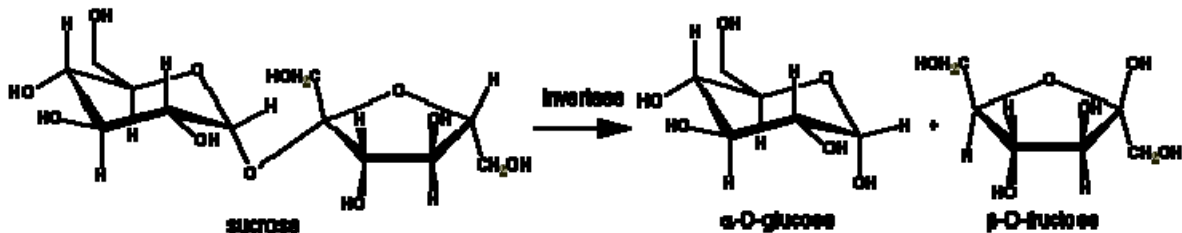


Figura 1. Reacción de la invertasa (Chaplin, 2006).

La reacción en el sitio activo se describe en la figura 2.

El néctar es un atributo medible en diferentes aspectos: composición, concentración (absoluta y relativa) y volumen. Al estar constituido por moléculas energéticamente costosas y agua, el néctar representa un costo de asignación de recursos para la planta (Salguero-Farías, 1999). La sacarosa proviene directamente de la savia, y se supone que los

monosacáridos se originan de la descomposición de la sacarosa, lo cual resultaría en una relación uno a uno entre los monosacáridos. Cuando la relación glucosa/fructosa es diferente a 1.0, se supone que un mecanismo adicional afecta la concentración relativa. Estos mecanismos no son comprendidos del todo (Nicolson, 1998). Además, la hidrólisis de la sacarosa aumenta la concentración osmótica del néctar y hace que entre más agua al nectario, afectando el volumen. Se esperaría que exista alguna correlación entre los atributos del néctar, pues la sacarosa afecta tanto al volumen del néctar como los porcentajes de azúcares (Nicolson, 1998).

La composición y concentración de azúcares en el néctar están relacionadas con la filogenia de la planta, el volumen de néctar secretado y las preferencias de los polinizadores (ver la Tabla 1). En general, insectos como los esfíngidos requieren de néctares más concentrados, por lo que la sacarosa es ideal como azúcar dominante. Un néctar más concentrado en sacarosa tiene menor osmolaridad que uno igualmente concentrado en hexosas, haciéndolo físicamente más asimilable para el insecto (aunque requiere de la sacarosa) (Nicolson, 1998).

A pesar de ser caracteres frecuentemente sujetos a presiones selectivas, la concentración y volumen del néctar son muy influenciados por el ambiente, y por tanto, distintos genotipos para caracteres del néctar podrían tener fenotipos similares, lo que representaría una limitante para la selección. Un estudio con *Ipomopsis longiflora* concluyó que existe mayor variación en caracteres del néctar en poblaciones naturales que en plantas de invernadero (Freeman y Wilken, 1987). Incluso se sugiere que factores extrínsecos, como la exposición del néctar a los polinizadores, afectan el contenido de sacarosa al envejecer las flores. Otro estudio con ramets en una población natural de *Heliconia psittacorum* determinó que las producciones excepcionales de néctar ocurrían sólo en ramets creciendo en suelo húmedo (Feinsinger, 1983), evidenciando la influencia ambiental. La concentración del néctar de *Echium vulgare* y *Sinapis alba* está fuertemente correlacionada con la humedad y la temperatura ambientales. Además, en *Echium vulgare* se encontró menor heredabilidad del volumen del néctar en condiciones controladas que en el campo, existiendo entonces una

posible interacción genotipo-ambiente; por otra parte, el volumen de néctar no está correlacionado con los caracteres vegetativos o florales (Leiss, 2004) .

Una forma en que la planta puede contrarrestar la influencia del ambiente, como la lluvia, es por mecanismos homeostáticos. En *Pyrostegia venusta*, la manipulación de la concentración y el volumen no afectaron sustancialmente la producción total de néctar. Sin embargo, la remoción de néctar (emulando la visita del polinizador) hace que el volumen aumente, pero la masa de azúcar se mantiene igual resultando en un néctar más diluido (Galletto *et al.* 1993).

Otros estudios sugieren la base genética de la producción de néctar. Un estudio con “ramets” de *Mirabilis multiflora* encontró indicios de diferencias genéticas entre “genets”, mas no se obtuvieron valores de varianza genética ni heredabilidad (Hodges, 1993). Un estudio con especies del género *Nicotiana*, encuentra que el volumen del néctar está positivamente correlacionado con el largo de la corola (Kaczorowski *et al.* 2005), lo cual sugiere que la corola es una señal visual de la cantidad de néctar presente.

En cuanto a la heredabilidad en los caracteres del néctar, se han hecho pocos estudios, y casi todos se realizan en ambientes controlados. Existen varias dificultades en este tipo de estudios: plasticidad fenotípica del néctar, variabilidad temporal, dificultad de extracción y costos económicos del análisis. Tampoco se han hecho suficientes estudios de interacciones genotipo-ambiente en la producción de néctar, lo cual es una posibilidad a la que se enfrentan los polinizadores en el campo (Mitchell, 2003). Un estudio en *Echium vulgare* demostró claramente la existencia de esta interacción en la producción de néctar (volumen) con respecto a la disponibilidad de agua (Leiss y Klinkhamer, 2005). Los pocos trabajos sobre heredabilidad del volumen del néctar encuentran valores significativos (mayores a 0.35), aunque en el campo tiende a bajar drásticamente (0.05-0.15 en *Ipomopsis aggregata*) (Mitchell, 2003). No existen estudios sobre la heredabilidad de componentes individuales del néctar.

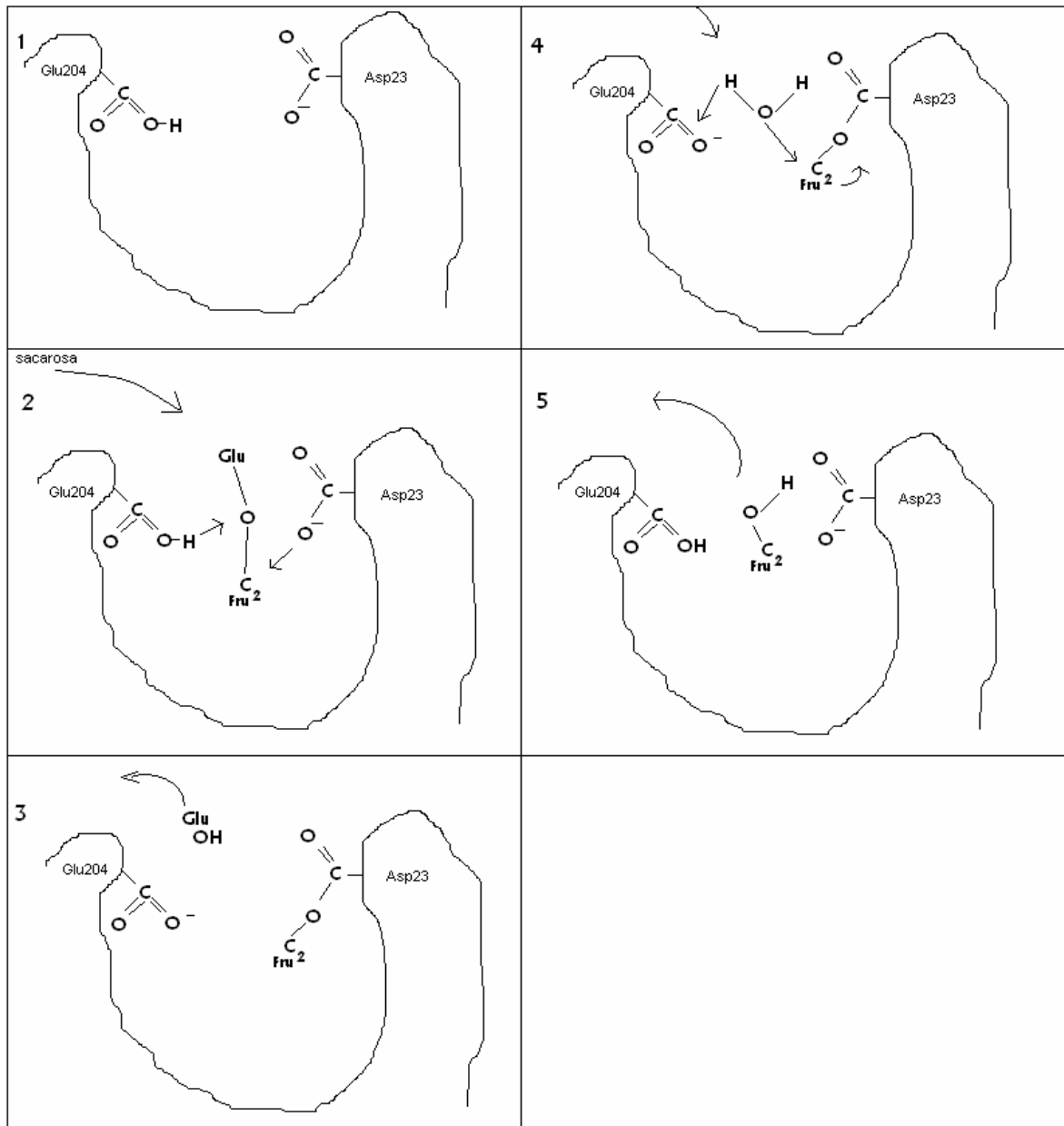


Figura 2. Reacción en el sitio activo de la invertasa. (1) las subunidades Glu204 y Asp23 se encuentran listas para iniciar la reacción. (2) una molécula de sacarosa entra al sitio activo de la enzima, con sus monómeros de glucosa (**Glu**) y fructosa (**Fru**). El oxígeno cargado negativamente de Asp23 reacciona con el carbono de la fructosa, y el hidrógeno de Glu204 con el oxígeno de la glucosa. (3) Se libera la glucosa y Glu204 queda con un oxígeno cargado negativamente. El monómero de fructuosa queda unido a Asp23. (4) Una molécula de agua entra al sitio activo. Uno de los hidrógenos del agua reacciona con el oxígeno cargado de Glu204, mientras que el oxígeno e hidrógeno restantes se une al carbono de la fructosa, separándola de Asp23 y dejándola en su estado inicial. (adaptado de Auclair, 2007)

Hipótesis

Datura stramonium es polinizada por esfíngidos (*Manduca sexta*), pero existen diferencias entre las poblaciones naturales de Teotihuacán y Ticumán en la tasa de polinización, teniendo Ticumán presencia de esfíngidos y Teotihuacán no. Si las diferencias en la abundancia de esfíngidos han persistido por generaciones, y los insectos seleccionan flores más grandes, esperaríamos diferencias cuantitativas y cualitativas en la recompensa (néctar), en los atributos florales relacionados con la atracción a polinizadores (tamaño de sus estructuras), y los que promueven el entrecruzamiento (la hercogamia) entre poblaciones de toloache. Además, la variación genética de los atributos seleccionados sería menor en la población donde hay selección, puesto que la selección de un fenotipo óptimo tiende a erosionar la variación.

Como la flor es una estructura que funciona de manera coordinada, y los caracteres de atracción y recompensa pueden estar siendo seleccionados correlativamente, se espera que en Ticumán exista un mayor número de correlaciones significativas y más fuertes.

Objetivos

- 1) Determinar la existencia de diferenciación poblacional fenotípica y genotípica entre las poblaciones de *D. stramonium* de las localidades de Teotihuacán y Ticumán para los atributos florales y del néctar.
- 2) Estimar la heredabilidad de los atributos florales y del néctar.
- 3) Estimar la correlación fenotípica y genotípica entre los atributos florales y del néctar.

Materiales y Método

Sistema de estudio

Datura stramonium (Solanaceae) es una planta anual ruderal que tiene una amplia distribución en México. Sus nombres comunes más conocidos son “toloache” en México, y “Jimsonweed” en Estados Unidos. Mide de 30 a 150 cm de alto.

Las flores presentan el síndrome de polinización por esfíngidos: flores tubulares de coloración blanca y morada, fragantes, con néctar concentrado en sacarosa y anthesis nocturna. Abren al atardecer y duran hasta la mañana del día siguiente; la producción de néctar comienza a las 1900 horas y termina a las 2400. Las concentraciones de néctar van desde 3.9% hasta 10-24% (Núñez-Farfán *et al.* 1996), e incluso más del 32% (A. López Velásquez, *com. pers.*). En la composición del néctar predomina la sacarosa, seguido de la fructosa y glucosa (Núñez-Farfán *et al.* 1996).

Las poblaciones varían ampliamente en su tasa de entrecruzamiento, habiendo un reporte de 1.9% en una población de Carolina del Norte, EUA (Motten y Antonovics, 1992), y de hasta 80% en Ticumán (Cuevas, 1996). Existen caracteres relacionados con la adecuación que tienen un coeficiente de depresión endogámica alto, y un carácter (hercogamia) está

correlacionado con la tasa de entrecruzamiento individual, y se mantiene con variación fenotípica a pesar de las bajas tasas de entrecruzamiento (Motten y Stone, 2000).

Descripción de los Sitios de Estudio

El pueblo de San Juan Teotihuacán se encuentra en el municipio de Teotihuacán (19° 41' latitud norte, 98° 52' longitud oeste); ubicándose en la cuenca de México. El clima predominante es templado semiseco con lluvias en verano. La temperatura media anual es de 15.4 °C, llegando a ser hasta de 33°C. La incidencia máxima de lluvia ocurre en el mes de julio y fluctúan entre los 55.6 y los 100 milímetros. El período de secas se presenta de noviembre a febrero: la primera helada sucede en octubre y la última en marzo.

El pueblo de Ticumán se encuentra en el estado de Morelos. (18°41' latitud norte, 99°07' longitud oeste). Su clima es subtropical y húmedo caluroso con invierno poco definido, con la mayor sequía a finales del otoño, invierno y principios de primavera. La temperatura media anual es de 23.5°C con precipitación de 840 milímetros anuales y el periodo de lluvias es de junio a octubre (H. Ayuntamiento de Tlaltizapan, 2005). En ambas localidades existen poblaciones de *Datura stramonium* que se han venido estudiando desde principio de los noventa (Núñez-Farfán, 1991; Cuevas, 1996; Valverde *et al.* 2001; López-Velázquez, 2003), por lo que se puede asumir que son poblaciones estables.

Se ha encontrado evidencia de selección estabilizadora del largo de flor por polinizadores en Ticumán, hacia un óptimo que es mayor que el promedio en Teotihuacán (López-Velázquez 2003).

En 2004 se realizó un experimento de observación de la tasa de visita de esfíngidos en ambas poblaciones, donde se observa que la tasa de polinización es ostensiblemente mayor en Ticumán (0.0697 flores por hora) que en Teotihuacán (0.002 flores por hora) (López-Velázquez, *com. pers.*).

Diseño Experimental

Trabajo en invernadero

Para medir la variación intra e interpoblacional en los caracteres florales y del néctar, así como la heredabilidad de los mismos, se utilizó un diseño experimental de hermanos completos con dos poblaciones. Este diseño permite estimar la variación fenotípica atribuible a un componente genético y la diferenciación poblacional.

En 2004 se recolectaron frutos de una población natural en San Juan Teotihuacán, Estado de México, y de una población en Ticumán, Morelos. Se recolectaron de 100 a 120 plantas en cada población, con 1 metro o más de distancia entre cada una para obtener familias genéticas. Se seleccionaron varios frutos por planta. Cabe señalar que las familias obtenidas de este procedimiento son una mezcla de medios hermanos y hermanos completos (Lawrence, 1984). Para no sobreestimar la variación en familias de este estilo, se calculó una heredabilidad en sentido amplio (H^2).

Las semillas fueron remojadas en agua durante dos días para remover parte de los alcaloides que naturalmente contiene la testa y promover la germinación. Posteriormente, cada lote de semillas de cada planta fue sembrado en una maceta y colocado en el invernadero para que germinaran, en el Instituto de Ecología de la UNAM.

El proceso de germinación duró de una a tres semanas aproximadamente. De cada maceta se seleccionaron y transplantaron 5 a 6 plántulas a macetas individuales con filtros de papel en el fondo (para evitar la pérdida excesiva de nutrientes). Se etiquetaron, anotando la población, la familia y el número de individuo.

En total se tuvieron 250 plántulas repartidas entre 40 familias, y estas a su vez divididas en dos poblaciones (125 plantas por población).

Desde el sembrado hasta la aparición del primer botón floral, las plantas fueron regadas *ad libitum* diariamente.

La floración comenzó el 11 de mayo de 2006, a partir de lo cual se comenzó a regular el riego, dando un litro diario a cada planta para evitar influir sobre el volumen del néctar. Se midieron los caracteres morfológicos florales (ver figura 3) y el diámetro del tallo con un vernier digital marca Mitutoyo®, y la altura de la planta con un flexómetro. Se midieron dos o más flores por planta.

Las flores fueron cortadas para la medición y almacenamiento del néctar. Éste se extrajo por medio de una jeringa de inyección para HPLC marca Hamilton®, graduada en microlitros. Cada contenido de néctar fue almacenado en un tubo Eppendorf® y congelado a -70 °C.

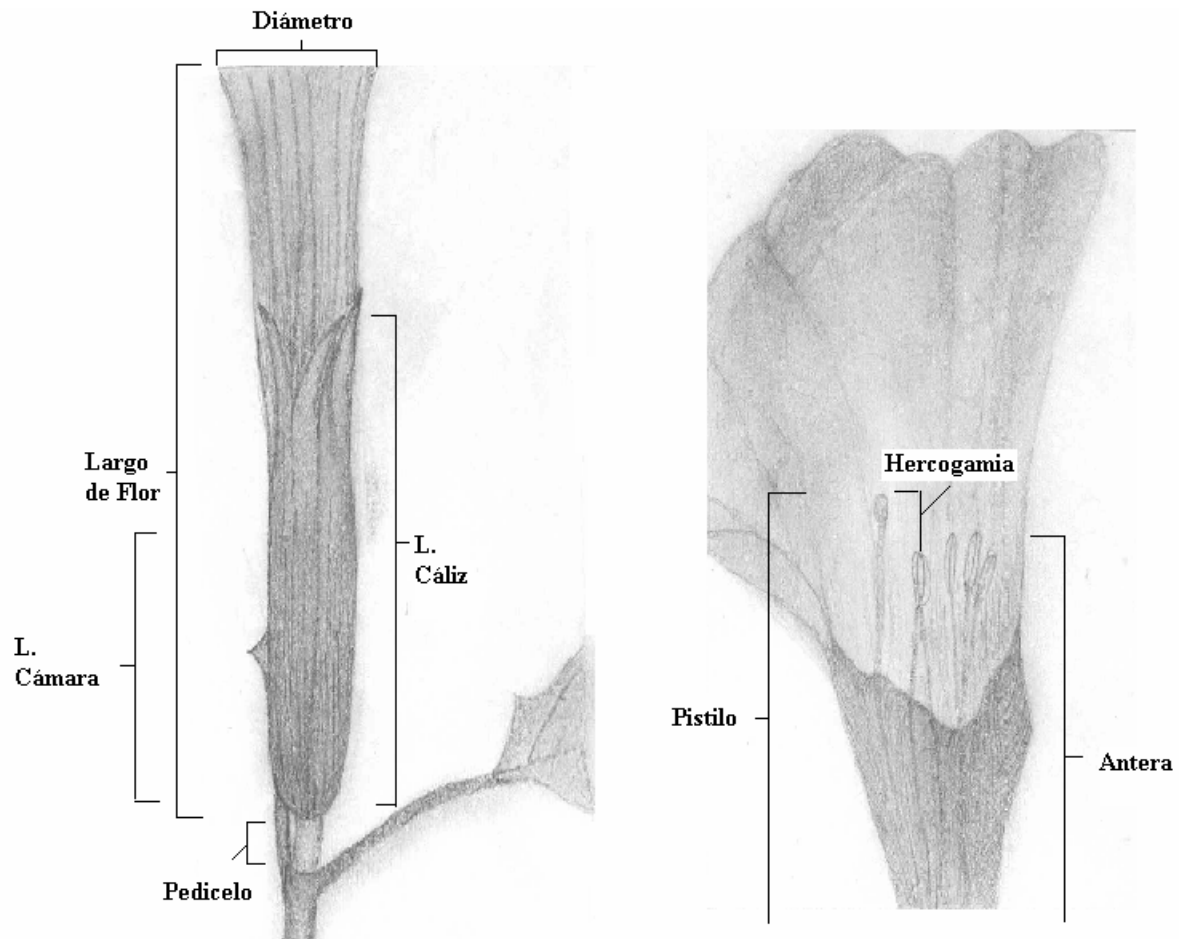


Figura 3. Caracteres morfológicos florales que se midieron.

Análisis de los carbohidratos

El análisis cuantitativo de los carbohidratos se realizó en el Instituto de Química de la UNAM. Para analizar la composición del néctar y la concentración de cada carbohidrato se utilizó la técnica de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography* - Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento). Para compuestos polares como los carbohidratos, fue necesario elegir una columna de fase inversa; así que se utilizó una columna Supelcosil LC-NH₂ con partículas de tamaño 5 µm (adecuada para el tamaño de las moléculas de interés en el estudio) y de medidas 25cm x 4.6 mm, marca SUPELCO®. Los compuestos polares se adherirían fuertemente a una columna de fase normal (polar), y con una de fase inversa son los compuestos que eluyen primero, facilitando su separación. Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetonitrilo-agua 75/25. Cada corrida duró 12 minutos a un flujo de 2 ml por minuto (Doughty, 1999). Como estándar se utilizó una mezcla de glucosa, fructosa y sacarosa disueltas en agua destilada; y se obtuvo una curva de calibración. Antes de ser inyectadas, a cada muestra se le agregaron 30 µl de agua destilada, pues el volumen resultaba muchas veces insuficiente para la inyección. Se obtuvieron las concentraciones de los azúcares en mg/ml.

A diferencia de un análisis con refractómetro de mano, la HPLC permite obtener datos precisos de concentración y peso seco de cada carbohidrato.

Análisis Estadístico

ANOVA

El Análisis de varianza (ANOVA) es una herramienta fundamental para los investigadores que estudian la variación en organismos, y fue introducido en los años veinte por Fisher. Al entender los conceptos subyacentes del ANOVA, el biólogo es capaz de comprender el funcionamiento de la variación y sus consecuencias en la evolución (Roff, 1997).

El ANOVA es la comparación de dos o más medias por medio de sus varianzas, utilizando la distribución de Fisher para determinar la significancia de las diferencias. Ésto implica descomponer los componentes de la variación entre grupos (o tratamientos), y dentro de los grupos; en términos de la ecología de poblaciones, y en particular en este experimento, se traduce en la variación debida al componente genético y a la debida al ambiente (Roff, 1997).

Cuando las variables son de carácter aleatorio, es decir, cuando la causa y dirección de la variación no está definida, se utiliza un ANOVA modelo II (Roff, 1997), como en el caso del presente estudio.

Diferenciación Poblacional

Por medio de un MANOVA se determinó si existe diferenciación poblacional en al menos un carácter, y el ANOVA nos permitió saber cuáles caracteres están diferenciados, lo cual se ve en el componente de población que explica la variación. Los caracteres que resultaron con diferenciación fueron comparados en sus promedios con sus errores estándar, lo cual nos mostró en qué población había valores más altos para cada atributo.

En total se analizaron 576 flores, 358 de Teotihuacán y 218 de Ticumán, comparando ocho atributos florales (ver figura 3) y dos de néctar (volumen y concentración de tres azúcares); además de la altura y el diámetro.

Variación Genética y Heredabilidad

La manera en que se seleccionaron las semillas para el experimento nos da una mezcla de medios hermanos y hermanos completos. Para el análisis se toma como un diseño de hermanos completos, para no sobreestimar los valores de heredabilidad.

El diseño de hermanos completos permite inferir que la covarianza entre los hermanos completos es igual a la mitad de la varianza genética aditiva ($\frac{1}{2}V_A$) (Falconer, 1996). La heredabilidad para este diseño se obtiene con la siguiente fórmula:

$$H^2 = V_G / V_P$$

Donde:

V_G – Variación Genética

V_P – Variación Fenotípica

En términos del diseño experimental que se montó, corresponde a:

$$H^2 = (2V_{AF}) / (V_{AF} + V_{AP})$$

$$H^2 = (2(MS_{AF} - MS_{AP})) / (MS_{AF} + (k - 1)MS_{AP})$$

Donde:

V_{AF} – Variación entre familias (among families)

V_{AP} – Variación entre progenie (among progeny)

MS – cuadrado medio del nivel respectivo (familia, individuo, etc.)

Esta estimación de la heredabilidad contiene dos fuentes de error: varianza por dominancia y el ambiente común. Sin embargo, el número que se obtiene es considerado aceptable, y en realidad representa un límite superior de la varianza genética aditiva.

La obtención de estos estimados se realizó por medio de un análisis de varianza de una vía. Se ejecutó un ANOVA anidado (Familia, Planta[Familia]) en cada población por separada para obtener las heredabilidades. En este caso, los cuadrados medios (MS) de cada nivel son los estimados de la varianza.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrados Medios	Cuadrados Medios Esperados
Entre Familias (AF)	$N - 1$	MS_{AF}	$V_{AP} + kV_{AF}$
Entre la Progenie (AP) dentro de Familias	$T - N$	MS_{AP}	V_{AP} σ_e^2 varianza del error

Donde N es el número de familias, T es el número de individuos y k es el tamaño de familia de ser iguales, de otra manera, se usa un estimado (Roff, 1997).

De esta manera se obtuvo la heredabilidad de los caracteres florales (ocho) y de néctar (cinco).

Para evaluar la confiabilidad de los valores de heredabilidad, se aplicó una prueba de Jackknife (Sokal & Rohlf, 1996), se obtuvo el error estándar y los intervalos de confianza para cada porcentaje del componente de varianza de los atributos.

Dado que el experimento se realizó en un ambiente común, la heredabilidad es un estimado de la variación genética. Las heredabilidades se compararon para evaluar en qué población hay más de esta variación en cada carácter. De acuerdo con la hipótesis, en la población donde existen mayores presiones selectivas, la variación será menor que donde no hay

selección por parte de los polinizadores. Adicionalmente, las heredabilidades nos permiten saber si los caracteres tienen potencial para evolucionar por selección natural.

Correlación

Se integró una matriz de correlación genética y una fenotípica para cada población, con los coeficientes de correlación de Pearson de cada atributo. Para la matriz de correlación genética se utilizaron los promedios de cada familia en cada atributo floral y del néctar, y en la matriz de correlación fenotípica se analizaron sólo por población.

Para sacar la “correlación muestral”, se utiliza la siguiente fórmula:

$$r_{xy} = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{(n - 1)s_x s_y}$$

Donde “ x_i ” y “ y_i ” son las observaciones pareadas de las dos variables aleatorias, “ \bar{x} ” y “ \bar{y} ” barra son los promedios de dichas variables, n es el número de elementos en cada vector. s_x y s_y son las desviaciones estándar de las variables (Rummel, 1976).

Las matrices de correlación genética nos hablan sobre el potencial evolutivo de cada población, y el nivel de integración de una estructura como la flor.

Resultados

Diferenciación Poblacional

El MANOVA indica que existen diferencias poblacionales significativas entre Ticumán y Teotihuacán ($\lambda= 3.5368$, $F= 76.396$, $P<0.0001$). El ANOVA para ambas poblaciones (tabla 2) determinó que el componente de variación correspondiente a población es significativo para la mayoría de los atributos, que se piensa, son seleccionados por los polinizadores en Ticumán. Ésto es consistente con la hipótesis, pero es necesario evaluar en qué dirección va esta diferenciación.

Al comparar los caracteres diferenciados entre poblaciones, se observa todos los caracteres florales y del néctar analizados presentaron diferencias entre poblaciones, siendo mayores para Ticumán en todos los casos (Figura 4). Ésto refuerza nuestra hipótesis, pues la selección en Ticumán y la ausencia de la misma en Teotihuacán resultaría en esta diferencia.

Las plantas de Ticumán tienen una mayor altura que las de Teotihuacán, aún en un ambiente común y arreglo al azar. Puede que los polinizadores seleccionen plantas más vigorosas, aunque puede deberse también a la depresión endogámica debida a la autopolinización (Bello, 2007; datos no publicados).

El ANOVA también reporta que al tomar las dos poblaciones juntas, el componente de variación entre familias es significativo, aunque para poder estimar y comparar la variación genética, es necesario efectuar el ANOVA para cada población por separado.

Heredabilidad

A partir de los ANOVA para cada población por separado (tabla 3), y aplicando un análisis de Jackknife para los componentes de varianza de familia (tabla 4, en el apéndice), se obtuvieron las heredabilidades para cada atributo floral y del néctar (tabla 5).

En general, Teotihuacán presenta mayor número de heredabilidades significativas, y más altas, que Ticumán (excepto en el largo de la cámara nectaria y el pedicelo). Ésto refuerza aún más nuestra hipótesis, pues la selección es lo que puede estar erosionando la variación genética en Ticumán, y en Teotihuacán, al no existir selección, se mantiene.

Correlación

En Teotihuacán existe un mayor número de correlaciones genéticas significativas que en Ticumán. Sin embargo, Ticumán tiene un mayor número de correlaciones fenotípicas significativas (tabla 6). El volumen del néctar tiene una alta correlación con el largo de la flor y la masa de sacarosa en ambas poblaciones (tabla 6). De ésto se concluye que en Teotihuacán la flor es una estructura fenotípicamente más integrada que en Ticumán, y el largo de flor está correlacionado con el volumen de néctar. La integración de cinco atributos florales y del néctar (Corola, Largo de Flor, Largo de Cámara, Volumen de Néctar y mg. de sacarosa) puede apreciarse mejor en la figura 5, donde se ve que existe una estrecha relación entre los caracteres de atracción y los de recompensa.

En la figura 6 se describe la correlación entre el largo de flor y el volumen del néctar para cada población, donde se aprecia que, aunque Ticumán tiene flores más grandes y con más néctar, la relación entre los dos atributos es muy parecida.

Carácter	SC Pobl.	g.l.	F Pobl.	P pobl	SC fam(pobl)	g.l.	F fam(pobl)	P fam(pobl)	SC error	g.l. error	MS error	MS modelo	R cuad.	F modelo	P modelo
Altura	56088.6	1	112.18	<.0001	22918.9	41	16.3064	<.0001	18237.38	532	34.28	2037.28	0.8104	59.4293	<.0001
L. Cáliz	834.943	1	24.409	<.0001	1511.51	41	2.7907	<.0001	7028.01	532	13.21	54.57	0.2459	4.1309	<.0001
Diámetro	17131.8	1	157.2	<.0001	4868	41	3.715	<.0001	17002.69	532	31.96	547.264	0.5748	17.1234	<.0001
L. Flor	23378.9	1	210.52	<.0001	4941.39	41	4.6045	<.0001	13453.89	514	26.175	702.63	0.6868	26.8437	<.0001
Pedicelo	183.148	1	45.94	<.0001	178.056	41	3.6962	<.0001	625.0753	532	1.174	9.114	0.3806	7.7859	<.0001
L. Cámara	4179.2	1	235.19	<.0001	799.896	41	4.84	<.0001	2144.457	532	4.031	124.633	0.7093	30.919	<.0001
Antera	8063.43	1	164.78	<.0001	2200.84	41	4.6742	<.0001	6109.486	532	11.484	10707.35	0.6367	22.1993	<.0001
Pistilo	14790.4	1	233.54	<.0001	2829.35	41	3.7264	<.0001	9851.94	532	18.519	454.906	0.6597	24.5647	<.0001
Vol. Néc.	6582.45	1	39.9	<.0001	7312.92	41	3.0099	<.0001	31526.234	532	59.26	324.657	0.3019	5.4785	<.0001
mg/ml fruct.	287.34	1	1.0802	0.303	10886.4	41	0.9903	0.4914	112073.25	418	268.118	263.64	0.0899	0.9833	0.5043

Tabla 2. ANOVA anidado de los atributos florales de las poblaciones de *Datura stramonium* (Ticumán y Teotihuacan).

Continuación de la tabla 2

Carácter	SC Pobl.	g.l.	F Pobl.	P pobl	SC fam(pobl)	g.l.	F fam(pobl)	P fam(pobl)	SC error	g.l. error	MS error	MS modelo	R cuad.	F modelo	P modelo
mg/ml gluc.	62.6616	1	0.1057	0.746	26146.5	41	1.6166	0.0114	164890.24	418	394.474	623.872	0.1371	1.5815	0.0143
mg/ml sac	17993.9	1	2.9196	0.094	278496	41	2.0096	0.0004	1412859.2	418	3380.05	7254.59	0.1773	2.1463	<.0001
mg fruc.	1.88204	1	5.002	0.029	16.1608	41	1.3267	0.0917	124.1893	418	0.2971	0.44706	0.1313	1.5047	0.0258
mg gluc.	0.89182	1	1.3162	0.256	30.2797	41	1.8095	0.0023	170.603	418	0.4081	0.743065	0.1546	1.8206	0.0019
mg sac.	265.902	1	26.659	<.0001	467.631	41	2.5593	<.0001	1992.06	447	4.4565	19.2777	0.2889	4.3257	<.0001
%fruc.	368.285	1	3.8364	0.055	4170.26	41	1.438	0.0436	29566.241	418	70.733	108.708	0.1337	1.5369	0.0202
%gluc.	185.194	1	0.7807	0.381	10636.4	41	1.8651	0.0014	58142.67	418	139.097	257.926	0.157	1.8543	0.0014
%sac.	1075.8	1	1.846	0.18	25781.3	41	1.6582	0.0082	158512.54	418	379.217	641.209	0.1452	1.6909	0.0058
Hercogamia	1012.46	1	29.421	<.0001	1566.22	41	8.4713	<.0001	2399.0043	532	4.5094	67.0428	0.5399	14.8673	<.0001
Diám. Tallo	6.1613	1	1.6258	0.209	171.657	52	6.3812	<.0001	349.0522	532	0.65611	4.353	0.3437	6.6345	<.0001

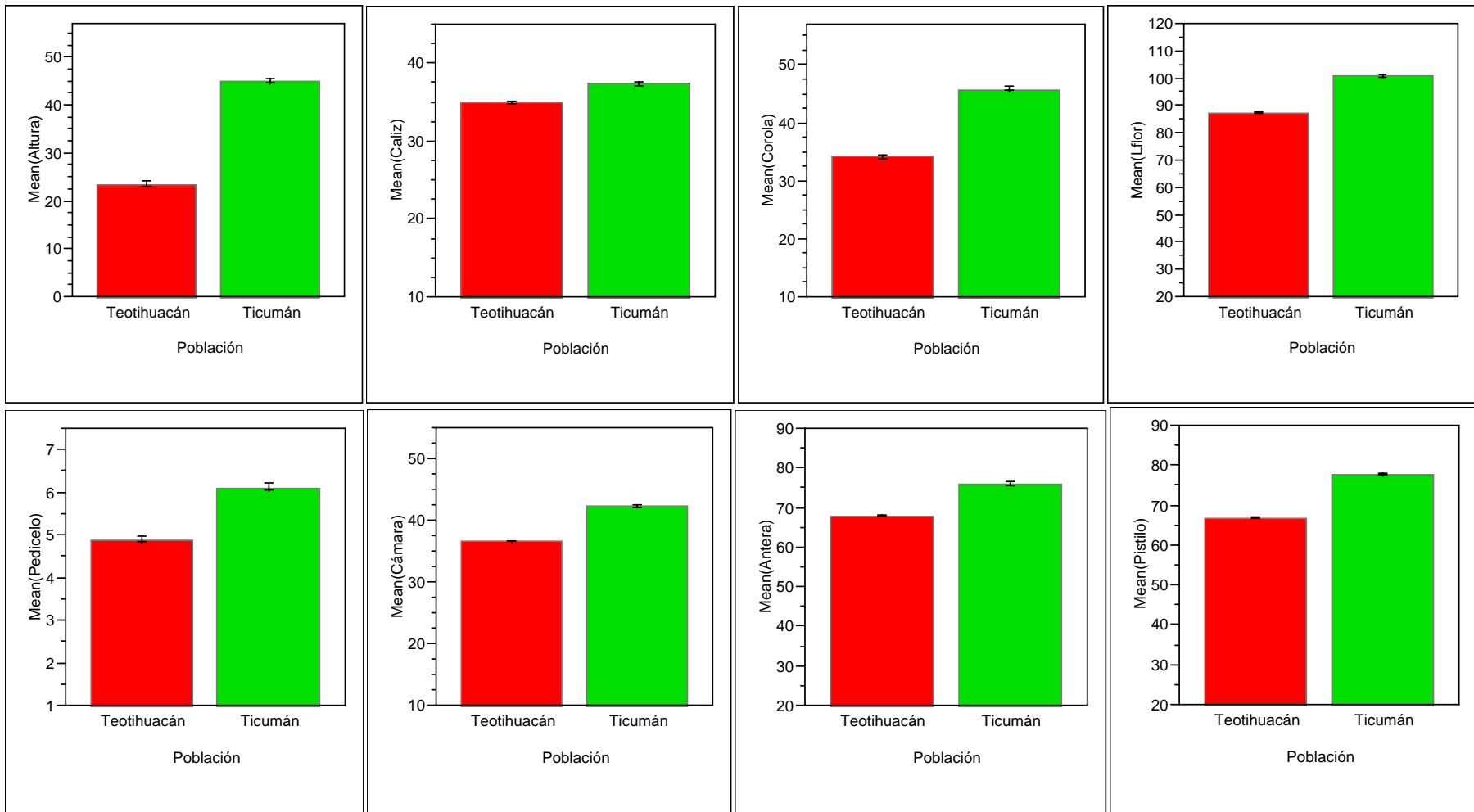
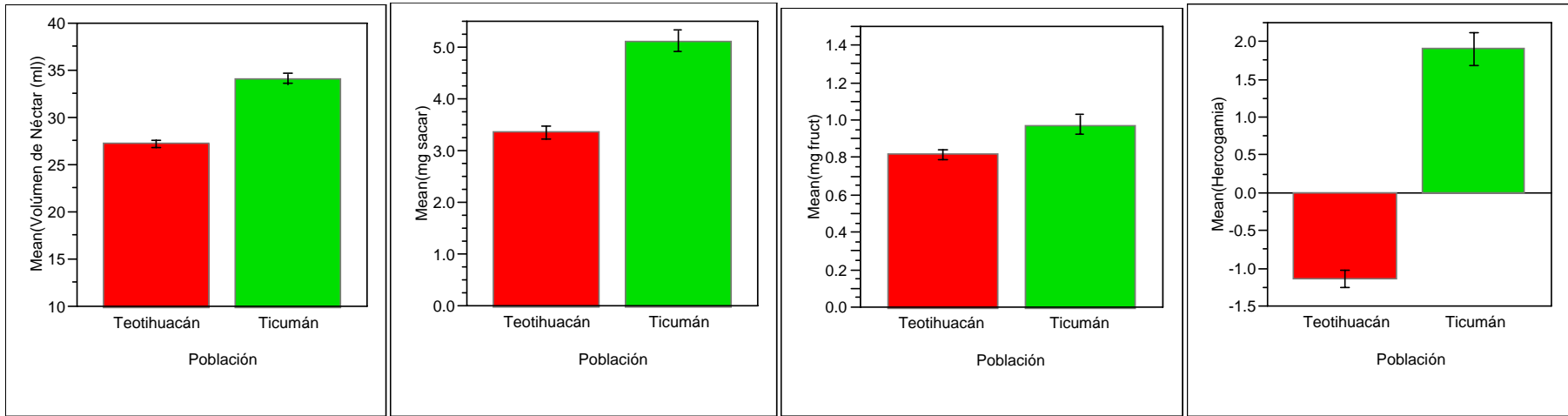


Figura 4. Gráficas de promedios de atributos florales y del néctar, por población, con EE. Todas $t < .0001$.



Continuación de la Figura 4

Tabla 3. Anova de los atributos florales de diferentes familias de hermanos.

Teotihuacán									
Carácter	SC	g.l.	MS	F	SC error	g.l.error	MS error	P	R cuad.
Altura	9341.118	22	424.596	11.530	12336.012	335	36.824	<.0001	0.431
L. Cáliz	958.800	22	43.582	3.042	4800.227	335	14.329	<.0001	0.166
Diámetro	3293.685	22	149.713	5.320	9426.881	335	28.140	<.0001	0.259
L. Flor	2943.401	22	133.791	6.176	6866.745	317	21.662	<.0001	0.300
Pedicelo	95.577	22	4.344	3.417	425.936	335	1.271	<.0001	0.183
L. Cámara	199.579	22	9.072	3.114	975.813	335	2.913	<.0001	0.170
Antera	868.503	22	39.477	4.617	2864.326	335	8.550	<.0001	0.233
Pistilo	1146.873	22	52.131	4.274	4086.427	335	12.198	<.0001	0.219
Vol. Néctar	4903.581	22	222.890	4.038	18490.626	335	55.196	<.0001	0.210
mg/ml fruct.	5463.995	22	248.363	0.927	74218.396	277	267.936	0.559	0.069
mg/ml gluc.	13127.290	22	596.695	1.523	108546.260	277	391.864	0.066	0.108
mg/ml sac.	174709.300	22	7941.330	2.284	963247.500	277	3477.430	0.001	0.154
mg fruct.	8.040	22	0.365	1.441	70.236	277	0.253	0.094	0.102
mg gluc.	11.272	22	0.512	1.449	97.927	277	0.353	0.091	0.103
mg sac.	268.900	22	12.223	3.074	1212.748	277	3.976	<.0001	0.181
% fruc.	1985.428	22	90.247	1.242	72.659	277	72.659	0.212	0.090
%gluc.	5357.101	22	243.505	1.667	40456.447	277	146.052	0.033	0.117
% sac.	13234.010	22	601.546	1.498	111220.510	277	401.518	0.073	0.106
Hercogamia	330.923	22	15.042	3.895	1293.775	335	3.862	<.0001	0.204
Diám. Tallo	111.199	22	5.055	6.585	257.143	335	0.768	<.0001	0.302
Ticumán									
Carácter	SC	g.l.	MS	F	SC error	g.l.error	MS error	P	R cuad.
Altura	13577.785	19	714.62	23.855	5901.364	197	29.956	<.0001	0.69704
L. Cáliz	552.712	19	29.0901	2.5724	2227.7903	197	11.3086	0.0006	0.19878
Diámetro	1574.313	19	82.8586	2.1546	7575.8118	197	38.4559	0.0047	0.172
L. Flor	1997.993	19	105.158	3.1449	6587.1531	197	33.437	<.0001	0.2327
Pedicelo	82.47914	19	4.34101	4.2944	199.13946	197	1.0108	<.0001	0.2928
L. Cámara	600.3171	19	31.5956	5.3261	1168.6445	197	5.9322	<.0001	0.3393
Antera	1332.3323	19	70.1228	4.2569	3245.1605	197	16.4729	<.0001	0.291
Pistilo	1682.4807	19	88.5516	3.0257	5765.5134	197	29.2666	<.0001	0.2258
Vol. Néctar	2409.34	19	126.807	1.9164	13035.608	197	66.171	0.0147	0.1559
mg/ml fruct.	5422.396	19	285.389	1.063	37854.854	141	268.474	0.3953	0.1252
mg/ml gluc.	13019.221	19	685.222	1.7148	56343.977	141	399.603	0.0401	0.1876
mg/ml sac.	103786.38	19	5462.44	1.713	449611.67	141	3188.74	0.0404	0.1875
mg fruct.	8.121067	19	0.4274	1.117	53.9531	141	0.3826	0.3404	0.1308
mg gluc.	19.007	19	1.0003	1.9408	72.6754	141	0.5154	0.0153	0.2073
mg sac.	198.7304	19	10.4595	1.9058	779.312	142	5.4881	0.0178	0.2031
% fruc.	2184.829	19	114.991	1.7176	9439.832	141	66.949	0.0396	0.1879
%gluc.	5279.335	19	277.86	2.2152	17686.223	141	125.434	0.0044	0.2298
% sac.	12547.334	19	660.386	1.9689	47292.03	141	335.404	0.0135	0.2096
Hercogamia	1235.296	19	65.015	11.5886	1105.2288	197	5.6103	<.0001	0.5277
Diám. Tallo	60.4576	19	3.181	6.82	91.909	197	0.4665	<.0001	0.3967

Tabla 5. Heredabilidades por población. Se resalta en negritas los valores significativos. Las P y EE de cada carácter corresponden a los de la tabla 5.

	Teotihuacán	Ticumán
Altura	0,8084	1,357
L. Cáliz	0,2324	0,2538
Diámetro	0,4354	0,1929
Largo de Flor	0,5196	0,331
Pedicelo	0,2694	0,467
L. Cámara	0,2396	0,5714
Antera	0,3779	0,4628
Pistilo	0,3488	0,3154
Vol. De Néctar	0,3272	0,1562
mg/ml fruct.	0	0
mg/ml gluc.	0,0772	0,164
mg/ml sac	0,1796	0,1637
mg fruct.	0,0656	0,0288
mg gluc.	0,0668	0,2104
mg sac.	0,2544	0,2022
% fruct.	0,0365	0,1646
% gluc.	0,0976	0,2638
% sac.	0,0736	0,216
Hercogamia	0,3142	0,803
Diám. Tallo	0,5292	0,6998

Tabla 6. Matrices de Correlaciones. Arriba de las diagonales se encuentra las matrices de correlación fenotípica, y abajo las de correlación genética. Las correlaciones significativas se encuentran en negritas. $p < .0001$

Teotihuacán	L. Cáliz	Diámetro	Largo flor	de L. Pedicelo	L. Cámara	Hercogamia	Volumen de mg Néctar	de mg sacarosa
Cáliz		0.3658	0.3888	0.1086	0.3788	-0.0498	0.2480	0.2309
Corola	0.7244		0.5418	0.2976	0.4651	0.0837	0.3831	0.2219
Lflor	0.6740	0.8217		0.3355	0.7601	-0.0305	0.4319	0.2450
Pedicelo	0.3916	0.7353	0.6012		0.1971	0.2021	0.2408	0.0341
Cámara	0.6377	0.7204	0.9216	0.5409		-0.1336	0.2657	0.2029
Hercogamia	-0.3209	-0.0153	-0.1461	0.1334	0.0020		0.2590	-0.1106
Néctar	0.5402	0.8300	0.8108	0.7355	0.7358	0.1501		0.4696
mg sacar	0.5708	0.6871	0.6238	0.5908	0.5147	-0.1503	0.6545	
Ticumán	L. Cáliz	Diámetro	Largo flor	de L. Pedicelo	L. Cámara	Hercogamia	Volumen de mg Néctar	de mg sacarosa
Cáliz		0.4329	0.4856	0.2229	0.3496	0.3014	0.2490	0.2470
Corola	0.3383		0.5867	0.3019	0.5424	0.2680	0.3590	0.2476
Lflor	0.2764	0.7027		0.2029	0.8722	0.1361	0.5232	0.3893
Pedicelo	0.4375	0.0684	-0.0296		0.1148	0.5114	0.1174	0.1162
Cámara	0.0295	0.5760	0.9225	-0.1439		-0.0192	0.4635	0.3207
Hercogamia	0.2794	-0.934	-0.3548	0.7234	-0.4552		0.0372	0.1733
Néctar	-0.1223	0.3248	0.6583	-0.1254	0.7288	-0.3413		0.5007
mg sacar	-0.1332	0.0663	0.3654	0.1283	0.4288	0.0007	0.5788	

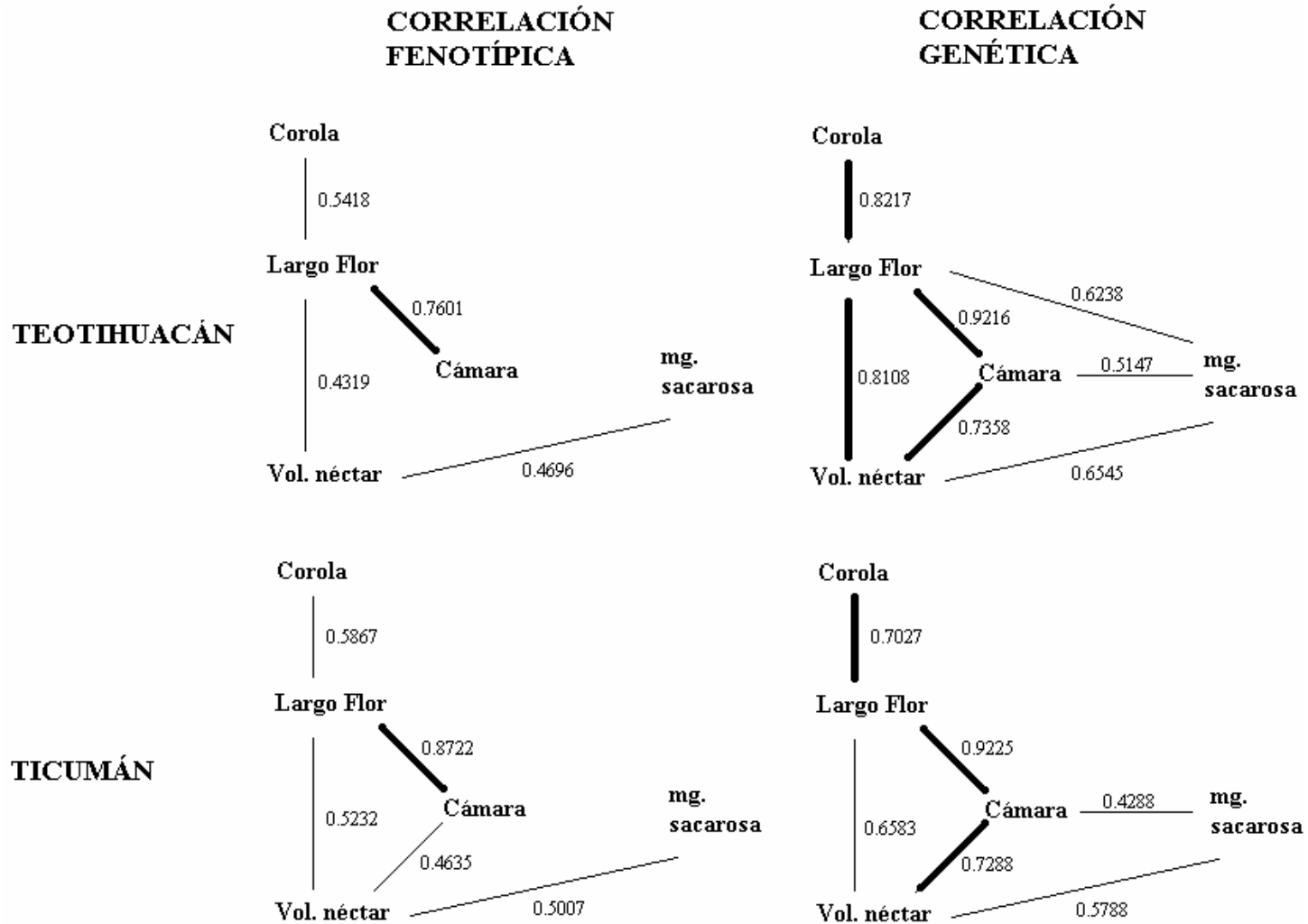


Figura 5. Diagramas de correlaciones fenotípicas y genotípicas entre 5 atributos (Corola, Largo de Flor, Volumen del néctar, Largo de Cámara y mg. de sacarosa) para dos poblaciones de *D. Stramonium* (Teotihuacan y Ticumán). Las líneas representan correlaciones significativas, y las líneas más gruesas son las correlaciones más fuertes.

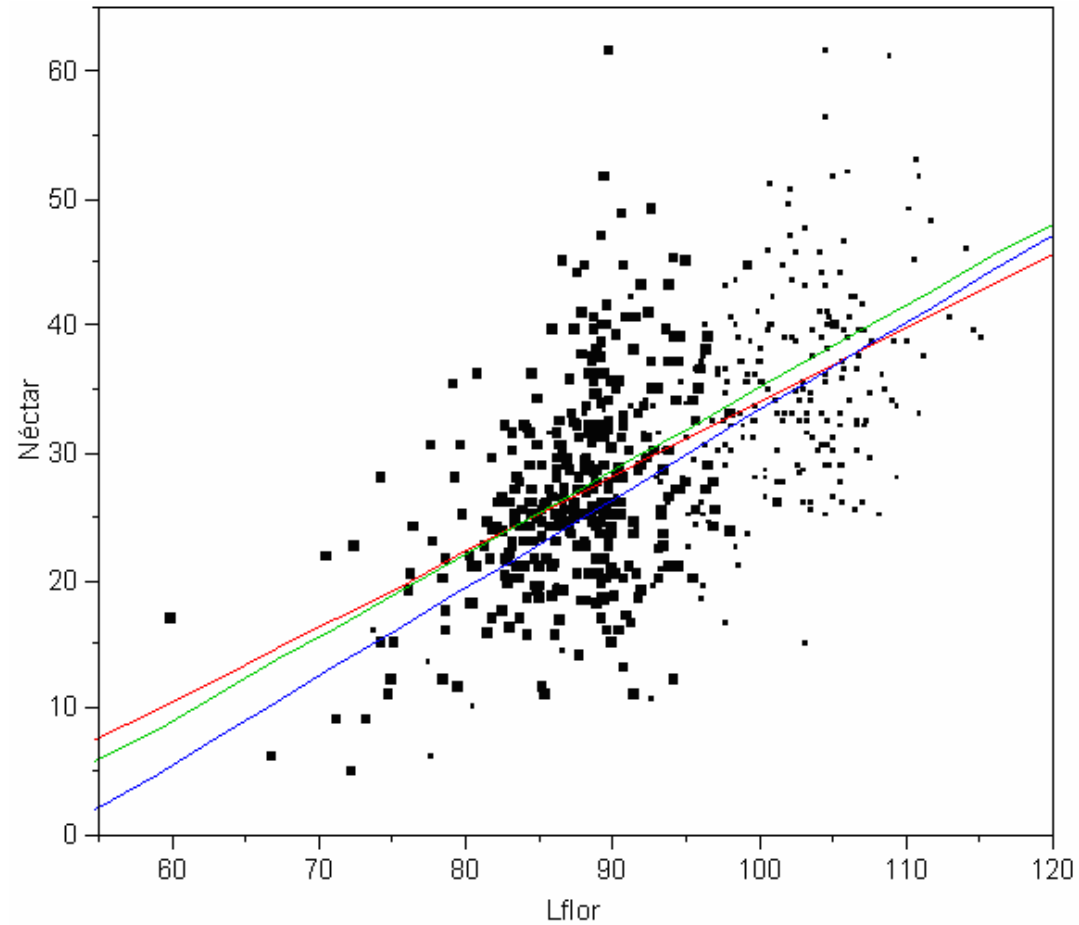


Figura 6. Relación entre el volumen del néctar (μl) y el largo de flor (mm) para ambas poblaciones de *Datura stramonium*. En rojo se observa la correlación tomando ambas poblaciones en conjunto. Teotihuacán está descrita de color verde y Ticumán de color azul. Las flores de Teotihuacán se muestran como cuadros grandes, y las de Ticumán como cuadros pequeños.

Discusión

Existen tres posibles explicaciones para la diferenciación del fenotipo floral entre las dos poblaciones de *Datura stramonium*: Un evento de deriva génica, diferencias ambientales (plasticidad) y diferenciación genética.

En un escenario donde la deriva génica fuera el causante de las diferencias en las flores entre Ticumán y Teotihuacán, existiría poca variación genética por el cuello de botella al que se habrían sometido las poblaciones (Falconer & McKay, 1996). Sin embargo este no es el caso.

Si la razón de las diferencias fuera simplemente el contraste entre los ambientes (calidad del suelo, irradiación solar, humedad, etc.), el experimento en un ambiente común (el invernadero) habría propiciado la aparición de convergencia fenotípica (Falconer y McKay, 1996). En la práctica, en dicho experimento se mantuvieron las diferencias entre las plantas de una y otra población, siendo que éstas se colocaron al azar y se fueron rotando dentro del invernadero.

La evidencia es consistente con que la presencia de polinizadores en la población de Ticumán ha ejercido un efecto sobre los promedios y la variación de los atributos florales y del néctar a lo largo del tiempo. En contraste con la población de Teotihuacán, donde la presencia de esfíngidos y abejas es casi nula, las plantas de Ticumán tienen (en conjunto de sus atributos) flores más grandes. Además parece que existe un aumento en la cantidad y calidad de la recompensa (mayor volumen de néctar y concentración de sacarosa, relacionada con el síndrome de polinización por esfíngidos, ver figura 4). En ambas poblaciones la concentración de sacarosa supera por mucho a la de fructosa y glucosa. Esta proporción concuerda con el síndrome de polinización por esfíngidos, y es más marcada en la población de Ticumán. Se puede apreciar que existe una correlación negativa entre la concentración de sacarosa y sus componentes monosacáridos, lo cual apoya la idea de que éstos últimos se generan a partir de ella.

También existe correlación positiva entre el largo de las flores y el volumen del néctar para ambas poblaciones (figura 6), así como entre el volumen del néctar y la cantidad de sacarosa. Todas estas evidencias llevan a pensar que los polinizadores, en este caso esfíngidos, seleccionan el tamaño de las flores al ser indicador de la cantidad y calidad del néctar (Bell, 1985; Reuven, 1989; Raguso, 2005). La evidencia sugiere que el tamaño de las flores y las características del néctar pueden ejercer un impacto directo en la adecuación en la población donde estuvieron bajo selección.

Otra manera de analizar las causas de esta diferencia es pensando en lo que pasa cuando las plantas dejan de ser seleccionadas por el tamaño de sus flores y el néctar. Puesto que estas plantas tienen flores, podemos suponer que en algún momento de su historia evolutiva cumplieron con la función de atraer polinizadores. Si al momento de crearse la población (o en algún punto en el pasado) estas plantas se enfrentaron a un ambiente sin selección por sus atributos florales y del néctar, éstos pudieron volverse inversiones costosas y ejercer un impacto negativo en la adecuación. Ejemplo del costo que puede representar la producción de flores grandes es un estudio con *Polemonium viscosum* y la mayor sobrevivencia de plantas con flores más chicas en situaciones adversas (Galen, 2000). Puede ser que las flores de la población de Teotihuacán se han tornado más pequeñas, hasta el punto que no representan un compromiso para su adecuación. Aún así, las flores de Teotihuacán tienen un tamaño relativamente grande, comparándolas con plantas de otras especies cuyas flores han dejado de ser funcionales con relación a los polinizadores en su historia evolutiva. Puede ser que actualmente la población esté evolucionando en esa dirección, o que existan restricciones filogenéticas y/o ontogenéticas para su desaparición. Para estar seguros de esto, necesitaríamos conocer la población ancestral, la filogenia de las poblaciones y sus características florales.

Evidencia del cambio evolutivo sufrido por las flores, dependiendo de las presiones selectivas enfrentadas por cada población, es la diferencia en la hercogamia. En Ticumán existe una mayor separación entre el estigma y las anteras que en Teotihuacán, situación que puede afectar el sistema de apareamiento entre poblaciones. En Ticumán, donde existe mayor tasa de entrecruzamiento (Cuevas, 1996) , una mayor hercogamia favorece la

exportación de polen; mientras que en Teotihuacán se ha seleccionado una separación menor para promover la autofecundación, dada la ausencia de polinizadores (*garantía reproductiva*).

Un parámetro que nos indica la capacidad de las poblaciones para evolucionar es la heredabilidad, que es un reflejo de la cantidad de variación genética presente. La evidencia es consistente con el hecho de que en la población de Teotihuacán existe un mayor número de heredabilidades significativas para los atributos florales y del néctar que en Ticumán (tabla 2). Si las plantas de las que se derivó la población de Ticumán tenían variación genética en sus atributos, la selección sobre los genotipos que posean valores fenotípicos más grandes pudo disminuir la cantidad de esta variación (Ridley, 2004). En Teotihuacán, al no existir selección sobre las flores más grandes y con mayor recompensa, la variación no se ve disminuida. Esta situación repercute en la capacidad de respuesta a la selección para Ticumán. Si disminuyera significativamente la población de esfíngidos en esta región, las plantas de Ticumán presentarían restricciones para cambiar a un tamaño de flor y cantidad de néctar óptimos para la nueva situación. Es particularmente interesante en el caso de los azúcares del néctar, pues la sacarosa es el único componente que muestra este patrón, y es el azúcar típicamente preferido por los esfíngidos; la glucosa y la fructosa no presentan variación genética ni diferenciación en ninguna de las dos poblaciones. Ésto quizá sea porque la concentración de estos azúcares se vea muy influenciada por factores ambientales, aunque se desconoce cuáles sean éstos, y de qué forma actuarían. Como la glucosa y la fructosa provienen de la sacarosa, y en este caso no presentan una relación 1:1, además de que la sacarosa sí presenta la variación genética y diferenciación esperadas, se piensa que lo que esté afectando la concentración de los monosacáridos actúa después de la acción de la invertasa. Se debe señalar que, aunque la evidencia apoya esta explicación, se necesitan realizar experimentos de selección natural en campo para darle más solidez.

En la figura 5 se puede apreciar la estrechez de la relación entre atributos de atracción (Corola y Largo de Flor) con caracteres del néctar (Volumen del Néctar y mg. de sacarosa), y la posición central que toma la cámara nectararia. La relación entre el largo de la cámara nectararia y los atributos anteriores puede darnos la clave de cómo se produce la relación

entre la atracción visual y la recompensa: el tamaño de la cámara nectararia probablemente esté relacionado de manera general con el tamaño de la flor, y al tener una cámara nectararia grande mayor cantidad de tejido, ésto resulta en mayor cantidad de néctar. Las diferencias en el grado de correlación entre el tamaño de la cámara nectararia y los demás atributos puede deberse a diferencias en la actividad fisiológica del tejido.

Las flores de Teotihuacán parecen una estructura más integrada que las de Ticumán, pues cuentan con un mayor número de correlaciones significativas, lo cual no es consistente con la hipótesis que se tenía. Ésto puede deberse a una restricción para mantener correlaciones en flores más grandes. Diferentes atributos pudieran tener diferente capacidad para presentarse en tamaños cada vez mayores, por lo que en flores más grandes se pueden romper las correlaciones, mientras que flores más pequeñas no tienen esta limitante. Aún así, en ambas poblaciones existe correlación positiva del largo de la flor con el volumen del néctar, y del volumen con la concentración de sacarosa, con lo que Ticumán sigue teniendo una señal visual de la recompensa. El hecho de que Teotihuacán presente correlaciones fuertes del tamaño de la flor con el néctar nos lleva a pensar que en algún punto en el pasado, las plantas que originaron esta población se vieron sujetas a selección por parte de polinizadores. Otra razón posible es que en Teotihuacán, al no haber polinizadores, se esté seleccionando un fenotipo óptimo para la autopolinización (flores más pequeñas), mientras que en Ticumán existan variaciones temporales de la estructura genética ligadas a fluctuaciones en la abundancia de los polinizadores, o bien, selección contrapuesta entre las abejas y los esfíngidos. Se necesitaría realizar un experimento más fino que permita evaluar estas dos hipótesis.

Conclusiones

La evidencia es consistente con la hipótesis de que las diferencias de presiones selectivas entre las poblaciones de Teotihuacán y Ticumán han ejercido un efecto sobre el tamaño de las flores, así como sobre la cantidad y calidad del néctar secretado. Los resultados permiten inferir que los polinizadores han seleccionado el volumen y concentración del néctar a lo largo del tiempo en Ticumán, y aun más, el análisis de los componentes del néctar indican que esta selección se ha realizado sobre la sacarosa, carbohidrato preferido por los esfíngidos. La selección de estos atributos ha sido posible porque el tamaño floral está correlacionado con el volumen del néctar, lo que ha llevado a que Ticumán presente, además, flores más grandes. Podemos pensar que el menor número de correlaciones significativas en Ticumán se debe a que al ir aumentando de tamaño las flores, la integración de las estructuras se pierde por diferencias en capacidad para presentarse en tamaños mayores de cada atributo. Mientras tanto, en Teotihuacán puede que la falta de un beneficio por néctares más cuantiosos y concentrados ha llevado a la dirección contraria que Ticumán, para disminuir los costos de su producción.

La selección a lo largo del tiempo ha tenido un impacto sobre la variación de los atributos florales y del néctar en la población de Ticumán. Parece ser que los esfíngidos han erosionado la variación genética al seleccionar la fracción de los genotipos que producen flores más grandes y néctares más cuantiosos y concentrados, cosa que no ha pasado en Teotihuacán, y por ello esta última población presenta mayores heredabilidades.

Apéndice

Tabla 4. Jackknife de los componentes de varianza entre familias para cada atributo floral en dos poblaciones. Se reporta el error estándar y los grados de libertad. Se resaltan en negritas los valores diferentes de cero, lo cual se determinó con la prueba de t.

Teotihuacán	Jackest	ES	t(.05,22)
Hojas	7.51982609	5.29622772	9.09362299
Altura	40.7901739	9.56316954	16.4199621
L. Cáliz	10.1804348	5.90807408	10.1441632
Diámetro	20.4471304	7.43142943	12.7597643
Lflor	26.2698261	8.41947956	14.4562464
Pedicelo	13.2337391	6.94534329	11.9251544
L. Cámara	12.3406087	8.26890399	14.1977082
Antera	19.4440435	6.90842819	11.8617712
Pistilo	18.607913	8.92504644	15.3243047
Dram	26.7756522	8.65623463	14.8627549
Néctar	16.1562609	6.78223615	11.6450995
mg/ml sacar	9.00295652	3.99615751	6.86140244
mg sacar	12.6865217	4.27991968	7.34862209

Ticumán	Jackest	ES	t(.05,19)
Hojas	7.4617	5.23882917	9.05793564
Altura	70.1927	12.607865	21.7989986
L. Cáliz	12.44205	7.36579539	12.7354602
Diámetro	9.8179	6.8406587	11.8274989
Lflor	16.76185	9.70474381	16.779502
Pedicelo	23.8915	6.03906163	10.4415376
L. Cámara	30.6163	15.8507308	27.4059136
Antera	24.28475	16.3840508	28.3280239
Pistilo	14.5958	10.1665783	17.5780138
Dram	35.76245	7.42319178	12.8346986
Néctar	8.01155	3.54122822	6.12278359
mg/ml sacar	8.0729	5.45422615	9.43035702
mg sacar	8.99755	5.20540662	9.00014805
%fructosa	8.9503	7.14761567	12.3582275
%glucosa	13.4617	5.3480774	9.24682582
%sacarosa	11.27625	6.41944052	11.0992127
mg/ml glucosa	7.957	4.38654802	7.58434152
mg glucosa	10.8015	6.00703972	10.3861717

Bibliografía

- Adler L. S. & J. L. Bronstein. 2003. Attracting Antagonists: Does Floral Nectar Increase Leaf Herbivory? *Ecology* 85(6): 1519-1526.
- Auclair J. 2007. Saccharase, Mécanisme de la catalyse.
<http://perso.orange.fr/svt.ronsard/svt.ronsard/>.
- Barret S. C. H. 2002. The Evolution of Plant Sexual Diversity. *Nature* 3: 274-284.
- Bell G. 1985. On the function of flowers. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 224(1235): 223-265.
- Bernardello L. M. 1986. The Nectary Exudate of *Lycium cestroides* (Solanaceae). *Biotropica* 18(3): 241-243.
- Bulmer, M. 2003. *Francis Galton: Pioneer of Heredity and Biometry*. Johns Hopkins University Press. Maryland. Pp. 375.
- Chaplin, M. 2006. Enzymes in the sucrose industry.
<http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/sucrose.html>
- Clausen, J., D.D. Keck & W.M. Hiesey. 1940. Experimental studies on the nature of species. I. Effect of varied environments on western North American plants. *Carnegie Institution of Washington Publicación no. 520: 1-452*.
- Cohen, J. (1988). *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (2nd ed.). Lawrence Erlbaum Associates. Hillsdale. Pp. 474.
- Conner J. K. 2002. Genetic Mechanisms of floral trait correlations in a natural population. *Nature*. 420(28): 407-410.

- Corbet S. A. 1978. Bee visits and the *Nectar of Echium vulgare L.* and *Sinapis alba L.* *Ecol. Entomol.* 3: 25-37.
- Cuevas G.E. 1996. Tasa de entrecruzamiento, vecindario genético y tamaño efectivo de la población en *Datura stramonium*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- Domínguez C, L.E. Eguiarte, J. Núñez-Farfán & R. Dirzo. Flower Morphometry of *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae): Geographical Variation in Mexican Populations. *Amer. J. Bot.* 85(5): 637-643.
- Doughty E. 1993. Choosing an HPLC Column for Carbohydrate Analyses. *The Reporter.* 14(1):9-10.
- Faegri, K & L van der Pijl. 1979. The principles of pollination ecology. Pergamon Press: Oxford. Pp. 257.
- Fenster, C., W. S. Armbruster, P. Wilson, M. R. Dudash & J. D. Thomson. 2004. Pollination Syndromes and Floral Specialization. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35: 375-403.
- Futuyma D. 2005. *Evolution*. Sinauer. Massachussets Pp. 556.
- Fahn A. 1979. Ultrastructure of Nectaries in Relation to Nectar Secretion. *Am. J. Bot.* 66(8): 977-985.
- Falconer D. & T. F. C. Mackay (1996). *Introduction to Quantitative Genetics*. (4ta ed.). Addison Wesley Longman. Essex. Pp. 480.

- Feinsinger P. 1983. Variable Nectar Secretion in a Heliconia Species Pollinated by Hermit Hummingbirds. *Biotropica* 15(1): 48-52.
- Freeman C. & D. Wilken 1987. Variation in Nectar Sugar Composition at the Intraplant Level in *Ipomopsis longiflora* (Polemoniaceae). *Amer. J. Bot.* 74(11): 1681-1689.
- Freeman E., W. H. Reid & R. D. Worthington. 1985. Patterns of Floral Nectar-Sugar Composition of *Ipomopsis longiflora* (Polemoniaceae) Near the Contact Zone of its Subspecies Longiflora and Australis. *Amer. J. Bot.* 72(11): 1662-1667.
- Galen, C. 2000. High and Dry: Drought Stress, Sex-Allocation Trade-offs, and Selection on Flower Size in the Alpine Wildflower *Polemonium viscosum* (Polemoniaceae). *Am. Nat.* 156: 72-83.
- Galetto L. 1991. Sobre el néctar y los nectarios de algunas especies de *Nicotiana* (Solanaceae). *Kurtziana* 21: 165-176.
- Galetto L. 1993. Estudios sobre el néctar en Asteridae argentinas: análisis químico e histología comparada de las estructuras secretoras. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Galetto L., L. M. Bernardello & H. R. Juliani. 1993. Characteristics of Secretion of Nectar in *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl.) Miers (Bignoniaceae). *New Phytol.* 127: 465-471.
- Galetto L., G. Bernardello & C. A. Sosa. 1998. The relationship between floral nectar composition and visitors in *Lycium* (Solanaceae) from Argentina and Chile: what does it reflect? *Flora* 193: 303-314.
- Galetto L., C. L. Morales & C. Torres. 1999. Biología reproductiva de *Salpichroa originifolia* (Solanaceae). *Kurtziana* 27: 211-224.

- Godin V. 2004. Correlation between characteristics of *Pentaphylloides fruticosa* (Rosaceae) flowers. *Uspekhi Sovremennoi Biologii*, 124 (5): 457-460
- Goldblatt P. & J. C. Manning. 2002. Evidence for Moth and Butterfly Pollination in *Galdiolus* (Iridaceae-Crocoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 89(1): 110-124.
- Gegear R. & T. M. Alberti. 2001. *Cognitive Ecology of Pollination: Animal Behavior and Floral Evolution*. Cambridge University Press. Pp 344.
- Guerenstein P, E. A. Yepez, J. Haren, D. G. Williams & J. G. Hildebrand. 2004 Floral CO₂ emission may indicate food abundance to nectar-feeding moths. *Naturwissenschaften* 91: 329-333.
- H. Ayuntamiento de Tlaltizapan. 2005. Enciclopedia de los Municipios de México <http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/morelos/Municipios/17024a.htm>
- Hamrick J. 1982. Plant Population Genetics and Evolution. *Amer. J. Bot.* 69(10): 1685-1693.
- Herrera J. 2004. Flower Size Variation in *Rosmarinus officinalis*: Individuals, Populations and Habitats. *Annals of Botany*. 95(3): 431-437.
- Hodges S. 1993. Consistent Interplant Variation in Nectar Characteristics of *Mirabilis multiflora*. *Ecology* 74(2): 542-548.
- Judd, W. S., C. S. Campbell, E. A. Kellogg, P. F. Stevens, and M. J. Donoghue. 2002. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. Pp. 18.

- Kaczorowski R, M. Gardener & P. Holtsford 2005. Nectar Traits in *Nicotiana* section *Alatae* (Solanaceae) in Relation to Floral Traits, Pollinators, and Mating System. *Amer. J. Bot.* 92(8): 1270-1283.
- Leiss K, Vrieling K & Klinkhamer P. 2004. Heritability of Nectar Production in *Echium vulgare*. *Heredity* 92: 446-451.
- Lawrence, M. J. 1984. The genetical analysis of ecological traits. Pages 27-64 in B. Shorrocks editor. *Evolutionary ecology*. Blackwell Scientific, Oxford.
- Leiss K. & P. G. L. Klinkhamer. 2005. Genotype by environment interactions in the nectar production of *Echium vulgare*. *Functional Ecology* 19: 454-459.
- 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.
- Mitchell R. & R.G. Shaw. 1993. Heritability of floral traits for the perennial wild flower *Penstemon centranthifolius* (Scrophulariaceae): Clones and crosses. *Heredity*. 71(2): 185-92.
- Mitchell R. 2003. Heritability of Nectar Traits: Why do we know so little? *Ecology* 85(6): 1527-1533.
- Motten A. & J. Antonovics. 1994. Determinants of Outcrossing Rate in a Predominantly Self-Fertilizing Weed, *Datura stramonium* (Solanaceae). *Amer. J. Bot.* 79(4): 419-427.

- Motten A. & J. L. Stone. 2000. Heritability of stigma position and the effect of stigma-anther separation on outcrossing in a predominantly self-fertilizing weed, *Datura stramonium* (Solanaceae). *Amer. J. Bot.* 87(3): 339-347.
- Nattero J. & A. A. Cocucci. 2007. Geographical variation in floral traits of the tree tobacco in relation to its hummingbird pollinator fauna. *Biological Journal of the Linnean Society.* 90(4): 657-667.
- Nicolson S. 1998. The Importance of Osmosis in Nectar Secretion and its Consumption by Insects. *Amer. Zool.* 38: 418-425.
- Núñez-Farfán J. 1991. Biología Evolutiva de *Datura stramonium* L. en el centro de México: selección natural de la resistencia a los herbívoros, sistema de cruce y variación genética intra e interpoblacional. Tesis doctoral, Centro de Ecología-UACP y P, CCH, UNAM. México.
- Núñez-Farfán J, R. A. Cabrales-Vargas & R. Dirzo. 1996. Mating System Consequences on Resistance to Herbivory and Life History Traits in *Datura stramonium*. *Amer. J. Bot.* 83(8): 1041-1049.
- Pooni H, M. J. Kearsley. 2002. *Plant Quantitative traits*. Enciclopedia of Life Sciences / www.els.net
- Proctor M, P. Yeo, & A. Lack 1996. *The natural history of pollination*. HarperCollins. Portland. Pp. 487.
- Raguso R. & M. A. Willis. 2005. Synergy between visual and olfactory cues in nectar feeding by wild hawkmoths, *Manduca sexta*. *Animal Behaviour.* 69: 407-418.
- Ridley M. 2004. *Evolution*. 3ra edición. Blackwell. Boston. Pp. 798.

Reuven D. & A. Schmida. 1989. Correlation between the Color, Size and Shape of Israeli Crucifer Flowers and Relationships to Pollinators. *Oikos*. 54(3): 281-286

Roff, D. 1997. *Evolutionary Quantitative Genetics*. Chapman and Hall. Pp. 41-43. NY

Rummel, R. 1976. *Understanding Correlation*.

<http://www.mega.nu:8080/ampp/rummel/uc.htm>.

Salguero-Farías J. & J.D. Ackerman. 1999. A Nectar Reward: Is more better? *Biotropica* 31(2): 303–311.

Schiebinger, L. 1996 The loves of plants. *Scientific American* 274:110-115.

Sokal R. & F. Rohlf. 1996. *Biometry: the principles and practice in statistics in biological research*. (4ta ed) W. H. Freeman. New York. Pp. 887.

Thom C, P. G. Guerenstein, W. L. Mechaber & J. G. Hildebrand. 2004. Floral CO₂ reveals flower profitability to moths. *J. Chem. Ecol.* 30(6): 1285-1288.

Valverde P. L, J. Fornoni & J. Núñez-Farfán. 2003. Evolutionary ecology of *Datura stramonium*: local differentiation and contrasting selection on growth and resistance to herbivorous insects. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 127-137

Vesprini J. & L. Galetto. 2000. The reproductive biology of *Jaborosa integrifolia* (Solanaceae): why its fruits are so rare? *Plant Syst. Evol.* 225: 15–28.

Vilchis R. 2005. *Enciclopedia de los Municipios de México*

<http://www.e-local.gob.mx/work/templates/enciclo/mexico/mpios/15092a.htm>

Voss R, M. Turner, R. Inouye, M. Fisher & R. Cort. 1980. Floral Biology of *Markea neurantha Hemsley* (Solanaceae), a Bat-pollinated Epiphyte. *American Midland Naturalist* 103(2): 262-2.

Waser N. M., L. Chittka, M. V. Price, N. M. Williams & J. Ollerton. 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*. 77: 1043-1060.