

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Por qué la dioecia es tan rara entre las plantas
con flores: un estudio en el género *Erythroxylum*

CÉSAR ANTONIO ABARCA GARCÍA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. CÉSAR A. DOMÍNGUEZ PÉREZ-TEJADA

MEXICO, D.F.

JULIO 2008



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.

Para mi hermana
Adriana:

Ráfaga

Pasaba mi niña,
¡qué bonita iba!,
con su vestidito
de muselina
y una mariposa
prendida.

¡Síguela, muchacho,
la vereda arriba!
Y si ves que llora
o medita,
píntale el corazón
con purpurina
y dile que no llore
si queda solita.

Federico García Lorca

Agradecimientos

Siempre que acabo de escribir me inundo de una extraña felicidad. De una felicidad que se desprende de las preguntas y las certezas que se condensan en la imagen que me persigue como un juego desde la niñez, las sillas blandas que se arremolinan bajo el sol. Cuando Emilia nació las vi. También las veo casi todas las mañanas en La Casa del Sol, uno de los lugares en donde esa imagen se transforma en el ciclo cotidiano de la imaginación. Así como quiero dejar testimonio de esa imagen que nos recorre y que es tan distinta a todo lo que conozco y por lo tanto tan difícil de encontrar fuera de aquí, voy a aprovechar este espacio para reconocer de forma breve a las personas que siento que de una manera fundamental me han ayudado -tanto académica como emocionalmente- a definir mi transformación incesante. A César Domínguez – que dirigió mi investigación doctoral- porque siempre nos hemos permitido indagar en los límites de lo teórico y al haberlo hecho, no sólo caímos en las zonas más profundas de la reflexión científica, sino que nos sorprendimos sorprendidos de esta investigación. A Luis Eguiarte y Valeria Souza, pues desde que los conozco he realizado un sin fin de actividades académicas con ellos, que poco a poco, se han ido convirtiendo en algunas de las principales herramientas intelectuales que gracias a ellos encontré. Espero utilizarlas cada día con mayor determinación. Al igual que Luis E., David Romero formó parte del comité académico que siguió mi formación desde la angustiosa profundidad que lo enterraba todo, hasta los primeros indicios que indicaban que vendría algo, aunque nunca imaginamos que sería tan maravilloso el resultado final. Ahora quiero referirme a algo fundamental, al trabajo en equipo. Sin el apoyo crítico y entusiasta que recibí de muchas personas, dudo mucho que

hubiera podido acabar mi tesis doctoral. Como fui parte de dos generaciones dentro del laboratorio de Interacción Planta-Animal, me siento como un híbrido muy afortunado, pues tuve la oportunidad de aprender en distintas circunstancias de la nueva y la vieja vanguardia, como las he denominado. De la vieja generación acabaron siendo muy buenos amigos míos Eduardo Cuevas, Raúl Alcalá y Sergio López, con quienes se que la mejor forma de investigar es con los amigos. De la nueva generación con quien principalmente tuve la oportunidad de indagar el mundo jugando, que por cierto es la única forma en como concibo la investigación, fue con Adriana López. Quisiera que fuera con gente como ellos, con la que siempre pudiera participar. Afortunadamente algunas personas me han hecho saber que con la afortunada brújula que poseo, siempre los podré encontrar. A ellos y a sus familias. Amadeo Estrada, Juan Arroyo y Luis Navarro son el mejor ejemplo de la pasión que no descansa y se desborda, que contagia a ver la realidad desde donde pocos la conciben. Rubén Pérez Ishiwara, Raúl Iván Martínez y Germán Ávila-Sakar, compartieron conmigo la parte más dura del trabajo, desde largas salidas al campo, hasta la tediosa tarea de cotizar y pedir el material para trabajar en el laboratorio. Su apoyo fue imprescindible y divertido; así como indescritibles muchos de los lugares que debido a las colectas de plantas pudimos conocer. A los Drs. Daniel Piñero y Pablo Vinuesa por lo valioso de sus comentarios a la versión final de mi tesis. A los Drs. Juan Nuñez y Mauricio Quesada, porque amablemente accedieron a formar parte del comité ante el cual presentaré mi tesis. Así como el apoyo humano fue importante, también lo fue el económico. Ahí habría que destacar que durante mis estudios doctorales conté con una beca que me otorgó el CONACYT (num. 154881) y que el trabajo en el campo y el laboratorio fue financiado

por los proyectos DGAPA-UNAM (IN210797) y CONACYT (1201P-N) que esas instituciones le otorgaron a César Domínguez.

Más complejo de agradecer aún, fue todo el apoyo económico y emocional que siempre hemos recibido de mis padres. Sin ellos por ejemplo, las dos estancias académicas que realizamos en España hubieran sido imposibles. El amor que siento por ellos es simplemente inconmensurable. Testimonio de ello son los intentos que realice en las cartas que les envíe desde España y Portugal. Aún menos traducible, es lo que hemos ido conformado y consolidado juntos Celia, Emilia y yo. Hemos aprendido a reconocernos en las circunstancias más diversas, a salir a tientas en las noches más oscuras para después de sembrarlas, poder ver como germinan una a una las estrellas. Es nuestra vida que todo lo que toca lo expande, lo vuelve pájaro, que abre nuevos caminos en el horizonte para los sentidos que se derraman, que necesitan siempre de otros sitios, de otras inquietudes, de nuevos rumores. Como todas las mañanas de los últimos años, me encuentro escribiendo junto a esa ventana que hemos construido frente al abismo que representa cada día, en la que me como el sol y aparece la noche, en la que Celia se come la noche y amanecemos abrazados nuevamente. Con Emilia. Juntos hemos aprendido un nuevo lenguaje que crece y se ancla como los atardeceres en los amantes, que extiende sus ramas hasta convertirlas en cielo, que esparce semillas con alas de golondrina y de reflejo. Es la memoria de nuestra infancia y la ruptura como despedida e inicio. En nuestra relación hay un soliloquio de ganas imborrables, de primicias incluyentes. La creamos para estar más cercanos. Para estar más distantes de los que llamamos los otros. A Marina, porque al desaparecer nuestras contradicciones, demostramos que la verdadera esencia humana es

disfrutarnos. Aprendimos a querernos construyéndonos como amigos. A Biko, a Sabán y a Oma.

César Antonio,

La Casa del Sol,

El Rodeo, Miacatlán, Morelos.



Agradecimientos	I—IV
Prólogo	V—VIII
Introducción general	1—6
Capítulo I: Tasa de endogamia biparental, depresión por endogamia y patrones de diversidad genética en plántulas y adultos de <i>Erythroxylum havanense</i>	7—31
Introducción	7
Material y método	12—17
Organismo de estudio.....	12
Sitio de estudio.....	13
Colecta del tejido.....	15
Extracción del ADN.....	15
Amplificación de los ISSRs.....	16
Análisis de los datos	17—19
<i>Tasa de endogamia biparental</i>	17
<i>Depresión por endogamia biparental</i>	17
<i>Medidas de diversidad y de diferenciación genética</i>	18
Resultados	20—23
<i>Tasa de endogamia biparental</i>	20
<i>Depresión por endogamia biparental</i>	21
<i>Medidas de diversidad y diferenciación genética</i>	21
Discusión	23
Conclusión	30
Capítulo II: The genetic consequences of evolving two sexes: the genetic structure of distylous and dioecious species of <i>Erythroxylum</i>	32—44
Abstract	32
Introduction	33
Materials and Methods	34—36
Study sites.....	34
Study organisms.....	34
Material collecting.....	35
DNA extraction.....	35
ISSR´s amplification.....	35
Data analyses.....	36
Results	36
Discussion	38
References	41
Capítulo III: ¿Es la evolución de la diecia un callejón sin salida?.....	45—53
Bibliografía recomendada.....	52
Capítulo IV: ¿Es la depresión por endogamia la fuerza selectiva más importante en la evolución de la diecia?: el caso de las especies ginodioicas.....	53—62
Introducción	53

Resultados y Discusión.....	58
Conclusiones.....	61
Discusión general.....	63—67
Conclusiones generales.....	68—70
Bibliografía general.....	71—84
Anexo I: Local genetic differentiation among populations of the mass-flowering tropical shrub <i>Erythroxylum havanense</i> (Erythroxylaceae).....	85—94
Summary.....	85
Introduction.....	85
Materials and Methods.....	86
Study site.....	86
Plant species	86
Data collection.....	87
Data analyses.....	88
Results.....	88
Discussion.....	90
References.....	93



Prólogo

Una característica común en las angiospermas, es la presencia de individuos hermafroditas. Es decir, aquellos en los que los órganos que producen los gametos masculinos (polen) y los femeninos (óvulos) se encuentran en una misma flor; o separados, pero dentro de una misma planta.

Por otro lado, si como lo mostró Fisher teóricamente (1941), la autofecundación aumenta la adecuación de los alelos que la promueven, entonces es esperable que la mayoría de las especies, que son hermafroditas (entre 75 y 90 % de las especies son hermafroditas, Richards 1986), se autofecunden. Sin embargo, al contrario de lo que podría esperarse una gran proporción de plantas con flores posee algún mecanismo fisiológico, morfológico o una combinación de ambos, que evita la autofecundación o reduce sus probabilidades (por ejemplo, cerca del 50% de las especies posee un sistema de incompatibilidad genético; Uyenoyama 2000; Fetscher 2001; Castric y Vekemans 2004; Glémin et ál. 2005). Debido a ello, se han desarrollado algunas hipótesis que intentan explicar por qué en las plantas que producen flores han surgido independientemente diversos mecanismos que evaden la autofecundación (Ver Sakai y Weller 1999).

La hipótesis que cuenta con mayor aceptación propone que los sistemas reproductivos que evitan la autofecundación han evolucionado debido a que reducen los efectos negativos de la endogamia (Lloyd 1975; Charlesworth y Charlesworth 1978; Lande y Schemske 1985; Barret y Eckert 1990; Barrett et ál. 1996). Dicho de otra forma, esta hipótesis propone que los sistemas reproductivos que evitan la autofecundación se derivaron de ancestros compatibles que al evitar la endogamia adquirieron ventajas selectivas. A pesar de ello,

algunos sistemas reproductivos que evitan la autofecundación no sólo evolucionaron de ancestros compatibles, sino también de ancestros incompatibles. Un ejemplo de ello, es la evolución de la dioecia en varias familias distílicas (Baker 1958; Ordnduff 1966; Waytt 1983). Aunque un individuo distílico y uno dioico no pueden producir semillas derivadas de autofecundación, en ambos sistemas reproductivos las cruza entre parientes (endogamia biparental) siguen siendo posibles. Por lo tanto, sólo si la dioecia redujera la endogamia biparental más que la distília, las ventajas que teóricamente tiene el evitar la endogamia y sus efectos negativos se mantendrían, aun cuando los ancestros fueran incompatibles.

Para evaluar si la dioecia es capaz de reducir el grado de endogamia respecto a una especie que posee un sistema de incompatibilidad genético, en esta tesis seguimos diferentes aproximaciones derivadas principalmente de la genética de poblaciones. Para ello, primero exploramos si una especie incompatible podría presentar altos niveles de endogamia biparental. Para probarlo escogimos a *Erythroxyllum havanense*, una especie distílica cuyo patrón de floración y fructificación puede restringir el flujo de genes dentro y entre poblaciones y por lo tanto, además de explicar la significativa diferenciación genética que detectamos con RAPDs entre poblaciones cercanas (y que presentamos en el anexo I de esta tesis), podría provocar que la endogamia biparental aumentara significativamente. Como lo mostramos en el capítulo I utilizando marcadores moleculares hipervariables (ISSRs), efectivamente *E. havanense* presenta una tasa de endogamia biparental estadísticamente significativa y una fuerte depresión por endogamia. Como la endogamia biparental puede aumentar la homocigosis dentro de una población, pero la depresión por endogamia biparental disminuirla, también describimos los patrones de diversidad

genética dentro y entre poblaciones de plántulas y de adultos. De esa manera, mostramos como la endogamia biparental y la depresión por endogamia biparental puede afectar la estructura genética de *E.havanense*.

En el capítulo II partimos de la idea de que si la evolución de la dioecia disminuyera la endogamia biparental más que un sistema reproductivo distílico incompatible, entonces una especie dioica del género *Erythroxyllum* debería de mostrar mayores niveles de diversidad genética que *E.havanense*. Si no fuera así, al menos debería de mantenerlos (Baker 1959), pues si no, la evolución de la dioecia no tendría las ventajas genéticas que tradicionalmente le han sido asociadas (ver Waycott et ál. 1996). Para evaluar esa predicción, comparamos la estructura genética de *E.havanense* con la de *E.rotundifolium*, la única especie dioica del género *Erythroxyllum* en México. El resultado más importante de ese capítulo fue que la evolución de la dioecia en *Erythroxyllum* no sólo no aumentó o mantuvo la variación genética, sino que la disminuyó. Además como la disminución de la variación genética de *E.rotundifolium* no parece ser un caso aislado, pues otros estudios de genética de poblaciones en especies dioicas muestran resultados similares, propusimos que esta reducción podría ser un proceso que acompaña la evolución de la dioecia. mo?

Pensamos que la disminución de la diversidad genética podría estar relacionada con que al separarse los sexos, el tamaño efectivo poblacional (N_e) podría disminuir.

Debido a que la reducción del N_e y de la variación genética podría tener repercusiones negativas (Newman y Pilson 1997), en el capítulo III discutimos cómo la dioecia, que tradicionalmente ha sido vista como un mecanismo que ofrece ventajas adaptativas, una vez que evoluciona podría considerarse un sistema reproductivo poco exitoso entre las angiospermas (ver Heilbuth 2000).

Dado que nuestros resultados sugieren que el evitar la endogamia podría no ser el proceso más general en la evolución de la unisexualidad, en el capítulo IV mostramos que en las primeras etapas de la separación de los sexos, la asignación de recursos a las funciones reproductivas es más importante que la depresión por endogamia.

Finalmente, la tesis en su conjunto sugiere que la dioecia en las angiospermas podría evolucionar debido a que cuando la producción de los gametos masculinos y femeninos se separa en distintos individuos, se resuelve un conflicto entre genes que controlan la expresión de la sexualidad y que tienen distintos patrones hereditarios. Por lo tanto, proponemos reconsiderar una hipótesis alternativa que está basada en la teoría de conflictos. Aunque ésta ha sido menos explorada que otras hipótesis evolutivas; como algunos autores lo han sugerido (por ejemplo, Hurst 1992; Patridge y Hurst 1998; Domínguez 1995), podría explicar tanto la aparición de la dioecia como de otras importantes transiciones evolutivas.

Nota: únicamente el anexo I y el capítulo II, que son artículos ya publicados, cuentan con bibliografía propia. Puesto que los demás capítulos comparten referencias, decidimos reunir todas las citas en una bibliografía general que se encuentra al final de la tesis.

Debido a que el capítulo III es un artículo de divulgación científica y la revista en la que fue aceptado sólo permite incluir algunas referencias, pero éstas podrían ser útiles para el lector que decida profundizar en el tema, aparecen con una marca (♣) en la bibliografía general.



Introducción general

Probablemente las principales preguntas de la biología evolutiva estén relacionadas con lo que Maynard Smith (1995) llamó las grandes transiciones evolutivas. Como su nombre lo indica, dichas transiciones son muy amplias, tanto, como la evolución del sexo o el origen de las células eucariontes. Subyacente a estos grandes cambios biológicos, sin embargo, se encuentran otros fenómenos relativamente menos amplios, pero que dada su magnitud, también han originado preguntas centrales que la biología evolutiva aún no ha acabado de responder. Un ejemplo de ello es el debate que todavía existe respecto a la separación de los sexos en distintos individuos o dioecia (Charlesworth 1999) y que se inició con los trabajos pioneros de Darwin en 1877.

La dioecia se caracteriza porque en una población una proporción de los individuos, generalmente la mitad (Webb 1999, Stehlik y Barret 2005), produce únicamente gametos masculinos y la otra mitad en cambio, únicamente gametos femeninos. La dioecia ha surgido independientemente en al menos tres grandes linajes, el de los animales, el de las plantas con semillas desnudas o gimnospermas y el de las plantas con flores o angiospermas. La mayoría de los animales terrestres (Charlesworth 1991), así como tres de los cinco principales órdenes de gimnospermas (Ginkopside, Cycadopside y Gnetopside; Richards 1986), son dioicos. En cambio en las angiospermas, aunque la dioecia ha evolucionado en repetidas ocasiones a partir de distintos sistemas reproductivos hermafroditas (ver Webb 1999), pocas especies lo son (alrededor del 6% del total, Renner y Ricklefs 1995).

Debido a que los ancestros de los animales terrestres y de las gimnospermas que conocemos son dioicos, no es posible reconstruir la historia evolutiva de ese sistema reproductivo a partir de dichos grupos. En el caso de las angiospermas en cambio, en donde la dioecia se encuentra en distintas fases de su evolución (Charlesworth 1991, Ainsworth 2000), tenemos una oportunidad exclusiva para reconstruir tanto su origen, como sus principales consecuencias evolutivas.

Las hipótesis que intentan explicar la evolución de la dioecia son varias (para una breve revisión del tema ver Thompson y Barrett 1981 y Thompson y Brunet 1990). Aún así, la mayoría de ellas únicamente cuenta con evidencia correlativa. Por ejemplo, la asociación entre la dioecia y los polinizadores generalistas de tamaño pequeño o la presencia de frutos rojos y carnosos dispersados por frugívoros especialistas, cuentan con un número limitado de estudios que no son concluyentes (Vamosi et ál. 2005). En otros casos se ha mostrado que existe una mayor incidencia de especies dioicas en islas o en climas tropicales que en otro tipo de ambientes (Weller et ál. 1990; Matallana et ál. 2005), pero ningún factor causal ha sido probado. En algunos casos más se ha propuesto otra clase de asociaciones, como su presencia en ambientes secos, el predominio de plantas leñosas, de tamaño grande, perennes y con ciclos de vida largos, pero la generalidad de esos patrones tampoco se conoce (ver Sakai et ál. 1995 y Sakai y Weller 1999).

Además de las propuestas anteriores, existen tres hipótesis que tienen una mayor aceptación, pues cuentan con modelos teóricos y evidencia empírica que en mayor o menor medida las validan.

En términos generales, una de las hipótesis plantea que la selección sexual (Darwin 1871), podría promover la separación de los sexos de una planta hermafrodita en distintos

individuos (Para un debate sobre el tema ver Arnold 1994 y Grant 1995). Sin embargo es difícil imaginar cómo, pues en la teoría darwiniana, la selección sexual actúa sobre distintos caracteres sexuales secundarios una vez que estos se encuentran ya separados en los machos y en las hembras. Por lo tanto, más que el origen de la unisexualidad en las angiospermas, lo que esta teoría también podría explicar, al igual que en los animales, es el dimorfismo sexual característico de las especies dioicas (como el tamaño de las inflorescencias, la forma y el color de las flores o la producción de néctar, Eckhart 1992).

Otra de las hipótesis propone que los atributos que maximizan la adecuación masculina y femenina podrían ser diferentes (Charnov 1982, Geber 1999). Por lo tanto, la evolución de la unisexualidad debería de traducirse en ventajas reproductivas asociadas con la asignación de recursos a cada una de las vías sexuales por separado. Tal como esta hipótesis predice, cuando se ha comparado la adecuación de hermafroditas y de hermafroditas que funcionalmente son hembras, la reasignación de recursos que los unisexuales hacen a la función femenina, ha podido explicar de manera importante, por qué su progenie generalmente es de mayor calidad que la de los hermafroditas (Para una revisión del tema, ver Cuevas y Abarca 2006). Debido a que la coexistencia de hermafroditas y hembras, definido como ginodioicismo, es uno de los principales sistemas reproductivos a través de los que la dioecia se ha derivado (Cuevas y Abarca 2006), esta hipótesis cuenta con una gran aprobación.

Aunque la hipótesis que sigue y la anterior no son mutuamente excluyentes, probablemente sea ésta la más general, pues no sólo explica cómo pudo haber evolucionado la dioecia, sino también otros sistemas reproductivos que promueven la fecundación cruzada. Esta hipótesis que está formalmente sustentada en los modelos de

genética de poblaciones desarrollados por Charlesworth y Charlesworth (1978 y 1979), supone que para que la dioecia evolucione, es necesario que en una población hermafrodita exista endogamia y depresión por endogamia (δ). En otras palabras, cuando la adecuación de la progenie que es el resultado de autofecundación es menor que la que se deriva de fecundación cruzada (depresión por endogamia), entonces se espera que un sistema reproductivo como la dioecia, que evita los efectos negativos de la autofecundación, se favorezca. En las especies ginodioicas autocompatibles en donde también se ha evaluado esta propuesta (ver Cuevas y Abarca 2006), se ha confirmado empíricamente la importancia que puede tener la δ en la transición de ese sistema reproductivo a la dioecia (Sakai et ál. 1989). Aunque esta hipótesis es ampliamente aceptada, aún hace falta evaluar algunos de sus principales supuestos. Por ejemplo, una de las consecuencias más generales que teóricamente podría tener la evolución de la dioecia, es un aumento de la diversidad genética, pues al evitar la autofecundación, este sistema reproductivo reduce la forma más extrema de endogamia (Hedrick 2000, Charlesworth 2003). A pesar de ello, no existe ningún estudio en donde se haya puesto a prueba esta hipótesis en especies dioicas. Aún así, si como en muchos estudios se ha mostrado, la diversidad genética de las plantas que se autofecundan es menor que las que promueven la fecundación cruzada (por ejemplo, Dvorak et ál. 1998, Wright et ál. 2002, Sweigart y Willis 2003), entonces es esperable que una especie dioica también posea mayores niveles de diversidad genética que una especie autocompatible. Por otro lado, si la dioecia se favorece principalmente en especies compatibles que tienen δ , es decir, en donde la selección elimina a los individuos homocigotos que se producen por autofecundación y por lo tanto permanecen principalmente los individuos heterocigotos, entonces la

evolución de la unisexualidad posiblemente no esté acompañada de un incremento de la diversidad genética. Un estudio que apoya parcialmente esta última explicación es el de *Thymus vulgaris*, una especie ginodioica compatible en donde se ha sugerido que la d , podría explicar porqué independientemente de la frecuencia de hembras entre las poblaciones, los niveles de diversidad genética son similares (Tarayre y Thompson 1997). Menos claro aún que cuando la dioecia evoluciona de especies compatibles, resulta el caso en donde se ha derivado de sistemas reproductivos que ya evitaban la autofecundación, como las especies que tienen algún sistema de autoincompatibilidad genético (Ver Webb 1999). Por lo tanto, para evaluar una de las predicciones más generales que supone que la evolución de la dioecia está acompañada de un incremento de la variación genética, aún hace falta comparar la estructura genética de una especie dioica con la de otros sistemas reproductivos (tanto compatibles como incompatibles). Si al contrario de lo que tradicionalmente se ha supuesto, la dioecia no aumenta o mantiene el mismo nivel de endogamia que el de su ancestro, entonces alguna de las ventajas adaptativas que se ha propuesto podría tener su evolución, desaparecerían. Entre las más importantes podría estar que conforme el tamaño efectivo poblacional (N_e) y la variación genética disminuyen, las probabilidades de extinción aumentan (Newman y Pilson 1997, Miller y Waits 2003). En otras palabras, podríamos explicar por qué la dioecia es un sistema reproductivo poco frecuente entre las angiospermas (Renner y Ricklefs 1995, Heilbuth 2000, Gross 2005).

Finalmente aunque se ha propuesto a la δ como la principal fuerza evolutiva en la transición del hermafroditismo a la dioecia, tanto en las especies ginodioicas (de las que

probablemente la dioecia se ha derivado en más ocasiones), como en algunas especies incompatibles (Ávila y Domínguez 2000), se ha mostrado que la reasignación de recursos también tiene un papel preponderante en dicha transición. Debido a que en las especies ginodioicas compatibles existen datos de δ y de reasignación de recursos, éstas resultan ideales para evaluar cuál es el papel relativo de ambas fuerzas selectivas en la evolución de la dioecia. Si como sugerimos antes, evitar la endogamia no es la principal ventaja selectiva en la evolución de la dioecia, ya que este sistema reproductivo podría no ser más eficaz que otros, entonces proponemos que el papel relativo de la asignación de recursos debería de ser más importante que el de la δ . Si así fuera, entonces una fuerza evolutiva más importante que la δ , podría explicar el origen de la dioecia en las angiospermas.



Tasa de endogamia biparental, depresión por endogamia y patrones de diversidad genética en plántulas y adultos de *Erythroxylum havanense*

César A. Abarca¹ y César A. Domínguez².

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México; AP 70—275, México DF.

¹*abarca_cesar@hotmail.com;* ²*tejada@servidor.unam.mx*

Introducción

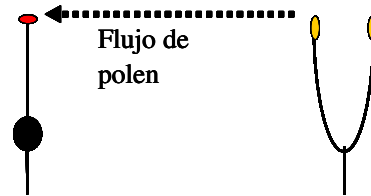
Aunque la mayoría de las especies de angiospermas se podría autofecundar, ya que generalmente ambos órganos reproductivos (masculino y femenino) se encuentran en una misma flor (hermafroditismo—entre el 75-90 %, Richards 1986), o una misma planta (monocismo), los mecanismos que reducen dicha posibilidad son comunes. Entre los diferentes mecanismos, los sistemas de incompatibilidad (SI) genéticos (esporofíticos y gametofíticos) y la separación espacial de los sexos en distintos individuos (dioecia) podrían ser considerados como los más eficientes, pues impiden la autofecundación por completo. Aún así, sólo los SI están ampliamente distribuidos (cerca del 50% del las especies posee un SI, Uyenoyama 2000; Fetscher 2001; Castric y Vekemans 2004; Glémin et ál. 2005), pues se estima que únicamente alrededor del 6% de las especies son dioicas (Renner Y Riclefs 1995).

Teóricamente la evolución de los mecanismos que reducen la autofecundación ha sido favorecida por la selección natural, ya que mediante éstos, las plantas evitan los efectos deletéreos de la endogamia (Charlesworth y Charlesworth 1978). Debido a ello, se considera que es poco probable que un sistema reproductivo que impide la autofertilización y sus efectos negativos, se origine de un ancestro que también la evitaba (Baker 1959). Por lo tanto, supuestamente la evolución de la dioecia a partir de especies incompatibles debería de estar restringida, ya que no tendría las ventajas teóricas que le confiere evitar la endogamia. Aún así, algunos autores han reconocido que la transición de la distílica a la dioecia podría ser una ruta evolutiva importante (por ejemplo- Darwin 1877; Ornduff 1966; Opler et ál. 1975; Lloyd 1979; Lack y Kevan 1987).

La distílica se caracteriza por la coexistencia de dos morfologías florales (que difieren en la longitud de los estilos) que se encuentran asociadas a un sistema de incompatibilidad (SI) heteromórfico que impide tanto la autofecundación, como la fecundación entre las mismas formas florales (Uyenoyama 2000, Castric y Vekemans 2004). Debido al SI heteromórfico de las plantas heterostílicas, los individuos distílicos al igual que los dioicos, sólo producen semillas cuando el fenotipo floral de dos individuos es distinto (disassortative mating, Richards 1986). Por lo tanto, aunque ambos sistemas reproductivos impiden la endogamia uniparental pues los individuos no se pueden autofecundar, la endogamia biparental puede ocurrir de manera similar. Es decir, en una población dioica las hembras puede aparearse con todos sus parientes machos; y en una distílica, una planta de estilo largo puede reproducirse con todos sus parientes de estilo corto. La única diferencia que existe, es que en una población dioica el flujo de polen se

restringe a una sola dirección (de los machos a las hembras, pero no al contrario), mientras que en una distílica el flujo puede ocurrir en ambas direcciones (de las plantas de estilo largo a las de estilo corto y viceversa, Figura 1). Por lo tanto, sólo si la dioecia redujera la endogamia biparental más que la distílica, un sistema dioico derivado de un ancestro distílico, seguiría manteniendo las ventajas que teóricamente tiene el evitar la endogamia (Charlesworth y Charlesworth 1978).

Dioecia: población de plantas en donde una proporción de los individuos produce flores estaminadas o masculinas (generalmente el 50%) y la otra proporción produce flores pistiladas o femeninas. La dioecia está considerada como la máxima separación de las funciones sexuales en plantas con flores.



Distílía: polimorfismo genético en el que dentro de una población coexisten dos morfologías florales que difieren recíprocamente en la longitud de las anteras y los estambres (hercogamia recíproca). Este polimorfismo además está acompañado por un sistema de autoincompatibilidad que evita la fecundación intra planta e intra morfo y una serie de características morfo-fisiológicas asociadas con los diferentes morfos florales.

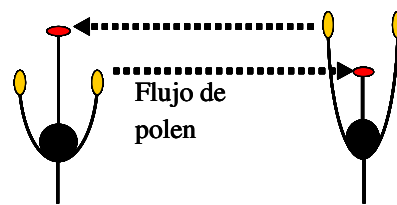


Figura 1. Principales características de un sistema reproductivo dioico y uno distílico. Aunque en ambos sistemas reproductivos un individuo sólo puede cruzarse endogámicamente con la mitad de sus parientes, en la dioecia el flujo de polen se da en una sola dirección, mientras que en la distílía se da en ambos (Figura modificada de Abarca y López 2007).

Para explorar si la dioecia puede evolucionar de un ancestro incompatible con una tasa de endogamia biparental significativa y una fuerte depresión por endogamia, en este estudio utilizamos a *Erythroxylum havanense*, una especie distíllica que posiblemente se encuentre en transición evolutiva a la dioecia (Domínguez et ál. 1997, Cuevas et ál. 2005).

Algunos estudios han mostrado que ciertas condiciones ecológicas propician que los apareamientos entre parientes ocurran más allá de lo esperado por el azar. Entre las condiciones más importantes se encuentran los patrones de forrajeo locales, pues restringen el flujo de genes a través del polen y de las semillas (Hardner, Potts y Gore, 1998). Una característica notoria de *E. havanense*, es que el patrón de floración que presenta, además de ser sincrónico y masivo, dura muy poco tiempo. Debido a que este tipo de floración se caracteriza por una abundancia efímera de recursos, los polinizadores y los dispersores de semillas de *E. havanense* forrajean más dentro de los parches de floración y fructificación que entre ellos (Gryj y Domínguez 1996, Domínguez et ál. 2005). Por lo tanto la floración de *E. havanense* probablemente sea la responsable de la significativa diferenciación genética que detectamos con RAPDs entre poblaciones cercanas (entre 1.5 y 19.75 km; Ver el anexo I). Si el patrón de floración y fructificación de *E. havanense* limita la dispersión de los genes (Gryj y Domínguez 1996, Domínguez et ál. 2005), entonces es esperable que las cruza entre parientes ocurran más allá de lo esperado por el azar. Para comprobarlo, en este estudio medimos la tasa de endogamia biparental de cinco poblaciones de *E. havanense*. Debido a que generalmente las cruza endogámicas tienen efectos negativos (Carr y Dudash 2003), también evaluamos la magnitud de la depresión por endogamia biparental. Como teóricamente los SI se favorecen pues evitan los efectos nocivos de la

endogamia (Charlesworth y Charlesworth 1979, Uyenoyama 1988, 1989), se espera que los genes que estén ligados al locus de incompatibilidad contengan un elevado número de alelos deletéreos (Peters et ál. 2003). Por consiguiente, cuando la tasa de endogamia aumenta en una población de individuos incompatibles, la magnitud de la depresión por endogamia debería de ser fuerte. *E. havanense* además de ser autoincompatible, es una especie que presenta un ciclo de vida largo, por lo que teóricamente es esperable que en los individuos endogámicos se exprese una alta carga genética (Carr y Dudash 2003).

Por otro lado, si en *E. havanense* hay endogamia biparental y posteriormente depresión por endogamia, entonces debería de reflejarse en la estructura genética de la siguiente forma. Como la depresión por endogamia generalmente elimina a los individuos homocigotos tempranamente de una población, entonces los individuos que sobreviven hasta la madurez deberían de ser los más heterocigotos. Si es así, la diversidad genética de las plántulas de *E. havanense* debería de ser menor que la de los adultos y la diferenciación genética entre poblaciones de adultos mayor. Debido a ello, también describimos la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones de plántulas y de adultos de *E. havanense*. Con la información obtenida, inferimos cómo la endogamia biparental y la depresión por endogamia biparental podrían afectar la estructura genética de la especie. Finalmente, discutimos algunas implicaciones de la evolución de la dioecia en el contexto de la hipótesis que propone que ésta se favorece principalmente porque evita los efectos negativos de la endogamia.

Material y métodos

Organismo de estudio

El género *Erythroxylum* (Erythroxylaceae) se constituye predominantemente de especies distílicas pantropicales, todos árboles o arbustos, perennes y leñosos. Al igual que en otros grupos distílicos, la dioecia también ha evolucionado en éste género (Ganders 1979, Barrett 1992). En México el género *Erythroxylum* esta compuesto por siete especies distílicas y una dioica (Kelly 2001).

Erythroxylum havanense es un arbusto distílico, perenne y autoincompatible que probablemente se encuentre en transición evolutiva a la dioecia (Domínguez et ál. 1997, Cuevas et ál. 2005). Estudios previos han mostrado que los individuos de estilo corto (thrum) y que presentan esterilidad masculina similar a las especies ginodioicas (Keyr-Puor 1981, Van Damme 1993, Samitou-Leprade 1994, Domínguez 1995, Cuevas et ál. 2005), compensan la pérdida en adecuación masculina incrementando la producción de semillas (Domínguez et ál. 1997, Cuevas et ál. 2005). De tal forma, algunos individuos thrum funcionan más como hembras y los pin (de estilo largo) como machos (Ávila y Domínguez 2000, Cuevas et ál. 2005).

E. havanense presenta una floración sincrónica y masiva que al durar poco tiempo, puede causar un aislamiento reproductivo entre poblaciones cercanas (Domínguez et ál. 2005). El periodo de floración promedio de un individuo es muy corto (2.8 ± 0.1 días, promedio \pm ES; Domínguez y Dirzo 1995) y las flores individuales sólo duran de 3 a 5 hrs. (Domínguez y Dirzo 1995). Sus principales polinizadores que son abejas del género *Trigona* (Apiade), forrajean de manera denso-dependiente (Domínguez et ál. 1997). La

variación en el tiempo de floración explica el 87% de la varianza en el tiempo de fructificación (Gryj y Domínguez 1996). El periodo promedio de fructificación de un individuo es sólo de 12 días (± 0.66), mientras que el de la población es de 37 días (Gryj y Domínguez 1996). La sincronía en la maduración de los frutos dentro y entre las plantas de un mismo parche produce una concentración abundante pero efímera de frutos que es removida rápidamente por varias especies de aves oportunistas (Gryj y Domínguez 1996). Después de que los frutos son consumidos, las aves depositan las semillas en la vecindad del parche de fructificación, cerca de la planta que les dio origen (Grij y Domínguez 1996).

Sitio de estudio

La estructura genética de las plántulas y de los adultos, así como la tasa de endogamia biparental en *E. havanense*, fue analizada en cinco poblaciones ubicadas en la costa del estado de Jalisco, en la región de Chamela (Figura 2). Tres de las poblaciones (Ardilla, Antiguo Sur y Tejón) se encuentran dentro de la estación de biología de Chamela, que pertenece al Instituto de Biología de la UNAM. Las otras dos (Cuitzmala y Ranchitos) se encuentran en las afueras de la estación.

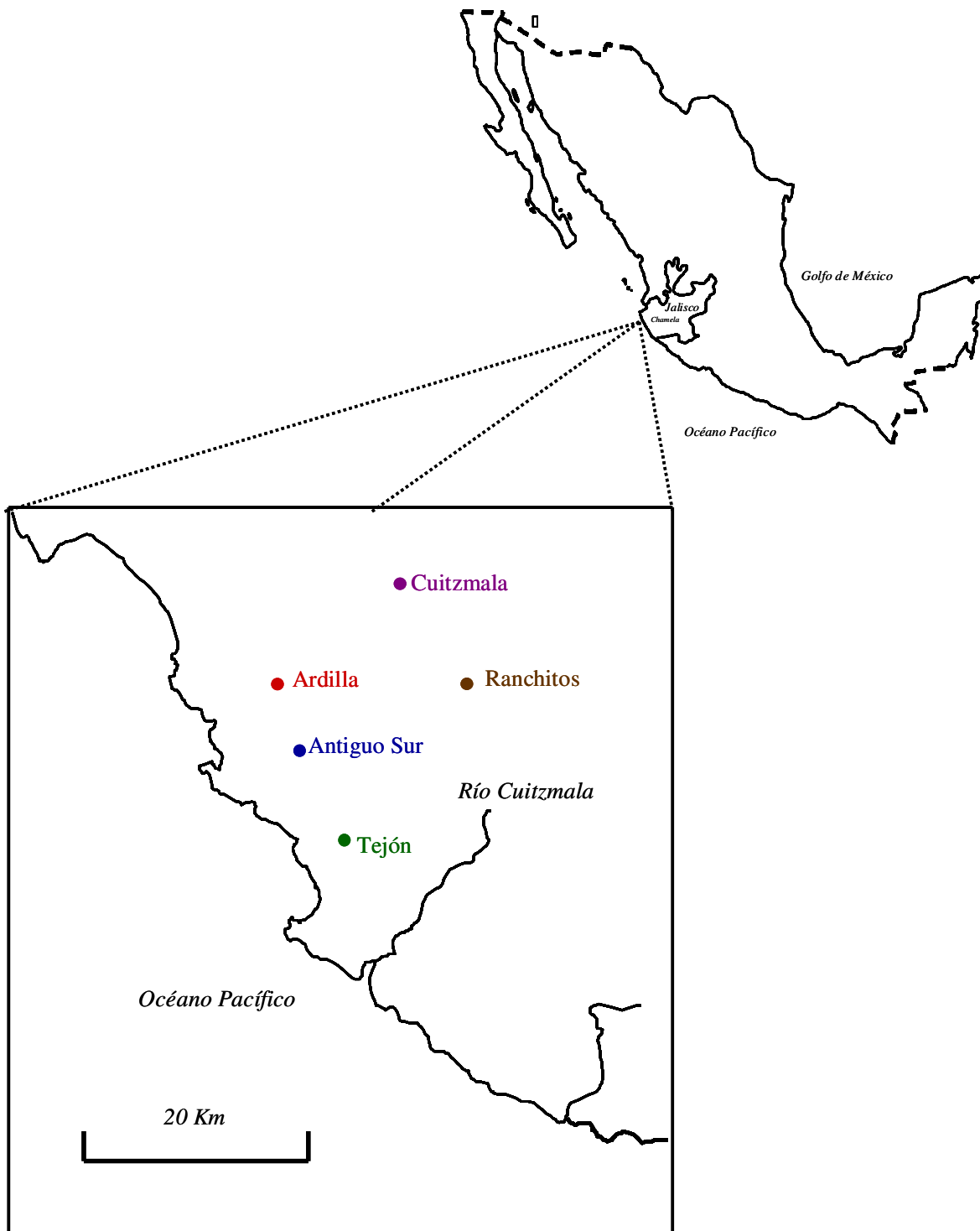


Figura 2. Ubicación de las cinco poblaciones de plántulas y adultos de *Erythroxylum havanense* estudiadas en la región de Chamela, Jalisco

Colecta del tejido

A principios del verano de 2002 colectamos el tejido foliar de entre 20 y 30 plantas que se encontraban floreciendo en cada población. Posteriormente, cuando las plantas comenzaron a fructificar, aproximadamente 20 días después de la floración, colectamos entre 30 y 50 frutos maduros de distintas plantas. Después de la colecta de tejido foliar, guardamos las muestras en nitrógeno líquido para transportarlas al laboratorio en donde fueron almacenadas a -80°C en un ultracongelador (Revco). Los frutos en cambio, fueron despulpados y las semillas se pesaron en una balanza analítica para ser sembradas en jiffy pots individualmente. Cada jiffy pot fue marcado con la identidad de la planta madre y de la semilla; colocándose aleatoriamente en un invernadero de la Estación Biológica de Chamela. Dejamos los frutos en el invernadero hasta el invierno, que es cuando las plántulas tienen las primeras hojas. El tejido foliar fresco de todas las plántulas, que colectamos en el invierno de 2002, fue almacenado en nitrógeno líquido para transportarlo al laboratorio en donde también fue refrigerado a -80°C .

Extracción del ADN

El ADN total fue extraído de 0.5 g de tejido fresco (hojas) de las plantas adultas y de 0.2 g de las plántulas mediante una modificación de la técnica mini-prep de Doyle y Doyle (1987). Una vez que el ADN se extrajo fue resuspendido en TE (10 mM de tris-HCl pH 8.0, 1 mM de EDTA) y almacenado a -20°C .

Amplificación de los ISSRs

Por medio de marcadores moleculares hipervariables ISSRs (Inter simple sequence repeats), analizamos la tasa de endogamia biparental y la estructura genética en cinco poblaciones de plántulas y de adultos de *E. havanense*.

Utilizamos cuatro secuencias repetidas que generaron un total de 119 bandas reproducibles. Los ingredientes por reacción (20 μ l en total para cada reacción) fueron los mismos para cada uno de los cuatro primers: 2mM de $MgCl_2$, 0.2 U de Taq polimerasa, 2.5 μ l de ADN, 0.2 mM de los dNTPs, 1 μ M de primer y buffer 1 X de Taq ADN polimerasa. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue realizada en un termociclador de gradiente (Techne, Touchgene) y el programa consistió de 5 min a 94 °C; 27 X 30 s a 94 °C, 45 s a 52 °C, 2 min a 72 °C, 7 min. a 72 °C.

Después del PCR, agregamos 1.5 μ l de azul de bromofenol a cada reacción y cargamos las muestras en geles de poliacrilamida al 6% para ser corridas en buffer TBE 1X. Utilizamos geles de acrilamida en lugar de agarosa, porque se resolvieron más bandas para cada primer. En cada gel cargamos un Ladder de 1 Kb (Gigco/BRL), y un control que era positivo y otro que era negativo. Los geles fueron corridos a un voltaje constante (500 V) durante 2.5 hrs. Cada gel fue teñido con nitrato de plata y fotografiado con una cámara digital Sony DSC-P50 cyber shot de 2.1 mega pixeles. Las imágenes de los geles fueron analizadas en el programa Lab works versión 4.5 para windows (98/Nt/2000 pro/xp pro), que asigna a cada fragmento un peso molecular definido por un ladder de 1 Kb. A cada banda asignada se le trató como dialélica (1 para la presencia de la banda y 0 para la ausencia de la banda).

Análisis de los datos

Tasa de endogamia biparental

Utilizamos a los genotipos de la progenie para estimar la tasa de fecundación cruzada unilocus (t_s) y multilocus (t_m). Las poblaciones fueron analizadas con el modelo de apareamiento mixto implementado en el software MLTR (Ritland 1996). El modelo de apareamiento mixto, supone que cada apareamiento representa un evento aleatorio de fecundación cruzada o de autofecundación con probabilidades de t y de $1 - t$, respectivamente. Posteriormente obtuvimos la tasa de endogamia biparental como $t_m - t_s$.

Además de estimar la tasa de fecundación cruzada y de endogamia biparental en cada población, obtuvimos la correlación de paternidad (r_p). Adicionalmente obtuvimos el coeficiente de endogamia parental para todas las poblaciones en su conjunto (F).

Los parámetros se estimaron utilizando el método de maximization-expectation recomendado por Ritland para nuestros datos (comunicación personal). Para ello realizamos 1,000 bootstraps y obtuvimos los errores estándar de cada parámetro que nos sirvieron para calcular el nivel de significancia.

Depresión por endogamia biparental

Para estimar la depresión por endogamia (δ) de una especie incompatible, es necesario sembrar semillas de distintas madres y esperar a que se desarrollen las plantas.

Posteriormente, cuando las plantas florecen, realizar dos tipos de cruza. Entre plantas que están emparentadas y que no lo están, pues de esa forma podremos comparar el desempeño de ambos tipos de cruza y tener una medida de la δ . Sin embargo, en *E. havanense* hacerlo

es muy tardado, pues los individuos florecen después de los ocho años. A pesar de ello, en un invernadero teníamos algunas familias genéticas que llevaban dos años floreciendo y que nos permitieron hacerlo. Como no teníamos una gran cantidad de plantas floreciendo, ni tampoco de flores por planta; además de que las flores son pequeñas y los granos de polen son viables por poco tiempo (aproximadamente 2 hrs. después de que haber sido expuestos, Abarca y Domínguez, observaciones personales) decidimos estimar la máxima magnitud de δ esperable en una especie incompatible. Es decir, comparamos la adecuación producto de las cruzas entre hermanos completos (del mismo padre y madre) vs. las cruzas entre plantas no emparentadas. En total pudimos realizar 116 cruzas, 38 endogámicas y 78 exogámicas y estimamos la magnitud de la δ como 1- (la adecuación promedio de las cruzas endogámicas / la adecuación promedio de las cruzas no endogámicas).

Medidas de diversidad y de diferenciación genética

Cuando se describe la estructura genética a partir de marcadores dominantes, tradicionalmente se suponen dos cosas. Una es que cada banda representa el fenotipo dominante de un solo locus con dos alelos (Williams et ál. 1990). La otra es que las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W). Como tenemos evidencia que sugiere que los apareamientos entre las plantas de *E. havanense* probablemente no ocurren al azar (Domínguez et ál. 2005), decidimos no basarnos únicamente en el criterio del equilibrio de H-W. Por lo tanto, recurrimos tanto al índice de Shannon (H') que no supone el equilibrio de H-W, como al cálculo de las frecuencias alélicas y al análisis molecular de varianza (AMOVA) que requieren de la suposición del equilibrio de H-W. Sin embargo, como con los tres métodos obtuvimos los mismos

resultados, en este trabajo únicamente reportamos las estimaciones derivadas del índice de Shannon.

Utilizamos el índice de Shannon para calcular la diversidad genética (H') tanto en los adultos como en las plántulas. En los adultos calculamos la H' en dos niveles distintos. 1) La diversidad dentro de las poblaciones ($H'_{pop (adultos)}$) y 2) La diversidad total ($H'_{sp (adultos)}$). Posteriormente estimamos la proporción de la diversidad dentro de las poblaciones como $H'_{pop}/H'_{sp (adultos)}$ y la proporción de la diversidad que se encuentra repartida entre las poblaciones como $(H'_{sp}-H'_{pop})/H'_{sp (adultos)}$.

En las plántulas en cambio, calculamos la H' en tres niveles distintos. 1) La diversidad promedio de las familias maternas dentro de cada población (H'_{fam}), 2) La diversidad dentro de las poblaciones ($H'_{pop (progenie)}$) y 3) La diversidad total ($H'_{sp (progenie)}$). Posteriormente estimamos la proporción de la diversidad que se encuentre dentro de las familias maternas como $H'_{fam}/H'_{sp (progenie)}$ (en donde H'_{fam} es la diversidad promedio de todas las familias maternas) y la diversidad dentro de las poblaciones como $H'_{pop}/H'_{sp (progenie)}$. Además estimamos la proporción de la diversidad que se encuentra repartida entre las familias maternas dentro de cada una de las poblaciones y entre las familias maternas entre las poblaciones como $(H'_{pop}-H'_{fam})/H'_{pop}$ (en donde H'_{fam} es la diversidad promedio de las familias maternas dentro de cada población) y $(H'_{sp}-H'_{fam})/H'_{sp}$ (en donde H'_{fam} es la diversidad promedio de todas las familias maternas), respectivamente. Finalmente, al igual que en los adultos, obtuvimos la proporción de la diversidad molecular que se encuentra repartida entre las poblaciones como $(H'_{sp}-H'_{pop})/H'_{sp (progenie)}$.

Resultados

Tasa de endogamia biparental

La tasa de fecundación cruzada multilocus (t_m) fue igual a uno en todas las poblaciones (Tabla 1), lo que indica que toda la progenie se produce por fecundación cruzada. La t_s siempre fue menor que la t_m . Dado que la diferencia de $t_m - t_s$ estima la endogamia biparental y ésta siempre fue positiva y significativa, la tasa promedio de endogamia biparental en *E. havanense* es del 10%. Las poblaciones de Ranchitos y Antiguo Sur presentaron la menor y la mayor tasa de endogamia biparental, respectivamente (Tabla 1). El coeficiente de endogamia parental promedio (F) resultó ser positivo y significativamente distinto de cero (ver el encabezado de la Tabla 1), lo que sugiere que en los progenitores no hay endogamia. Los valores de las correlaciones de paternidad (r_p) fueron altos en todas las poblaciones, lo cual indica que la probabilidad de encontrar hermanos completos (hijos de un mismo padre) dentro de cada familia es muy alta (Tabla 1).

Tabla 1. Tasa de fecundación cruzada multilocus (t_m) y unilocus (t_s) en cinco poblaciones de *E. havanense*. $t_m - t_s$, endogamia biparental; r_p , correlación de paternidad. En paréntesis se presentan los errores estándar. El coeficiente F que mide la endogamia parental, resultó ser de 0.0171 (0.040) ** para el conjunto de las cinco poblaciones.

	t_m	t_s	$t_m - t_s$	r_p
Ardilla	1.0 (0.001)**	0.881 (0.015)**	0.119 (0.015)**	0.329 (0.09)**
Antiguo Sur	1.0 (0.001)**	0.879 (0.012)**	0.121 (0.013)**	0.499 (0.181)**
Cuitzmala	1.0 (0.001)**	0.905 (0.004)**	0.095 (0.005)**	0.366 (0.108)**
Ranchitos	1.0 (0.001)**	0.918 (0.009)**	0.082 (0.009)**	0.255 (0.089)**
Tejón	1.0 (0.001)**	0.906 (0.004)**	0.094 (0.004)**	0.245 (0.139)**

P < 0.0001**

Las poblaciones fueron analizadas juntas utilizando el método de maximization-expectation y asumiendo el modelo de apareamiento mixto (Ritland 1996).

Depresión por endogamia biparental

De todas las polinizaciones endogámicas que realizamos (entre hermanos completos), ninguna de las flores se convirtió en fruto. En cambio, cerca del 30% de las flores que fecundamos con polen de individuos no emparentados produjo frutos. De los frutos producidos, el 38% germinó. Debido a que ninguna de las cruzas entre hermanos completos produjo frutos, la magnitud de la depresión por endogamia biparental estimada en *E. havanense* es igual a uno.

Medidas de diversidad y diferenciación genética

La comparación entre la estructura genética de las plántulas y de los adultos obtenida con los ISSRs, reveló que los patrones de diversidad molecular en *E. havanense* son complejos. Por un lado, la diversidad genética promedio de las familias maternas dentro de cada una de las poblaciones (H'_{fam}), resultó ser significativamente menor que la que hubo dentro de las poblaciones de adultos (H'_{pop} (adultos)) ($t = 3.007$; *g.l.* 8; $p < 0,0169$; Tabla 2). Del mismo modo, la proporción de la diversidad que se encuentra dentro de todas las familias maternas (H'_{fam}/H'_{sp}), fue menor que la que hubo en los adultos (H'_{pop}/H'_{sp} (adultos)) (Tabla 2). Ambos resultados sugieren que gran parte de la diversidad genética reside dentro de las familias maternas. Es decir, que la varianza genética entre hermanos es pequeña. Por consiguiente, la diferenciación genética entre las familias maternas dentro de cada una de las poblaciones ($(H'_{pop}-H'_{fam})/H'_{pop}$), así como entre cualquier familia materna ($(H'_{sp}-H'_{fam})/H'_{sp}$), fue grande; siendo generalmente mayor a la encontrada entre las poblaciones de los adultos ($(H'_{sp}-H'_{pop})/H'_{sp}$ (adultos)) (Tabla 3).

Tabla 2. Estimaciones de la diversidad genética obtenidas con el índice de Shannon (H') en cinco poblaciones de plántulas y de adultos de *E. havanense*.

Población	H'_{fam^1}	$H'_{pop (progenie)}$	$H'_{pop (adultos)}$
Ardilla	0.50	0.89	0.64
Antiguo Sur	0.55	0.91	0.69
Cuitzmala	0.57	0.74	0.67
Ranchitos	0.66	0.84	0.76
Tejón	0.62	0.89	0.66
H'_{fam}/H'_{sp}	0.59	_____	_____
$H'_{pop}/H'_{sp (progenie)}$	0.91	_____	_____
$H'_{pop}/H'_{sp (adultos)}$	0.74	_____	_____

El índice H' es una medida de diversidad genética que no asume que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg. La H'_{fam} fue calculada a partir del promedio de las familias de cada población. La H'_{fam^2} en cambio fue estimada con el promedio de todas las familias. Debido a que la H'_{pop} se calcula con el promedio de las poblaciones, en las plántulas se estimó como si no hubiera familias.

Tabla 3. Valores de diversidad genética que se encuentran repartidos entre familias maternas y entre poblaciones de plántulas y de adultos de *E. havanense*.

Población	$(H'_{pop} - H'_{fam^1})/H'_{pop}$
Ardilla	0.44
Antiguo Sur	0.39
Cuitzmala	0.22
Ranchitos	0.26
Tejón	0.26
$(H'_{sp} - H'_{fam^2})/H'_{sp}$	0.41
$(H'_{sp} - H'_{pop})/H'_{sp (progenie)}$	0.09
$(H'_{sp} - H'_{pop})/H'_{sp (adultos)}$	0.26

La H'_{fam^1} fue calculada a partir del promedio de las familias de cada población. La H'_{fam^2} se estimó con el promedio de todas las familias, sin haber tomado en cuenta los promedios de las familias de cada una de las poblaciones.

Por otro lado, la diversidad genética que se encontró dentro de cada una de las poblaciones de plántulas (H'_{pop} (progenie)), resultó ser significativamente mayor a la que hubo en las poblaciones de los adultos (H'_{pop} (adultos)) ($t = 3.007$; *g.l.* 8; $p < 0.0018$; Tabla 2). Así mismo, la proporción de la diversidad genética que se encontró dentro las poblaciones de plántulas (H'_{pop}/H'_{sp} (progenie)), fue más alta que la que hubo dentro de los adultos (H'_{pop}/H'_{sp} (adultos)) (Tabla 2). Por lo tanto, la diversidad genética que se encuentra repartida entre las poblaciones de plántulas ($(H'_{sp}-H'_{pop})/H'_{sp}$ (progenie)), es menor que la que existe entre las poblaciones de los adultos ($(H'_{sp}-H'_{pop})/H'_{sp}$ (adultos)) (Tabla 3). Estos resultados sugieren que a pesar de que las familias maternas están estructuradas, existe flujo génico entre las poblaciones.

Discusión

Teóricamente una de las ventajas de evitar la autofecundación, es que se reduce la expresión de los genes recesivos que tienen efectos deletéreos (Charlesworth 1979, Lande y Schemske 1985, Husband y Schemske 1996). Sin embargo, como en las especies que evitan la autofecundación los apareamientos entre individuos emparentados siguen siendo posibles, si éstos aumentan, dicha ventaja selectiva podría desaparecer. El principal resultado de este estudio fue haber encontrado que en *E. havanense*, una especie distílica incompatible, la tasa de endogamia biparental fue significativa (Tabla 1) y la magnitud de la depresión por endogamia igual a uno.

Si bien la tasa de fecundación cruzada (t_m) que estimamos en *E. havanense* no fue distinta de lo reportado en otras especies de plantas incompatibles (Abarca y López 2007) y árboles tropicales (Ward et ál. 2005), la endogamia biparental si resultó ser más grande, de un orden de magnitud mayor que la mayoría de las angiospermas (Collevatti et ál. 2001, Abarca y López 2007). Aunque *E. havanense* podría ser un caso particular, en *Caryocar brasiliense*, en donde también se utilizaron marcadores hipervariables para estimar la tasa de endogamia biparental, los resultados fueron similares a los obtenidos en *E. havanense* y más grandes a los que habían sido reportados para la misma especie pero con enzimas (Collevatti et ál. 2001). Lo que Collevatti et ál. (2001) y nuestros datos sugieren, es que las enzimas que tradicionalmente han sido utilizadas para estimar la t_m , podrían subestimar la tasa de endogamia biparental.

Por otro lado, cuando el movimiento de polen es limitado, se espera que los hijos de una planta madre sean de uno o de pocos padres cercanos (Bawa 1990). Es decir, que la mayoría de los hermanos de una familia sean completos. En *E. havanense* los valores de r_p que miden esa probabilidad fueron altos (entre 25% y cerca del 50%, Tabla 1), lo cual refleja que el flujo de polen generalmente ocurre entre plantas que están a poca distancia entre sí.

Si consideramos que ninguna de las cruas endogámicas que experimentalmente generamos (entre hermanos completos) produjo frutos, entonces no sólo significa que la tasa de endogamia biparental calculada probablemente esté subestimada, sino que los hijos endogámicos son costosos. Por ejemplo, la magnitud de la δ biparental en *E. havanense* fue tan alta, como la uniparental de varias especies ginodioicas compatibles (en *Cucurbita foetidissima* la $\delta = 0.71$; Kohn y Biardi 1995; y en *Silene acaulis* = 0.95; Shikoff 1988). Es

decir, un sistema reproductivo que teóricamente se favorece porque evita los efectos deletéreos de la endogamia uniparental, posteriormente puede sufrir los efectos de la endogamia biparental de forma similar a una especie que se autofecunda.

Por otro lado, Husband y Schemske (1996) mostraron que en las especies con una larga historia de fecundación cruzada, la carga genética además de expresarse en etapas tempranas del desarrollo, es más alta que en las especies endogámicas. Debido a que en México el género *Erythoxylum* posee siete especies distílicas y una dioica, todos árboles o arbustos perennes y exogámicos, un valor de δ de uno es compatible con la hipótesis que sugiere que las plantas exogámicas con ciclos de vida largos acumulan mutaciones recesivas de gran efecto (Carr y Dudash 2003).

Ya que la endogamia aumenta la cantidad de homocigotos en una población y la δ los elimina, es esperable que ocurran cambios espacio-temporales en la estructura genética. Por ejemplo, que los niveles de variación genética se incrementen (Morris et ál. 2002). De manera congruente con este supuesto y con nuestros datos anteriores, la diversidad genética dentro de las familias maternas (H'_{fam}) fue significativamente menor que la de los adultos (H'_{pop} , Tabla 2). Como otro de los efectos de la endogamia es un aumento en los niveles de diferenciación genética (Hedrick 2000), pensamos que haber encontrado una amplia divergencia entre las familias dentro de las poblaciones ($(H'_{pop}-H'_{fam})/H'_{pop}$) así como entre cualquier familia materna ($(H'_{sp}-H'_{fam})/H'_{sp}$, Tabla 3) es el reflejo de ello. Además como con la endogamia aumenta la estructuración genética, también encontramos una correlación significativa entre la tasa de endogamia biparental y la diferenciación genética entre las familias dentro de las poblaciones ($(H'_{pop}-H'_{fam})/H'_{pop}$ Figura 3).

Que la diferenciación genética entre las poblaciones de adultos ($(H'_{sp}-H'_{pop})/H'_{sp}$ (adultos) fuera menor que la que hubo entre las familias maternas ($(H'_{sp}-H'_{fam})/H'_{sp}$) también fue algo que esperábamos (Tabla 3), pues indica que los individuos homocigotos son eliminados por la selección natural. Por ello, probablemente la correlación entre la tasa de endogamia biparental y la diversidad genética fue negativa y significativa únicamente para las familias dentro de poblaciones (H'_{fam} , Figura 4), pero no para las poblaciones de adultos (H'_{pop} , $F = 1.96$; $P > 0.25$).

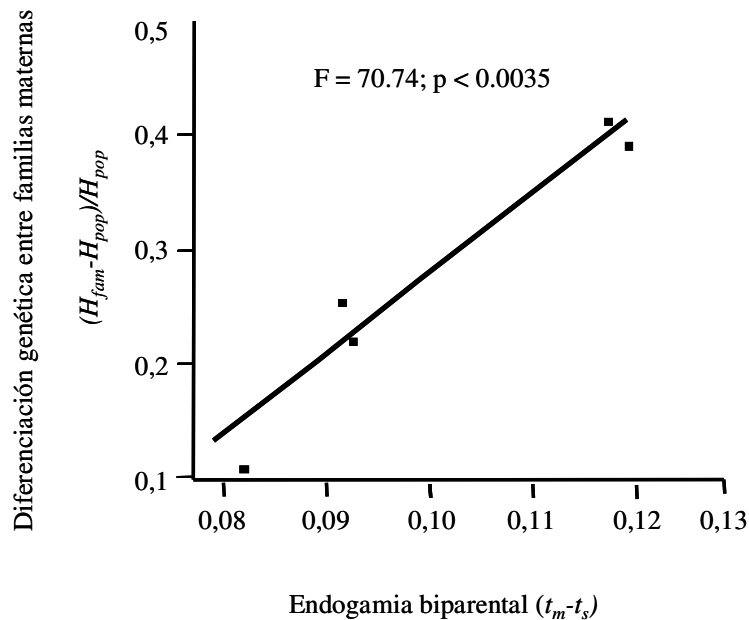


Figura 3. Relación entre la diferencia genética entre familias dentro de poblaciones ($H'_{fam}-H'_{pop})/H'_{pop}$ y la tasa de endogamia biparental en cinco poblaciones de *Erythroxylum havanense*

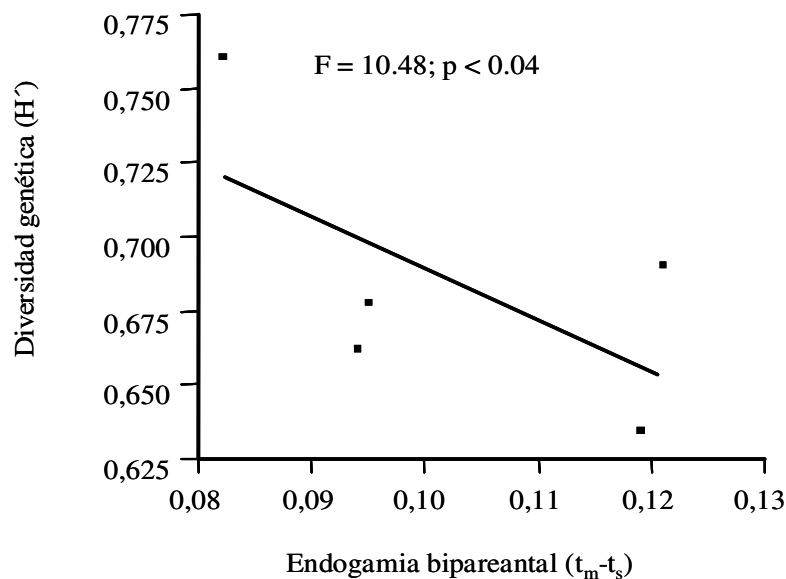


Figura 4. Relación entre los valores del índice de diversidad genética de Shannon (H') y la tasa de endogamia biparental (t_m-t_s) en cinco poblaciones de plántulas en *Erythroxylum havanense*

En contraste con los resultados anteriores, que la diversidad genética de las poblaciones de plántulas ($H'_{pop (progenie)}$) resultara significativamente mayor que la de los adultos ($H'_{pop (adultos)}$, Tabla 2), indica que el flujo génico también ocurre entre poblaciones, y no solamente (como lo sugieren los datos anteriores) entre parientes cercanos. Aún así, muchos individuos exogámicos deben ser eliminados. Eso explicaría no solamente la disminución de la variación genética en el tiempo, sino que la diferenciación entre las poblaciones de adultos ($(H'_{sp} - H'_{pop}) / H'_{sp (adultos)}$) fuera casi tres veces mayor que la que hay entre las poblaciones de plántulas ($(H'_{sp} - H'_{pop}) / H'_{sp (progenie)}$) Tabla 3).

Para mostrar los patrones de flujo génico de otra manera, construimos un fenograma (UPGMA) a partir de las frecuencias alélicas que calculamos para todos los pares de familias maternas (Nei 1973, Figura 5). Del fenograma hay dos aspectos que queremos resaltar. El primero es que algunas de las familias como las de Ranchitos generalmente se localizan en un

mismo grupo, lo cual es compatible tanto con un movimiento local de genes, como con la alta diferenciación genética que encontramos entre las familias maternas dentro y entre las poblaciones (Tabla 3). El segundo aspecto es que varias de las familias como las de Ardilla se encuentran agrupadas con familias de otras poblaciones, lo cual revela que también hay flujo de genes entre poblaciones.

Finalmente queremos señalar que aunque uno de los principales argumentos de la evolución de la dioecia supone que ésta se favorece porque evita los efectos negativos de la endogamia uniparental (Charlesworth 1979), la dioecia también se ha originado de sistemas reproductivos que evitaban la autofecundación (Webb 1999). Por ejemplo, en el género *Erythroxylum*, la dioecia además de haberse derivado de la distíflia al menos en una ocasión, algunas poblaciones de *Erythroxylum havanense* probablemente se encuentren en transición evolutiva a la dioecia (Domínguez et ál. 1997, Cuevas et ál. 2005). Por lo tanto, si una especie dioica lograra reducir la endogamia biparental y sus efectos negativos más que la distíflia, entonces este sistema reproductivo, al ser más eficiente, mantendría las ventajas selectivas que tiene evitar la endogamia aún habiendo evolucionado de una especie incompatible. Sin embargo, si así fuera, llama la atención que mientras los sistemas de incompatibilidad están ampliamente distribuidos entre las angiospermas, el porcentaje de especies dioicas sea tan pequeño.

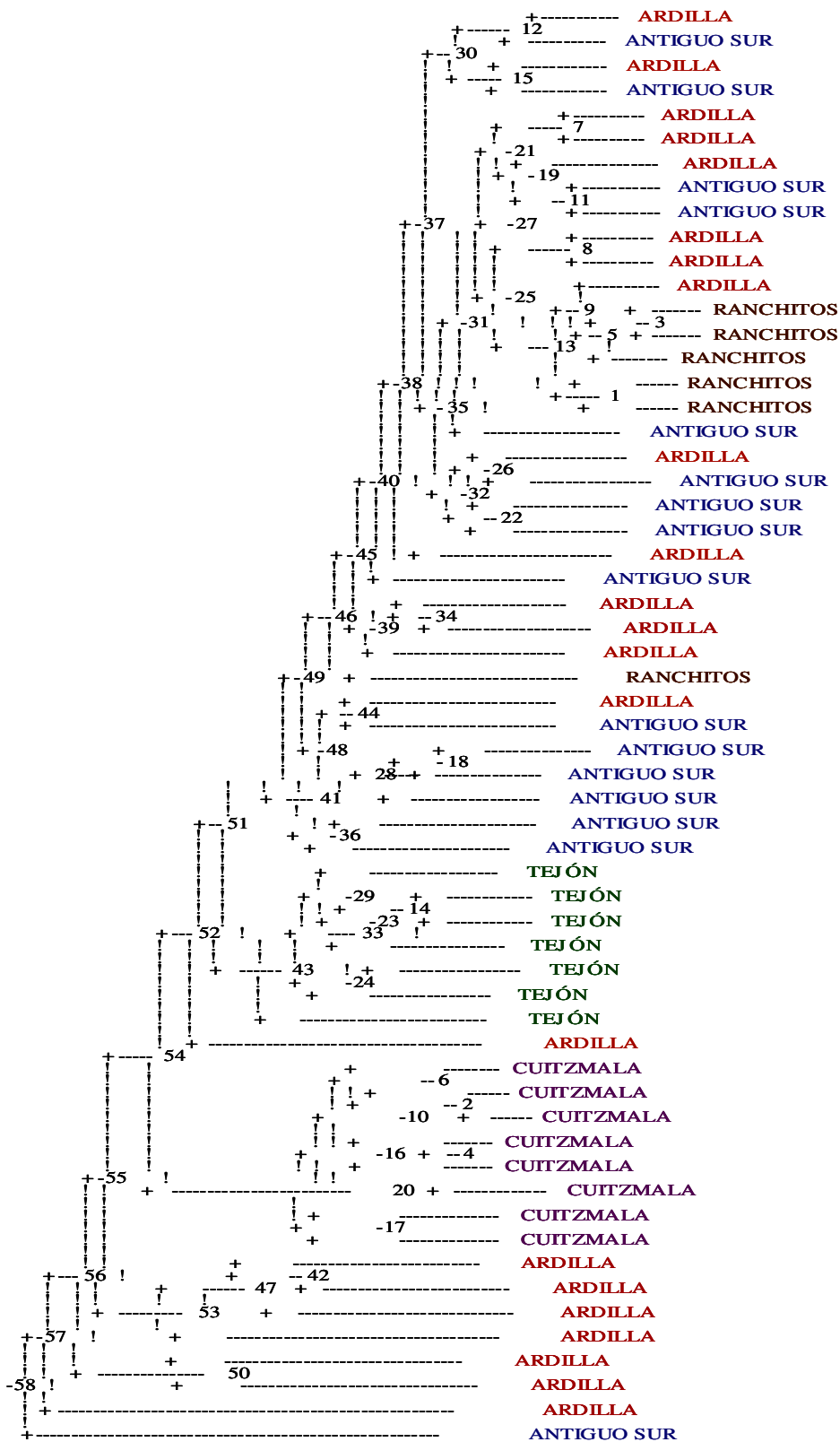


Figura 5. Fenograma construido con el método UPGMA a partir de las distancias genéticas de Nei (1978) para todos los pares de familias.

Conclusiones

En este estudio detectamos que la tasa de endogamia biparental en *Erythroxylum havanense* es significativa. Debido a que la magnitud de la δ es muy fuerte, probablemente la endogamia biparental aún sea mayor que lo que detectamos. Aún así, el valor de endogamia biparental que estimamos resultó ser de un orden de magnitud mayor que lo reportado en la mayoría de las angiospermas (Ward, Dick y Lowe 2005). Posiblemente sea el patrón de floración sincrónica y masiva que puede generar un movimiento local de genes, lo que promueva las cruas entre parientes en *E. havanense*. La interacción entre la endogamia biparental y la δ biparental además de generar costos reproductivos (pues los individuos producidos endogámicamente son eliminados de las poblaciones), afecta la estructura genética de la especie. Finalmente además del flujo local de genes, también detectamos flujo entre las poblaciones.



The genetic consequences of evolving two sexes: the genetic structure of distylous and dioecious species of *Erythroxyllum*

César A. Abarca,¹ Angélica Martínez-Bauer,¹ Francisco Molina-Freaner²
and César A. Domínguez^{1*}

¹Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología,
Universidad Nacional Autónoma de México: AP 70-275, México DF 04510, México
and ²Departamento de Ecología de la Biodiversidad, Instituto de Ecología,
Universidad Nacional Autónoma de México: AP 1354, Hermosillo,
Sonora 83250, México

ABSTRACT

Question: Is the evolution of dioecy associated with increasing levels of genetic variation?

Background and hypothesis: Dioecy and self-incompatibility are seen as alternative mechanisms promoting outcrossing and avoiding the deleterious effects of inbreeding depression. Under this formulation, we would expect similar genetic variation between dioecious and self-incompatible species. In contrast, differences in genetic variation between these two breeding systems would indicate that sexual specialization has genetic effects that go beyond the avoidance of inbreeding.

Organisms and methods: We studied the genetic structure of one distylous and one dioecious species of *Erythroxyllum* by means of ISSR markers. We measured the level and distribution of genetic diversity in five populations of the dioecious *E. rotundifolium* and in six populations of the self-incompatible distylous *E. havanense*.

Results: Expected heterozygosity and Shannon genetic diversity in populations of the distylous *E. havanense* were significantly greater than in populations of dioecious *E. rotundifolium*. Differences between species were small but differences among populations accounted for a large fraction of the genetic variation. Levels of differentiation were slightly greater among populations of the dioecious species. Overall, our results indicate that the evolution of dioecy in *Erythroxyllum* is associated with a significant reduction in genetic diversity and increasing population differentiation.

Keywords: Baker's hypothesis, dioecy, distyly, *Erythroxyllum*, genetic differentiation, genetic diversity, sexual dimorphism.

* Author to whom all correspondence should be addressed. e-mail: tejada@servidor.unam.mx
Consult the copyright statement on the inside front cover for non-commercial copying policies.

INTRODUCTION

Following Darwin's (1877) lead, many authors have proposed that the avoidance of inbreeding has been a major factor in the evolution of plant breeding systems (Lloyd, 1975, 1976; Charlesworth and Charlesworth, 1978; Thomson and Barrett, 1981; Sakai and Weller, 1999). This argument has also been used to explain the evolution of dioecy because the presence of male and female plants completely avoids uniparental inbreeding (Baker, 1959; Charlesworth and Charlesworth, 1978; Thomson and Barrett, 1981). Empirical studies with gynodioecious species have shown that both selfing and inbreeding depression are involved in the maintenance of females within populations, and eventually, in the evolution of sexual specialization (Ashman, 1992; Molina-Freaner and Jain, 1993; Sakai *et al.*, 1997; Thompson and Tarayre, 2000). Based on the observation that self-incompatibility and dioecy were negatively correlated at the family level, Baker (1959) hypothesized that dioecy and self-incompatibility were alternative selfing-avoidance mechanisms (see Sakai and Weller, 1999, for a review). This hypothesis implicitly assumes that dioecious (or self-incompatible) species should have higher levels of heterozygosity and lower population structure than selfing species. It also predicts a similar genetic structure when self-incompatible and dioecious species are compared. Nonetheless, although the avoidance of inbreeding hypothesis has permeated the scientific literature for decades (Bawa, 1982), few direct attempts have been made to evaluate whether the increased outcrossing rates produced by the evolution of dioecy have a concomitant effect on the heterozygosity levels of the population (Waycott *et al.*, 1996; for gynodioecious species, see Gouyon and Couvet, 1987; Cuevas *et al.*, 2006).

The few empirical studies examining the genetic variation of dioecious species have found no general support for the inbreeding avoidance hypothesis (Waycott *et al.*, 1996; Terauchi *et al.*, 1997; Bartish *et al.*, 1999; Rottenberg *et al.*, 1999; Crawford *et al.*, 2001; Dorken *et al.*, 2002; Dorken and Barrett, 2004). For example, allozyme genetic diversity did not differ between self-compatible monoecious and dioecious populations of *Sagittaria latifolia* (Dorken *et al.*, 2002). In contrast, a chloroplast haplotype-based estimation of genetic diversity was more than six times greater among monoecious than dioecious populations (Dorken and Barrett, 2004). The genetic variation of dioecious species from the Juan Fernandez Islands was slightly greater than that of non-dioecious species, but this difference was non-significant (Crawford *et al.*, 2001). Moreover, a study examining the patterns of inbreeding in dioecious and self-compatible mosses showed that both groups have a deficiency of heterozygosity, although this deficiency was higher in self-compatible species (Eppley *et al.*, 2007). Studies on other dioecious species found relatively low levels of genetic diversity (Waycott *et al.*, 1996; Terauchi *et al.*, 1997; Bartish *et al.*, 1999; Rottenberg *et al.*, 1999) and/or heterozygote deficiency [i.e. a significant F_{IS} (Lokker *et al.*, 1994; Rottenberg *et al.*, 1999; Luna *et al.*, 2007)]. Overall, the above examples suggest that dioecy does not increase the amount of genetic variation, and could even reduce it.

In this study, we compared the genetic structure of a dioecious species with that of a closely related self-incompatible species. If both dioecy and self-incompatibility are inbreeding-avoidance mechanisms (Baker, 1959), dioecious species should have greater genetic variation than self-compatible but not self-incompatible species. Dioecy has repeatedly evolved from self-incompatible distylous ancestors (see Webb, 1999), and therefore no differences in genetic diversity should be apparent between these two breeding systems. Accordingly, we measured the amount of genetic diversity in five populations of the dioecious species *Erythroxylum rotundifolium*, and in six of its distylous relative *E. havanense*. Similar levels of genetic variation between the two species would be consistent with Baker's statement. Higher or lower levels of genetic variation in *E. rotundifolium* would indicate

that sexual specialization has population genetic effects that go beyond the avoidance of inbreeding.

METHODS

Study sites

We studied six populations of *E. havanense* distributed along the tropical deciduous forests of the Pacific coast of Mexico. We sampled three populations from the state of Jalisco (Ranchitos, Limón, and Ardilla), one from Guerrero (Ixtapa), and two from Oaxaca (Huatulco and Nizanda). The distribution of *E. rotundifolium* along the Pacific coast of Mexico closely resembles that of *E. havanense*, although the former is also found in the tropical dry forests of southeast Mexico. Thus, we sampled three populations from the Pacific coast in the state of Oaxaca (Concepción Papalo, Otaltepec, and Huatulco), one from the Atlantic coast in the state of Yucatán (Celestún), and one from the Caribbean sea (Cobá, Quintana Roo; Fig. 1).

Study organisms

Erythroxylum (Erythroxylaceae) is a Pantropical genus comprising 250 species of distylous shrubs and trees, although some derived dioecious species also occur (Ganders, 1979; Barrett, 1992;

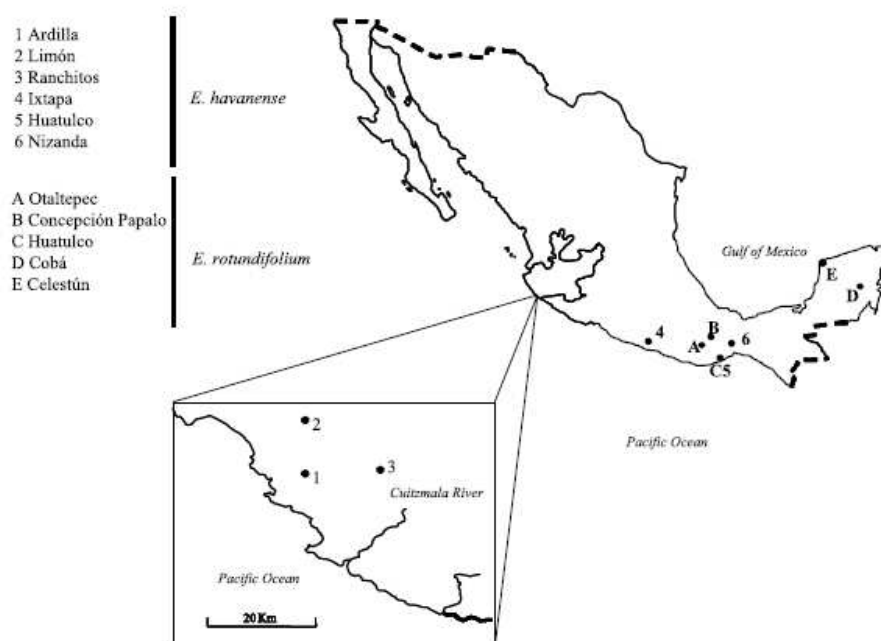


Fig. 1. Map showing the location of the six populations of *Erythroxylum havansne* (in numbers) and the five populations of *Erythroxylum rotundifolium* (in letters) sampled in this study.

Kelly, 2001). Phylogenetic relationships among species of *Erythroxylum* are poorly understood (Johnson *et al.*, 2005). Nonetheless, our results indicate (see below) much lower genetic differentiation between *E. havanense* and *E. rotundifolium* than among other *Erythroxylum* species (Johnson *et al.*, 2005), suggesting that they are closely related.

Erythroxylum havanense is a tropical distylous shrub with a heteromorphic incompatibility system preventing seed production from self- and same-morph crosses (Dominguez *et al.*, 1997). Flowering initiates soon after the first heavy rains of the wet season and results in a marked reproductive synchrony within and among individuals [3 ± 0.1 days and 6 ± 0.9 days for individual and population flowering periods, respectively (Dominguez and Dirzo, 1995)]. Fruit maturation is also highly synchronized among plants within a patch (Gryj and Dominguez, 1996). Mass flowering and synchronous ripening produce a high and ephemeral abundance of resources for both pollinators and frugivores (Dominguez *et al.*, 2005), which in turn concentrates their foraging bouts within a flowering (fruiting) patch. *Erythroxylum rotundifolium* is a dioecious tree that also flowers in response to the first heavy rains, but unlike *E. havanense* it has an extended flowering period and a marked reproductive asynchrony among individuals. Plant flowering periods may vary from 18 to 40 days, while that of the population lasts up to 3 months (Martínez-Bauer, 2007). Flowers of female plants have reminiscences of stamens, while those of males present a sterile pistiloid, thus indicating its derived condition (Kelly, 2001; Martínez-Bauer, 2007).

Accordingly, differences in flowering phenology between these two species could also influence the patterns of genetic structure. While the high levels of genetic variation and population structure found in *E. havanense* may be explained by the effect of synchronous reproduction on both pollinators and frugivores (Dominguez *et al.*, 2005), the marked flowering asynchrony observed in *E. rotundifolium* suggests that effective mating occurs only between those individuals that flower in synchrony with each other. Thus, temporal reproductive isolation has the potential to subdivide the population into smaller mating groups.

Material collection

Fresh tissue was collected from the leaves of 20–30 individuals of each population during the summers of 2001 and 2002. In total, 300 plants were sampled in this study. Tissue samples were frozen in liquid nitrogen for transport to the laboratory where they were stored at -80°C .

DNA extraction

DNA was extracted from 1 g of fresh tissue (leaves) with a modified mini-prep technique (Doyle and Doyle, 1987). Once DNA was extracted, it was re-suspended in TE (10 mmol \cdot l $^{-1}$ tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol \cdot l $^{-1}$ EDTA) and stored at -20°C .

ISSR amplification

Four simple sequence repeats (ISSR) were used as primers to generate a total of 119 polymorphic bands in single-primer reactions. The ingredients per reaction (20 μ l in total in each) were the same for each of the four primers: 2 mmol \cdot l $^{-1}$ MgCl₂, 0.2 U Taq polymerase, 2.5 μ l DNA, 0.2 mmol \cdot l $^{-1}$ dNTPs, 1 μ mol \cdot l $^{-1}$ primer, and 1 \times Taq DNA polymerase buffer.

The polymerase chain reaction (PCR) was conducted in a Techne thermocycler, Touchgene gradient, and the program was 5 min at 94°C; 27 × 30 s at 94°C, 45 s at 52°C, 2 min at 72°C, 7 min at 72°C; 6°C soak.

Following PCR, 1.5 µl bromophenol blue marker dye was added to each reaction and the samples were loaded onto a 6% polyacrylamide gel in 1 × TBE buffer. We used acrylamide gels because more bands were solved for each primer than in agarose gels. Additionally, 1 Kb Ladder (Gigco/BRL) and positive and negative controls were loaded onto each gel. Gels were ran at constant voltage (500 V) for 2.5 h. Each gel was stained with silver nitrate and digitized using a Sony DSC-P50 cyber shot camera (2.1 megapixels). Images were analysed using the Labworks software package (4.5 version for Windows 98/Nt/2000 pro/XP pro), which assigns a fragment size to each band using an algorithm based on the 1 Kb ladder. Bands for each assigned locus were scored as diallelic (1 for band present and 0 for band absent).

Data analyses

Because of the dominant nature of ISSR markers, it is not possible to distinguish between dominant homozygotes and heterozygotes. Consequently, Hardy-Weinberg equilibrium must be assumed for genetic analyses. We followed this approach and used Lynch and Milligan's (1994) criteria to calculate unbiased allelic frequencies. We then estimated the average percentage of polymorphic loci (P) and the average expected heterozygosity (H_e) per population (Hedrick, 2000). Because our sampling procedure included a hierarchical arrangement (species, populations within species, and individuals within populations and species), population genetic structure was analysed following the procedures outlined by Weir and Cockerham (1984) and implemented in the TFGA program (Miller, 1997). Finally, to gain a thorough understanding of the genetic structure of the studied species, we performed independent estimations of the F -statistics.

Because the Hardy-Weinberg assumption could be easily violated (see Culley and Wolfe, 2001), a complementary estimation of the genetic variation based on the Shannon information measure was performed (Lewontin, 1972; King and Schaal, 1989; Bussell, 1999; Dominguez *et al.*, 2005). We calculated the amount of genetic diversity for each species (H'_{sp}), the average genetic variation among populations from each species (H'_{pop}), and the total diversity (H'_{tot}). Population genetic structure was estimated following the same hierarchical structure we used in the allelic frequencies analysis. We estimated the proportion of genetic diversity explained by differences between species [$(H'_{tot} - H'_{spp})/H'_{tot}$, where H'_{spp} equals the average genetic diversity among species], and among populations within species [$(H'_{tot} - H'_{pops})/H'_{tot}$, where H'_{pops} equals the genetic variation among populations averaged across species]. Genetic structure was then independently estimated for each species. We calculated two measures of genetic differentiation, one for each species, as $(H'_{sp} - H'_{pop})/H'_{sp}$. Finally, we used Neighbour-Joining and Euclidean distances to construct a phenogram of the populations with the Phyllip program [version 3.6 (Felsenstein, 2004)].

RESULTS

Genetic analyses revealed a large amount of genetic variation in both species (Table 1). *Erythroxylum havanense*, the distylous species, showed significantly greater polymorphism (P) than the dioecious *E. rotundifolium* (89.63% and 73.6% for *E. havanense* and

Table 1. Estimates of genetic diversity for six populations of distylous *Erythroxyllum havanense* and five populations of dioecious *Erythroxyllum rotundifolium* from Mexico

Species	Population	<i>n</i>	<i>P</i>	<i>H_e</i>	<i>H'</i>
<i>Erythroxyllum havanense</i>	Ranchitos	23	88.2	0.29	0.6795
	Ardilla	18	81.5	0.26	0.6369
	Limón	21	91.6	0.31	0.7322
	Huatulco	28	92.4	0.32	0.7622
	Ixtapa	27	95.8	0.34	0.7627
	Nizanda	21	88.2	0.31	0.7622
<i>Erythroxyllum rotundifolium</i>	Cobá	20	73.31	0.22	0.5313
	Otaltepec	18	69.7	0.21	0.4791
	Celestún	20	69.7	0.2	0.5302
	Concepción Papalo	20	69.7	0.21	0.5132
	Huatulco	21	85.7	0.24	0.624

Note: Expected heterozygosity (H_e) and percentage of polymorphic loci (P) were calculated assuming that populations are at Hardy-Weinberg equilibrium. Shannon's index (H') provides a measure of genetic diversity that does not rely on the Hardy-Weinberg equilibrium. n = number of individuals scored.

E. rotundifolium, respectively; $U = 1.0$, $P = 0.01$). Expected heterozygosity in *E. havanense* ranged from 0.26 to 0.34 (average $H_e = 0.30$), while that of *E. rotundifolium* varied between 0.20 and 0.24 (average $H_e = 0.21$). The amount of genetic variation in populations from the heterostylous species was significantly higher than in dioecious populations (Mann-Whitney $U = 2.73$; $P = 0.0001$).

Hierarchical analysis of F -coefficients showed that differences between species accounted for only a small proportion of the total genetic variation (Table 2). Differences among populations within species were also significant and accounted for almost 30% of the genetic variation (Table 2). Independent estimations of population differentiation, one for each species, were in agreement with our previous analysis and showed that populations differ significantly from each other in both species (Table 3). Population differentiation in *E. rotundifolium*, the dioecious species, was 17% higher than that of the distylous *E. havanense*.

Estimations of genetic variation based on the Shannon index were in general agreement with those derived from allelic frequencies (Table 1). Populations of *E. havanense* were significantly more diverse than those of the dioecious *E. rotundifolium* ($H'_{pop} = 0.71$ and 0.53 for *E. havanense* and *E. rotundifolium*, respectively; $U = 2.73$; $P = 0.0001$). Both approaches (allelic frequencies and Shannon index) showed that genetic variation in the more variable dioecious population (Huatulco) was lower than that of the less variable distylous population (Ardilla). These results indicate that the dioecious species contains less genetic variation than the distylous species.

Analyses of genetic structure showed that differences between species accounted for a small proportion of the total genetic variation. In contrast, differences among populations within species explained a substantial amount of the genetic variation (Table 2). Analyses of the genetic structure performed independently for each species also showed high values of population differentiation in both species (Table 3). Genetic structure was higher among dioecious than among distylous populations (Table 3).

Table 2. Hierarchical analysis of the genetic structure in both *Erythroxylum havanense* and *Erythroxylum rotundifolium*

$F_{(st)}$	0.052
$(H'_{tot} - H'_{sp})/H'_{tot}$	0.073
$F_{(sc)}$	0.26
$(H'_{tot} - H'_{pop})/H'_{tot}$	0.33

Note: Hierarchical analysis was calculated from allele frequencies and the Shannon information index. $F_{(st)}$ and $(H'_{tot} - H'_{sp})/H'_{tot}$ represent genetic differences between species; and $F_{(sc)}$ and $(H'_{tot} - H'_{pop})/H'_{tot}$ represent genetic differences among populations between species. For details, see data analyses.

Table 3. Independent estimations of the genetic differences among populations of each species

<i>Erythroxylum havanense</i>	$F_{(st)}$	0.24
	$(H'_{sp} - H'_{pop})/H'_{sp}$	0.24
<i>Erythroxylum rotundifolium</i>	$F_{(st)}$	0.29
	$(H'_{sp} - H'_{pop})/H'_{sp}$	0.31

Note: Each estimation was derived from allele frequencies $F_{(st)}$ and Shannon's index $[(H'_{sp} - H'_{pop})/H'_{sp}]$. For details, see data analyses.

Neighbour Joining produced two main groups, one for each species (Fig. 2). Populations of *E. rotundifolium* were separated into two groups, each corresponding to geographic affinity (Otaltepec and Concepción Papalo, from Oaxaca; and Celestún and Cobá, from the Yucatán peninsula). Although the Huatulco population is also located in the state of Oaxaca, it showed the greatest genetic distance within the *E. rotundifolium* group. Populations of *E. havanense* showed no pattern regarding geographic distances, since populations from distant localities were grouped together. Independent analyses of isolation by distance showed no relationship between genetic and geographic distances for either species ($r = 0.19$, $P = 0.60$ and $r = 0.25$, $P = 0.66$ for *E. rotundifolium* and *E. havanense*, respectively).

DISCUSSION

The most important single result of this study is that genetic diversity of the dioecious species, *E. rotundifolium*, was significantly less than that of the distylous *E. havanense*. Thus, although both dioecy and self-incompatibility are efficient inbreeding-avoidance mechanisms (Baker, 1959), the genetic consequences of following one of these evolutionary paths are not equivalent. Our results suggest that even though both species maintain relatively high levels of genetic variance, the evolution of dioecy in this genus was associated

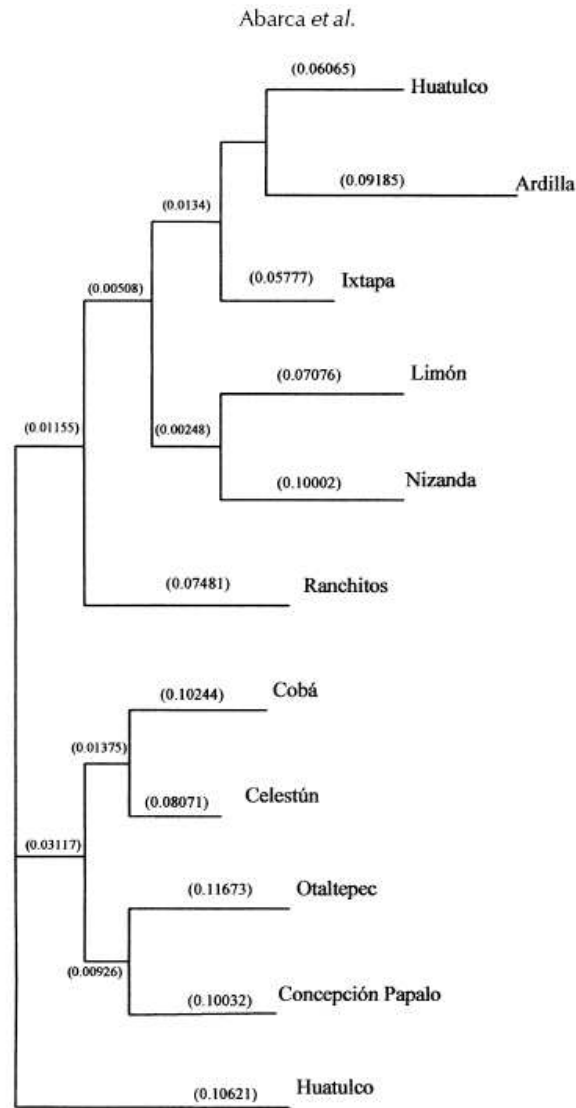


Fig. 2. Phenogram built with the Neighbour-Joining method and Euclidian distances (Excofier 1992) in the Phylip program [version 3.6 (Felsenstein, 2004)]. Numbers indicate branch length.

with a significant decline in the amount of genetic diversity and an increase in the extent of population differentiation. Nonetheless, the genetic differences observed in this study could also be a consequence of species-specific differences in life-history traits (Hamrick and Godt, 1996), or in the evolutionary history of the species analysed. Our findings, however, do not represent an isolated case, since other dioecious species varying in life and/or evolutionary history also show reduced genetic diversity when compared with non-dioecious species

(Waycott *et al.*, 1996; Terauchi *et al.*, 1997; Bartish *et al.*, 1999; Rottenberg *et al.*, 1999; Crawford *et al.*, 2001; Dorken *et al.*, 2002; Dorken and Barrett, 2004). The approach adopted in this study differs from that in previous ones because, to our knowledge, this is the first study to compare the genetic structure of a dioecious species with that of a closely related self-incompatible species.

There are two possible proximal explanations for the relatively low level of genetic variation observed in the dioecious *E. rotundifolium*. First, it is likely that *E. havanense* possesses an exceptionally high level of genetic diversity producing the false impression of a relatively low amount in the dioecious species. Second, the genetic diversity of *E. havanense* falls within the range of other outcrossing tropical perennial plants and, consequently, *E. rotundifolium* actually has low levels of genetic variance. As revealed by allozyme-based studies (Ganders *et al.*, 1985; Hamrick and Loveless, 1986; Pérez-Nasser *et al.*, 1993; Loiselle *et al.*, 1995), the genetic diversity of distylous species usually falls within the range reported for other long-lived perennial outcrossing plants (Hamrick and Godt, 1996). Nonetheless, the results of this and previous studies (Dominguez *et al.*, 2005) show that *E. havanense* has particularly high levels of genetic variation ($H_e = 0.431 \pm 0.04$ and 0.30 ± 0.03 for RAPD and ISSR-based estimations, respectively) that are almost double the average values of other long-lived perennial outcrossing species [$H_e = 0.214 \pm 0.117$, $H_e = 0.220 \pm 0.08$, and $H_e = 0.230 \pm 0.08$ for RAPD, ISSR, and AFLP-based estimations, respectively (Nybom and Bartish, 2000; Nybom, 2004)]. Thus, even though the genetic variation of *E. rotundifolium* was significantly lower than that of its distylous relative, it falls within the range observed for other long-lived perennial outcrossing species (Nybom and Bartish, 2000; Nybom, 2004). In short, although this result could suggest that both breeding systems represent alternative outbreeding mechanisms, the *magnitude* of the genetic diversity maintained by the distylous species is one-third higher than that of the dioecious species. Under this scenario, it would be pertinent to ask what mechanisms may generate these differences, as well as the consequences.

There are at least three non-exclusive explanations for the observed reduction in the extent of genetic diversity of the dioecious species. First, because the evolution of dioecy is usually accompanied by the presence of sexual dimorphisms [floral display, amount of rewards, etc. (see Geber, 1999)], pollinators may discriminate against the less attractive individuals [usually the females (Delph, 1996; Eckhart, 1999; Vamosi and Otto, 2002)], reducing effective population size [N_e (Hedrick, 2000)]. It is well known that N_e is directly related to the magnitude of the genetic variation within a population (Wright, 1930; Charlesworth, 2003). Second, biases in sex ratio may also reduce the effective population size (Hedrick, 2000). Because $N_e = 4N_fN_m / (N_f + N_m)$ [where N_f and N_m denote the number of females and males within a population, respectively (Hedrick, 2000)], any deviation from equal representation of males and females results in $N_e < N$ (Hedrick, 2000). Third, a lack of reproductive synchronization between male and female individuals may reduce the effective population size by producing temporal fluctuations in population sex ratio. It should be noted that the three mechanisms would result in increased variance in the reproductive success between the sexes and among individuals within a sex.

Preliminary observations performed in the Chamela *E. rotundifolium* population indicate that pollinator visitation differs between the sexes, with females receiving twice the number of visits observed in male plants (Martínez-Bauer, 2007). Although the sex ratio of the population is 1:1, the flowering onset of individual plants is not synchronous, thus resulting in a marked temporal variation in the number of individuals of each sex that flower simultaneously (Martínez-Bauer, 2007). In contrast, the flowering pattern of *E. havanense* is

highly synchronous both within and among individuals (Dominguez and Dirzo, 1995), and pollinators do not discriminate between Pin and Thrum plants (Dominguez *et al.*, 1997). Moreover, the population density of *E. havanense* is much higher than that of *E. rotundifolium* (1320 and 35 individuals per hectare in *E. havanense* and *E. rotundifolium*, respectively). Thus, the combined effects of female-biased pollinator foraging, the lack of flowering synchronization between most male and female plants, and the relatively low population density of *E. rotundifolium* likely result in high reproductive variances and low effective population sizes. Overall, differences in the reproductive biology and demographic traits of *E. rotundifolium* and *E. havanense* may explain why the dioecious species has less genetic variation and higher population differentiation than its distylous relative.

Finally, we thought that the differences in the foraging behaviour of pollinators observed in this study may have originated as a by-product of the selective forces favouring the evolution of separated sexes. Although both male and female flowers of *E. rotundifolium* produce nectar, the secretory tissue of female flowers shows marked differences from that of males. Female flowers have functional and well-developed nectaries located in the wall of the ovary. The secretory tissue of male flowers is also located in the wall of the vestigial ovary, but in contrast with the female nectary, it consists of groups of secretory cells without a clear differentiation (Martinez-Bauer, 2007). Given that the secretory tissue is associated with the ovary wall, and because the evolution of separated sexes involves the sterilization of the female function in male flowers, it would be possible that the evolution of dioecy in *E. rotundifolium* also reduced the ability of male flowers to produce nectar. This scenario is in accordance with previous proposals that the evolution of sexual dimorphisms may influence the response of pollinators to individuals of each sex (Vamosi and Otto, 2002). Such differences have the potential to increase the variance in reproductive success and, therefore, to reduce the effective population size of dioecious populations (Charlesworth, 2003).

Overall, our results and those of other studies indicate that dioecious species have lower levels of genetic variance than other non-dioecious species (Waycott *et al.*, 1996; Terauchi *et al.*, 1997; Bartish *et al.*, 1999; Rottenberg *et al.*, 1999; Crawford *et al.*, 2001; Dorken *et al.*, 2002; Dorken and Barrett, 2004). Thus, although both dioecy and self-incompatibility may function as effective inbreeding-avoidance mechanisms (Baker, 1959), the evolution of unisexuality seems to reduce the amount of genetic variation. In *E. rotundifolium*, such a reduction is probably a consequence of the evolution of sexually dimorphic attributes influencing the effective population size. Whether this phenomenon is widespread among other dioecious species requires further work involving multiple phylogenetically independent comparisons.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank R. Pérez-Ishiwara and R.I. Martínez for their assistance in the laboratory, G. Ávila for his help with fieldwork, and L. Eguiarte and C. Oliver for comments. This work was funded by DGAPA-UNAM (IN210797) and CONACYT (0201P-N). C. Abarca was supported by a CONACYT scholarship (#154881).

REFERENCES

- Ashman, T.-L. 1992. The relative importance of breeding and maternal sex in determining progeny fitness in *Sidalcea oregana* ssp. *spicata*, a gynodioecious plant. *Evolution*, **46**: 1862–1874.
- Baker, H.G. 1959. Reproductive methods as factors in speciation in flowering plants. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **24**: 177–191.

- Barrett, S.C.H. 1992. Heterostylous genetic polymorphism: model systems for evolutionary analysis. In *Monographs in Theoretical and Applied Genetics* (S.C.H. Barrett, ed.), pp. 1–29. New York: Springer.
- Bartish, L.V., Jeppsson, N. and Nybom, H. 1999. Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molec. Ecol.*, **8**: 791–802.
- Bawa, K.S. 1982. Outcrossing and the incidence of dioecism in island floras. *Am. Nat.*, **119**: 866–871.
- Bussell, J.D. 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity among populations of *Isotoma petrae* (Lobeliaceae). *Molec. Ecol.*, **8**: 775–789.
- Charlesworth, B. and Charlesworth, D. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *Am. Nat.*, **112**: 975–997.
- Charlesworth, D. 2003. Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **358**: 1051–1070.
- Crawford, D.J., Ruiz, E., Stuessy, T.F., Tepe, E., Aqueveque, P., Gonzalez, F. et al. 2001. Allozyme diversity in endemic flowering plant species of the Juan Fernandez archipelago, Chile: ecological and historical factors with implications for conservation. *Am. J. Bot.*, **88**: 2195–2203.
- Cuevas, E., Arias, D.M., Domínguez, C.A., Castillo, R.A. and Molina-Freaner, F. 2006. The genetic structure of the gynodioecious *Kallstroemia grandiflora* (Zygophyllaceae): the role of male sterility and colonization history. *Heredity*, **97**: 269–274.
- Culley, T.M. and Wolfe, A. 2001. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity*, **86**: 545–556.
- Darwin, C. 1877. *The Different Forms of Flowers on Plants of the Same Species*. London: John Murray.
- Delph, L.F. 1996. Sexual dimorphism in flower size. *Am. Nat.*, **148**: 299–320.
- Domínguez, C.A. and Dirzo, R. 1995. Rainfall and flowering synchrony in a tropical shrub: variable selection on the flowering time of *Erythroxylum havanense*. *Evol. Ecol.*, **9**: 204–216.
- Domínguez, C.A., Avila-Sakar, G., Vásquez-Santana, S. and Márquez-Guzmán, J. 1997. Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *Am. J. Bot.*, **84**: 626–632.
- Domínguez, C.A., Abarca, C.A., Eguiarte, L.E. and Molina-Freaner, F. 2005. Local genetic differentiation among populations of the mass-flowering tropical shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *New Phytol.*, **166**: 663–672.
- Dorken, M.E. and Barrett, S.C.H. 2004. Chloroplast haplotype variation among monoecious and dioecious populations of *Sagittaria latifolia* (Alismataceae) in eastern North America. *Molec. Ecol.*, **13**: 2699–2707.
- Dorken, M.E., Friedman, J. and Barrett, S.C.H. 2002. The evolution and maintenance of monoecy and dioecy in *Sagittaria latifolia* (Alismataceae). *Evolution*, **56**: 31–41.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, **19**: 11–15.
- Eckhart, V.M. 1999. Sexual dimorphism in flowers and inflorescences. In *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants* (M.A. Geber, T.E. Dawson and L.F. Delph, eds.), pp. 123–148. Berlin: Springer.
- Eppley, S.M., Taylor, P.J. and Jesson, L.K. 2007. Self-fertilization in mosses: a comparison of heterozygote deficiency between species with combined versus separated sexes. *Heredity*, **98**: 38–44.
- Felsenstein, J. 2004. *PHYLIP (Phylogenetic Inference Package)*, version 3.6. Seattle, WA: Department of Genetics, University of Washington.
- Ganders, F.R. 1979. The biology of heterostyly. *NZ J. Bot.*, **17**: 607–635.
- Ganders, F.R., Denny, S.K. and Tsai, S. 1985. Breeding system and genetic variation in *Amsinckia spectabilis* (Boraginaceae). *Can. J. Bot.*, **66**: 533–538.

- Geber, M.A. 1999. Theories of the evolution of sexual dimorphism. In *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants* (M.A. Geber, T.E. Dawson and L.F. Delph, eds.), pp. 97–118. Berlin: Springer.
- Gouyon, P.H. and Couvet, D. 1987. A conflict between two sexes, females and hermaphrodites. In *The Evolution of Sex and its Consequences* (S.C. Stearns, ed.), pp. 245–261. Basel: Birkhauser.
- Gryj, E.O. and Domínguez, C.A. 1996. Fruit removal and post-dispersal survivors in the tropical dry forest tree *Erythroxylum havanense*: ecological and evolutionary implications. *Oecologia*, **108**: 368–374.
- Hamrick, J.L. and Godt, M.J. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plants. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **351**: 1291–1298.
- Hamrick, J.L. and Loveless, L.D. 1986. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. *Biotropica*, **18**: 201–207.
- Hedrick, P. 2000. *Genetics of Populations*. Sudbury, MA: Jones & Bartlett.
- Johnson, E.L., Zhang, D. and Emche, S.D. 2005. Inter- and intra-specific variation among five *Erythroxylum* taxa assessed by AFLP. *Ann. Bot.*, **95**: 601–608.
- Kelly, L.M. 2001. Erythroxylaceae Kunth. In *Flora del Valle de Tehuacan-Cuicatlán* (L.M. Kelly, H. Ochotorena and R. Medina, eds), Fascículo 33, pp. 1–4. Mexico, DF: Instituto de Biología, UNAM.
- King, L.M. and Schaal, B. 1989. Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missourensis*. *Evolution*, **43**: 1117–1119.
- Lokker, C., Susto, D., Lovett-Doust, L. and Lovett-Doust, J. 1994. Population genetic structure of *Vallisneria Americana*, a dioecious clonal macrophyte. *Am. J. Bot.*, **81**: 1004–1012.
- Lewontin, R.C. 1972. The apportionment of human diversity. *Evol. Biol.*, **6**: 381–398.
- Lloyd, D.G. 1975. The maintenance of gynodioecy and androdioecy in angiosperms. *Genetica*, **45**: 325–339.
- Lloyd, D.G. 1976. The transmission of genes via pollen and ovules in gynodioecious angiosperms. *Theor. Pop. Biol.*, **9**: 299–316.
- Loiselle, V., Sork, V., Nason, J. and Graham, C. 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub *Psychotria officinalis*. *Am. J. Bot.*, **82**: 1420–1425.
- Luna, R., Epperson, B.K. and Oyama, K. 2007. High levels of genetic variability and inbreeding in two Neotropical dioecious palms with contrasting life histories. *Heredity*, **99**: 466–476.
- Lynch, M. and Milligan, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPDs markers. *Molec. Ecol.*, **3**: 91–99.
- Martínez-Bauer, A. 2007. Biología reproductiva de una especie dioica, *Erythroxylum rotundifolium* (Erythroxylaceae). Bachelor thesis, Faculty of Sciences, UNAM.
- Miller, M.P. 1997. *Tools for Population Genetic Analyses (TFGPA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data*. Computer software distributed by author.
- Molina-Freaner, F. and Jain, S.K. 1993. Inbreeding effects in a gynodioecious population of the colonizing species *Trifolium hirtum* all. *Evolution*, **47**: 1472–1479.
- Nybohm, H. 2004. Comparison of the different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molec. Ecol.*, **13**: 1143–1153.
- Nybohm, H. and Bartish, I. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Pers. Plant. Ecol. Evol. Syst.*, **3**: 93–114.
- Pérez-Nasser, N., Eguiarte, L.E. and Piñero, D. 1993. Mating system and genetic structure of the distylous tree *Psychotria faxluscens* (Rubiaceae). *Am. J. Bot.*, **80**: 45–52.
- Rottenberg, A., Zohary, D. and Nevo, E. 1999. Patterns of isozyme diversity and vegetative reproduction of willows in Israel. *Int. J. Plant Sci.*, **160**: 561–566.
- Sakai, A.K. and Weller, S. 1999. Gender and sexual dimorphism in flowering plants: a review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates, and phylogenetic approaches. In

- Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants* (M.A. Geber, T.E. Dawson and L.F. Delph, eds.), pp. 1–31. Berlin: Springer.
- Sakai, A.K., Weller, S., Chen, M., Cou, S. and Tسانونت, C. 1997. Evolution of gynodioecy and the maintenance of females: the role of inbreeding depression, outcrossing rates, and resource allocation in *Schtedea adamantis* (Caryophyllaceae). *Evolution*, **51**: 724–736.
- Terauchi, R., Terachi, T. and Miyashita, N.T. 1997. DNA polymorphism at the *pgl* locus of a wild yam, *Dioscorea tokoro*. *Genetica*, **147**: 1899–1914.
- Thomson, J.D. and Barrett, S.C.H. 1981. Selection for outcrossing, sexual selection and the evolution of dioecy in plants. *Am. Nat.*, **118**: 443–449.
- Thompson, J.D. and Tarayre, M. 2000. Exploring the genetic basis and proximate causes of female fertility advantage in gynodioecious *Thymus vulgaris*. *Evolution*, **54**: 1510–1520.
- Vamosi, J.C. and Otto, S.P. 2002. When looks can kill: the evolution of sexually dimorphic floral display and the extinction of dioecious plants. *Proc. R. Soc. Lond. B*, **269**: 1187–1194.
- Waycott, M., Walker, D.I. and James, S.H. 1996. Genetic uniformity in *Amphibolis Antarctica*, a dioecious seagrass. *Heredity*, **76**: 578–585.
- Webb, C.J. 1999. Empirical studies: evolution and maintenance of dimorphic breeding systems. In *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants* (M.A. Geber, T.E. Dawson and L.F. Delph, eds.), pp. 61–95. Berlin: Springer.
- Weir, B.S. and Cockerham, C.C. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**: 1358–1370.
- Wright, S. 1930. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, **28**: 114–138.



¿Es la evolución de la dioecia un callejón sin salida?

César A. Abarca¹, Eduardo Cuevas García² y César A. Domínguez^{1a}

¹*Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología Universidad Nacional Autónoma de México, , AP 70-275, México DF 04510 México;* y ²*Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California, Santa Cruz, California 95064.*
^{1a}*abarca_cesar@hotmail.com;* ²*ecuevas@ucsc.edu;* ^{1a}*tejada@servidor.unam.mx*

Probablemente la mayoría de nosotros ha visto algún documental en el que se muestran los distintos y complejos cortejos que anteceden a las cópulas en muchas especies de animales, incluyendo la nuestra. De ahí que muchas veces asociemos el término sexualidad con la presencia de machos y de hembras que eligen activamente a su pareja; lo que en los vertebrados es particularmente cierto. Sin embargo, otros grupos como las plantas o los invertebrados marinos muestran una gran diversidad en la expresión de la sexualidad.

A pesar de que la mayoría de las plantas con flores son hermafroditas (75% del total tiene las dos funciones sexuales en la misma flor) en éstas se ha favorecido una amplia gama de atributos sexuales, particularmente relacionados con el movimiento de gametos entre individuos (fecundación cruzada). Entre los atributos más notorios se encuentran los de atracción, como las fragancias, las formas y los colores, que llegan a ser

muy variables. Sin embargo, como las especies hermafroditas presentan ambos sexos en una misma flor y potencialmente podrían auto-fertilizarse; algunos biólogos desde la época de Darwin comenzaron a preguntarse —¿Por qué existen distintos mecanismos que evitan la auto-fertilización?— Actualmente, la explicación más aceptada tiene que ver con que la progenie producida por auto-fertilización, generalmente es menos vigorosa que la producida por fecundación cruzada (a lo que se le conoce como depresión por endogamia). Es decir, si las plantas que se auto-fertilizan presentan depresión por endogamia, entonces se espera que se favorezcan mecanismos que faciliten la producción de hijos por medio de fecundación cruzada. Entre los mecanismos que promueven la fecundación cruzada en las plantas, los más comunes son: la separación de los órganos sexuales, tanto espacial como temporalmente; y los sistemas de incompatibilidad genética (que impiden la fecundación de los óvulos con polen de una misma planta).

Uno de los sistemas de reproducción que evita la auto-fertilización por completo, y que ha evolucionado tanto en plantas como en animales, es la dioecia. La dioecia en las plantas está caracterizada porque en una población los individuos poseen únicamente flores masculinas (o estaminadas) o femeninas (o pistiliadas); lo que representa la máxima separación espacial de las estructuras reproductivas. Sin embargo, al contrario que en los animales terrestres, la dioecia en las plantas con flores es poco común (sólo entre el 7-9% del total de las especies son dioicas).

¿Por qué si la dioecia parece ser tan exitosa en un grupo taxonómico, lo es tan poco en otro?

Una posibilidad es que en las angiospermas la dioecia sea una novedad evolutiva y por consiguiente, las especies dioicas no hayan tenido tiempo suficiente para diversificarse. Sin embargo, se ha mostrado que incluso cuando la dioecia posea aproximadamente el mismo tiempo de haberse originado que sus grupos hermanos hermafroditas o monoicos (la misma planta presenta flores masculinas y femeninas), su tasa de diversificación es menor. Siendo así, surgen nuevas interrogantes, pues si los clados dioicos presentan menos especies, por alguna razón la evolución de la dioecia está acompañada de una menor tasa de especiación o mayores probabilidades de extinción. Alrededor de este enigma evolutivo, existen tres aproximaciones contemporáneas que intentan darle respuesta.

La primera explicación se refiere a como los polinizadores deben de visitar a las plantas dioicas para que se lleve a cabo la fecundación; pues para que ocurra ésta se requiere que un mismo grupo de polinizadores visite tanto a las plantas masculinas como femeninas. Sin embargo, como las presiones de selección que operan sobre las flores masculinas y femeninas generalmente son distintas, se ha favorecido el dimorfismo floral. Como resultado del dimorfismo, comúnmente los machos presentan despliegues o recompensas florales que son más atractivas para los polinizadores que los de las hembras. Por ejemplo, en *Leucadendron xanthoconus* los machos en promedio producen 322 inflorescencias, mientras que las hembras tan sólo 16.3. Dichos contrastes florales entre machos y hembras llevó a un grupo de investigación a proponer que el dimorfismo podría acrecentar las probabilidades de extinción, ya que en algunas especies los polinizadores visitan más a las flores masculinas (como en *Silene dioica* o en *Wurmbea dioica*) y por lo tanto, las hembras dejan pocos hijos o ninguno. Esta situación podría ser

drástica en ambientes donde hubiera limitación de visitantes florales y un marcado dimorfismo floral. Obviamente en muchas especies hermafroditas esto no sucedería, pues aún en ausencia de polinizadores, podrían auto-fertilizarse y producir semillas, como en la famosa *Arabidopsis thaliana*.

La segunda propuesta parte del supuesto de que la producción de semillas de una hembra dioica debería ser mayor que la de una hermafrodita, pues las hermafroditas tienen que invertir sus recursos para producir tanto polen como óvulos, mientras que una hembra sólo produce óvulos. Si las semillas se dispersan poco, entonces el agrupamiento espacial de semillas y plántulas de una planta dioica será mayor que la de una hermafrodita y por lo tanto, habrá una mayor competencia por los recursos y probablemente se incrementará la mortalidad.

Ambas propuestas resultan interesantes, pero dependen de contextos ecológicos muy específicos; la primera de los dispersores de polen y la segunda de los de semillas. Sin embargo, muchas especies dioicas no necesitan de animales para reproducirse. Por ejemplo, varias especies son polinizadas por el viento (e.g. encinos, ailes) o por corrientes de agua (e.g. pastos marinos) y por lo tanto, pensamos que debe haber una explicación más general.

La tercera propuesta que intenta explicar por qué la dioecia es poco exitosa, se refiere a que en las especies dioicas no hay autofertilización. De manera general, si un individuo no se auto-fertiliza, se espera que genere progenie más variable que uno que sí lo hace. De forma congruente con esta idea, muchos estudios han mostrado que las especies que se auto-fertilizan poseen menores niveles de diversidad genética que las especies hermafroditas que tienen fecundación cruzada. Por ejemplo, en el género

Mimulus, la especie *M. guttatus* que es hermafrodita y se reproduce principalmente por fecundación cruzada, posee una mayor diversidad genética que *M. nasutus*, la cual se autofecunda predominantemente. De manera similar, la heterocigosis de una especie dioica debería ser más alta que la de una especie que se auto-fertiliza y similar a una especie hermafrodita que promueve la fecundación cruzada. Para evaluar esa predicción, comparamos la diversidad genética de una especie dioica y una hermafrodita que no se puede auto-fertilizar. A pesar de que la diversidad genética de estas dos especies, ambas del género *Erythroxylum*, debería de haber sido equivalente, la especie hermafrodita (*E. havanense*) tuvo mayores niveles de diversidad genética que la especie dioica (*E. rotundifolium*). Aunque no hay más trabajos diseñados para evaluar si la dioecia puede mantener altos niveles de heterocigosis (como teóricamente se espera), nuestro estudio no es un caso aislado. Por ejemplo, en *Sagittaria latifolia*, las poblaciones dioicas presentaron menos variación genética que las poblaciones monoicas; y en *Amphibolis antarctica* (un pasto marino), que constituye el caso de pérdida de variación genética más drástico, ni utilizando marcadores moleculares muy variables, se logró encontrar rastro alguno de diversidad genética. Por lo tanto, los estudios de diversidad genética en especies dioicas sugieren que la pérdida de variación podría ser producto de la evolución de la dioecia. —

¿Y qué relación hay entre la baja variación genética y el poco éxito evolutivo de las especies dioicas?— Pues mucha, porque se ha mostrado tanto teórica como empíricamente que conforme disminuye la diversidad genética de una especie, aumenta significativamente el riesgo de extinción. Por lo tanto, si con la evolución de la dioecia disminuye la diversidad genética y aumentan las probabilidades de extinción, entonces

también podríamos explicarnos porqué el número de familias dioicas incluidas en las listas de extinción, es más considerable que el de sus linajes hermanos hermafroditas.

Antes de terminar, vamos a tratar de responder a una última pregunta. Si como vimos, la dioecia en las plantas con flores no sólo no parece ser una innovación clave en términos evolutivos, sino que podría aumentar las probabilidades de desaparición de una especie —¿Cómo se puede explicar entonces su origen?— Teóricamente el primer paso de la evolución de la dioecia, lo constituye la aparición de individuos que son estériles para alguna de las dos funciones reproductivas en una población hermafrodita. Si los individuos que surgen son estériles para la función masculina, que es lo más común, la población estará conformada por individuos hermafroditas e individuos que funcionan como hembras (población ginodioica). Por el contrario, si los individuos son estériles para la función femenina, la población estará constituida por individuos hermafroditas e individuos que funcionan como machos (población androdioica). Como la esterilidad más frecuente y mejor estudiada es la masculina, se sabe que ésta se origina debido a una mutación en el genoma mitocondrial. Como las mitocondrias en las angiospermas se heredan a través de los óvulos (vía materna); y la mutación que esteriliza la función masculina sesga la asignación de recursos hacia la producción de óvulos; se favorece la propagación de la mutación mitocondrial. Conforme la mutación mitocondrial se propaga, evidentemente menos individuos hermafroditas habrá. Probablemente por ello en algunas especies como en *Thymus vulgaris*, la frecuencia de hembras puede ser cercana al cien por ciento. En esas circunstancias, la adecuación de los genes mitocondriales es muy alta, pues mientras más óvulos y semillas se producen, más copias de los genes esterilizadores existirán. Sin embargo, también se sabe que la fertilidad masculina puede ser restaurada.

Cuando ello sucede, se debe a que una mutación de origen nuclear, revierte los efectos de un esterilizador mitocondrial. En el caso de que no surgiera otro esterilizador mitocondrial después de la aparición del restaurador nuclear, una población regresaría a ser totalmente hermafrodita. Dado que la restauración de la fertilidad masculina disminuye la producción de óvulos, los recursos se reasignarían nuevamente para producir tanto óvulos como polen y la adecuación de los genes mitocondriales disminuiría. Una forma en como se ha propuesto que podría resolverse esta discrepancia entre los genes mitocondriales que generan la esterilidad masculina y los nucleares que la restauran (conflictos genéticos), es separando la producción de los óvulos y del polen en distintos individuos, justo como ocurre en las especies dioicas.

Para finalizar, queremos agregar que el estudio de la dioecia constituye un excelente ejemplo para mostrar que la evolución es totalmente ciega. Por un lado, al separarse los sexos en distintos individuos se resuelve un conflicto entre dos genomas (el mitocondrial y el nuclear); por otro, la separación de los sexos puede generar condiciones que hagan que las angiospermas dioicas sean más susceptibles de desaparecer que las hermafroditas. También queremos recordar que la especialización puede llevar a la extinción. Es decir, no porque el dioicismo se haya derivado del hermafroditismo significa que sea una condición más “exitosa”. Es decir, la evolución no es un proceso direccional que mejora a las especies.

Agradecimientos. Queremos agradecerle a Alejandro Flores por la revisión que hizo de la primera versión del manuscrito y a Celia Oliver por la cuidadosa revisión que hizo de la versión final.

Bibliografía recomendada:

Abarca, C. A. López, A. 2007. La estimación de la endogamia y la relación entre la tasa de fecundación cruzada y los sistemas reproductivos en las plantas con flores: una interpretación de su significado evolutivo. *En Ecología Molecular*. Eguiarte, L. E; Souza, V; Aguirre, X (eds), Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, UNAM.

Cuevas, G. E; Abarca, C. A. 2006. Origen, mantenimiento y evolución del ginodioicismo. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 78: 33-42.

Heilbut, J. C. 2000. Lower species richness in dioecious clade. *American Naturalist* 156: 221-241.

Heilbut, J. C; Ilves, K. L; Otto, S. P. 2001. The consequence of dioecy for seed dispersal: modeling the seed-shadow handicap. *Evolution* 55(5): 880-888.

Vamosi, J. C; Otto, S. P. 2002. When looks can kill: the evolution of sexually dimorphic floral display and the extinction of dioecious plants. *Proceedings of Royal Society of London, series B* 269: 1187-1194.



¿Es la depresión por endogamia la fuerza selectiva más importante en la evolución de la dioecia?: el caso de las especies ginodioicas

César A. Abarca¹ y César A. Domínguez²

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México; AP 70—275, México DF.

¹abarca_cesar@hotmail.com; ²tejada@servidor.unam.mx

Introducción

Darwin (1877) fue de las primeras personas en estudiar los efectos negativos de la autofecundación en las plantas (endogamia uniparental). Generalmente cuando autofecundaba flores de una planta con polen propio y otras con polen externo (de un individuo distinto), la progenie producto de autofecundación era inviable o de menor calidad que la producto de fecundación cruzada (depresión por endogamia). Al continuar con sus observaciones Darwin 1877 también se dio cuenta que varias de las especies con las que trabajó, poseían diferentes características florales que reducían o evitaban la autofecundación. A partir de esas observaciones pioneras, el interés por saber cuál es el papel de la depresión por endogamia (δ) en la evolución de los sistemas reproductivos ha continuado. Lloyd (1975 b) y Charlesworth y Charlesworth (1978) por ejemplo, propusieron que cuando la δ es fuerte, se favorece la separación de los sexos en diferentes

individuos (dioecia). Un grupo de plantas que ha servido para evaluar la hipótesis que propone que la δ favorece la evolución de la dioecia, son las especies ginodioicas.

El ginodioicismo se caracteriza porque en una población de plantas hermafroditas, surge una mutación mitocondrial que esteriliza la función masculina de algunos individuos y por lo tanto, hace que funcionen como hembras (Sun y Ganders 1986). La esterilidad masculina representa el primer paso de la evolución de la dioecia y el ginodioicismo, la vía más común. Posteriormente al establecimiento del ginodioicismo, se necesita que otra mutación esterilice la función femenina de los hermafroditas para que la dioecia evolucione. Finalmente, hace falta que ambas mutaciones se ligen para evitar que recombinen y por lo tanto, se produzcan hermafroditas nuevamente (ver Cuevas y Abarca 2006 para una revisión del tema).

En las especies ginodioicas sin embargo, las plantas que son estériles para la función masculina se encuentran en desventaja reproductiva respecto a las plantas hermafroditas, pues sólo pueden dejar hijos a través de una de las dos funciones reproductivas (Sun y Ganders 1986; Ashman 1992). Por lo tanto, la desventaja reproductiva se compensa a través de la selección de los individuos estériles que producen más o mejores semillas; lo cual es posible al menos de dos modos. Primero, porque como un individuo estéril para la función masculina no produce hijos por autofecundación, evita los efectos negativos de la endogamia (Charlesworth 1981; Frank 1989; Ashman 1992; Molina-Freaner y Jain 1993). Segundo, porque al no invertir en la producción de polen y óvulos como lo hace una planta hermafrodita, pueden reasignar todos sus recursos

únicamente a la producción de óvulos y por lo tanto, de más y mejores semillas (Ashman 1992; Molina-Freaner y Jain 1993).

Los modelos teóricos predicen que cuando el producto de $s\delta > 0.5$ (en donde s es la tasa de autofecundación y δ la depresión por endogamia), las plantas estériles pueden ser mantenidas en una población aún si no reasignaran recursos para producir más semillas (Charlesworth y Charlesworth 1978). Es decir, aunque el número de óvulos de una hembra y una hermafrodita fuera igual, la hermafrodita sólo produciría la mitad de semillas respecto a una hembra, pues la otra mitad moriría como consecuencia de la δ .

Por otro lado, los modelos teóricos también suponen que si por medio de la reasignación de recursos las hembras produjeran el doble de semillas que las hermafroditas, éstas podrían mantenerse aún sin la ventaja que les daría la δ (Charlesworth 1999).

Debido a que la δ y la compensación no son mecanismos excluyentes, cuantificarlos es importante, ya que además de entender su papel relativo en el mantenimiento de las hembras, podríamos evaluar si la δ como se ha propuesto, es la fuerza evolutiva más importante en la evolución de la dioecia (ver Sakai y Weller 1999 para una revisión del tema).

Ya que la dioecia no sólo se ha derivado de especies autocompatibles (incluyendo algunas especies ginodioicas como *Plantago lanceolata*, Van Damme y Van Delden 1984; o *Plantago coronopus*, Koelewijn, 1996), probablemente la compensación sea más importante en la evolución de la dioecia que la δ . Si así fuera, entonces el papel relativo de la δ en el mantenimiento de las hembras debería ser menor que el de la compensación.

Para evaluar esa predicción, en este trabajo revisamos los datos empíricos de δ y compensación reportados en especies ginodioicas y a partir de ello, discutimos las implicaciones evolutivas que tiene para el mantenimiento de las hembras y la evolución de la dioecia, que los valores de δ y compensación sean distintos.

Para inferir el papel relativo de la δ y la compensación, es necesario comparar el desempeño de la progenie derivada de tres tipos de cruza. 1) De la autofecundación en hermafroditas, 2) de la fecundación cruzada en hermafroditas y 3) de la fecundación cruzada en hembras. Cuando la adecuación de las hermafroditas producto de autofecundación y fecundación cruzada es igual entre sí, pero la adecuación de las hembras es mayor (que sólo producen progenie por medio de fecundación cruzada), significa que no hay δ . Por lo tanto, una hembra se mantiene por pura compensación (Figura 1a). Al contrario, cuando la adecuación de las hembras y las hermafroditas producto de fecundación cruzada es igual entre sí, y menor que la de las hermafroditas producto de autofecundación, significa que no hay compensación. Por lo tanto, una hembra se mantiene por pura δ (Figura 1b). Cuando la compensación y la δ son importantes, la adecuación de las hermafroditas producto de autofecundación siempre será la menor, y la de las hembras y las hermafroditas producto de fecundación cruzada, dependerá de la importancia relativa de ambos factores (Figura 1c y 1d).

Como en los trabajos que revisamos se midieron distintos componentes de adecuación entre las especies (por ejemplo, el peso de las semillas, la germinación, etc.), construimos un índice que hiciera comparables los datos. Para ello, únicamente consideramos los resultados en donde las diferencias entre las cruza (autofecundación en

las hermafroditas y fecundación cruzada en hembras y hermafroditas) fueran significativas. Para construir el índice que denominamos como φ , en cada estudio multiplicamos los distintos componentes de adecuación que se midieron (por ejemplo, el peso de las semillas X la germinación X otros componentes de adecuación). En cada estudio siempre se consideraron los mismos componentes de adecuación para los tres tipos de cruza. Posteriormente, para que el índice tomara valores entre 0 y 1, dividimos los valores de la adecuación multiplicativa de cada tipo de cruza, entre el valor más alto. Con la información obtenida, construimos una distribución del valor φ para cada especie.

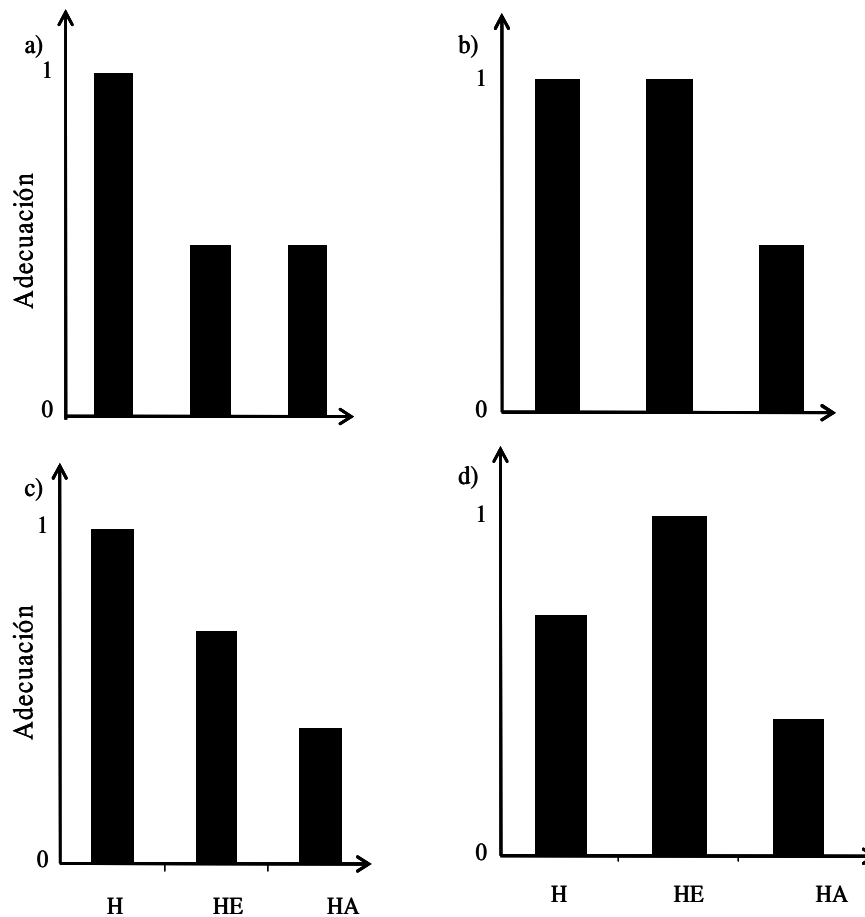


Figura 1. Adecuación de hembras (H) y hermafroditas producto de fecundación cruzada (HE) y autofecundación (HA) que se espera cuando las hembras se mantienen por a) compensación, b) depresión por endogamia, o c) y d) ambos factores, siendo mas importante la compensación en el primer caso y la depresión por endogamia en el segundo.

Resultados y Discusión

Aunque la δ y la compensación no son mecanismos excluyentes en el mantenimiento de las hembras, en pocos trabajos se han estimado ambos. En total encontramos diecinueve artículos en donde se reportó el mantenimiento de las hembras dentro de poblaciones ginodioicas. En catorce de ellos sin embargo, sólo se midió o infirió la magnitud de la δ o la reasignación de recursos (Sun y Ganders 1986; Wolff, Friso y Van Damme 1988; Khon y Biardi 1995; Sakai, Karoly y Weller 1989; Molina-Freaner y Jain 1993; Norman et ál. 1995; Mutikainen y Delph 1998; Shykoff 1988; Jolls y Chenier 1989; Khon 1989; Agren y Willson 1991; Eckhart 1992; Maki 1993; Ashman 1994). Por lo tanto, no nos sirvieron para evaluar la hipótesis que planteamos. Únicamente en cinco trabajos el diseño experimental estaba explícitamente hecho para discriminar el papel relativo de la δ y la asignación de recursos en el mantenimiento de las hembras (Ashman 1992 b; Sakai et ál. 1997; Del Castillo 1998; Thompson y Tarayre 2000; Marshall y Ganders 2001).

El resultado más importante que encontramos, fue que tanto la δ como la asignación de recursos explicaron el mantenimiento de las hembras en todas las especies ginodioicas consideradas (Figura 2). Aunque ambos mecanismos no fueron excluyentes, en cuatro de las cinco especies la compensación fue más importante que la δ (Figura 1c y 2). Sólo en *Silene vulgaris* los valores de φ se ajustaron a la distribución que se espera cuando la δ es más importante que la compensación (Figura 1d y 2).

Un aspecto importante de mencionar, es que aunque el valor de φ de las hembras generalmente fue más grande que la de los otros dos tratamientos (Figura 2), en la mayoría de las especies la δ explicó algún componente del ciclo de vida. En *Silene acaulis* por

ejemplo, el número de semillas por fruto y el peso de éstas, fue en promedio menor en las hembras que en las hermafroditas producto de fecundación cruzada. Únicamente en *Sidalcea hendersonii* la compensación explicó todos los componentes del ciclo de vida. También hay que mencionar que en algunas especies, las diferencias en la adecuación de algunos componentes fue muy pequeña entre todos los tratamientos. Por lo tanto, el tener estimaciones únicamente de alguno o algunos componentes del ciclo de vida, podría sobrestimar el papel de la compensación o la δ .

Como hemos mencionado, teóricamente la δ ha sido considerada como la fuerza selectiva más importante en la evolución de la dioecia (ver Sakai y Weller 1999 para una revisión). Dado que el ginodioicismo se considera la ruta más importante a partir de la cual se ha derivado la dioecia y además la mayoría de las especies ginodioicas son compatibles, la δ debería de haber sido el principal mecanismo a través del cual las hembras se mantuvieran en una población. Sin embargo, como lo muestra nuestro análisis, no es la δ sino la compensación el principal mecanismo por el que las hembras son mantenidas. Además, como puede verse en la figura 2, los valores de φ alcanzados por las hembras fueron de al menos el doble que los de las hermafroditas producto de fecundación cruzada. Esta diferencia tan grande implica que el papel de la compensación es mucho más importante que el de la δ . Otro dato que muestra la importancia de la compensación es que en *Silene vulgaris*, la única especie en donde la contribución de la δ fue más importante que la de la compensación, la diferencia en el valor de φ entre las hembras y las hermafroditas producto de fecundación cruzada, es semejante (Figura 2). Es decir, si la compensación no fuera tan relevante, entonces los valores de φ de las hembras deberían ser menores.

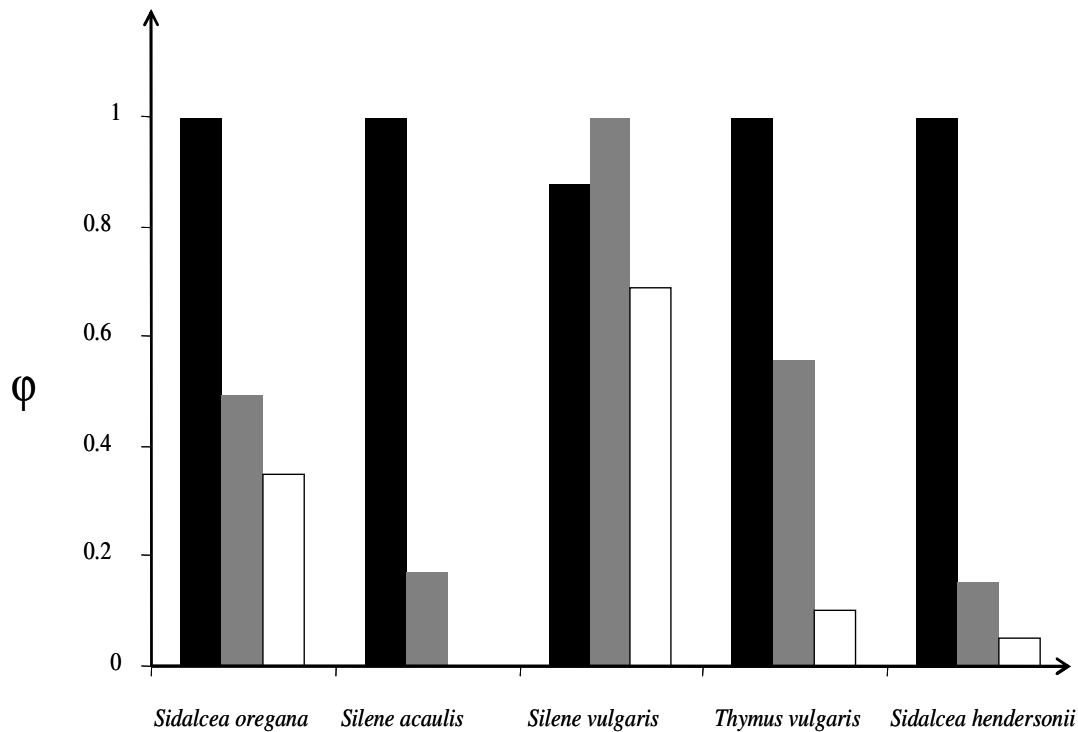


Figura 2. Distribución del valor ϕ de hembras (barras en negro) y hermafroditas producto de fecundación cruzada (barras en gris) y autofecundación (barras en blanco) en cinco especies ginodioicas.

Ya que una hipótesis alternativa que es compatible con nuestros resultados podría explicar la evolución de la dioecia de manera más general que la hipótesis de la δ , la presentamos a continuación. En la mayoría de las especies ginodioicas, la esterilidad masculina es ocasionada por una mutación en el genoma mitocondrial (De Hann 1996). Dicha mutación se propaga debido a que los genes que provocan la esterilidad y que cambian la asignación de recursos, se heredan a través de las mitocondrias (herencia materna). Sin embargo, como los genes nucleares se heredan tanto a través de los óvulos como del polen (herencia biparental), su adecuación podría disminuir conforme aumenta la frecuencia de los genes que provocan la esterilidad. Sin embargo, se ha demostrado que existen restauradores nucleares que restablecen la fertilidad masculina (De Hann 1996).

De esa forma, la aparición de un gen mitocondrial que esteriliza la función masculina, podría hacer que disminuyera la adecuación de los genes nucleares y viceversa. Esta dinámica en la que primero surge un gen esterilizador mitocondrial y después un gen que es capaz de restaurar la fertilidad, ha sido interpretada como un conflicto de intereses reproductivos entre el genoma nuclear y el mitocondrial (Cosmides y Tooby 1981; Hurst et ál. 1992, Domínguez 1995). El conflicto se establece, ya que ambos genomas además de presentar patrones hereditarios distintos, controlan la expresión de sexo. Siendo así, una forma en como se ha propuesto se resolvería este conflicto, es separando la producción de gametos masculinos y femeninos en distintos individuos (Hurst 1992).

Conclusiones

En pocas especies ginodioicas se ha discriminado el papel relativo de la δ y la compensación en el mantenimiento de las hembras. Sin embargo, aunque son pocas las especies en las que el diseño experimental permite discriminar el papel de ambos factores, en todos los casos no son mutuamente excluyentes.

Debido a que teóricamente se ha propuesto que la δ es la fuerza selectiva más importante en la evolución de la dioecia, su contribución al mantenimiento de las hembras debería de haber sido al menos igual que el de la compensación. Sin embargo, su contribución relativa no fue tan importante como el de la compensación. Por lo tanto, nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la dioecia en las angiospermas se favorece

más que por evitar los efectos deletéreos de la endogamia, porque se resuelve un conflicto intragenómico.



Discusión general

Desde los primeros trabajos que realizó Darwin (1877) en las plantas con flores, la distíla ha sido utilizada como un modelo para estudiar la evolución de los sistemas reproductivos en las angiospermas (ver Barrett 1992). Teóricamente, la distíla podría ser un sistema reproductivo estable, o bien evolucionar a la homostíla o a la dioecia (Loyd et ál. 1990, Loyd y Webb 1992).

En términos generales, la evolución de la distíla a la homostíla requiere de la pérdida de uno de los dos morfos florales y de la ruptura del sistema de incompatibilidad genético (Loyd et ál. 1990, Loyd y Webb 1992). Como en *Armeria maritima* se ha mostrado (Vekemans et ál. 1990), la ruptura del sistemas de incompatibilidad genético puede ocurrir en condiciones de escasez de polinizadores o eventos de colonización de nuevos ambientes, en donde la limitación por polen, favorece la transición de un sistema de fecundación cruzada a uno endogámico.

Por otro lado, la evolución de la distíla a la dioecia está acompañada de la especialización de las funciones reproductivas en cada uno de los morfos florales, generalmente siendo el morfo trhum (que presenta las anteras por arriba del estigma), el que se especializa como macho y el morfo pin (que presenta el estigma por arriba de las anteras), el que lo hace como hembra (Barrett 1992).

En *Erythroxylum havanense* la variación espacio temporal que puede ocurrir en la floración y la fructificación (que es sincrónica y masiva, Dominguez 1995) entre poblaciones cercanas, hace que los polinizadores y los dispersores de semillas concentren más sus visitas entre plantas cercanas (Gryj y Domínguez 1996) y por lo tanto, que las

cruzas entre parientes aumenten significativamente. Paradójicamente aunque no es la falta de visitas lo que aumenta la endogamia en *E. havanense*, el efecto de la floración y fructificación en masa podría ser análogo al de la limitación por polen, pues también causa que la tasa de endogamia aumente. Por lo tanto, al menos teóricamente, en *E. havanense* podría esperarse que hubiera selección para que el sistema de incompatibilidad se rompiera y posiblemente ello facilitaría la evolución de la homostíla. Sin embargo, al contrario de esa suposición, varios estudios han mostrado que *E. havanense* se encuentra en etapas intermedias de la evolución a la dioecia (Ávila y Domínguez 2000, Cuevas et ál. 2005), lo cual sugiere que un sistema reproductivo dioico podría evitar la endogamia biparental de manera más eficiente que uno distílico. Sin embargo, si así fuera, esperábamos que los niveles de diversidad genética de *E. rotundifolium*, que es una especie dioica, hubieran sido mayores que los de *E. havanense*, que es una especie distílica. Pero al contrario, los niveles de diversidad genética de *E. rotundifolium* no sólo no fueron mayores o incluso iguales a los de *E. havanense*, sino significativamente menores. De manera similar a lo que encontramos en *E. rotundifolium*, los niveles de diversidad genética reportados en otras especies dioicas resultaron ser menores que los de otros sistemas reproductivos hermafroditas o si no, presentaron deficiencia de heterócigos (Waycott *et ál.*, 1996; Terauchi *et ál.*, 1997; Bartish *et ál.*, 1999; Rottenberg *et ál.*, 1999; Crawford *et ál.*, 2001; Dorken *et ál.*, 2002; Dorken y Barrett, 2004, Luna et ál. 2005). Aunque reconocemos que nuestros resultados serían más robustos si hubiéramos aumentado el número de especies, asegurando la independencia filogenética, lo que en su conjunto pensamos que sugieren son al menos dos cosas. Una es que evitar los efectos negativos de la endogamia, como se ha propuesto (Lloyd, 1975, 1976; Charlesworth y Charlesworth, 1978; Thomson y Barrett,

1981; Sakai y Weller, 1999), es la fuerza selectiva más importante en la evolución de la dioecia y que por lo tanto, la disminución de la variación genética es un producto secundario. La otra es que al contrario, una fuerza evolutiva más general sea la que explique la evolución de la unisexualidad en las angiospermas. En el segundo capítulo de esta tesis nosotros sugerimos que después de que la dioecia se origina, el dimorfismo sexual característico de las plantas dioicas polinizadas por animales (Ver Geber 1999), podría explicar porqué *E. rotundifolium* posee un tamaño efectivo poblacional más pequeño que *E. havanense* y por consiguiente, menor variación genética. Sin embargo, llama la atención que aparentemente no importa si las especies dioicas son polinizadas por animales u otros medios como el agua, pues como ya mencionamos, siempre presentan bajos niveles de diversidad genética o deficiencia de heterócigos (Waycott *et ál.*, 1996; Terauchi *et ál.*, 1997; Bartish *et ál.*, 1999; Rottenberg *et ál.*, 1999; Crawford *et ál.*, 2001; Dorken *et ál.*, 2002; Dorken y Barrett, 2004, Luna *et ál.* 2005). Lo que esos datos en su conjunto podrían estar indicando, es que la evolución de la dioecia en las angiospermas, está acompañada de una disminución de la variación genética desde sus primeros pasos. En otras palabras, que el evitar la endogamia a través de la separación de los sexos en distintos individuos, es menos importante de lo que teóricamente se ha supuesto (Lloyd, 1975, 1976; Charlesworth y Charlesworth, 1978; Thomson y Barrett, 1981; Sakai y Weller, 1999). Para examinar esa hipótesis, en el tercer anexo de esta tesis decidimos comparar si la depresión por endogamia o la asignación de recursos es más importante en las primeras etapas evolutivas de la dioecia. Aunque las conclusiones de nuestro estudio están basadas en pocas especies, los resultados siempre indicaron lo mismo. Es decir, que la reasignación de recursos, como esperábamos, es más importante que la depresión por endogamia en los primeros pasos de

la evolución de la dioecia a través del ginodioicismo. Si aunado a nuestros resultados anteriores, agregamos que la dioecia no solamente ha evolucionado de ancestros compatibles, sino también de especies que ya evitaban la endogamia uniparental a través de distintos mecanismos (Ver Webb 1999), entonces al contrario de lo que se ha supuesto (Lloyd, 1975, 1976; Charlesworth y Charlesworth, 1978; Thomson y Barrett, 1981; Sakai y Weller, 1999), no parecería que la ventajas selectiva de la dioecia fuera el evitar la endogamia, pues no parece ser más eficiente que otros sistemas reproductivos, sino al contrario.

Por otro lado, si como hemos sugerido en *E. havanense*, la esterilidad masculina que hace que los individuos *thrum* funcionen como hembras y los *pin* como donadores de polen, es similar a la de las especies ginodioicas (Domínguez et ál. 1997, Abarca 2000), entonces pensamos que la hipótesis que está basada en conflictos de carácter intra-genómico para explicar la transición de la dioecia a través del ginodioicismo (y que expusimos en el tercer capítulo de esta tesis), también podría explicar de manera general la evolución de la dioecia en las angiospermas, pues esta explicación si incluiría tanto a las especie incompatible como a las incompatibles. Sin embargo, para poder probarlo, aún hace falta mucho trabajo empírico al respecto, pues por ejemplo, aún son pocas las especies en donde se ha podido cuantificar la esterilidad masculina fuera de las plantas ginodioicas y menos aún, en donde se haya mostrado que la esterilidad masculina se debe a mutaciones que se originan en el genoma mitocondrial (Van Damme 1993, Kheyr-Pour 1981, Samitou-Laprade 1994).

Finalmente, si como algunos autores han propuesto, existe una relación negativa entre los niveles de variación genética y las probabilidades de extinción de una especie

(Saccheri et ál. 1998), entonces nuestros resultados podrían explicar al menos en parte, por qué entre las angiospermas la dioecia es el sistema reproductivo que presenta mayores probabilidades de extinción (Heilbuth 2000, Vamosi y Otto 2002, Vamosi y Vamosi 2005) y por lo tanto, por qué es tan poco frecuente entre ellas (Renner y Ricklefs 1995).



Conclusiones generales

- El patrón de floración y fructificación en masa de *Erythroxylum havanense* promueve que el forrajeo de los polinizadores y dispersores de semillas ocurra más dentro de los parches de floración y fructificación que entre ellos. Por lo tanto, restringe el flujo de genes.
- Una de las consecuencias del movimiento local de genes en *E. havanense* es que aún entre poblaciones muy cercanas, la diferenciación genética es significativa.
- El limitado flujo de genes también genera que las cruzas entre parientes aumenten más allá de lo esperado por el azar.
- Las cruzas entre parientes cercanos (hermanos completos) tienen como resultado que en *E. havanense* se exprese el máximo valor de depresión por endogamia (δ). Este resultado es esperable en especies incompatibles con ciclos de vida largo como *E. havanense*, pues teóricamente este tipo de características promueve que se acumule una importante carga genética.
- La diversidad genética de las poblaciones de plántulas fue menor que la de los adultos. Ello es compatible con que en *E. havanense* una fracción significativa de las cruzas ocurra entre parientes y también con la fuerte δ que hace que los individuos más variables sean los que sobrevivan.

- Los valores de diferenciación genética entre familias y entre poblaciones de plántulas de *E. havanense* fueron muy grandes, lo cual sigue siendo congruente con un flujo de genes restringido. A pesar de ello, en el fenograma construido para la progenie se observa que hay flujo genético entre las poblaciones, pues algunas familias de distintas poblaciones se encuentran en un mismo grupo.
- *E. havanense* es una especie distílica incompatible que posee una mayor diversidad genética que la especie dioica *E. rotundifolium*. Por lo tanto, rechazamos la hipótesis de Baker que propone que la dioecia y la incompatibilidad son mecanismos alternativos para evitar la endogamia.
- Como otros estudios han mostrado, en general las especies dioicas tienen menos diversidad genética que las especies no dioicas. Por lo tanto, la evolución de la dioecia en las angiospermas, como ocurre en *Erythroxylum*, podría no sólo no aumentar o mantener la variación genética respecto a su ancestro, sino disminuirla.
- A pesar de que las hipótesis que intentan explicar la separación de los sexos en distintos individuos son adaptativas, en las angiospermas la evolución de la dioecia podría tener desventajas genéticas y evolutivas respecto a otros sistemas reproductivos.

- En las especies ginodioicas la asignación de recursos a las funciones reproductivas fue más importante en el mantenimiento de las hembras que la δ . Por lo tanto, el ginodioicismo que es la ruta evolutiva más común a la dioecia, no apoya la hipótesis que asume que la δ es la principal fuerza selectiva en la evolución de la unisexualidad.
- Nuestros datos en conjunto sugieren que evitar la endogamia no es el mecanismo más importante en la evolución de la dioecia. En cambio, apoyan la hipótesis que sugiere que al separarse la producción de los gametos masculinos y femeninos en distintos individuos, se resuelve un conflicto que se establece porque genes con distintos patrones hereditarios controlan la expresión sexual.



Bibliografía General

- Abarca, C. A. 2000. El efecto de la esterilidad masculina sobre la genética de poblaciones de *Erythroxylum havanense*, implicaciones para la evolución de la heterostilia. Tesis de licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Abarca, C. A. López, A. 2007. La estimación de la endogamia y la relación entre la tasa de fecundación cruzada y los sistemas reproductivos en la plantas con flores: una interpretación de su significado evolutivo. *En Ecología Molecular*. Eguiarte, L. E; Souza, V; Aguirre, X (eds), Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, UNAM.
- Agren, J; Wilson, M. F. 1991. Gender variation and sexual differences in reproductive characters and seed production in ginodioecious *geranium maculatum*. *American Journal of Botany* 78(4): 470-480.
- Ainsworth, C. 2000. Boys and girls come out to play: The molecular biology of dioecious plants. *Annals of Botany* 86: 211-221.
- Arnold, S. J. Is there a unifying concept of sexual selection that applies to both plants and animals? *American Naturalist* 144: s1-s12
- Ashman, T-L. 1992. The relative importance of breeding and maternal sex in determining progeny fitness in *Sidalcea oregana Ssp. Spicata*, a gynodioecious plant. *Evolution* 46 (6): 1862-1874.
- (♣) Ashman, T-L; Bradburn, M; Cole, D. H; Blaney, B. H. Raguso, R. A. 2005. The scent of a male: the role of floral volatiles in pollination of a gender dimorphic plant. *Ecology* 86 (8): 2099-2105.
- Ávila, G; Domínguez, C. A. 2000. Parental effects and gender specialization in a tropical heterostylous shrub. *Evolution* 54: 866-877.
- (♣) Awadalla, P; Ritland, K. 1997. Microsatellite variation and the evolution in the *Mimulus guttatus* species complex with contrasting mating systems. *Molecular Biology and Evolution* 14(10): 1023-1034.

- Baker, H. G. 1958. Studies in the reproductive biology of West African Rubiaceae. *African Science Association* 4: 9-24.
- Baker, H. G. 1959. Reproductive methods as factor in speciation of flowering plants. *Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology* 24: 177-191.
- (♣) Baker, H. G. 1984. Some functions of dioecy in seed plants. *American Naturalist* 124(2): 149-158.
- (♣) Bañuelos, M. J; Obeso, J. R. 2003. Maternal provisioning, sibling rivalry and seed mass variability in the dioecious shrub *Rhamnus alpinus*. *Evolutionary Ecology* 17: 19-31.
- Bartish, L. V; Jeppsson, N; Nybom, H. 1999. Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular Ecology* 8: 791-802.
- Barrett, S. C. H; Eckert, C. G; 1990. Variation and evolution of mating system in seed plants. In *Biological approaches and evolutionary trends in plants*. Kawano, S. (ed), London, Academic Press.
- Barrett, S. C. H. 1992. Heterostylous genetic polymorphism: model systems for evolutionary analysis. In *Monographs in theoretical and applied genetics*. Barrett, S. C. H. (ed), Springer, Berlin Heidelberg, New York.
- Barrett, S. C. H; Harder, L. D; Worley, A. 1996. The comparative biology of pollination and mating in flowering plants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London, Series B* 351: 1271-1280.
- (♣) Baudry, E; Kerdelhué, C; Innan, H; Sttephan, W. 2001. Species and recombination effects on DNA variability in the *Tomato* genus. *Genetics* 158: 1725-1735.
- Bawa, K. S. 1990. Plant-pollinator interactions in tropical rain forest. *Annual Review in Ecology and Systematics* 21: 399-422.
- Carr, D. E; Dudash, M. R. 2003. Recent approaches into the genetic basis of inbreeding depression in plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, series B* 358: 1071-1084.

- Castric, V; Vekemans, X. 2004. Plant self-incompatibility in natural populations: a critical assessment of recent theoretical and empirical advances. *Molecular Ecology* 13: 2873-2889.
- Charlesworth, B; Charlesworth, D. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *American Naturalist* 112: 975: 997.
- Charlesworth, D; Charlesworth, B. 1979. The evolutionary genetics of sexual systems in flowering plants. *Proceedings of the Royal Society of London, series B* 205: 513-530.
- Charlesworth, D. 1981. A further study of the problem of maintenance of females in gynodioecious species. *Heredity* 46: 27-39.
- Charlesworth, B. 1991. The evolution of sex chromosomes. *Science* 251: 1030-1033.
- (♣) Charlesworth, D; Charlesworth, B. 1995. Quantitative genetics in plants: the effect of the breeding system on genetic variability. *Evolution* 49(5): 911-920.
- (♣) Charlesworth, D; Yang, Z. 1998. Allozyme diversity in *Leavenworthia* populations with different inbreeding levels. *Heredity* 81: 453-461.
- Charlesworth, D. 1999. Theories of the evolution of dioecy. In *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Geber, M. A; Dawson, T. E; Delph, L. F. (eds), Springer-Verlag, Germany.
- Charlesworth, D. 2003. Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B* 1-20.
- Charnov, E. 1982. Monographs in Population Biology, 18: the theory of sex allocation. Princeton University press, Princeton, New Jersey.
- Collevatti, R. G; Grattapaglia, D; Hay, J. D. 2001. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. *Heredity* 86: 60-67.
- Cosmides, L. M; Tooby, J. 1981. Cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict. *Journal of Theoretical Biology* 89: 83-129.

- Crawford, D. J; Ruiz, E; Stuessy, T. F; Tepe, E; Aqueveque, P; González, F. 2001. Allozyme diversity in endemic flowering plant species of the Juan Fernandez archipelago, Chile: ecological and historical factors with implications for conservation. *American journal of Botany*. 88: 2195-2203.
- Cuevas, G. E; Molina-Freaner, F; Eguiarte, L. E; Domínguez, C. A. 2005. Patterns of male sterility within and among populations of the distylous shrub *Erythroxylum havanense* (erythroxylaceae). *Plant Ecology* 176: 165-172.
- Cuevas, G. E; Abarca, C. A. 2006. Origen, mantenimiento y evolución del ginodioicismo. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 78: 33-42.
- Darwin, C. 1871. The descent of man, and selection in relation to sex. . *J. Murray*, London.
- Darwin, C. 1877. The different forms of flowers on plants of the same species. *J. Murray*, London.
- De Hann, A. A. 1996. The maintenance of male-sterility in *Plantago lanceolata* L. Ph. D. thesis. University of Heteren, Netherlands.
- Del Castillo, R. F. 1998. Fitness consequences of maternal and nonmaternal components of inbreeding in the gynodioecious *Phacelia dubia*. *Evolution* 52(1): 44-60.
- (♣) Delph, L. F; Knapczyk, F. N; Taylor, D. R. 2002. Among-population variation and correlations in sexually dimorphic trait of *Silene latifolia*. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 1011-1020.
- (♣) Delph, L. F; Wolf, D. E. 2005. Evolutionary consequences of gender plasticity in genetically dimorphic breeding systems. *New Phytologist* 166: 119-128.
- Domínguez, C. A. 1995. Genetic conflicts of interest in plants. *Trends in Ecology and Evolution* 10 (1): 412-416.
- Domínguez, C. A; Dirzo, R. 1995. Rainfall and flowering synchrony in a tropical shrub: variable selection on the flowering time of *Erythroxylum havanense*. *Evolutionary Ecology* 9: 204-216.

- Domínguez, C. A; Avila-Sakar, G; Vásquez-Santana, S; Márquez-Guzmán, J. 1997. Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American journal of Botany* 84: 626-632.
- Domínguez, C. A; Abarca, C. A; Eguiarte, L. E; Molina-Freaner, F. 2005. Local genetic differentiation among populations of the mass-flowering tropical shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *New Phytologist* 166: 663-672.
- Dorken, M. E; Friedman, J; Barrett, S.C.H. 2002. The evolution and maintenance of monoecy and dioecy in *Sagittaria latifolia* (Alismataceae). *Evolution* 56(1): 31-41.
- Dorken, M. E; Barrett, S.C.H. 2004. Chloroplast haplotype variation among monoecious and dioecious populations of *Sagittaria latifolia* (Alismataceae) in eastern North America. *Molecular Ecology* 13: 2699-2707.
- Doyle, J. J; Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Dvorak, J; Luo, M, C; Yang, Z, L. 1998. Restriction fragment length polymorphism and the divergence in the genomic regions of high and low recombination in self-fertilizing and cross-fertilizing *Aegilops* species. *Genetics* 148: 423-434.
- Eckhart, V. M. 1992. Resource compensation and the evolution of gynodioecy in *Phacelia linearis* (Hydrophyllaceae). *Evolution* 46(5): 1313-1328.
- Frank, S. A. 1989. The evolutionary dynamics of cytoplasmic male sterility. *American Naturalist* 133: 345-376.
- Fetscher, E. A. 2001. Resolution of male-female conflict in an hermaphroditic flower. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 268: 525-529.
- (♣) Filatov, D. A; Laporte, V; Vitte, C; Charlesworth, D. 2001. DNA diversity in sex-linked and autosomal genes of the plant species *Silene latifolia* and *Silene dioica*. *Molecular Biology and Evolution* 18(8): 1442-1454.
- Fisher, R. A. 1941. Average excess and average effect of a gene substitution. *Ann. Eugen.* 11: 53-63.

- Freeman, D. C; Doust, J. L; El-Keblawy A; Miglia, K. J; Macarthur, E. D. 1997. Sexual specialization and inbreeding avoidance in the evolution of dioecy. *The Botanical Review* 63(1): 66- 92.
- Ganders, F. R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607-635.
- Geber, M. A. 1999. Theories of evolution of sexual dimorphism. In *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Geber, M. A; Dawson, T. E; Delph, L. F (eds), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Glémin, S; Gaude, T; Guillemin, M; Lournas, M; Olivieri, I; Mignot, A. 2005. Balancing selection in the wild: testing population genetic theory of self-incompatibility in the rare species *Brassica insularis* *Genetics* 171(1): 279-289.
- Grant, V. 1994. Sexual selection in plants: pros and cons. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America* 92: 1247-1250.
- Gross, C. L. 2005. A comparison of the sexual systems in the trees from the Australian tropics with other tropical biomes- more monoecy but why? *American Journal of Botany* 92(6): 907-919.
- Gryj, E. O; Domínguez, C. A. 1996. Fruit removal and postdispersal survivorship in the tropical dry forest tree *Erythroxylum havanense*: ecological and evolutionary implications. *Oecologia* 108: 368-374.
- Hardner, C. M; Potts, B. M; Gore, P. T. 1998. The relationship between success and spatial proximity of *Eucalyptus globules ssp. Globulus* parents. *Evolution* 52 (2): 614-618.
- Hedrick, P. 2000. *Genetics of populations*. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts.
- Heilbuth, J. C. 2000. Lower species richness in dioecios clade. *American Naturalist* 156: 221-241.
- Heilbuth, J. C; Ilves, K. L; Otto, S. P. 2001. The consequence of dioecy for seed dispersal: modeling the seed-shadow handicap. *Evolution* 55(5): 880-888.

- Holsinger, K. E. 2000. Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proceedings of the National Academy of Science of United States of America* 97(13): 7037-7042.
- (♣) Humeau, L; Pailler, T; Thompson, J. D. 1999. Cryptic dioecy and leaky dioecy in endemic species of *Dombeya* (Sterculiaceae) on La Reunion. *American Journal of Botany* 86(10): 1437-1447.
- Hurst, D. L. 1992. Intragenomic conflict as an evolutionary force. *Proceedings of the Royal Society of London* 284: 135-140.
- Husband, B. C; Schemske, D. W. 1996. Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution* 50(1): 54-70.
- Hurst, D. D. G; Hurst, D. L; Johnstone, R. A. 1992. Intranuclear conflict and its role in Evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 7(11): 373-378.
- Jolls, C; Chenier, T. C. 1989. Gynodioecy in *Silene Vulgaris* (Caryophyllaceae): progeny success, experimental design, and maternal effects. *American Journal of Botany* 76(9): 1360-1367.
- Kelly, L. M. 2001. Erythroxylaceae Kunth. *En Flora del Valle de Tehuacan-Cuicatlán*. Kelly, L. M; Ochotorena, H; Medina, R (eds), Instituto de Biología, UNAM, México, D. F. Fascículo 33: 1-4.
- Kheyr-Pour, A. 1981. Wide nucleo-cytoplasmic polymorphism for male sterility in *Origanum vulgare*. *Journal of Heredity* 72: 45-71.
- Khon, J. R. 1989. Sex ratio, Seed production, Biomass allocation, and the cost of male function in *Cucurbita foetidissima* HBK (Cucurbitaceae). *Evolution* 43(7): 1424-1434.
- Kohn, J; Biardi, J. 1995. Outcrossing rates and inferred levels of inbreeding depression in gynodioecious *Cucurbita foetidissima* (Cucurbitaceae). *Heredity* 75: 77-83.
- Koelewijn, H. 1996. Sexual differences in the reproductive characters in gynodioecious *Plantago cronopus*. *Oikos* 75: 443-452.
- (♣) Kraft, T; Sall, T; Magnusson-Rading, I; Nilsson, N.O; Halldén, C. 1998. Positive correlation between recombination rates and levels of genetic variation in

- natural populations of sea beet (*Beta vulgaris* subsp. *maritima*). *Genetics* 150: 1239-1244.
- Lack, A. J; Kevan, P. G. 1987. The reproductive biology of a distylous tree, *Sarchotecha celebica* (Oxalidaceae) in Salawesi, Indonesia. *Botanical Journal of Linnaean Society* 95: 1-8.
 - Lande, R; Schemske, D. W. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. 1. Genetic models. *Evolution* 38: 116-127.
 - (♣) Lewis, D. 1941. Male sterility in natural populations of hermaphrodite plants. *New Phytologist* 40: 56-63.
 - (♣) Lui, F; Charlesworth, D; Kreitman, M. 1999. The effect of mating system differences on nucleotide diversity at the phosphoglucose isomerase locus in the plant genus *Leavenworthia*. *Genetics* 151: 343-357.
 - Luna, R; Epperson, B. K; Oyama, K. 2007. High levels of genetic variability and inbreeding in two Neotropical dioecious palms with contrasting life histories . *Heredity*. 99: 466-476.
 - Lloyd, D. G. 1975 b. The maintenance of gynodioecy and androdioecy in angiosperms. *Genetica* 45: 325: 339.
 - Lloyd, D. G. 1976. The transmission of genes via pollen and ovules in gynodioecious angiosperms. *Theoretical and population biology* 9: 299-316.
 - Lloyd, D. G. 1979. Evolution towards dioecy in heterostylous populations. *Plant systematics and evolution* 131: 71-80.
 - Lloyd, D. G; Webb, C. J; Dulberg, R. 1990. Heterostyly in species *Narcissus* (Amarillydaceae), *Hgonia* (Linaceae) and other disputed cases. *Plant systematics and evolution* 1722: 215-227.
 - Lloyd, D. G; Webb, C. J. 1992. The evolution of heterostyly in Monographs on theoretical and applied genetics. Barrett, S. C. H. Springer, Berlin Heilderberg, 270 pp.
 - Maki, M. 1993. Outcrossing and fecundity advantage of females in gynodioecious *Chionographis japonica* Var. *Kurohimensis* (Liliaceae). *American journal of Botany* 80(6): 629-634.

- Marshall, M; Ganders, F. 2001. Sex-biased seed predation and the maintenance of females in a gynodioecious plant. *American Journal of botany*. 88: 1437-1443.
- Matallana, G; Wendt, T; Araujo, D. S. D; Scarano, F. R. 2005. High abundance of dioecious plants in a tropical coastal vegetation. *American Journal of Botany* 92(9): 1513-1519.
- (♣) Maurice, S; Belhassen, E; Couvet, D; Gouyon, P, H. 1994. Evolution of dioecy: can nuclear-cytoplasmic interaction select for maleness? *Heredity* 73: 346-354.
- Maynard Smith, J; Haigh, J. 1995. The major transitions in evolution. Oxford: *Freeman*. 364 pp.
- Miller, C. R. Waits, L. P. 2003. The history of effective population size and genetic diversity in the Yellowstone grizzly (*Ursus arctos*): implications for conservation. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 100 (7): 4334-4339.
- Molina-Freaner, F; Jain, S. K. 1993. Inbreeding effects a gynodioecious population of the colonizing species *Trifolium hirtum* All. *Evolution* 47: 1472-1479.
- Morris, A. B; Baucom, R. S; Cruzan, M. B. 2002. Stratified analysis of the soil seed bank in the cedar glade endemic *Astragalus bibulatus*: evidence for historical changes in genetic structure. *American Journal of Botany* 89(1): 29-36.
- Mutikainen, P; Delph, L. F. 1998. Inbreeding depression in gynodioecious *Lobelia siphilitica*: among-family differences override between-morph differences. *Evolution* 52(6): 1572-1582.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 70: 3321-3323.
- Newman, D; Pilson, D. 1997. Increased probability of extinction due to decreased genetic effective population size: experimental populations of *Clarkia pulchella* 51 (2): 354-362.
- Norman, J. K. A; Sakai, A. K; Weller, S. G; Dawson, T. D. 1995. Inbreeding depression in morphological and physiological traits of *Schiedea lydgatei* (Caryophyllaceae) in two environments. *Evolution* 49: 297-306.

- (♣) Olson, M. S; Antovics, J. 2000. Correlation between male and female reproduction in the subdioecious herb *Astilbe biternata* (Saxifragaceae). *American Journal of Botany* 87(6): 837-844.
- Opler, P. A. Baker, H. G; Frankie, G. W. 1975. Reproductive biology of some Costa Rican *Cordia* species (Biraginaceae). *Biotropica* 7: 234-247.
- Ornduff, R. 1966. The origin of dioecism from heterostyly in *Nimphoides* (Menyanthaceae). *Evolution* 20: 309-314.
- Peters, A. D; Halligan, D.L; Whitlock, M. C; Keightley, P. D. 2003. Dominance and overdominance of mildly deleterious induced mutations for fitness traits in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 165: 589-599.
- Patridge, L; Hurst, L. D. 1998. Sex and conflict. *Science* 281: 2003-2007.
- Renner, S. S; Ricklefs, R. E. 1995. Dioecy and its correlates in the flowering plants. *American Journal of Botany* 82: 596-606.
- Richards, A. J. 1986. Plant breeding systems. *G. Allen and Unwin*, London Boston.
- Ritland, K. 1996. Multilocus mating system program-MLTR. Available free of charge via rtp at 128.100.165.100.
- Rottemberg, A; Zohary, D; and Nevo. E. Patterns of isozyme diversity and vegetative reproduction of willows in Israel. *International Journal of Plant Science*. 160: 561-566.
- Saccheri, I; Kuussaari, M; Kankare, M; Vikman, P; Fortelius, W; Hanski, L. 1998. Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392: 491-494.
- Sakai, A. K; Karoly, K; Weller, S. G. 1989. Inbreeding depression in *Schiedea globosa* and *S. Salicaria* (Caryophyllaceae), subdioecious and gynodioecious Hawaiian species. *American journal of Botany* 76(3): 437-444.
- Sakai, A. K; Wagner, W. L; Ferguson, D. M; Herbst, D. R. 1995. Origins of dioecy in the Hawaiian flora. *Ecology* 76(8): 2517-2529.
- Sakai, A. K; Weller, S. G; Chen, M; Chou, S; Tسانont, C. 1997. Evolution of gynodioecy and maintenance of females: the role of inbreeding depression, outcrossing rate, and resource allocation in *Schiedea adamantis* (Caryophyllaceae). *Evolution* 51(3): 724-736.

- Sakai, A. K; Weller, S. 1999. Gender and sexual dimorphism in flowering plants: a review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates, and phylogenetic approaches. *In Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Geber, M. A; Dawson, T. E; Delph, L. F. (eds), Springer-Verlag, Germany.
- Samitou-Leprade, P. 1994. Cytoplasmic male sterility in plants: molecular evidence and the neocyttoplasmic conflict. *Trends in Ecology and Evolution* 9 (11):
- (♣) Savolainen, O; Langley, C.H; Lazzaro, B. P; Fréville, H. 2000. Contrasting patterns of nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus in the outcrossing *Arabidopsis lyrata* and the selfing *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Biology and evolution* 17(4): 645-655.
- (♣) Schoen, D. J; Brown, A. H. D. 1991. Intraspecific variation in population gene diversity and effective population size correlates with the mating system in plants. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 88: 4494-4497.
- Shykoff, J. 1988. Maintenance of gynodioecy in *Silene acaulis* (Caryophyllaceae): stage specific fecundity and viability selection. *American Journal of Botany* 75: 844-850.
- (♣) Stanton, M.L. 1987. Reproductive biology of petal color variants in wild populations of *Raphanuss sativus*: I. pollinator response to color morphs. *American Journal of Botany* 74(2): 178-187.
- Sun, M; Ganders, F. R. 1986. Female frequencies in gynodioecious populations correlated with selfing rates in hermaphrodites. *American Journal of Botany* 73 (11): 1645-1648.
- Stehlik, I; Barrett, S. C. H. 2005. Mechanism governing sex-ratio variation in dioecios *Rumex nivalis*. *Evolution* 59(4): 814-825.
- Sweigart, A.L; Willis, J. H. 2003. Patterns of nucleotide diversity in two species of *Mimulus* are affected by mating system and asymmetric introgression. *Evolution* 57(11): 2490-2506.

- Tarayre, M; Thompson, J. D. 1997. Population genetic structure of the gynodioecious *Thymus vulgaris* L. (Labiatae) in southern France. *Journal of Evolutionary Biology* 10: 157-174.
- Terauchi, R; Terachi, T; Miyashita, N. T. 1997. DNA polymorphism at the *pgi* locus of a wild yam, *Dioscorea tokoro*. *Genetica* 147: 1899-1914.
- Thompson, J. D; Barrett, S. C. H. 1981. Selection for outcrossing, sexual selection, and the evolution of dioecy in plants. *American Naturalist* 118: 443-449.
- Thompson, J. D; Brunet, J. 1990. Hypotheses for the evolution of dioecy in seed plants. *Trends in Ecology and Evolution* 5(1): 1-16.
- Thompson, J. D; Tarayre, M. 2000. Exploring the genetic basis and proximate causes of female fertility advantage in gynodioecious *Thymus vulgaris*. *Evolution* 54(5): 1510-1520.
- Uyenoyama, M. K. 1988. On the evolution of genetic incompatibility systems. III. Introduction of weak gametophytic self-incompatibility under partial inbreeding. *Theoretical population Biology* 34: 47-91.
- Uyenoyama, M. K. 1989. On the evolution of genetic incompatibility systems. IV. Origin of sporophytic self-incompatibility in response to overdominance in viability. *Theoretical population Biology* 36: 339-365.
- Uyenoyama, M. K. 2000. The evolution of breeding systems in *Evolutionary genetics: from molecules to morphology*. Singh, R. S; Krimbas, C. (eds), Cambridge, United Kingdom.
- Vamosi, J. C; Otto, S. P. 2002. When looks can kill: the evolution of sexually dimorphic floral display and the extinction of dioecious plants. *Proceedings of Royal Society of London, series B* 269: 1187-1194.
- Vamosi, J. C; Otto, S. P; Barrett, S. C. H. 2003. Phylogenetic analysis of the ecological correlates of dioecy in angiosperms. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 1006-1018.
- (♣) Vamosi, J. C; Vamosi, S. M. 2004. The role of diversification in causing the correlates of dioecy. *Evolution* 58(4): 723-731.

- Vamosi, J. C; Vamosi, S. M. 2005. Present day risk of extinction may exacerbate the lower species richness of dioecious clades. *Diversity and Distribution* 11: 25-32.
- Van Damme, J. M. M; Van Delden, W. 1984. Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. IV. Fitness components of sex types in different life cycle stage. *Evolution* 38: 1326-1336.
- Van Damme, J. M. 1993. Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. II. Inheritance of male sterility types. *Heredity* 50: 253-273.
- Vekemans, X; Lefeburec, C; Beialla, L; Meerts, P. 1990. The evolution and breakdown of the heteromorphic incompatibility system of *Armeria maritima* revisited. *Evolutionary Trends in Plants* 4(1): 15-23.
- Ward, M; Dick, C.W; Gribel, R; Lowe, A.J. 2005. To self, or not to self... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. *Heredity* 95: 246-254.
- Waycott, M; Walker, D. I; James, S. H. 1996. Genetic uniformity in *Amphibolis Antarctica*, a dioecious seagrass. *Heredity* 76: 578-585.
- Waycott, M; Sampson, J. F. 1997. The mating system of an hydrophilous angiosperm *posidonia australis* (Posidoniaceae). *American Journal of Botany* 84(5): 621-625.
- Waytt, R. 1983. Pollinator-plant interactions and the evolution of breeding systems. In *Pollination Biology*. Real, L (ed), Academic press, Orlando.
- Webb, C. J. 1999. Empirical studies: evolution and maintenance of dimorphic breeding systems. In *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Geber, M. A; Dawson, T. E; Delph, L. F. (eds), Springer-Verlag, Germany.
- Weller, S. G; Sakai, A. K; Wagner, W. L; Herbst, D. R. 1990. Evolution of dioecy in *Schiedea* (Caryophyllaceae) in the Hawaiian islands: biogeographical and ecological factors. *Systematic Botany* 15(2): 266-276.
- Williams, J. G. K; Kubelik, A. R; Livak, K. J; Rafalski, J. A; Tingey, S. V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

- Wolff, K; Friso, B; Van Damme, J. M. M. 1988. Outcrossing rates and male sterility in natural populations of *Plantago coronopus*. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 190-196.
- Wright, S. I; Lauga, B; Charlesworth, D. 2002. Rates and patterns of molecular evolution in inbred and outbred *Arabidopsis*. *Molecular Biology and Evolution* 19(9): 1407-1420.
- (♣) Wright, S. I; Lauga, B; Charlesworth, D. 2003. Subdivision and haplotype structure in natural populations of *Arabidopsis lyrata*. *Molecular Ecology* 12: 1247- 1263.



Local genetic differentiation among populations of the mass-flowering tropical shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae)

César A. Domínguez¹, César A. Abarca¹, Luis E. Eguiarte¹ and Francisco Molina-Freaner²

¹Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, UNAM AP 70-275, México, DF 04510 Mexico; ²Departamento de Ecología de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, UNAM AP 1354, Hermosillo, Sonora 83000, Mexico

Summary

Author for correspondence:
César A. Domínguez
Tel: +52 55 56229039
Fax: +52 55 56161976
Email: tejada@servidor.unam.mx
Received: 13 December 2004
Accepted: 14 December 2004

- This study is aimed to understand the role of life-history traits in determining the genetic structure of populations. We used *Erythroxylum havanense*, a distylous shrub with synchronous and massive patterns of flowering and fruiting. We suggest that the high concentration of ephemeral resources produced by mass flowering satiates both pollinators and frugivores, restricting gene flow and leading to genetic differentiation among populations.
- Using random amplified polymorphic DNAs as genetic markers, we estimated genetic diversity and structure statistics to quantify the amount and distribution of genetic variation within and among five populations from the Pacific coast of Mexico.
- High levels of genetic variation within populations and significant differentiation among populations located very near to each other were found. Furthermore, spatial autocorrelation analysis indicated the presence of significant genetic structure at short spatial distances.
- We suggest that by influencing the foraging behavior of pollinators and frugivores, mass flowering may produce the observed patterns of genetic structure, while small differences in flowering or fruiting phenology could further reinforce the isolation of nearby populations.

Key words: AMOVA (analysis of molecular variance), distyly, Erythroxylaceae, genetic structure, local genetic differentiation, mass flowering, Mexico, random amplified polymorphic DNA (RAPD).

New Phytologist (2005) **166**: 663–672

© *New Phytologist* (2005) doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01359.x

Introduction

Under island and stepping-stone models of population structure, genetic differentiation is inversely proportional to the average effective rate of gene flow among populations (Hartl & Clark, 1997). Empirical evidence for flowering plants has shown that several attributes of the mating and gene dispersal system associated with the potential for gene flow affect the levels of differentiation among populations (Hamrick & Godt, 1996; Nybom & Bartish, 2000). For example, species with a predominant selfing breeding system, or seed dispersal by gravity, usually exhibit greater differentiation among populations, presumably owing to

restricted gene flow (Hamrick & Godt, 1996). However, other reproductive attributes that potentially influence the potential for gene flow such as flowering phenology have seldom been explored.

Flowering phenology refers to the seasonal timing of flowering (Rathcke & Lacey, 1985) and represents the window of opportunity for pollen-mediated gene flow in plants. Flowering duration within populations can last from a single day to the entire year among species (Rathcke & Lacey, 1985), setting different opportunities for pollen movement. Mass flowering represents the most extreme example of flowering synchrony at both the individual and population level (Frankie *et al.*, 1974; Gentry, 1978; Domínguez & Dirzo,

1995). Flowering synchrony can influence the levels of gene flow and differentiation among populations depending on the effects on other organisms such as pollinators and seed dispersers (Rathcke & Lacey, 1985; Domínguez & Dirzo, 1995). High levels of synchrony at both the individual and population level may increase the number of pollinators attracted to flowers (Augsburger, 1980, 1981; Domínguez *et al.*, 1997), and the rates of outcrossing in self-compatible species. Conversely, by producing a high concentration of resources, mass flowering may promote geitonogamy (de Jong *et al.*, 1992) and nearest-neighbor pollination if pollinators respond in a density-dependent manner and are locally satiated, thus restricting pollen-mediated gene flow. If mass-flowering results in synchronous fruit ripening in animal dispersed species (Gryj & Domínguez, 1996), the high concentration of fruit resources in a short time may have a similar effect, satiating frugivores and restricting seed-mediated gene flow (Loiselle *et al.*, 1995a). However, our knowledge of levels of gene flow and genetic differentiation in mass-flowering species is rather poor. Accordingly, it would be relevant to determine the levels of genetic differentiation in mass flowering species and contrast it with theoretical expectations.

Erythroxylum havanense Jacq. (Erythroxylaceae) is a perennial distylous tropical shrub with an extreme pattern of mass flowering (Domínguez & Dirzo, 1995). Flowering in this species begins shortly after the first heavy rains of the wet season when soil humidity reaches the threshold that triggers flowering (Domínguez & Dirzo, 1995). The average flowering period of an individual is only 3 d and populations typically flower for 6 d (Domínguez & Dirzo, 1995). By contrast, most species in the community flower from 1 to 5 months (Bullock & Solís-Magallanes, 1990). The mass-flowering pattern of *E. havanense*, along with its patchy distribution (Avila & Domínguez, 2000), produce arrays of plants (physical and phenological patches) with a high and ephemeral concentration of resources exploited by bees that forage in a density-dependent manner (Domínguez *et al.*, 1997). Moreover, variation in ripening times among individuals closely reflects the variation in flowering times (Gryj & Domínguez, 1996). Thus, synchronous ripening within and among plants from a fruiting patch, along with fast fruit removal rates, produce a high and ephemeral concentration of resources for opportunistic frugivores (Gryj & Domínguez, 1996).

In this paper we describe the genetic structure of five populations located very near from each other (average distance 11 km) in the Chamela region of the Pacific coast of Mexico. The mass-flowering behavior of *E. havanense* raises the issue of whether this pattern has repercussions for gene flow and population genetic differentiation. We hypothesize that while enhancing the rates of pollen transfer and seed production within flowering patches (Domínguez & Dirzo, 1995), the high concentration of ephemeral resources produced by mass flowering restricts gene flow among subpopulations. Consequently, we expect that individual flowering patches behave as

almost panmictic populations, while genetic differentiation is expected among flowering patches separated by a few-hundred meters. Genetic differentiation could be further reinforced because the frugivorous birds that consume this species' fruits drop most of the seeds in the vicinity of the fruiting patch (Gryj & Domínguez, 1996). Hence, in order to evaluate the patterns of fine-scale spatial genetic structure, we performed a spatial autocorrelation analysis among plants belonging to the same flowering patch.

Materials and Methods

Study site

This study was carried out in the region of Chamela, Jalisco, Mexico, located near the Pacific coast of Mexico (19°30' N, 105°03' W). Mean annual rainfall (1977–91) is 707 mm, and 80% of the total precipitation falls between the months of July and October (Bullock, 1986). A detailed description of the climate, flora and vegetation structure of the Chamela region can be found in Bullock (1986), Lott (1993) and Lott *et al.* (1987), respectively (see also Noguera *et al.*, 2002).

Plant species

Erythroxylum havanense is an understory perennial distylous shrub, with complete intramorph incompatibility (Domínguez *et al.*, 1997). It has an aggregated distribution forming patches of 20–100 individuals in which the proportion of pin and thrums is generally 1 : 1. Flowering begins shortly (7–10 d) after the first heavy rains that mark the beginning of the wet season (Domínguez & Dirzo, 1995). An average individual has flowers during only 3 d (± 0.1 , mean \pm SE hereafter), with most flowers (approx. 80%) opening on one peak day. The flowering period of a patch lasts only 6 d (± 0.9) and synchrony between patches may vary among years depending on the intensity of the first rains (Domínguez & Dirzo, 1995). Individual flowers may last only 3–5 h (Domínguez & Dirzo, 1995; C. A. Domínguez, pers. obs.) and are pollinated mainly by bees of the genera *Trigona* (Apidae) and *Xylocopa* (Anthophoridae) (Domínguez *et al.*, 1997). Moreover, flowering phenology explains 87% of the variance in ripening time; hence, the fruiting pattern of *E. havanense* is characterized by a high concentration of resources during a very short period (Gryj & Domínguez, 1996). The average individual fruiting period (the time an individual plant had ripe fruits) lasts only 12 d (± 0.66), while that of the population is 37 d (Gryj & Domínguez, 1996). This period is very short compared with the average fruiting season of 88 d (± 7.9) of a sample of 107 fleshy-fruited Neotropical species (Gryj & Domínguez, 1996). When mature, fruits are bright-red, ovoid drupes that are dispersed by several species of birds that drop most of the seeds in the vicinity of the fruiting patch (Gryj & Domínguez, 1996).

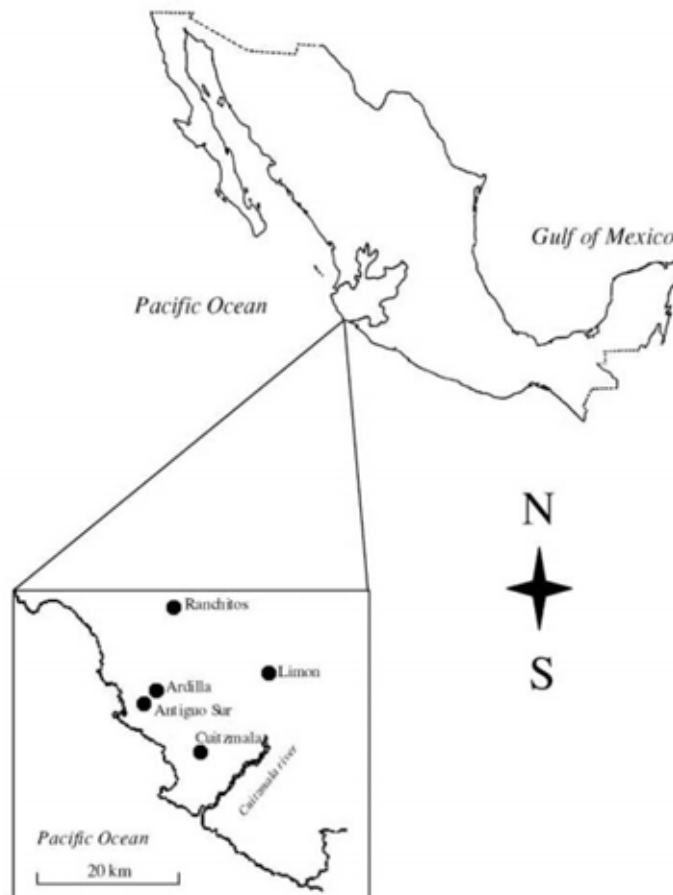


Fig. 1 Map showing the location of the five populations of *Erythroxylum havanense* sampled in this study.

Data collection

Sampling procedures. Five populations of *E. havanense* were chosen in the Chamela region in western Mexico (Fig. 1). Two populations were located on the Chamela Biological Station (Antiguo Sur and Ardilla); the other populations were located south (Cuitzmalá), east (Limon) and north (Ranchitos) of the station. In each population we marked all the individuals of *E. havanense* (range 36–137), and 22–36 reproductive individuals were randomly selected for genetic analyses. An average of 29 individuals per population was used for DNA extraction and for random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker analyses.

DNA extraction and RAPD amplifications. For RAPD analyses we collected young leaf material from all selected individuals from each population. DNA was extracted using the cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method (Doyle & Doyle,

1987). The DNA concentration was measured using a Hoefer fluorometer (Dynaquant 200, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA), and all samples were adjusted to a concentration of $25 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$ for polymerase chain reaction (PCR). Amplification reactions were performed in a 25- μl volume containing 50 ng template DNA, 1.25 units of *Taq* DNA polymerase (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA), 0.1 mM each dNTP (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), and 1 μM primer (Gibco BRL), in 1 \times reaction buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl_2) using a Perkin-Elmer 480 thermal cycler. The amplification cycle consisted of an initial 3 min denaturation at 94°C ; followed by 44 cycles of 1 min denaturation (94°C), 1 min annealing (36°C), and a 2.5 min extension (72°C); with a final 10-min extension at 72°C . Amplification products were separated on 1.6% agarose gels using a 1 \times TBE (0.09 M Tris, 0.09 M Boric acid, 0.01 M EDTA) running buffer. Gels were stained with ethidium bromide and visualized under UV light. Five primers

from Operon Technologies (Alameda, CA, USA) were used: 5A, 7B, 10A, 17A, and 11B. To aid interpretation of band identity between gels, each contained a Gene Ruler DNA ladder mix (Gibco BRL). Reproducibility and repeatability of amplification profiles were tested for each primer. Control samples containing all reaction material except DNA were used to test that no self-amplification or DNA contamination occurred.

Data analyses

Analyses of population genetic structure using RAPD markers can be carried out using different approaches. For example, it has been shown that the exclusion of fragments with low frequency in each population (Lynch & Milligan, 1994) results in F_{ST} values concordant with those estimated from codominant allozyme markers (Aagaard *et al.*, 1998; Jencowski *et al.*, 1999; Nybom & Bartish, 2000). Other methods such as the Shannon's index for genetic diversity (Lewontin, 1972; King & Schaal, 1989; Bussell, 1999) and Analysis of Molecular Variance (Excoffier *et al.*, 1992) have been successfully applied to describe the genetic structure of plants (Huff *et al.*, 1993; Bussell, 1999; Martín & Hernández-Bermejo, 2000; Nybom & Bartish, 2000; Müller-Schärer & Fischer, 2001; Sales *et al.*, 2001). Both the calculation of allelic frequencies and the analysis of molecular variance require assumptions about the levels of selfing and null homozygote frequencies and their relationship to heterozygosity (Bussell, 1999). Because *E. havanense* is an obligated outcrosser it is possible to assume that selfing is absent in this species, but given that this is only an assumption we also used the Shannon's index approach that makes no assumptions regarding the levels of heterozygosity. Accordingly, we used all three approaches to a more thoroughly characterization of the genetic structure of *E. havanense*.

We first assumed that populations are at Hardy-Weinberg equilibrium and that each band represents the dominant phenotype of a single biallelic locus (Williams *et al.*, 1990). Amplified fragments, named by the primer used and the molecular mass in base pairs (bp) were scored as present or absent in each individual. Allelic frequencies were then calculated on the basis of Taylor expansion and only those bands whose observed frequency is less than $1 - (3/N)$ were used for obtaining unbiased estimates (Lynch & Milligan, 1994). Allelic frequencies were then used to calculate the expected heterozygosity and population differentiation (Weir & Cockerham, 1984; Hartl & Clark, 1997). Genetic distances among populations were also calculated using Nei (1978) unbiased method, and then used to construct an UPGMA phenogram.

In order to describe the amount of RAPD genetic diversity without relying in the Hardy-Weinberg equilibrium assumption, we used the Shannon's information measure (H' , Lewontin, 1972; King & Schaal, 1989). This was calculated at two levels: the average diversity within populations (H'_{pop}), and the total diversity (H'_{sp}). The proportion of diversity within populations was then estimated as H'_{pop}/H'_{sp} , and

the proportion of molecular diversity among populations as $(H'_{sp} - H'_{pop})/H'_{sp}$.

Analyses of molecular variance were performed by means of the AMOVA 1.55 program (University of Geneva, Geneva, Switzerland) (Excoffier *et al.*, 1992). Only bands that fulfilled the Lynch and Milligan (1994) criterion were included within the analyses. Selected bands were analysed directly as phenotypes using the Euclidean distance matrix (Excoffier *et al.*, 1992). An AMOVA allowed us to calculate variance components and their significance for the among-populations and within-population levels. We also extracted the analogues of F_{ST} statistics as well as the pairwise genetic distances among the five populations. Homogeneity of molecular variance in pairs of populations was tested with Bartlett's test, which is also implemented in the program AMOVA 1.55. In order to explore the relationships among populations, the pairwise Φ_{ST} values produced by AMOVA were used to construct an UPGMA tree.

Fine-scale population structure was further analysed by using the spatial autocorrelation analysis developed by Smouse & Peakall (1999); this is a multivariate method based on multiallelic, multilocus genetic distances. By contrast with other methods, this procedure treats the genetic data set as a whole, strengthening the spatial signal and reducing the stochastic noise produced by allele to allele or locus to locus approaches. We performed a multilocus spatial autocorrelation analysis with plants from the Ardilla population. This population was chosen because it had the highest number of sampled plants and because we knew its recent history of flowering. Plants were located within a 50 × 50 m plot, which in turn was immersed in a larger population. Genetic spatial autocorrelation coefficients between all pairs of individuals (r) were calculated by using the Spatial Autocorrelation procedure in the GENALEX v5.1 program from Peakall & Smouse (2001). Microgeographical distance classes were set to 5 m. Tests for statistical significance were performed by random permutation to produce a 95% confidence interval of random genetic variation with respect to spatial position. Because models of restricted dispersal predict positive autocorrelation at short distances, we also report one-tailed tests for positive spatial structure (Smouse & Peakall, 1999; Peakall *et al.*, 2003).

Results

The RAPD assays revealed a large amount of variation (Table 1), with the five primers amplifying a total of 51 repeatable DNA fragments. The amplified products ranged from 0.3 kb to 1.5 kb. Among the 51 repeatable bands, 45 were polymorphic, and 41 fulfilled Lynch & Milligan's (1994) condition for obtaining unbiased estimates of allelic frequencies. *Erythroxylum havanense* showed high levels of genetic variation within and among populations. The 144 individuals of *E. havanense* belonged to 123 different RAPD phenotypes. Expected heterozygosity values ranged from 0.36 at Limon to 0.47 at the Ardilla population (Table 1). Populations within the Biological Station

Table 1 Estimates of genetic diversity for five closely located populations of *Erythroxylum havanense* from the Pacific coast of Mexico

Population	<i>n</i>	H_e	H'
Ranchitos	27	0.437 (0.0080)	0.57
Ardilla	36	0.475 (0.0037)	0.73
Antiguo Sur	23	0.463 (0.0049)	0.87
Cuitzmala	22	0.417 (0.0142)	0.82
Limon	36	0.363 (0.0271)	0.47

Expected heterozygosity (H_e) was calculated assuming that populations are at Hardy–Weinberg equilibrium and that each random amplified polymorphic DNA (RAPD) band represents the dominant phenotype of a single biallelic locus. The Shannon's information index (H') provides a measure of genetic diversity that does not rely on the Hardy–Weinberg equilibrium. *n*, Number of individuals scored. Standard errors are in parentheses.

(Antiguo Sur and Ardilla) showed the highest expected heterozygosities. Differences among populations accounted for 9.4% of the genetic variation of this species ($F_{ST} = 0.094$). A bootstrap-derived confidence interval (1000 permutations)

indicated that this value significantly differs from zero (95% confidence interval 0.077–0.112). An exact test of population differentiation (Raymond & Rousset, 1995) showed that except for two pairs (Ranchitos–Ardilla and Ranchitos–Limon), allelic frequencies differed between all pairs of populations despite the relatively short distances separating them (range 1.5–19.75 km).

The average Nei's unbiased genetic distance among populations was 0.086. The lowest genetic distance was between the Ranchitos and Ardilla populations (0.011); while Limon and Cuitzmala were the most dissimilar (0.267). The UPGMA phenogram produced two main clusters, one including the Cuitzmala and Antiguo Sur populations and other including Limon and a cluster formed by the Ardilla and Ranchitos populations (Fig. 2a). Populations located close to each other appear on separate branches of the phenogram, suggesting that there is little relationship between genetic and geographic distances. An analysis of isolation by distance confirmed this, as it showed no relationship between physical distances and the F_{ST} values between pairs of populations (Mantel test, $r = 0.3$, $P = 0.21$).

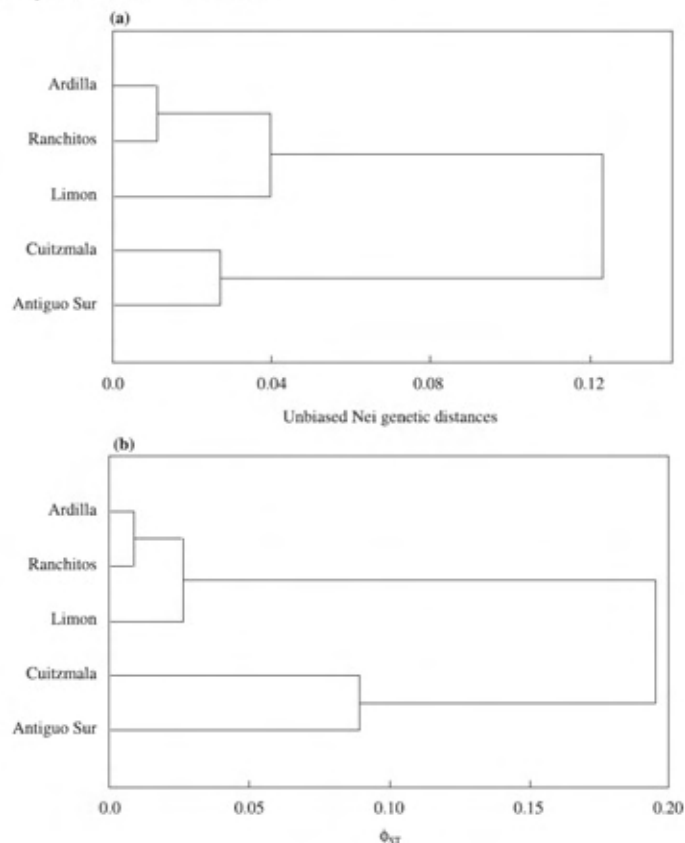


Fig. 2 UPGMA phenograms constructed using (a) Nei's (1978) unbiased genetic distance and (b) pairwise F_{ST} derived from an analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular variance in five populations of *Erythroxylum havanense* from the Pacific coast of Mexico.

Table 2 Summary of the analysis of molecular variance (AMOVA) performed on five populations of *Erythroxylum havanense* from western Mexico

Source of variation	df	VC	% Total	P
Among populations	4	0.67	13.76	< 0.0002
Within populations	139	4.19	86.24	< 0.0002
Total	143			

VC, variance-components estimates; % Total, percentages of the total variance contributed by each component.

Genetic diversity measures based on the calculation of Shannon's index were slightly different from those based on allelic frequencies. Although both measurements indicated high levels of genetic diversity, populations were in a different order. The Antiguo Sur and Cuitzmala populations had the highest mean genetic diversities, and Limon had the lowest value (Table 1). The mean diversity within the five populations of *E. havanense* was $H'_{pop} = 0.692$, and the total diversity was $H'_{sp} = 0.76$. The proportion of within population genetic variation (H'_{pop}/H'_{sp}) was 0.9046, and consequently 9.54% of the RAPD genetic diversity was due to the among population level.

Analyses of molecular variance were in agreement with those derived from the analysis of allelic frequencies. Highly significant genetic differences ($P < 0.0002$) exist among populations and among individuals within populations (Table 2). Of the total molecular variance, 13.76% was attributable to population differences and 86.24% to individual differences within populations. Bartlett's test for homogeneity of the RAPD variance among populations indicated a strong and significant heterogeneity among the *E. havanense* populations ($P = 0.007$). Eight out of 10 pairwise comparisons were significantly different in heterogeneity. As was the case for the analyses based on the allelic frequencies, the Ranchitos population did not differ significantly from the Ardilla and Limon populations. Genetic distances among populations (ϕ_{ST}) also revealed a significant genetic differentiation. All pairwise distances were significantly different from zero, except pairs formed between the Ardilla, Ranchitos and Limon populations (Table 3). Geographical distances do not explain the observed genetic differences (ϕ_{ST}) among the studied populations of *E. havanense* (Mantel's test: $r = 0.33$, $P = 0.168$). The

ϕ_{ST} -based UPGMA phenogram showed the same topology as that estimated on the basis of unbiased Nei's genetic distances, although there were differences in branch lengths (Fig. 2b).

Results from the spatial autocorrelation analysis showed that *E. havanense* has a significant microspatial genetic structure (Fig. 3). The multilocus correlogram showed that values of r associated with distances below c. 5 m were positive and exceeded the upper 95% confidence interval. Negative values exceeding the lower confidence limit were observed beyond c. 35 m (Fig. 3). Thus, although *E. havanense* shows a patchy distribution of genotypes that rapidly declines with distance, the relatively low value of r (0.093) suggests that the seed shadows of different plants overlap.

Discussion

Flowering phenology is a critical reproductive trait of plants because it determines the number of potential mates and may influence the patterns of gene flow within and among populations (Rathcke, 1983; Rathcke & Lacey, 1985; Bronstein *et al.*, 1990). It has been shown that the extreme flowering synchrony that characterizes mass flowering species has reproductive advantages associated with pollinator attraction, higher outcrossing rates, greater opportunities to find mates and escape from seed predators (Augspurger, 1980, 1981; Dieringer, 1991; Domínguez & Dirzo, 1995; Kato & Hiura, 1999). Previous studies have demonstrated that the attraction of opportunistic pollinators (Domínguez & Dirzo, 1995; Domínguez *et al.*, 1997) and escape from seed predators (Domínguez, 1990) are the main selective forces favoring mass flowering in *E. havanense*. The results of this study suggest that beyond the reproductive consequences, flowering synchrony may have significant effects on the genetic structure of mass-flowering species. We found that *E. havanense* has high levels of genetic variation within and among populations, low but significant levels of genetic isolation among nearby populations, and fine-scale genetic structure within a population. These results are in accordance with our expectations that by influencing the foraging behavior of pollinators and frugivores, mass flowering, and its extended effects on fruiting phenology, may isolate nearby populations and produce genetic structure within populations.

However, current data do not allow us to discriminate between the relative effects of pollen- or seed-mediated gene flow. Nonetheless, because genetic differentiation among populations implies

Population	Ranchitos	Ardilla	Antiguo Sur	Cuitzmala	Limon
Ranchitos	–	9.25	9.75	19.75	8.5
Ardilla	0.0080 ^{ns}	–	1.5	14.5	11.25
Antiguo Sur	0.0684*	0.0500*	–	14.75	12.0
Cuitzmala	0.2769***	0.2263***	0.0889*	–	10.5
Limon	0.0258 ^{ns}	0.0252 ^{ns}	0.1622***	0.3827***	–

*, < 0.05; ***, < 0.0001; ns, not significant.

Table 3 Geographical distances (km, above diagonal) and genetic distances (ϕ_{ST} values, below diagonal) among five populations of *Erythroxylum havanense* from the Chamela region in the Pacific coast of Mexico

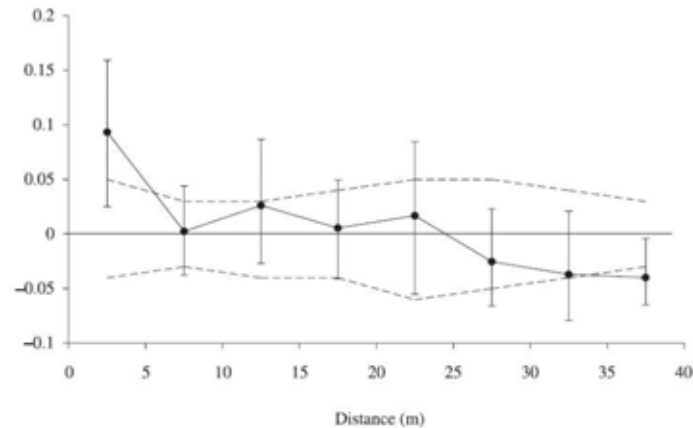


Fig. 3 Multiallele genetic autocorrelation analysis showing the short-scale spatial genetic structure observed at the Ardilla population of *Erythroxylum havanense*. The 95% null-hypothesis confidence regions are indicated by dotted lines, and confidence error bars about r as determined by bootstrapping.

a reduction in gene flow through both pollen and seeds, we think that both processes might have occurred in *E. havanense*. For example, using nuclear and cytoplasmic genetic markers, Bacles *et al.* (2004) showed that habitat fragmentation reduced pollen-mediated gene flow among remnant populations of *Sorbus aucuparia*, but effective seed dispersal by birds decreased genetic differentiation among them. Other studies have also shown that genetic differentiation may be prevented by effective seed dispersal by birds (Loiselle *et al.*, 1995a; Bruederle *et al.*, 1998). Accordingly, we think that by producing a massive and synchronous fruiting pattern, mass flowering has the potential to affect not only pollinators but also frugivores, thus favoring local foraging and fewer movements among fruiting patches. Additional studies exploring the patterns of genetic differentiation of nuclear and cytoplasmic (cpDNA) markers would allow evaluation of the relative importance of restricted pollen- or seed-mediated gene flow.

Our genetic analyses indicated that most of the genetic variation of *E. havanense* occurred within, rather than between populations, a finding that is consistent with the outbreeding nature of the species (Hamrick & Godt, 1996; Nybom & Bartish, 2000). Approximately 11% (the average of the three estimations) of the RAPD genetic variation was accounted for by the differences among populations. Although the amount of genetic differentiation found for *E. havanense* is consistent with that expected for outcrossing species (Bussell, 1999; Nybom & Bartish, 2000), it should be noted that genetic differentiation occurred among populations located at an average distance of only 11 km, and even those populations located as close as 1.5 km to each other showed significant differentiation. This result is unexpected for a species that is an obligated outcrosser, is pollinated by bees that are able to flight long distances and whose fruits are bird dispersed (Gryj & Domínguez, 1996; Domínguez *et al.*, 1997). In order to make a thorough comparison of the amount of genetic differentiation of *E. havanense* with those of tropical outcrossing

species, we reviewed the literature for RAPD-based studies evaluating the genetic structure of plants. We were able to get information on genetic differentiation (F_{ST} , G_{ST} or Φ_{ST}) and life-history traits for 91 species. Information on flowering periods was not available in most studies, thus precluding a comparison of species differing in this attribute. The data set included a heterogeneous collection of species regarding their affinities, life forms and mating systems, so we restricted our analyses to tropical, perennial, outcrossing species (this database is available from the authors). Moreover, a close examination indicates that most studies have focused on species whose populations have suffered some kind of human impact (fragmentation, isolation, disturbance, etc.) or have a special condition (endangered, endemic with restricted distributions, rare species, etc.). In order to account for these potentially confounding variables, the data set was split into two STATUS categories, one including all the studies related to species with apparently undisturbed natural populations (WILD group), and a second group with all other species (DIST group). We evaluated the effects of the geographical distance between populations (the distance between the more distant pair of populations sampled in a given study; see Nybom & Bartish, 2000), and of the categorical variable STATUS, on the levels of population differentiation by means of ANCOVA. We found a significant general relationship between geographical distance and genetic differentiation ($F_{1,24} = 8.6$, $P = 0.0073$). WILD species had a lower average level of genetic differentiation than species in the DIST group (0.13 ± 0.037 and 0.31 ± 0.032 , for WILD and DIST groups, respectively; $F_{1,24} = 19.37$, $P = 0.0002$). As indicated by the significance of the interaction term ($F_{1,24} = 5.45$, $P = 0.028$), genetic differentiation showed a positive relationship with geographic distance in the WILD, but not in the DIST group (Fig. 4). According to the ANCOVA model the predicted value of differentiation for populations separated by 20 km is only 0.002, far below the value we observed in

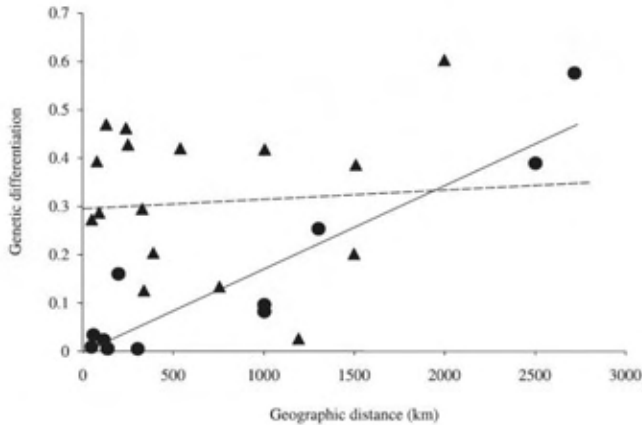


Fig. 4 Results from ANCOVA showing the predicted relationship between genetic differentiation (Φ_{ST} , G_{ST} , or estimations based on Shannon's information index) and the maximum geographic distance between sampled populations of 27 tropical perennial outcrossing species. The solid line indicates the adjusted model for species with undisturbed natural populations (circles, $-0.000082 + 0.0002 \times \text{distance}$), while the dotted line accounts for species with evidence of disturbance or a special status (triangles, $0.3028 + 0.000019 \times \text{distance}$).

this study. Overall, these findings support our hypothesis that genetic differentiation in *E. havanense* is above the expected value for tropical outcrossing species with similar geographic distances among populations.

The mass flowering pattern of *E. havanense* (Gentry, 1978; Augspurger, 1981; Domínguez & Dirzo, 1995), along with its effects on fruiting phenology (Gryj & Domínguez, 1996), may explain the fine-scale differentiation observed in the Ardilla population and the genetic structure among closely adjacent populations. A short flowering time and high flowering synchrony within and among individuals characterizes the flowering pattern of *E. havanense* (see the Materials and Methods section). The fruiting pattern is also massive and synchronous, and has the potential to satiate frugivores (Gryj & Domínguez, 1996). Consequently, mass flowering could produce the observed patterns of genetic differentiation by one (or both) of the following mechanisms. First, by producing a high and ephemeral concentration of resources for both pollinators and frugivores, mass-flowering (and synchronous fruiting) could restrict gene flow to other flowering (fruiting) populations if pollinators and frugivores are satiated within a single population. Indeed, previous studies on the reproductive biology of *E. havanense* have shown that pollinators of this species forage in a density-dependent manner (Domínguez *et al.*, 1997), and frugivores are satiated within a fruiting patch (Gryj & Domínguez, 1996). Second, mass flowering in *E. havanense* is triggered by the increase in soil moisture brought about by the first heavy rains of the wet season (Domínguez & Dirzo, 1995). The availability of water for plants depends, in turn, on a series of highly heterogeneous environmental factors as topographic zone (slopes, plateaus or gullies, aspect; Domínguez & Dirzo, 1995), soil characteristics (texture, organic matter content, infiltration; Domínguez & Dirzo, 1995; Cotler *et al.*, 2002), and rainfall heterogeneity (García-Oliva *et al.*, 1991, 2002). All these environmental

attributes interact with each other to produce a complex spatiotemporal dynamics in terms of water availability for plants. Given that complete synchrony only occurs in those years when the onset of the wet season is characterized by intense rainfalls (Domínguez & Dirzo, 1995), most years are characterized by asynchronous flowering among patches. Accordingly, gene flow through pollen and seeds among populations may be reduced because they do not flower and fruit in complete synchrony as a consequence of the heterogeneous availability of water (Domínguez & Dirzo, 1995).

The former explanation is also in accordance with the pattern of fine-scale genetic structure that we observed at the Ardilla population. This pattern suggests that although related plants reside near each other, this pattern vanishes rapidly as the distance between plants increases. Results from the spatial autocorrelation analysis also suggest that most dispersal occurs at a local scale, since significant negative deviations are only evident at distances that closely reflect the limit of the patch. Previous observations on the foraging behavior of frugivores of *E. havanense* have shown that most seeds are deposited in the vicinity of the plant (Gryj & Domínguez, 1996). Similar spatial patterns have been observed in other species that generally have substantial pollen flow and restricted seed dispersal (Campbell & Dooley, 1992; Loiselle *et al.*, 1995b; Smouse & Peakall, 1999; Dutech *et al.*, 2002; Garnier *et al.*, 2002).

Overall, our results with *E. havanense* support the idea that mass flowering has the potential to produce genetic structure among close populations. Significant differentiation among patches along with the relatively weak pattern of fine-scale spatial genetic structure, reinforce the idea that flowering patches behave as panmictic populations, while gene flow among patches separated by a few-hundred meters is below to that expected for this tropical outcrossing perennial. It has been demonstrated elsewhere that even small differences in

the onset of flowering have strong consequences on individual fitness (Domínguez & Dirzo, 1995). Hence, the selective pressures favoring high intrapopulation flowering synchrony in *E. havanense* may also be partly responsible for the observed patterns of genetic differentiation.

Acknowledgements

The authors thank Rodolfo Dirzo, Theresa Culley, Juan Nuñez-Farfán, Daniel Piñero, Ann Sakai, Stephen Weller, and two anonymous reviewers for helpful comments on earlier versions of the manuscript. We are also grateful to Minerva Martínez, Raúl Iván Martínez and Rubén Pérez Isiwara for field and laboratory assistance. This work was funded by DGAPA-UNAM (IN210797) and CONACYT (0201P-N), and by a sabbatical fellowship to C.A.D. by CONACYT and UNAM.

References

- Aagaard JE, Krutovskii KV, Strauss SH. 1998. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas Fir. *Heredity* 81: 69–78.
- Augsburger CK. 1980. Mass flowering of a tropical shrub (*Hybanthus prunifolius*): influence on pollinator attraction and movement. *Evolution* 34: 475–488.
- Augsburger CK. 1981. Reproductive synchrony of a tropical shrub: experimental studies on effects of pollinators and seed predators on *Hybanthus prunifolius* (Violaceae). *Ecology* 62: 775–788.
- Avila G, Domínguez CA. 2000. Parental effects and gender specialization in a tropical heterostylous shrub. *Evolution* 54: 866–877.
- Bacles CFE, Lowe AJ, Ennos RA. 2004. Genetic effects of chronic habitat fragmentation on tree species: the case of *Sorbus aucuparia* in a deforested Scottish landscape. *Molecular Ecology* 13: 573–584.
- Bronstein JL, Gouyon P, Gliddon C, Kjellberg F, Michaloud G. 1990. The ecological consequences of flowering asynchrony in monoecious figs: a simulation study. *Ecology* 71: 2145–2156.
- Bruederle LP, Tomback DF, Kelly KK, Hardwick RC. 1998. Population genetic structure in a bird-dispersed pine, *Pinus albicaulis* (Pinaceae). *Canadian Journal of Botany* 76: 83–90.
- Bullock SH. 1986. Climate of Chamela, Jalisco, and trends in the south coastal region of México. *Archives of Meteorology, Geophysics and Bioclimatology Series B* 36: 297–316.
- Bullock SH, Solís-Magallanes A. 1990. Phenology of canopy trees of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica* 22: 22–35.
- Bussell JD. 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity among populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology* 8: 775–789.
- Campbell D, Dooley JL. 1992. The spatial scale of genetic differentiation in a hummingbird-pollinated plant: a comparison with models of isolation by distance. *American Naturalist* 139: 735–748.
- Cotler H, Durán E, Siebe C. 2002. Caracterización morfo-edafológica y calidad de sitio de un bosque tropical caducifolio 2002. In: Noguera F, Vega-Rivera J, García-Aldrete A, Quesada-Avedaño M, eds. *Historia natural de Chamela*. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 17–79.
- Dieringer G. 1991. Variation in the individual flowering time and reproductive success of *Agalinis uricifolia* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany* 78: 497–503.
- Domínguez CA. 1990. Consecuencias ecológicas y evolutivas del patrón de floración sincrónico y masivo de *Erythroxylum havanense* Jacq. (Erythroxylaceae). PhD Dissertation. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Domínguez CA, Dirzo R. 1995. Rainfall and flowering synchrony in a tropical shrub: variable selection on the flowering time of *Erythroxylum havanense*. *Evolutionary Ecology* 9: 204–216.
- Domínguez CA, Avila-Sakar G, Vázquez-Santana S, Márquez-Guzmán J. 1997. Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany* 84: 626–632.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.
- Dutech C, Seiter J, Petronelli P, Joly HI, Jarne P. 2002. Evidence of low gene flow in a Neotropical clustered tree species in two rainforest stands of French Guyana. *Molecular Ecology* 11: 725–738.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Frankie GW, Baker HG, Opler PA. 1974. Comparative phenological studies of trees in tropical wet and dry forests in the lowlands of Costa Rica. *Journal of Ecology* 62: 881–919.
- García-Oliva F, Ezcurra E, Galicia L. 1991. Patterns of rainfall distribution in the Central Pacific coast of México. *Geographica Annaler* 73A: 179–186.
- García-Oliva F, Camou A, Maass JM. 2002. El clima de la región central de la costa del Pacífico mexicano 2002. In: Noguera F, Vega-Rivera J, García-Aldrete A, Quesada-Avedaño M, eds. *Historia natural de Chamela*. México, DF: Universidad Nacional Autónoma de México, 3–10.
- Garnier LKM, Durand J, Dajoz I. 2002. Limited seed dispersal and microspatial population structure of an agamosperous grass of West African savannahs, *Hyparrhenia diplandra* (Poaceae). *American Journal of Botany* 89: 1785–1791.
- Gentry AH. 1978. Antipollinators for mass-flowering plants? *Biotropica* 10: 68–69.
- Gryj EO, Domínguez CA. 1996. Fruit removal and postdispersal survivorship in the tropical dry forest tree *Erythroxylum havanense*: ecological and evolutionary implications. *Oecologia* 108: 368–374.
- Hamrick JL, Godt MJW. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 351: 1291–1298.
- Hard DL, Clark AG. 1997. *Principles of population genetics*. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates.
- Huff DR, Peakall R, Smouse PE. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss (*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.). *Theoretical and Applied Genetics* 86: 927–934.
- Jencowski E, Prosperi JM, Ronfort J. 1999. Differentiation between natural and cultivated populations of *Medicago sativa* (Leguminosae) from Spain: analysis with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and comparison to allozymes. *Molecular Ecology* 8: 1317–1330.
- de Jong TJ, Klinkhamer PGL, Staalduinen MJ. 1992. The consequences of pollination biology for selection of mass or extended blooming. *Functional Ecology* 6: 606–615.
- Kato E, Hiura T. 1999. Fruit set in *Syzyca obtusifolia* (Syracaceae): the effect of light availability, display size, and local floral density. *American Journal of Botany* 86: 495–501.
- King LM, Schaal B. 1989. Ribosomal-DNA variation and distribution in *Rudbeckia missouriensis*. *Evolution* 43: 1117–1119.
- Lewontin RC. 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology* 6: 381–398.
- Loiselle BA, Sork VL, Graham C. 1995a. Comparison of genetic variation in bird-dispersed shrubs of a tropical wet forest. *Biotropica* 27: 487–494.
- Loiselle BA, Sork VL, Nason J, Graham C. 1995b. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub, *Psychotria officinalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82: 1420–1425.

- Lott EJ. 1993. Annotated checklist of the vascular flora of the Chamela Bay region, Jalisco, Mexico. *Occasional Papers of the California Academy of Sciences* 148: 1–60.
- Lott EJ, Bullock SH, Solis-Magallanes A. 1987. Floristic diversity and structure of upland and arroyo forests in coastal Jalisco. *Biotropica* 19: 228–235.
- Lynch M, Milligan BJ. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91–99.
- Martín JP, Hernández-Bermejo E. 2000. Genetic variation in the endemic and endangered *Rosmarinus tomentosus* Huber-Morath and Maire (Labiatae) using RAPD markers. *Heredity* 85: 434–443.
- Müller-Schärer H, Fischer M. 2001. Genetic structure of the annual weed *Senecio vulgaris* in relation to habitat type and population size. *Molecular Ecology* 1: 17–21.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583–590.
- Noguera F, Vega-Rivera J, García-Aldrete A, Quesada-Avendano M. 2002. *Historia natural de chamela*. México DF: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Nybohm H, Bartsch I. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution, and Systematics* 3: 93–114.
- Peakall R, Smouse PE. 2001. GENALEX v5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Canberra, Australia: Australian National University.
- Peakall R, Ruibal M, Lindenmayer DB. 2003. Spatial autocorrelation analysis offers new insights into gene flow in the Australian bush rat, *Rattus fuscipes*. *Evolution* 57: 1182–1195.
- Rathcke B. 1983. Competition and facilitation among plants for pollination. In: Real L, ed. *Pollination biology*. New York, NY, USA: Academic Press, 305–325.
- Rathcke B, Lacey EP. 1985. Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 179–214.
- Raymond ML, Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280–1283.
- Sales E, Nebauer SG, Mus M, Segura J. 2001. Population genetics study in the Balearic endemic plant species *Digitalis minor* (Scrophulariaceae) using RAPD markers. *American Journal of Botany* 88: 1750–1759.
- Smouse PE, Peakall R. 1999. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele genetic structure. *Heredity* 82: 561–573.
- Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358–1370.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531–6535.



About New Phytologist

- *New Phytologist* is owned by a non-profit-making charitable trust dedicated to the promotion of plant science, facilitating projects from symposia to open access for our Tansley reviews. Complete information is available at www.newphytologist.org.
- Regular papers, Letters, Research reviews, Rapid reports and Methods papers are encouraged. We are committed to rapid processing, from online submission through to publication 'as-ready' via *OnlineEarly* – the 2003 average submission to decision time was just 35 days. Online-only colour is free, and essential print colour costs will be met if necessary. We also provide 25 offprints as well as a PDF for each article.
- For online summaries and ToC alerts, go to the website and click on 'Journal online'. You can take out a personal subscription to the journal for a fraction of the institutional price. Rates start at £109 in Europe/\$202 in the USA & Canada for the online edition (click on 'Subscribe' at the website).
- If you have any questions, do get in touch with Central Office (newphytol@lancaster.ac.uk; tel +44 1524 592918) or, for a local contact in North America, the USA Office (newphytol@ornl.gov; tel 865 576 5261).

