

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

INSTITUTO DE ECOLOGIA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

Consecuencias ecológicas de la esterilidad masculina asociada al morfo thrum  
de *Erythroxylum havanense* y la evolución de la heterostilia.

**TESIS**

QUE PRESENTA:

**LUIS FERNANDO ROSAS PACHECO**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

TUTOR: DR. CESAR DOMINGUEZ PEREZ-TEJADA

MEXICO, D. F.

JUNIO 2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS

La paciencia y confianza que César Domínguez me dio han sido fundamentales para desarrollarme intelectualmente, por ello mil gracias. A lo largo de los años en el doctorado mi comité tutorial cambio de composición, quiero agradecer a Rodolfo Dirzo, Mauricio Quesada, Luis Eguiarte y Francisco Molina su disposición siempre amable y el aporte de ideas que sin duda contribuyeron a mejorar el proyecto y el contenido de la tesis.

Néstor Mariano, Luis Eguiarte, Francisco Molina y César Domínguez fueron fundamentales en el planteamiento del diseño experimental y de los análisis. La revisión y los comentarios críticos de Ken Oyama, Guillermo Dávila, Luis Eguiarte, Pablo Vinuesa, Mauricio Quesada y Carlos Montaña me ayudaron a mejorar el manuscrito final de la tesis. Juan Fornoni, Mauricio Quesada, Francisco Molina, Cristina Martínez, Eduardo Mendoza, Eduardo Cuevas, Felipe Melo, Betsabe Ruiz y Rafael Bello han revisado parte de los manuscritos y sus comentarios me han permitido acercarme a la expresión de ideas con mayor claridad. Gracias.

El apoyo de Gumersindo Sanchez, Néstor Mariano, César Abarca e Ivonne Herrerías fue muy importante para finalizar el trabajo de laboratorio. En esta etapa que fue casi de pesadilla, Luis Eguiarte, Daniel Piñero, Mauricio Quesada, John Nasson y la gente asociada a sus laboratorios me permitieron utilizar libremente su equipo y sus instalaciones. John Nasson fue especialmente amable cuando visite su laboratorio y me ayudo a entender la lógica de los análisis de paternidad con marcadores moleculares. Muchas gracias a todos.

El trabajo de campo en Chamela fue una odisea en la que Francisco Molina, César Domínguez, Jessica Pérez, Eduardo Cuevas, César Abarca, Martha Palomino, Ivonne Herrerías y Karina Boege me ayudaron desinteresadamente. La gente de la estación de Chamela siempre me ayudo a resolver las complicaciones propias del campo. La Familia Verduzco, sobre todo la señora Eva, Delia, Leonor, Gustavo y Abel me facilitaron la vida y me hicieron sentir como en casa. Juan Manuel fue un apoyo invaluable para realizar las tareas más pesadas durante el experimento en 1999. Va mi sincero agradecimiento para todos ellos. El ambiente de celebración en el albergue de Mauricio en Chamela es sencillamente para agradecer con ganas de repetir.

En el laboratorio de interacción planta animal he tenido la suerte de compartir mi desarrollo personal y académico con Raúl A., Néstor, Gume, Reina, Cecilia G., Cristina, Lalo M., Lalo C., César, Betsabe, Lucero, Martha, Mario V., Laura, Vero, Armando, Jessica, Adriana, Paula S., Paula M., Ely, Sarita, Karina, Cecilia C., Rubén y los que se acumulen esta semana!! A todos les quiero agradecer sinceramente.

Mil gracias a Cristina, Verónica, Valerie, Sandra, Marina, Eduardo, Juanito, Juan Carlos, Rafa, Armando y Felipe. Por lo compartido y aprendido juntos. Con Richard y Carlos he tenido que aprender a reírme de la “penuria crónica” y de la propensión a la conciencia descompuesta. ¡Gracias!.

A “las magas” que me demostraron el maravilloso y amable universo que su sólo nombre puede traer de la memoria y dejar siempre una sonrisa, mi gratitud inmune al tiempo.

El más cariñoso y genuino agradecimiento es para mi madre y mi padre, Federico y Carmen, por la certeza de que en el dar se lo encuentran todo.

Las sonrisas, los brazos y las casas de mis hermanos Mari, Lolis, Elvi, Federico, Benjamín y Miguel, han sido mi sostén e impulso para crecer desde que tengo memoria. Mis sobrinos Fede, Alma, Alex, Miguel, Gaby, Mariana, Germán y Caro, que motivan a sonreír. Mis cuñados Rosario, Ara, David, Leo, Marlon y Mary que ayudan de forma generosa. A todos ellos un cálido abrazo de agradecimiento.

Quiero agradecer el rico espacio de desarrollo que encontré en la UNAM, y al CONACYT, la DGE y el PAPIIT (proyecto IN209600) por el apoyo económico que brindaron para realizar esta tesis.

## Contenido

Resumen / Abstract

Introducción General

Capítulo I: Esterilidad masculina y evolución de la especialización sexual en una especie distilica: una ruta del dimorfismo hermafrodita a la diecia funcional.

Capítulo II: Esterilidad masculina parcial y evolución de la especialización sexual en *Erythroxylum havanense*: una evaluación de los efectos paternos en la compensación pos-reproductiva.

Capítulo III: Efecto de la variación ambiental sobre la compensación reproductiva en el arbusto distílico *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae).

Discusión General

Agradecimientos

## Resumen

Las rutas evolutivas del hermafroditismo al diocismo consideran principalmente el surgimiento y dispersión de mutaciones de esterilidad masculina o femenina en poblaciones monomórficas. En este trabajo se evaluaron las consecuencias reproductivas de la esterilidad masculina asociada al morfo thrum del arbusto distilico *Erythroxylum havanense*, con la finalidad de explorar la evolución de sexos separados a partir de este sistema hermafrodita dimórfico donde las plantas pin y thrum tienen una dependencia recíproca para producir semillas. En el capítulo I se realizó un experimento de cruces entre donadores de polen thrum y madres pin, se determinó la paternidad de la progenie y se analizaron las consecuencias de la variación en asignación a la función masculina sobre la adecuación masculina y femenina de las plantas thrum. Los resultados revelaron que hay plantas thrum completamente estériles para la función masculina, y que la adecuación de las plantas con mayor grado de esterilidad supera la adecuación total de las plantas “más hermafroditas” del mismo morfo. En el capítulo II se evaluó si el crecimiento y la supervivencia de la progenie del experimento previo eran influenciados por el nivel de esterilidad de los padres y si dicha relación podría modificar la ventaja reproductiva de las plantas thrum que son funcionalmente “más hembras”. No se detectaron efectos paternos en el desempeño de la progenie durante los primeros cuatro años de vida. Por lo tanto, no parece que las plantas thrum “más hermafroditas” tengan una ventaja pos-reproductiva sobre las plantas hembra del mismo morfo. Los resultados de estas dos secciones indican que las plantas thrum completamente estériles pueden invadir este sistema reproductivo de plantas hermafroditas. Finalmente se examinó el efecto de la sincronía reproductiva en la magnitud de la compensación (semillas thrum / semillas pin) reproductiva que se requiere para solventar la pérdida de la función masculina de las plantas thrum. El análisis mostró que la reproducción asincrónica disminuye la producción de semillas en ambos morfos. Lo más relevante es que la producción de semillas pin es más sensible a la asincronía y la magnitud de la compensación reproductiva del morfo thrum se incrementa ampliamente en esta condición. En general, la dependencia reproductiva entre los morfos florales en combinación con la ventaja en fecundidad y la evolución de la esterilidad masculina en las plantas thrum, pueden ser factores claves en la evolución de la diccia funcional a partir de este sistema hermafrodita que de origen es dimórfico.

## Introducción General

Cuando Linneo produjo su sistema de clasificación de plantas en 1735, reconoció y enfatizó la ocurrencia de plantas con sexos separados. Darwin (1877) no sólo documentó la frecuencia relativa de ambos sexos y su fecundidad, sino también consideró las fuerzas selectivas que podrían favorecer el establecimiento de sistemas reproductivos dimórficos y las probables rutas evolutivas. Desde entonces la evolución de la especialización sexual en las plantas es un tema de profundo interés entre los biólogos evolutivos. Un aspecto fundamental de la evolución de dos sexos separados a partir de una condición hermafrodita monomórfica es que se requieren como mínimo dos cambios genéticos (ver Charlesworth 1999). Uno que produzca hembras (esterilidad masculina, EM) y otro que produzca machos (esterilidad femenina). Se requiere que una mutación de esterilidad invada una población hermafrodita y se establezca un dimorfismo reproductivo formado por plantas unisexuales y hermafroditas, y una segunda mutación que esterilice la función sexual complementaria de las plantas hermafroditas persistentes. La relativa facilidad con la que se propagan las mutaciones que esterilizan la función masculina de plantas hermafroditas hace suponer que son un factor clave en la evolución de la especialización sexual (Lloyd 1975; Charlesworth y Charlesworth 1978; Couvet et al., 1990; Maurice et al., 1993; Schultz 1994; Geber et al., 1999). Como se verá más adelante, la EM involucra genes mitocondriales que se heredan por la vía materna (semillas) y por lo tanto su propagación no requiere la producción de polen ni es afectada por la pérdida de adecuación masculina de sus portadores (Lewis 1941; Lloyd 1975; Charlesworth y Charlesworth 1978). La alta frecuencia de la EM en las angiospermas (543 especies en 178 géneros y 50 familias, Jacobs y Wade 2003) es consistente con este planteamiento.

Debido a que las plantas hermafroditas obtienen en promedio la mitad de su adecuación a través de la función masculina y la otra mitad a través de la función femenina, la pérdida de la función masculina resulta en una evidente desventaja reproductiva (Fisher 1958, Charnov 1982). Por lo tanto, el mantenimiento de hembras en poblaciones hermafroditas requiere que los individuos con esterilidad masculina compensen la función que pierden incrementando la cantidad y/o calidad de la progenie (semillas) que producen

con respecto a los hermafroditas (Charlesworth 1981; Gregorious y Ross 1984; Gouyon y Couvet 1987). La magnitud de la compensación que se requiere para mantener la esterilidad masculina depende del modo en que ésta se hereda. Si la esterilidad masculina se debe a genes nucleares (i.e., herencia nuclear), las hembras que mantienen sólo una de sus funciones reproductivas deben incrementar más de dos veces su fertilidad y superar la adecuación que obtienen las plantas hermafroditas a través de su polen y sus semillas (Ross y Gregorious 1985; Frank 1989; Gouyon et al., 1991). Esta premisa se puede visualizar de la siguiente manera. En una población hermafrodita cada individuo contribuye genes a la siguiente generación a través de la producción de semillas y a través de los óvulos que son fertilizados con su polen. Si una planta se “convierte” en hembra, pierde la mitad de adecuación que brinda la fertilización de óvulos y tiene una clara desventaja frente a una planta hermafrodita. Para recobrar la función perdida, una hembra tiene que duplicar el número y/o la calidad de semillas que produce. Si la esterilidad se debe a genes citoplasmáticos que se heredan exclusivamente a través de los óvulos (i.e., herencia citoplasmática), la ruta de transmisión a través del polen no existe para dichos genes. En este escenario la selección favorecerá a la esterilidad masculina siempre y cuando la fertilidad de las hembras supere la producción de semillas de las hermafroditas (Lewis 1941; Belhassen et al., 1991). Cuando la sexualidad es determinada por genes nucleares y citoplasmáticos (i.e., herencia núcleo-citoplasmática), la magnitud de la compensación esperada es intermedia a la predicha para las herencias nuclear y citoplasmática (Lewis 1941; Charlesworth 1981; Gouyon y Couvet 1987). La relación entre la asignación de recursos y la esterilidad masculina núcleo-citoplasmática puede visualizarse como una forma de “selección antagonista” entre los genes del núcleo y del citoplasma (Frank 2000). Debido a que los genes mitocondriales de las angiospermas se transmiten sólo a través de las semillas (Lewis 1941), la selección favorece a las variantes mitocondriales que reducen la asignación de recursos en la producción de polen e incrementan la producción de semillas (Hanson 1991). La reasignación de recursos del polen a las semillas, reduce la transmisión de genes nucleares debido a que su herencia biparental depende de la producción de polen y semillas. Por lo tanto, existe un conflicto de intereses entre genes mitocondriales (citoplasmáticos) y nucleares en la asignación de recursos a las funciones reproductivas masculina (polen) y femenina (óvulos) (Couvet et al., 1990, ver Figura 1). La idea del



conflicto de intereses entre genes nucleares y citoplasmáticos es consistente con la evolución de genes nucleares que contrarrestan el efecto de genes de esterilidad citoplasmática (Frank 1989). De hecho se ha considerado que la evolución de poblaciones de hembras y hermafroditas (ginodiocismo) refleja la expresión de dicho conflicto (Lewis 1941). Asimismo las predicciones teóricas y la evidencia empírica indican que en la mayoría de los casos la esterilidad masculina en plantas está determinada por la interacción entre genes citoplasmáticos de esterilidad y genes nucleares que restauran la fertilidad del polen de manera específica (Couvét et al., 1990; Bellhassen et al., 1991; Hanson 1991; Saumitou-Laprade et al., 1994; Koelewijn y van Damme 1995a y 1995b).

La expectativa teórica de que las hembras deben compensar la adecuación perdida produciendo más y/o mejores semillas se ha demostrado en varias especies ginodioicas (Ashman 1992, 1999; Delph y Lloyd 1996; Poot 1997; Delph et al., 1999; Delph y Mutikainen 2003). A su vez, la compensación reproductiva se ha interpretado como el resultado de diversos factores. 1) Directamente como consecuencia de la reasignación de los recursos que no se invierten en la producción de polen para incrementar la producción de semillas (Darwin 1877; Lloyd 1974). 2) La depresión por endogamia, que se puede expresar en la progenie de las plantas hermafroditas que se autofecundan (Charlesworth y Charlesworth 1978; Ashman 1992; Thompson y Tarayre 2000). 3) Los efectos pleiotrópicos de los restauradores nucleares (costo de la restauración), que pueden reducir la adecuación de la progenie que los porta (Charlesworth y Ganders 1979; Delannay et al., 1981; Frank 1989; de Haan et al., 1997; Bailey et al., 2003). 4) La limitación por polen o polinizadores que puede reducir la fecundidad de las hembras cuando su frecuencia en las poblaciones es elevada (Frank 1989; Gouyon et al., 1991; Taylor et al., 1999; McCauley et al 2000; Ramsey y Vaughton 2002). Finalmente 5) por diferencias entre sexos en la atracción de polinizadores (Williams y Fenster 1998; Williams et al., 2000) y en la depredación de semillas (Marshall y Ganders 2001; Collin et al., 2002).

El estudio de los factores relacionados con el incremento de la fecundidad femenina y con el mantenimiento de hembras en poblaciones hermafroditas, se ha desarrollado bajo la premisa de que la esterilidad masculina se debe a mutaciones de efecto mayor. Aún

cuando la EM es un atributo que se expresa en general de forma discreta (poblaciones de hembras y hermafroditas), la presencia de individuos parcialmente estériles en especies ginodioicas bien estudiadas (Ågren y Willson 1991; Atlan et al., 1992; Hermanutz y Innes 1994; Koelewijn y van Damme 1996; Gigord et al., 1999) indica que la EM no se debe necesariamente a la expresión de un sólo locus con dos o tres estados discretos. El grado de discrepancia entre genes citoplasmáticos y nucleares así como la variación en el número de genes involucrados son dos factores que se han utilizado para explicar la presencia de individuos con esterilidad masculina parcial (EMp) (Koelewijn y van Damme 1996; Gigord et al., 1999; Koelewijn 2003). Asimismo se ha reportado que las poblaciones de especies ginodioicas donde se presentan individuos con EMp difieren no sólo en la proporción de hembras, hermafroditas y plantas con EMp, sino también en la habilidad de los fenotipos intermedios para producir polen y frutos (Atlan et al., 1992; Gigord et al., 1999; Koelewijn 2003). Esta información es relevante pues señala que bajo el modelo de herencia más común de la EM (núcleo-citoplasmático), se producen fenotipos sexuales que no pierden totalmente la función ni la adecuación masculina. A diferencia del ginodiocismo “clásico” la presencia de EMp permite no sólo evaluar el contraste reproductivo entre hembras y hermafroditas, sino además permite evaluar como es la varianza en adecuación masculina y femenina en individuos parcialmente estériles. Asimismo, la EMp es un sistema apropiado para explorar el papel de la EM en la modificación de los patrones de asignación reproductiva y en la evolución de la especialización sexual. Basado en estos antecedentes, el objetivo general de la tesis fue evaluar el papel de la EMp en la evolución de la especialización sexual del sistema reproductivo de *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae), un arbusto distílico con esterilidad masculina parcial y ventaja femenina asociada al morfo thrum.

En este trabajo utilizamos el marco conceptual de la teoría de asignación sexual para evaluar el efecto de la EMp en la modificación de la asignación reproductiva, y en la evolución de la especialización sexual de los morfos florales de *E. havanense* (ver adelante). La teoría de asignación sexual explora como son “las curvas de adecuación”, o la respuesta de la adecuación masculina y femenina a los cambios en la proporción de recursos asignados a cada función sexual (Charnov 1982), y constituye una explicación

general a la diversidad de sistemas reproductivos en plantas, desde el hermafroditismo hasta el diocismo. En el modelo de asignación sexual está implícita la idea de una disyuntiva en la asignación de recursos entre las funciones sexuales, una proporción “ $r$ ” de recursos son asignados a la función masculina y una proporción “ $1 - r$ ” a la función femenina. De acuerdo a esta idea las adecuaciones masculina ( $m$ ) y femenina ( $f$ ) se expresan como una función exponencial de los recursos invertidos en la función masculina [ $m \propto r^b$  y  $f \propto (1 - r)^c$ ]. Un exponente ( $b$  o  $c$ )  $< 1$  genera funciones que desaceleran o saturan la retribución de la inversión de recursos (Figura 2a, “i”), mientras que exponentes ( $b$  o  $c$ )  $> 1$  generan funciones que aceleran el beneficio de la inversión de recursos (Figura 2a, “iii”). Las curvas de saturación indican que un gasto limitado de recursos es suficiente para acercarse al máximo posible de adecuación y favorecen la inversión en ambas funciones sexuales. En contraste, las curvas de aceleración indican que se requiere invertir una gran cantidad de recursos para aproximarse al máximo posible de adecuación y favorecen la inversión de la totalidad de los recursos en una u otra función sexual. Si se grafica la curva de adecuación masculina versus la femenina se pueden obtener “los conjuntos de adecuación” (Levins 1968) que muestran la disyuntiva reproductiva y los patrones de asignación que maximizan la adecuación (Figura 2b). Los conjuntos de adecuación convexos (encima de la diagonal) indican que la adecuación de un fenotipo hermafrodita es superior al de cualquier fenotipo unisexual. Los conjuntos de adecuación cóncavos (abajo de la diagonal) indican que la adecuación de un fenotipo que hace todo el gasto en la función femenina o en la función masculina (unisexual), es mayor que la adecuación de cualquier hermafrodita. En general las curvas de adecuación masculina y/o femenina que aceleran las ganancias de la inversión de recursos, producen conjuntos de adecuación que favorecen la evolución del diocismo (Charnov 1982).

La evidencia empírica relacionada a la forma de las funciones de adecuación y a la existencia de una disyuntiva en la asignación de recursos entre las funciones sexuales es relativamente escasa (ver Campbell 2000). Esto se debe principalmente a la dificultad para medir con precisión los recursos invertidos en ambas funciones sexuales y el éxito reproductivo masculino y femenino. Diversos atributos como la proporción de flores macho, el cociente número de flores/número de semillas, así como la biomasa invertida en

estambres, gineceo y semillas se han utilizado como estimadores de la asignación de recursos. Si bien la selección de las unidades para estimar la inversión de recursos en ambas funciones sexuales puede ser un problema en si mismo, la mayor dificultad es obtener un estimador preciso de la adecuación masculina y femenina, sobre todo en poblaciones naturales. La adecuación femenina se estima habitualmente cuantificando la producción de semillas, y el estudio del desempeño de la progenie ha permitido evaluar con mayor precisión la fertilidad y los factores (ejem. dispersión y competencia) que pueden modificar la forma de la función femenina (Lloyd 1984). La estimación de la adecuación masculina es un asunto relativamente más complejo. Algunos estudios han utilizado las cargas de polen en los estigmas de plantas receptoras (Thomson y Thomson 1989) y la remoción de polen (Young y Stanton 1990) como estimadores de la adecuación masculina. Sin embargo estas medidas no garantizan que los óvulos hayan sido fertilizados ni miden apropiadamente la adecuación masculina. El desarrollo de análisis de paternidad con base en marcadores genéticos (Smouse y Meagher 1994) ha permitido estimar el número de óvulos que fecunda cada planta y obtener una medida más precisa de la adecuación masculina.

La forma de las curvas de adecuación se ha evaluado con detalle en las hermafroditas *Ipomopsis aggregata* (Campbell 1998), *Cynoglossum officinale* y *Echium vulgare* (Rademaker y de Jong 2000) y en la andromonoica *Solanum carolinense* (Elle 1999). En general los resultados indican que la adecuación masculina aumenta como respuesta al incremento en la asignación de recursos en esta función. Acorde a lo esperado teóricamente para los sistemas hermafroditas, el aumento en la inversión de recursos en ambas funciones sexuales produce incrementos lineales de la adecuación, o curvas de saturación que resultan en conjuntos de adecuación convexos.

En teoría la disyuntiva reproductiva debería producir una correlación genética negativa en los recursos asignados a las dos funciones sexuales. Sin embargo, pocos estudios han cuantificado la variación genética de la biomasa de estructuras reproductivas asociadas a una y otra función sexual (*Zea mays*, Garnier et al. 1993; *Lythrum salicaria*, O'Neil y Schmitt 1993; *Begonia semiovata*, Agren y Schemske 1995; e *Ipomopsis aggregata*, Campbell 1997). En tres estudios se ha reportado una correlación positiva

entre los componentes de la función masculina y femenina, y únicamente en el caso del maíz se encontró una correlación negativa en la asignación de recursos a las estructuras masculinas y femeninas (Garnier et al. 1993). En general estos resultados proveen poca evidencia sobre la disyuntiva reproductiva y sugieren que la variación genética en la asignación de recursos puede ser menor a la variación de los rasgos asociados con la adquisición de recursos (Campbell 2000).

En conjunto, la evidencia de los trabajos mencionados se restringe a la evaluación de los patrones de asignación reproductiva en especies hermafroditas. Sin embargo las condiciones específicas (el cambio en los patrones de asignación y sus consecuencias en el éxito reproductivo) que permitirían a las plantas con esterilidad masculina o femenina invadir poblaciones de plantas hermafroditas, han sido poco estudiadas empíricamente (Ashman 1999, Koelewijn 2003). En este trabajo realizamos un experimento de cruza controladas, determinamos la paternidad de semillas producidas y estimamos el éxito reproductivo masculino y femenino de plantas thrum con diferente nivel de EM en una población natural. Con base en esta información analizamos las consecuencias reproductivas de la variación en la asignación a la función masculina, y evaluamos si el dimorfismo morfológico que caracteriza a la distilia junto a la EM del morfo thrum, proveen las condiciones que permitirían la evolución de dos sexos separados.

*Erythroxylum havanense* es un arbusto distílico de floración masiva y sincrónica que se caracteriza por presentar esterilidad masculina asociada al morfo thrum (ver Figura 3) y por una asimetría reproductiva entre los morfos florales (Domínguez et al., 1997). Los individuos de morfo pin producen 1.8 veces más polen viable que los thrum, pero en contraste las plantas thrum producen 46 % más semillas que las pin y su progenie crece más rápido y se reproduce primero en comparación con la progenie de las plantas pin (Domínguez et al., 1997; Avila-Sakar y Domínguez 2000). *E. havanense* presenta también un sistema de incompatibilidad intramorfo que impide la producción de semillas en cruza entre individuos del mismo tipo floral (Domínguez 1990). Es decir, los óvulos thrum son fecundados necesariamente con polen pin y viceversa (ver Figura 4). Debido a la dependencia reciproca de los morfos florales para producir semillas, se ha sugerido que la

asimetría reproductiva de *E. havanense* podría promover la evolución de su sistema reproductivo, las plantas thrum funcionando como hembras y las pin principalmente como machos (Avila-Sakar y Domínguez 2000). La mayoría de las hipótesis sobre la evolución del dioicismo en plantas se basan en la existencia de correlaciones con atributos como la presencia de frutos carnosos, el hábito leñoso, flores pequeñas e inconspicuas y la colonización de islas (Thomson y Brunet, 1990). En el caso particular de la evolución de dos sexos separados a partir de la distilia, se supone que las plantas de un tipo floral se especializan como hembras y las plantas del tipo floral opuesto se especializan como machos a través de la modificación gradual de la sexualidad (Darwin 1877; Lloyd 1979; Casper y Charnov 1982). Esta transición se ha relacionado con factores ecológicos como el flujo asimétrico de polen entre los tipos florales (Ornduff 1966; Beach y Bawa 1980; Muechow y Grebus 1989). En contraste con la evidencia correlativa de la evolución del dioicismo, en este trabajo se presenta evidencia directa de la especialización sexual de una especie distílica. En particular se plantea que debido a la reciprocidad reproductiva de los tipos florales, la evolución de la EM thrum puede resultar en la pérdida automática de la función femenina de las plantas pin, y en el establecimiento de una población funcionalmente dioica sin la necesidad de una segunda mutación de esterilidad complementaria. Este escenario contrasta con las dos mutaciones de esterilidad que implica la evolución de dos sexos separados a partir de una condición hermafrodita monomórfica.

El trabajo está dividido en tres secciones. En los capítulos I y II se evalúa el efecto de la EM en la cantidad y calidad de la progenie de las plantas thrum, y se analiza el papel de ambos componentes de adecuación en el establecimiento de plantas thrum completamente estériles. La dependencia reproductiva de los morfos florales hace que la adecuación promedio de la función masculina de un morfo sea equivalente a la adecuación promedio de la función femenina del morfo complementario. Por ello esta parte del estudio se concentra exclusivamente en el análisis de las consecuencias reproductivas de la EM de las plantas thrum. En el tercer capítulo se analiza el papel de la varianza ambiental en la compensación reproductiva de la EM de las plantas thrum frente a las pin en condiciones naturales. En este caso se realiza una comparación de las consecuencias reproductivas en las plantas de ambos morfos.

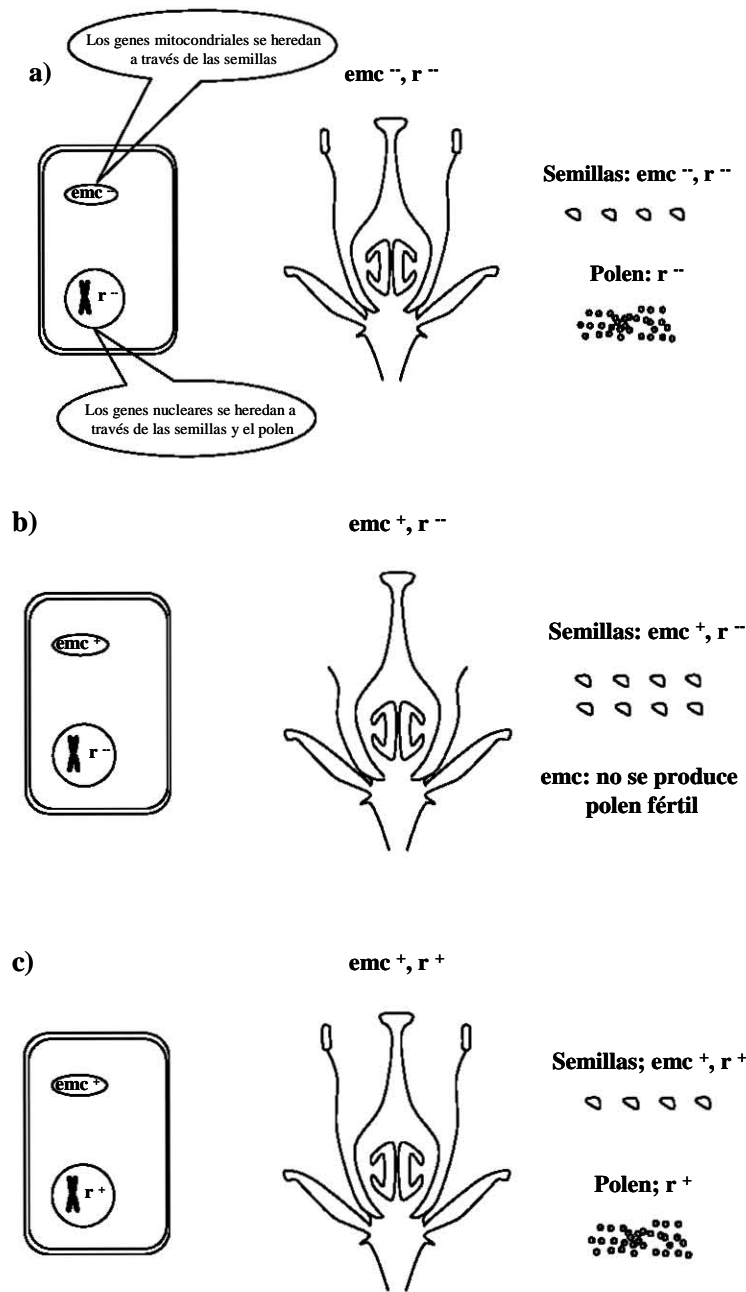


Figura 1. Evolución de la esterilidad masculina citoplasmática (emc) y restauración de la fertilidad masculina: “un conflicto de intereses y selección a nivel de genes”. La figura ilustra una célula (por simplicidad el núcleo es haploide) y una flor de genotipos particulares. a) El locus mitocondrial “emc” se hereda exclusivamente a través de las semillas mientras que los loci nucleares como “r” se heredan a través de las semillas y los granos de polen. b) Una mutación “emc+” elimina la producción de polen y puede incrementar la producción de semillas si los recursos del polen se reasignan a la producción de semillas. Como resultado se incrementa la frecuencia de “emc+” (hembras). La producción de hembras no favorece a los genes nucleares debido a que estos no se transmiten por el polen de las plantas estériles. c) Debido a que la adecuación de los genes nucleares depende de su transmisión a través de polen y semillas, la selección favorece al alelo restaurador “r+” que contrarreste el efecto de “emc+”. La población puede fijarse para alelos antagonistas “emc+” y r+” y ser fenotípicamente indistinguible de la población ancestral emc-, r-.. (Tomado de Futuyma 2005).

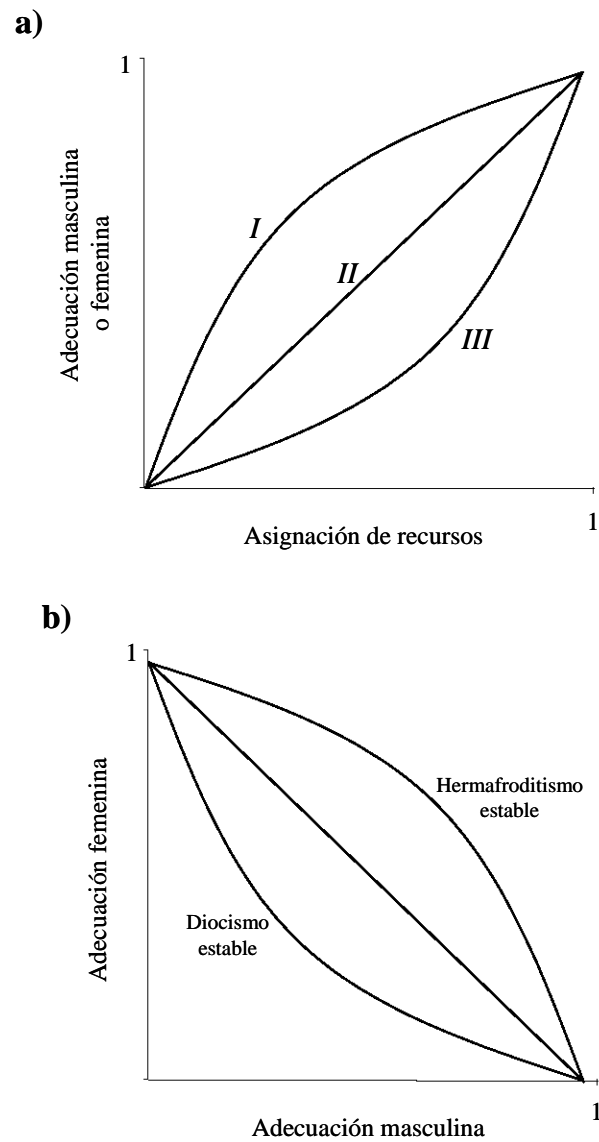


Figura 2. Teoría de asignación sexual. a) Las curvas de adecuación indican la respuesta de la de adecuación masculina y femenina a los cambios en el nivel de recursos invertidos. Las curvas de adecuación pueden ser I) de saturación, II) lineales o III) de aceleración. b) La combinación de las adecuaciones macho y hembra muestra la disyuntiva reproductiva y los conjuntos de adecuación. Los conjuntos de adecuación convexos (por arriba de la diagonal) favorecen el hermafroditismo y los cóncavos el diocismo.



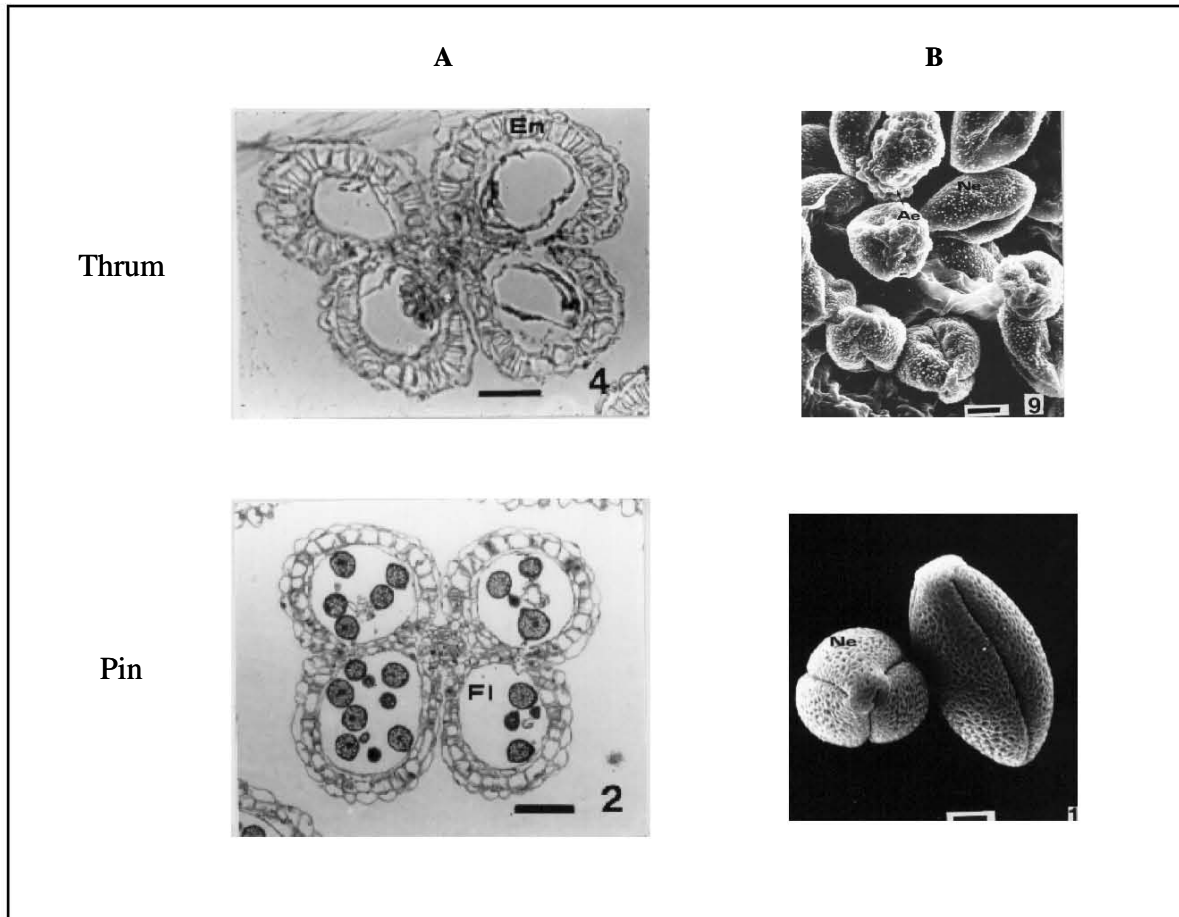


Figura 3. En la parte superior una antera (A) thrum en meiosis con los loculos vacíos, y (B) granos de polen abortivos (exina en papilas) y normales en un loculo de antera thrum. En la parte inferior una antera pin fértil (A) y granos de polen pin fértiles con exina reticulada (Tomado de Dominguez et al., 1997).

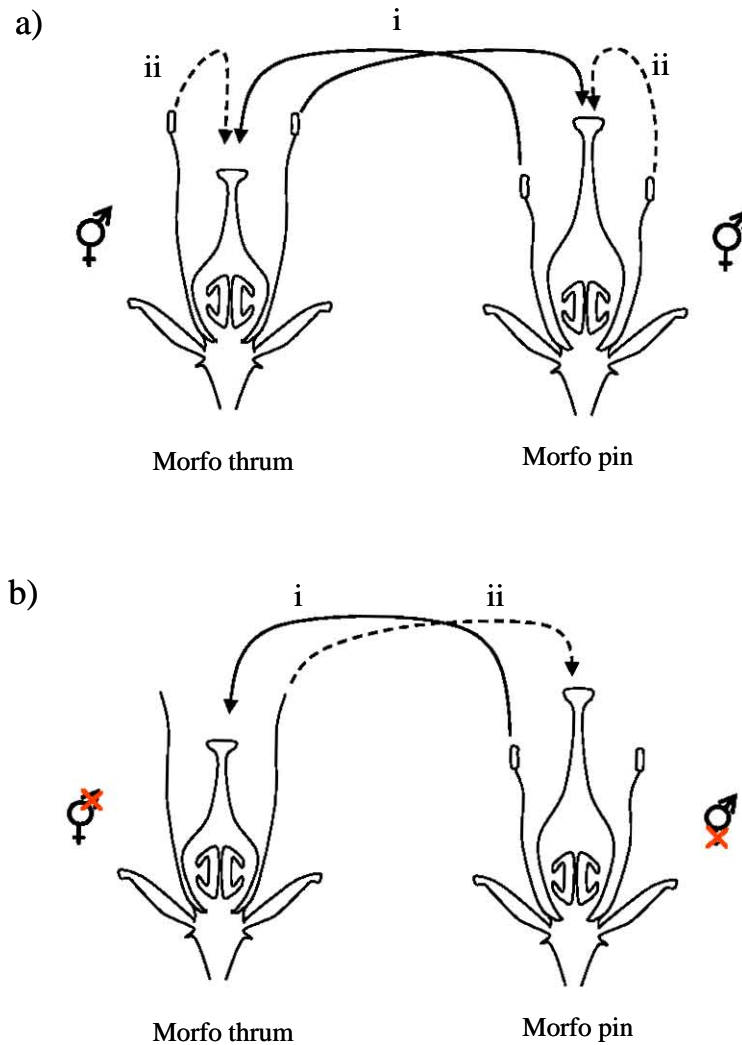


Figura 4. a) La distilia es un sistema hermafrodita con dos tipos florales (pin y thrum) que difieren en la posición relativa de anteras y el estilo. El dimorfismo floral está acompañado de un sistema de incompatibilidad intra-morfo que impide la producción de semillas cuando se cruzan individuos del mismo tipo floral. Las flechas de línea continua (i) señalan las cruces compatibles y fértiles. Las flechas de línea punteada (ii) indican las cruces incompatibles. A pesar de tener ambas funciones sexuales las plantas pin requieren del polen thrum para fertilizar sus óvulos y viceversa. b) En el modelo propuesto para *Erythroxylum havanense* la esterilidad masculina del morfo thrum anula las cruces donde estas plantas actúan como donadores de polen (ii). Debido a la reciprocidad reproductiva de los morfos florales y a la evolución de la esterilidad masculina thrum, las plantas pin funcionarán como donadores de polen (i) y las thrum como hembras.

## Capítulo I

Esterilidad masculina y evolución de la especialización sexual en una especie distilica: una ruta del dimorfismo hermafrodita a la diecia funcional

Luis Fernando Rosas Pacheco y César A. Domínguez

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Apartado Postal 70-275, C. P. 04510,  
México Distrito Federal, México.

## Resumen

Un aspecto fundamental de la evolución de la especialización sexual de las angiospermas, es que si se parte de un estado hermafrodita monomórfico la evolución de dos sexos separados requiere como mínimo dos cambios genéticos. Uno que produzca hembras (esterilidad masculina) y otro que produzca machos (esterilidad femenina). Una ruta alternativa de evolución a la diecia es a partir de la distilia, que se caracteriza por el dimorfismo floral asociado a un sistema de incompatibilidad intramorfo que impide la fertilización entre plantas con flores del mismo tipo. La fertilización recíproca hace suponer que la especialización gradual de los morfos en una y otra función sexual puede resultar en la evolución de la diecia. En contraste con las dos mutaciones sucesivas o la especialización gradual de un sistema dimórfico que estas hipótesis proponen como requisitos para la evolución de la diecia, se puede plantear que el surgimiento de una sola mutación de esterilidad en un sistema distílico donde la fertilización es recíproca, puede facilitar la evolución de dos sexos separados sin requerir de una segunda mutación de esterilidad complementaria. En este estudio evaluamos si la esterilidad masculina (EM) asociada al morfo thrum de *Erythroxylum havanense* se favorece sobre el mantenimiento de su condición hermafrodita original. La evolución de la EM thrum requiere que la inversión de recursos en la función femenina se favorezca por encima de la asignación simultánea en las funciones masculina y femenina. Es decir, que la adecuación de los individuos totalmente estériles supere la adecuación de los individuos cosexuales. Para probar esta expectativa teórica se calcularon y contrastaron las pendientes que relacionan la asignación de recursos a la función masculina (producción de polen viable) con el éxito reproductivo masculino y femenino de plantas thrum con diferente nivel de esterilidad masculina (NEM). Se realizó un experimento de cruza controlada y con base en marcadores genéticos ISSRs se logró determinar la paternidad del 89 % de la progenie y estimar la adecuación masculina. La adecuación femenina se estimó con base en la fecundidad del morfo thrum evaluada en un estudio previo. Encontramos que el 14 % de los individuos thrum en la población son completamente estériles para la función masculina, y que el NEM se relaciona negativamente con la adecuación masculina y de forma positiva con la femenina. Las funciones de adecuación revelaron que el éxito reproductivo de los individuos thrum con mayor NEM supera la adecuación de los fenotipos del mismo morfo que conservan su condición bisexual y que se reproducen por ambas vías sexuales. Debido a la dependencia reproductiva de los morfos florales, la esterilidad masculina total del morfo thrum puede resultar en la pérdida “automática” de la función femenina del morfo pin, y en el establecimiento de una población funcionalmente dioica, aún sin necesidad de una segunda mutación de esterilidad complementaria.

## Introducción

Porqué y cómo evolucionan individuos unisexuales a partir de ancestros cosexuales son preguntas fundamentales para comprender el complejo proceso de la reproducción sexual en las angiospermas. La evidencia empírica señala que la especialización sexual ha evolucionado en repetidas ocasiones a partir de diversas formas de cosexualidad (Webb 1999). Un aspecto fundamental de esta transición, es que si se parte de un estado hermafrodita monomórfico la evolución de dos sexos separados requiere como mínimo dos cambios genéticos (Charlesworth 1999). Uno que produzca hembras (esterilidad masculina) y otro que produzca machos (esterilidad femenina). En primer lugar se requiere que una mutación de esterilidad invada una población hermafrodita y se establezca un dimorfismo reproductivo donde coexisten plantas unisexuales y hermafroditas (rutas del ginodioicismo o androdioicismo). Y luego que una segunda mutación esterilice la función sexual complementaria de los hermafroditas remanentes. Otro escenario evolutivo diferente ocurre cuando la selección actúa sobre sistemas reproductivos cosexuales que de origen son dimórficos (rutas de la heterostilia y la heterodicogamia). En este caso la evolución de dos sexos separados se debe a la especialización gradual de los tipos florales en alguna de las dos funciones sexuales (Darwin 1877; Lloyd 1979; Casper y Charnov 1982). Es decir, la evolución del dioicismo a partir de una condición hermafrodita requiere como mínimo dos mutaciones de esterilidad sucesivas y complementarias, o la especialización gradual de tipos florales cosexuales y dimórficos en una y otra función sexual. De acuerdo a estas hipótesis se puede plantear que el surgimiento de una mutación de esterilidad en un sistema distílico donde la fertilización es recíproca puede facilitar la evolución de dos sexos separados sin requerir de una segunda mutación de esterilidad complementaria. La distilia es un dimorfismo floral (pin y thrum) asociado a un sistema de incompatibilidad intramorfo que impide la fertilización entre plantas del mismo tipo floral. Esto significa que la producción de semillas de un morfo depende de la disponibilidad y fertilidad del polen del morfo contrario. Debido a ésta reciprocidad reproductiva, una mutación que esterilice la función masculina de un morfo, puede conducir a la pérdida “automática” de la función femenina del morfo complementario. En contraste con las dos mutaciones de esterilidad que se requieren para la evolución de sexos separados a partir de una condición

hermafrodita monomórfica, la evolución de la especialización sexual en una especie distílica puede ocurrir sin la necesidad de una segunda mutación complementaria de esterilidad.

Diversos autores han planteado que el diocismo puede evolucionar a partir de la distilia (Darwin 1877; Lloyd 1979; Casper y Charnov 1982; Charlesworth 1989). Se presume que debido a que los dos morfos florales se fertilizan de forma recíproca, un morfo se especializa como macho y el otro como hembra a través de la modificación gradual de la sexualidad. Esta transición evolutiva se ha documentado en varias familias con especies heterostílicas, pero en general se ha relacionado con factores ecológicos como la intervención de los polinizadores en el flujo asimétrico de polen entre los morfos florales (Ornduff 1966; Beach y Bawa 1980; Wyatt 1983; Muenchow y Grebus 1989). Sin embargo en pocas ocasiones se ha vinculado el efecto de mutaciones de esterilidad que modifican de manera intrínseca la expresión sexual de plantas distílicas con la evolución de la especialización sexual (Baker 1958; Avila-Sakar y Domínguez 2000). *Erythroxylum havanense* es un arbusto distílico que por sus características constituye un sistema ideal para evaluar la evolución de sexos separados a partir de un sistema reproductivo hermafrodita, dimórfico y con esterilidad masculina.

*E. havanense* tiene un sistema de incompatibilidad intramorfo y esterilidad masculina parcial (EMp) asociada a una ventaja femenina compensatoria en las plantas de morfo thrum (Domínguez et al. 1997). Las plantas pin producen en promedio 1.8 veces más polen viable que los individuos thrum. En contraste las plantas thrum producen 46 % más semillas que las pin, y su progenie sobrevive y se reproduce a los 8 años de edad con una probabilidad 2.8 veces mayor que la de madres pin (Domínguez et al., 1997; Avila-Sakar y Domínguez 2000). Debido a esta asimetría reproductiva y a que los óvulos thrum son fecundados por polen pin y viceversa (Domínguez 1990), se ha propuesto que esta especie experimenta un proceso de especialización sexual donde las plantas thrum funcionarían principalmente como hembras y las pin como machos (Avila-Sakar y Domínguez 2000). Sin embargo ninguna de las hipótesis clásicas que se utilizan para explicar la evolución de la especialización sexual en especies heterostílicas (i.e. servicio de polinizadores, flujo y

limitación por polen) explica las diferencias reproductivas observadas entre los morfos florales de esta especie (Avila-Sakar y Domínguez 2000). Por lo tanto el objetivo de este estudio es evaluar si la esterilidad masculina parcial (EMp) asociada al morfo thrum junto a la dependencia reproductiva de los morfos florales de *Erythroxylum havanense*, favorecen la evolución de la esterilidad masculina total (EM) en plantas de este morfo y el establecimiento de un sistema reproductivo funcionalmente dioico (i.e. hembras thrum y machos pin).

La EM surge y se propaga con relativa facilidad en poblaciones de plantas hermafroditas. Esto se debe principalmente a que en la mayoría de los casos la EM involucra genes mitocondriales que se heredan vía materna (Cosmides y Tooby 1981; Couvet et al., 1990; Saumitou-Laprade et al., 1994), y por tanto su propagación no requiere la producción de polen, ni es afectada por la pérdida de adecuación masculina de sus portadores (Lewis 1941; Lloyd 1975; Charlesworth y Charlesworth 1978; Charlesworth 1999). Una expectativa teórica es que la EM debería ser común en poblaciones naturales. En efecto, a diferencia de la esterilidad femenina, la EM ocurre con alta frecuencia en las angiospermas (543 especies en 178 géneros y 50 familias, Dem'yanova 1985, en Jacobs y Wade 2003). Debido a que las plantas hermafroditas obtienen en promedio “la mitad” de su adecuación a través de la función masculina, la esterilidad del polen resulta en una desventaja reproductiva (Fisher 1958; Charlesworth 1981; Gouyon y Couvet 1987). Bajo el modelo de herencia de la EM más restrictivo, esta desventaja puede ser compensada por las hembras si duplican el número y/o la calidad de las semillas que producen las hermafroditas (Lloyd 1974; Frank 1989; Couvet et al., 1990; Delph et al., 1999). La compensación reproductiva y el mantenimiento de hembras se han estudiado bajo la suposición de que la modificación de los patrones de asignación sexual y la evolución de sistemas reproductivos como el ginodioicismo, se deben a mutaciones de esterilidad de efecto mayor (Lewis 1941; Ross y Gregorius 1985; Delannay et al., 1981; Jacobs y Wade 2003). En general éste es el caso, pero como se verá enseguida, la herencia núcleo-citoplasmática de la esterilidad puede resultar en EMp. La expresión parcial de la EM implica que la dinámica evolutiva de la especialización sexual en presencia de mutaciones de esterilidad puede modificarse potencialmente, no obstante se sabe bastante poco de sus consecuencias (reproductivas).

Además de genes citoplasmáticos de esterilidad, la determinación del sexo en especies con EM incluye genes nucleares que restauran la fertilidad del polen de manera específica (Couvet et al., 1990; Bellhassen et al., 1991; Saumitou-Laprade et al., 1994; Koelewijn y van Damme 1995a, 1995b). Debido al número de genes involucrados y a que la correspondencia o “adaptación” entre genes citoplasmáticos y nucleares puede tener algún nivel de desajuste, se pueden producir individuos parcialmente estériles (Koelewijn y van Damme 1996; Gigord et al., 1999; Koelewijn 2003). La EMP se caracteriza por la presencia de individuos cuyas flores tienen anteras reducidas o que producen sólo una proporción de polen fértil, y se ha reportado en poblaciones de diversas especies ginodioicas bien estudiadas (*Plantago lanceolata*, van Damme y van Delden 1982, Koelewijn y van Damme 1996; *Silene acaulis*, Hermanutz y Innes 1994; *Silene* spp, Maurice 1999; *Geranium maculatum*, Ågren y Willson 1991; *Saxifraga granulata*, Stevens y Richards 1985) donde coexisten hermafroditas (H), hembras (EM), y una proporción de plantas con EMP. Dichas poblaciones difieren en la proporción de fenotipos sexuales (H, EM y EMP) y en la habilidad de los fenotipos parcialmente estériles para producir frutos (ver Tabla 1). Por ejemplo, en *G. maculatum* y en *P. lanceolata* la adecuación de las plantas con EMP es intermedia a la de hembras y hermafroditas, y la producción de semillas y la proporción de anteras funcionales se correlacionan de forma negativa. Es decir, a diferencia de las hembras los individuos parcialmente estériles no pierden en su totalidad la función ni la adecuación masculina. Asimismo la EMP se puede relacionar con la modificación de los patrones de asignación reproductiva. En *Plantago coronopus* se ha mostrado que la compensación de la EMP se relaciona con el desvío de recursos de la función masculina hacia la femenina (Koelewijn 2003). La expresión parcial de la EM permite evaluar de manera explícita si el beneficio de la inversión de recursos en ambas funciones sexuales es subaditivo y como se predice teóricamente (Lloyd 1984), esto favorece la evolución de la especialización sexual. En particular la EMP brinda la oportunidad de recurrir al marco teórico de la asignación sexual para evaluar los gradientes de selección de las funciones sexuales de individuos parcialmente estériles y dar una sólida explicación a la propagación de mutaciones de esterilidad.



La teoría de asignación sexual evalúa cómo es la relación entre la asignación de recursos a las funciones masculina y femenina y la adecuación por cada vía. Es decir, cómo son las funciones de adecuación (Charnov 1982). En el modelo clásico los recursos son finitos y se asignan a la función masculina o a la femenina de manera simultánea. La adecuación masculina ( $m$ ) se incrementa con la proporción de recursos asignados a la función masculina ( $r$ ), y la forma de esta relación se define por una función exponencial del tipo ( $m \propto r^b$ ). Al mismo tiempo la adecuación femenina ( $f$ ) disminuye de acuerdo a la función ( $f \propto (1-r)^c$ ) (Charnov 1982; Campbell 1998). Las curvas de adecuación que aceleran las ganancias de la inversión de recursos en una función sexual (i.e. cóncavas,  $b$  o  $c > 1$ ), favorecen la evolución de sexos separados. Las curvas de saturación ( $b$  o  $c < 1$ ), por el contrario, favorecen la evolución del hermafroditismo (Charnov 1982). Evaluar estas predicciones es complejo, principalmente porque las funciones de adecuación relacionan dos variables que son notablemente difíciles de medir, la adecuación (sobre todo la masculina) y la cantidad de recursos asignados a la función masculina ( $r$ ) (Campbell 2000). En este estudio evaluamos la magnitud y el signo de la relación entre las adecuaciones masculina y femenina y los recursos invertidos en la reproducción en individuos thrum con diferente nivel de esterilidad masculina (NEM). Como medida de la inversión en la función masculina ( $r$ ) utilizamos la variación en la producción de polen viable y exploramos las consecuencias reproductivas de dicha variación en la producción de frutos (adecuación femenina) y en la paternidad de semillas (adecuación masculina).

En resumen, en este trabajo contrastamos los coeficientes de regresión de las adecuaciones masculina y femenina en función del NEM y evaluamos si la inversión en la función femenina se favorece por encima de la asignación simultánea en las funciones masculina y femenina. Lo cual resultará teóricamente en la invasión de individuos thrum completamente estériles sobre el mantenimiento de la cosexualidad. Dada la reciprocidad reproductiva de los morfos florales de *E. havanense*, el establecimiento de plantas thrum completamente estériles constituye el factor clave que permitiría la transición evolutiva de la distilia a la diecia funcional (i.e. hembras thrum y machos pin).

## Materiales y Métodos

### *Sitio de estudio*

El estudio se realizó en la Estación de Biología de Chamela, una reserva natural de la UNAM en la costa del Estado de Jalisco, México (19° 30' N, 105° 03' W). La vegetación se caracteriza por un denso bosque tropical deciduo. La precipitación media anual es de 707 mm. Existe una marcada época de secas de noviembre a mayo, y entre julio y octubre cae el 80 % de la precipitación. Una descripción detallada de la flora y el clima puede encontrarse en Lott et al. (1987) y Bullock (1986) respectivamente.

### *La planta de estudio*

*Erythroxylum havanense* Jacq. (Erythroxylaceae) es un arbusto perenne distílico que tiene un sistema de incompatibilidad completa entre los morfos florales. Las plantas crecen en forma agregada en grupos de entre 20 y 100 individuos y la proporción de morfos florales pin : thrum no difiere de una proporción 1 : 1 (Domínguez 1990). La floración empieza entre 7 y 10 días después de la primera lluvia fuerte que marca el inicio de la temporada húmeda. Las plantas individuales florecen durante un periodo corto de  $2.8 \pm 0.1$  días (de aquí en adelante media  $\pm$  ee) y el periodo de un grupo se extiende a  $5.7 \pm 0.9$  días (Domínguez y Dirzo 1995). Es decir, la floración dentro de un parche es masiva y sincrónica. La capacidad de respuesta a la humedad es un atributo relevante que permite manipular la floración experimentalmente como se verá más adelante. Las flores son pequeñas ( $\approx 1$  cm), son polinizadas principalmente por abejas de los géneros *Trigona* (Apidae) y *Xylocopa* (Anthophoridae) y la receptividad del estigma se limita a las primeras horas del día. Los frutos maduros son pequeñas drupas rojas que contienen sólo un óvulo fértil (Domínguez et al., 1997). *Erythroxylum havanense* presenta esterilidad masculina asociada principalmente al morfo thrum. Las plantas thrum producen 4.7 veces más flores estériles ( $X^2_1 = 38.15$ ,  $P < 0.0001$ ) y sólo el 54 % del polen viable que producen las plantas pin (ver Dominguez et al., 1997). En contraste los individuos thrum producen 46 % más semillas que los pin, y su progenie crece más rápido y se reproduce primero en comparación con la progenie de plantas pin (Avila-Sakar y Domínguez 2000). Debido a esta asimetría reproductiva y a que todos los óvulos de las plantas pin son fecundados por

polen thrum y viceversa (Domínguez 1990), se ha propuesto que el sistema reproductivo de esta especie experimenta un proceso de especialización sexual, las plantas thrum actuando principalmente como hembras y las plantas pin como machos (Avila-Sakar y Domínguez 2000). Además la EM en *E. havanense* tiene un componente heredable que es independiente de la variación ambiental. Un análisis de la repetibilidad de la EM indica que una parte (0.47) de la variación fenotípica se explica por diferencias permanentes entre individuos ( $F_{(1-22)} = 15.8$ ,  $P = 0.0006$ ,  $R^2 = 0.39$ , Rosas et al., 2005). Los patrones de desarrollo floral indican que la EM es evidente en el 67 % de las flores thrum y sólo en 14.3 % de las flores pin (Domínguez et al., 1997). Finalmente la EM en diferentes poblaciones de la región de Chamela es invariablemente mayor en las plantas de morfo thrum (Cuevas et al., 2005). La EM se evaluó con base en cultivos de polen *in vitro*. Se calculó la esterilidad masculina individual como:  $EM = 1 - FP$ , donde FP es la proporción de polen germinado dividido por el polen total ( $FP = \text{polen germinado} / \text{polen total}$ ). Una descripción detallada de la evaluación de la viabilidad del polen de esta especie se puede encontrar en Cuevas et al. (2005) y Rosas et al. (2005).

#### *Esterilidad masculina y paternidad en condiciones experimentales*

*Diseño experimental.* – Debido a la dependencia reproductiva de los morfos florales, la adecuación masculina promedio de los individuos de un morfo es prácticamente igual a la adecuación femenina de los individuos del morfo contrario. En este caso particular, la selección de la EM thrum puede conducir a la pérdida automática de la función femenina pin y como hemos mencionado, al establecimiento de una población funcionalmente dioica. Por lo tanto nuestra evaluación se enfoca en las consecuencias reproductivas de la EM y en la especialización del morfo thrum en la función femenina. Para evaluar el efecto de la variación en la viabilidad del polen en el éxito reproductivo de la función masculina del morfo thrum, realizamos un experimento de cruzas controladas en una población natural. Con base en el riego artificial de grupos discretos de plantas se indujo la floración sincrónica y la polinización cruzada natural entre donadores de polen thrum con diferente NEM, y plantas maternas pin. El análisis de la paternidad de la progenie de las plantas pin permitió evaluar el éxito reproductivo masculino de los donadores thrum en función de su NEM. El diseño del experimento consistió en conjuntos de 4 donadores de polen de morfo

thrum con diferente grado de esterilidad masculina y 2 plantas pin receptoras de polen (ver Figura 1). Los donadores fueron seleccionados con base en la distribución de frecuencias de la esterilidad masculina (ver Rosas et al., 2005), y en cada réplica se incluyeron plantas con nivel alto, medio y bajo de EM. El experimento se replicó en diez ocasiones estimulando la floración secuencial de las 6 plantas de cada réplica como se describe a continuación.

*Diseño de riego e inducción de la floración.* – El experimento se realizó un mes antes del inicio de la temporada de lluvias. Como se mencionó, la capacidad de las plantas para responder a la humedad del suelo permite manipular la floración. El riego experimental nos permitió inducir la floración sincrónica entre individuos de una réplica y en secuencia entre las réplicas del experimento, de tal forma que no hubo más de un grupo floreciendo al mismo tiempo (ver Figura 2). A cada planta se le suministró 20 litros de agua iniciales y posteriormente 10 litros cada tercer día. El primer bloque experimental se irrigó el 12 de mayo de 1999. El inicio del riego de cada réplica se desfasó por un intervalo de 2 días entre el riego de una réplica y la siguiente, de forma que el décimo grupo experimental se irrigó hasta el 8 de junio del mismo año. Con base en este esquema de riego secuencial se evitó la sobreposición de la floración entre plantas de réplicas independientes. Una vez que las plantas de una réplica florecían en sincronía, los polinizadores visitaron las flores y la polinización ocurrió naturalmente. Esta técnica de inducción de la floración nos permitió asegurar que el flujo de polen y los apareamientos sucedieran exclusivamente entre las 4 plantas donadoras (thrum), y las 2 plantas receptoras (pin) de cada réplica experimental. Esto implica que el número potencial de progenitores paternos de cada semilla se limita a cuatro, lo cual es relevante para incrementar la probabilidad de asignación de parentesco genético en el análisis de paternidad. El experimento estaba originalmente diseñado para obtener 20 familias maternas pin. Sin embargo, el follaje y las flores de varias plantas fueron consumidos casi completamente por hormigas cortadoras (*Atta* sp.), por lo que nuestro tamaño de muestra se redujo a 10 familias maternas pin. Cinco de las réplicas consistieron de una planta receptora pin y cuatro donadores thrum, y cinco réplicas estuvieron formadas por una planta receptora y tres donadores. En lo sucesivo los datos presentados se refieren a este conjunto de 10 réplicas.

*Distancia entre consortes y despliegue floral.* – Dos factores que pueden influir en la probabilidad de donación de polen y en el éxito reproductivo masculino son la distancia entre consortes y la producción de flores por planta. Para evaluar el efecto de la distancia entre consortes en la contribución de cada donador a la paternidad de las semillas, se calculó la distancia entre cada donador y receptor de polen. Por su parte, la producción de flores puede determinar la cantidad de polen viable que produce una planta. Estudios previos han mostrado que los polinizadores más comunes de *E. havanense* forrajean preferentemente en plantas con muchas flores (Domínguez et al., 1997). En consecuencia el despliegue floral puede influir en la cantidad de polen exportado y en el número de óvulos que son fertilizados en otras plantas. Por lo tanto se registró el número de flores abiertas durante el experimento en cada individuo.

*Germinación de semillas y crecimiento de plántulas.* – Una vez que los frutos maduraron se colectaron entre 30 y 60 (según disponibilidad) de cada planta materna, se removió la pulpa y se estimó la masa de las semillas (Scientech SA 120). Tres días después de colectadas, las semillas se pusieron a germinar en jiffy pots utilizando como sustrato suelo de la estación donde otras plantas de *E. havanense* crecen. Un total de 511 plántulas de 10 plantas maternas pin ( $51 \pm 3.66$  semillas por planta) fueron trasplantadas en lugares asignados al azar dentro de una exclusión construida en una área de la selva donde *E. havanense* crece de manera natural. En noviembre de 1999 se colectó una muestra de hojas de la progenie y de los progenitores para extraer el ADN. Las hojas se embolsaron, etiquetaron, y transportaron en un tanque de nitrógeno líquido al laboratorio donde se almacenaron en un ultra congelador (-80 °C).

#### *Obtención de marcadores genéticos y análisis de paternidad*

*Extracción de ADN y amplificación por PCR.* – La muestra analizada consistió de las plantas maternas, los donadores de polen y 460 plántulas que sobrevivieron a la fecha de colecta de las muestras. Usando el método “mini prep” de CTAB (Doyle y Doyle 1987; Lefort y Douglas 1999) se aisló ADN genómico de 200 mg de tejido foliar. Utilizando un fluorómetro (Hoefer Biofarmacia Dynaquant 200) se determinó la concentración del ADN, y todas las muestras fueron estandarizadas a una concentración de 25 µg/ml para utilizarlas

como templado en los ensayos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La mezcla de la reacción contenía Buffer de PCR 1X (Tris-HCL 20 mM, pH 8.4 y KCL 50 mM), MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTPs 0.2 μM c/u, Taq 1 u, 1 μM de primer (todo de Gibco BRL ®) y 20 ng de ADN. Los PCR se realizaron en un termociclador Techne Touchgene Gradient. El programa de amplificación consistió de un ciclo de desnaturalización inicial de 2 min a 94 °C, seguido de 27 ciclos de 30 seg a 94 °C, 45 seg a 52 °C y 1 min a 72 °C con un ciclo de extensión final de 7 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron separados en geles de acrilamida al 6% [19:1 acrilamida:bis, urea 7 M, y buffer TBE 1X (Tris-HCL 0.09 M, Acido bórico 0.09 M y EDTA 4 mM)]. Las electroforesis se realizaron en cámaras duales de secuenciación (CBS Scientific Company) a 500 V y 18 mA. Los productos de PCR fueron visualizados empleando el protocolo de tinción con plata de Bassam et al. (1991). Los geles se documentaron con una cámara digital (Leica Digilux 1). El tamaño de los fragmentos amplificados (bandas) se calculó con base en un estándar de peso molecular (Ladder) de 100 - 2072 pb de ADN (Gibco BRL ®) utilizando el algoritmo que provee el programa LabWorks-4® (Image Acquisition and Analysis Software, UVP Laboratory Products, 1998).

*Selección de marcadores ISSRs y análisis de paternidad.* – Una batería de 26 primers de ISSRs (inter simple sequence repeats) de amplificación general en plantas (Gibco BRL ®) fue utilizada para probar su potencial de amplificación de fragmentos (loci) polimorfos. Estos ensayos incluyeron a todos los progenitores (plantas maternas y donadores de polen) y una muestra de 5 plántulas de cada grupo experimental. Con base en estas pruebas se eligieron seis primers que produjeron los fragmentos más polimorfos, repetibles, y claros para utilizarlos como marcadores genéticos. Se registró la presencia de fragmentos entre 200 y 1500 pb y su tamaño se estimó con precisión por medio de marcadores estándar de peso molecular (ver arriba). Asumiendo que cada fragmento representa el fenotipo dominante de un locus bialélico (Williams et al., 1990), los fragmentos amplificados se calificaron como; 1 = presencia de banda (AA o Aa), 0 = ausencia de banda (aa). La reproducibilidad de los resultados se verificó duplicando los experimentos (amplificación por PCR y electroforesis) de manera independiente. Asimismo en cada experimento se incluyó un control de amplificación “nulo” que contenía todos los elementos de la reacción

del PCR menos el templado de ADN. Posteriormente se compararon los patrones de amplificación de los progenitores maternos con los de su progenie para confirmar la reproducibilidad de dichos patrones, y corroborar la expresión de todos los fragmentos de ISSRs producidos e incluidos en el análisis.

### ***Análisis de Datos***

*Asignación de Paternidad* – Las 10 plantas maternas que fueron expuestas a 3 ó 4 donadores produjeron en total 460 plántulas que fueron analizadas con seis primers de ISSRs (ver Tabla 2). Considerando únicamente los fragmentos claramente reproducibles, se calculó el número total de bandas amplificadas, el porcentaje de polimorfismo, y (asumiendo equilibrio de H-W) la frecuencia del alelo recesivo (q) en las plantas progenitoras. El procedimiento de asignación de paternidad por exclusión directa (Ellstrand 1984) puede dividirse en dos partes. Primero se comparó el genotipo multiloci de la progenie (de cada plántula individual) con el de su progenitor femenino, se sustrajeron todas la bandas que podían deberse a la contribución materna (AA o Aa) y se obtuvo un patrón de fragmentos remanentes en la progenie. Es decir, un patrón de fragmentos de la progenie libre de contribución materna y necesariamente de origen paterno. Segundo, el patrón de fragmentos remanentes se contrastó con los genotipos de los posibles progenitores paternos (3 o 4 potenciales) de cada plántula, y se excluyó a los donadores cuyo genotipo no incluía al menos 2 de estos fragmentos paternos. De esta forma uno o más individuos pueden ser asignados como padres putativos. En los análisis se incluye únicamente la progenie con un progenitor paterno asignado. Una vez que se determinó la paternidad de las plántulas, se calculó la contribución de cada donador ( $W_{pi}$ ) al total de progenie con paternidad asignada dentro de su réplica experimental como:  $W_{pi} = n_{pi} / N_p$ . Donde  $N_p$  es el número de plántulas para el que se logró determinar la paternidad en una réplica particular, y  $n_{pi}$  es el número de plántulas producidas por el donador “i” en dicha réplica experimental. Esta medida es utilizada posteriormente como variable de respuesta en el análisis de la “esterilidad masculina y paternidad en condiciones experimentales”. Por último, la solidez de la asignación de paternidad lograda con nuestro análisis se contrastó

con la potencia predicha por un modelo que estima la fracción teórica de progenie para la cual se puede asignar paternidad a un solo individuo ( $P_{ET}$ : Lewis y Snow 1992).

*Esterilidad masculina y paternidad en condiciones experimentales.* – Se analizó el efecto del nivel de esterilidad masculina (NEM), el número de flores producidas (NF), y la distancia entre donador y receptor de polen (D) en la contribución de cada donador a la paternidad de semillas (ver resultados). La variable de respuesta fue transformada (arcoseno

y ) para satisfacer el supuesto de la distribución normal del error. Un aspecto

fundamental del diseño experimental consistió en reducir el número de padres potenciales de cada semilla para incrementar la probabilidad de asignación de parentesco genético, y determinar la paternidad de la progenie. Por lo tanto, el procedimiento para caracterizar la adecuación masculina de los individuos thrum requirió formar bloques de plantas con un número reducido de donadores de polen (4 en cada réplica). Una consecuencia probable de formar grupos de consortes en bloques experimentales es que la variación dentro de cada réplica tenga un efecto imprevisto sobre la variable de respuesta entre réplicas. Por lo tanto se utilizó un análisis de covarianza (JMP 4.0.4. SAS Institute, 2001) y en el modelo se incluyeron los tres factores mencionados (NEM, NF y D), el efecto de la réplica como covariable y las interacciones significativas.

*Esterilidad masculina y éxito reproductivo masculino y femenino.* – Uno de los objetivos más importantes de este trabajo fue la estimación de la relación entre la asignación de recursos a la función masculina y la adecuación masculina y femenina de plantas thrum con diferente NEM. Como medida de la inversión en la función masculina ( $r$ ) se utilizó el nivel de esterilidad masculina (NEM) de cada donador de polen. Un valor del  $NEM = 1$  corresponde a la menor inversión en la función masculina  $r = 0$  de plantas thrum completamente estériles. En contraparte un  $NEM = 0$  corresponde a la mayor inversión de recursos en la función masculina  $r = 1$ . Debido a que las funciones de adecuación se obtuvieron en evaluaciones independientes (ver adelante), las pendientes de ambas funciones se compararon en unidades estandarizadas dentro del ámbito de variación observado para el NEM. Primero se caracterizó la relación lineal de la adecuación femenina ( $W_f$ ) en función del NEM. Se utilizó un modelo de regresión que relaciona el cociente



frutos/flores (fruit-set) con el NEM de las plantas thrum [ $\text{Fruit-set}_{(\text{thrum})} = -0.7077 + (1.216 * \text{NEM})$ ].  $F_{(1, 21)} = 4.21$ ,  $P = 0.05$ ,  $R^2 = 0.132$ , Rosas et al., 2005)], se mantuvo fijo el número de flores utilizando el promedio de flores por individuo (668 flores/individuo, Rosas et al., 2005), y se obtuvo el modelo que describe la función de adecuación femenina ( $W_f = -424.62 + 729.6 * \text{NEM}$ ). Después se caracterizó la relación lineal de la adecuación masculina ( $W_m$ ) en función del NEM thrum. Se calculó la cota máxima de producción de semillas pin (óvulos fecundados por plantas thrum) como la diferencia más conservadora de la fecundidad relativa de las plantas pin frente a las thrum en condiciones naturales (fruit-set pin/fruit-set thrum,  $0.143/0.201 = 0.71$ , Domínguez et al., 1997). Como en el caso anterior se mantuvo fijo el número de flores y con base en el modelo de covarianza que calcula la contribución de los donadores de polen thrum a la paternidad de progenie pin en función del NEM y el número de flores (ver resultados), se obtuvo el modelo que describe la función de adecuación masculina. Con base en las pendientes de la relación entre el NEM y las adecuaciones masculina y femenina, se evaluó si la EM de las plantas thrum se favorece sobre el mantenimiento de una condición cosexual. La expectativa teórica señala que si la adecuación de los individuos totalmente estériles supera la adecuación de los individuos cosexuales, entonces la inversión en la función femenina se favorecerá por encima de la asignación simultánea en las funciones masculina y femenina. Es decir el beneficio de invertir recursos en ambas funciones sexuales debe ser subaditivo (Lloyd 1984).

## **Resultados**

*Nivel de variación de ISSRs.* – El análisis mostró que los seis primers de ISSRs produjeron un total de 111 fragmentos. Considerando la ausencia de banda en al menos el 5 % de los individuos, 72 (64.8 %) fragmentos fueron polimórficos (Tabla 2). El número de fragmentos amplificados y el porcentaje de polimorfismo por primer variaron de 10 a 28, y de 45 % a 71 % respectivamente. Asumiendo equilibrio de Hardy – Weinberg la frecuencia del alelo recesivo ( $q$ ) calculada con base en la frecuencia del fenotipo  $q^2$  (ausencia de banda) para cada locus polimórfico varió de 0.42 (banda ausente en 7 de 39 individuos) a

0.75 (banda ausente en 22 de 39 individuos). La frecuencia promedio del alelo recesivo en los 72 loci polimórficos generados por los seis primers fue de 0.586.

*Asignación de paternidad.* – Todas las plántulas ( $n = 460$ ) expresaron al menos alguna banda que no se detectó en su progenitor materno pero sí en al menos uno de los donadores de polen de cada réplica. Se asignó inequívocamente la paternidad de 411 plántulas (89.3 %). La paternidad de 4 a 6 semillas (de 8 a 13 %) por réplica permaneció ambigua. El poder de asignación de paternidad entre las réplicas del experimento fue muy homogéneo, lo que indica que la falta de resolución se debe principalmente a la expresión dominante de los marcadores (no es posible distinguir el genotipo dominante AA del heterocigoto Aa). Sin embargo, en ningún caso se detectó la expresión de bandas que condujera a la exclusión ambigua de candidatos paternos o a la exclusión de todos los donadores posibles. El promedio de la proporción de óvulos fecundados por cada donador de polen fue de 0.28, pero la contribución relativa de los donadores a la paternidad de semillas varió considerablemente (entre 0 y 0.88, ver Figura 3b). El análisis de paternidad reveló que las plantas que no contribuyeron a la paternidad de las semillas presentan niveles de esterilidad mayores a 0.9, por lo que estas plantas pueden considerarse efectivamente estériles para la función masculina. De acuerdo con los resultados el 14 % de las plantas thrum incluidas en el experimento son completamente estériles. Con base en 72 loci polimórficos y una frecuencia promedio de  $q = 0.586$  se estimó la fracción teórica de progenie para la que se puede asignar paternidad a un solo individuo ( $P_{ET}$ , ver Lewis y Snow 1992). El modelo indica que es posible excluir a todos los donadores potenciales excepto al verdadero progenitor paterno para el 92.5 % de la progenie producida en grupos de plantas con sólo 4 donadores de polen. Este estimador de  $P_{ET}$  coincide con el valor de asignación de paternidad logrado con nuestros datos (89.3 % de las semillas).

*Esterilidad masculina y paternidad en condiciones experimentales.* – El análisis reveló que la esterilidad masculina, el número de flores, y la réplica tienen un efecto significativo sobre la contribución de los donadores a la paternidad de las semillas producidas (Tabla 3). La distancia entre consortes no tuvo un efecto significativo sobre la contribución a la paternidad de las semillas. La interacción entre el grado de esterilidad masculina y la

réplica experimental mostró un efecto significativo sobre la variable de respuesta. Las demás interacciones entre los factores principales no mostraron efectos significativos. El modelo explica 82 % de la varianza total en el éxito reproductivo de la función masculina ( $F_{21, 34} = 8.53, P = 0.0001$ ). El efecto significativo del NEM señala que hay una relación positiva entre la fertilidad del polen y la contribución a la paternidad de las semillas (Figura 3). Este resultado puede ser obvio, pero es importante pues señala que la estimación de la fertilidad del polen es adecuada. Además este resultado indica que existe considerable variación en el éxito reproductivo masculino de las plantas thrum. De hecho el análisis de paternidad reveló que en el extremo de esta variación hay individuos que aparentemente han perdido por completo la función masculina. El efecto significativo del número de flores indica que las plantas que producen más flores tienen mayor probabilidad de donar polen y fecundar óvulos en otras plantas. Posiblemente este resultado está relacionado con el patrón de forrajeo denso-dependiente de los principales polinizadores de esta especie (Domínguez et al., 1997). El efecto significativo de la interacción réplica x esterilidad indica que la relación entre la fertilidad del polen y la adecuación masculina de un individuo, es influenciada por la estructura y composición del grupo de plantas con las que éste se aparee y compite. Este resultado revela también que en la evaluación de la varianza del éxito reproductivo en condiciones naturales, es importante considerar el efecto del “ambiente social” en el vecindario inmediato de cada individuo.

*Esterilidad masculina y éxito reproductivo masculino y femenino.* – En esta sección se obtuvieron y compararon las pendientes de la relación lineal de las adecuaciones masculina y femenina de las plantas thrum en función de la asignación de recursos a la función masculina. El modelo que describe la función de adecuación masculina ( $W_m = 439.31 - 459.17 * NEM$ ) se obtuvo con base en el modelo de covarianza que calcula la contribución de los donadores thrum a la paternidad de progenie pin en función del NEM y el número de flores, acotado por la máxima producción de semillas pin [ $Paternalidad_{(thrum)} = (1.998 - 2.21 * NEM) + (0.0001346 * \text{número de flores})$ ] \* [ $W_f \text{ pin} = 0.71$ ]. El análisis reveló que las pendientes de adecuación masculina y femenina difieren en magnitud y signo. La pendiente que relaciona la inversión en la función masculina y el éxito reproductivo de las plantas thrum es mayor para la función femenina que para la masculina. El incremento de una

unidad en la fertilidad del polen aumenta la adecuación masculina en 50 frutos y disminuye la adecuación femenina en 73 frutos (Figura 4). El análisis mostró que las plantas más estériles obtienen la mayoría o el total de su adecuación produciendo frutos y fertilizando muy pocos o ningún óvulo en otras plantas. Lo cual sugiere que las plantas parcialmente estériles tienen mayor éxito reproductivo como donadoras de polen, pero en comparación con plantas más estériles producen menos frutos a través de la función femenina. Los resultados indican que las funciones reproductivas masculina y femenina de los individuos thrum en la población de *E. havanense* que hemos estudiado se correlacionan negativamente (Figura 4a). Los resultados revelan además que la adecuación total de los individuos thrum aumenta con el grado de esterilidad y que la adecuación de los individuos que mantienen más conservada su condición bisexual es menor a la de los fenotipos totalmente estériles (Figura 4b). La adecuación de las plantas completamente estériles es 1.33 (304/228 frutos) veces mayor que la adecuación promedio de plantas con esterilidad masculina parcial, y 1.67 (304/182 frutos) veces superior a la adecuación de plantas cosexuales. Los resultados sugieren que hay una correlación negativa entre las funciones sexuales de individuos thrum con EMP, y que la ventaja reproductiva de las plantas más estériles puede favorecer la selección de la EM en el morfo thrum.

## **Discusión**

La presencia de una mutación que esteriliza la función masculina de individuos hermafroditas se considera un factor clave en la evolución de la especialización sexual. Una correlación negativa entre las funciones sexuales masculina y femenina, y la ventaja reproductiva de los portadores de la mutación de esterilidad sobre los fenotipos hermafroditas, son dos condiciones que pueden favorecer esta transición (Lewis 1941; Gouyon y Couvet 1987; Couvet et al., 1990; Cosmides y Tooby 1981; Charnov 1982). En este trabajo mostramos que la proporción de polen viable que producen las plantas thrum de *Erythroxylum havanense* determina su éxito reproductivo a través de la función masculina. Hay una relación positiva entre la fertilidad del polen y la contribución a la paternidad de semillas pin. Por el contrario, la fertilidad del polen se relaciona de forma negativa con la producción de frutos. Estos resultados indican que la adecuación masculina y femenina de

las plantas thrum están correlacionadas de forma negativa. Los resultados revelaron además que la adecuación de los individuos thrum con mayor grado de esterilidad masculina, puede superar el éxito reproductivo de los fenotipos del mismo morfo que conservan su condición bisexual y que obtienen adecuación por ambas vías sexuales. El incremento de la fertilidad femenina que acompaña la pérdida de la función masculina de los individuos thrum de *Erythroxylum havanense*, sugiere que la esterilidad masculina parcial puede anteceder el establecimiento de hembras en este sistema reproductivo inicialmente distílico. La correspondencia reproductiva de los morfos florales hace que la propagación de individuos estériles en una población distílica sea particularmente relevante para la evolución de la diecia. Debido a que los óvulos de uno de los morfos son necesariamente fertilizados por el polen del morfo complementario, la esterilidad asociada a un morfo puede resultar en el establecimiento de una población funcionalmente dioica. En la literatura clásica se supone que la transición de la distilia a la diecia ocurre por la selección y especialización gradual de los morfos florales en alguna de las funciones sexuales (Darwin 1877; Lloyd 1979). En *Erythroxylum havanense*, esta transición hacia la especialización sexual parece estar dirigida por una modificación genética que inhabilita de manera gradual la función masculina del morfo thrum.

Entre las condiciones que permitirían la propagación de EM en poblaciones hermafroditas se incluyen variación genética en la asignación de recursos, una correlación negativa entre las funciones sexuales que favorezca la compensación de la función perdida, y en el caso de herencia núcleo-citoplasmática de la esterilidad, efectos pleiotrópicos de los genes restauradores sobre la fertilidad (Charlesworth 1981; Ross y Gregorius 1985; van Damme 1984; Frank 1989). Los individuos thrum de la población de *Erythroxylum havanense* que hemos estudiado muestran amplia variación en la producción de polen viable (de  $\approx 0$  a 40 %) y una fracción considerable de la variación fenotípica de este rasgo (0.47) se explica por diferencias permanentes entre individuos ( $F_{1,22} = 15.8$ ,  $P = 0.0006$ ,  $R^2 = 0.39$ , ver Rosas et al., 2005). Esta variación tiene importantes consecuencias reproductivas. Los análisis mostraron que el rendimiento de la inversión de recursos en la función masculina incrementa a una tasa menor que la ganancia por la vía femenina. Como resultado, la adecuación total de las plantas thrum con mayor grado de esterilidad

masculina puede ser desde 1.33 hasta 1.67 veces superior que la de plantas que producen más polen fértil (Figura 4b). Una expectativa que se deriva de estos resultados es la evolución de la EM total del morfo thrum. Acorde a esta predicción y a los resultados del análisis de la paternidad de la progenie, hay plantas thrum completamente estériles o funcionalmente hembras.

Los resultados de trabajos previos indican que la marcada asimetría reproductiva entre los morfos florales de *Erythroxyllum havanense* puede promover la evolución de su sistema reproductivo, las plantas thrum funcionando principalmente como hembras y las pin como machos. Este planteamiento se basa en dos hallazgos principales. Las plantas thrum pueden compensar la pérdida de la función masculina con una ventaja en fecundidad sobre las plantas pin (Domínguez et al., 1997), y la probabilidad de sobrevivir y reproducirse a los 8 años, es 2.8 veces mayor en la progenie de madres thrum (Avila-Sakar y Domínguez 2000). Es decir, las plantas thrum no sólo superan a las plantas pin en el número de semillas producidas sino también en el desempeño de su progenie. A pesar de que no se tiene información sobre el o los mecanismos de compensación de la EM en esta especie, la ventaja reproductiva de las plantas thrum como progenitores maternos que se ha mencionado y la evolución de la EM thrum que sugiere nuestro estudio, son resultados independientes que señalan de forma consistente la evolución de la especialización sexual de los morfos florales de *E. havanense*.

La ruta evolutiva de la distilia a la dioecia es de particular interés pues esta transición puede ser facilitada debido a que las poblaciones distílicas son dimórficas de “origen”, en general autoincompatibles y de entrecruza obligada. Si la frecuencia de fertilizaciones ilegítimas (autofecundación o fecundaciones intra-morfo) es irrelevante, se puede esperar que la función femenina o la feminización de uno de los morfos sea equivalente a la masculinización del morfo complementario. Debido a estos atributos de la distilia, se ha señalado que la transición evolutiva de la distilia a la diecia involucra la reducción de una de las dos funciones sexuales en un morfo, acompañada de la reducción de la función contraria en el morfo complementario (Lloyd 1979; Casper y Charnov 1982; Charlesworth 1989). Esta transición se ha documentado en diferentes familias con especies

distílicas. En *Mussaenda chippii* y en *M. tristigmatica* (Rubiaceae) el diocismo parece haber evolucionado a partir de distilia por la esterilización del polen pin y la inaccesibilidad a los estigmas thrum, lo que hace a los individuos thrum funcionalmente machos (Baker 1958). En el género *Cordia* (Boraginaceae) las especies muestran un rango de condiciones desde la heterostilia sin especialización sexual, hasta la dioecia (i.e. especialización sexual completa, Opler et al., 1975). La reciprocidad reproductiva entre los morfos florales de *E. havanense* puede promover que en la medida que las plantas thrum pierdan la función masculina e incrementen su capacidad para producir semillas, las plantas pin incrementen su adecuación donando polen. En contraste con la ruta evolutiva del diocismo a partir de una condición cosexual monomórfica, la evolución de la EM thrum podría facilitar el establecimiento de poblaciones funcionalmente dioicas sin requerir una segunda mutación que esterilice la función femenina de las plantas pin. De hecho, bajo este escenario se puede predecir que si la inversión en la función femenina es costosa, las mutaciones que impidan el desarrollo del gineceo de las flores pin pueden seleccionarse de forma automática.

Si bien los resultados señalan que la esterilidad masculina del morfo thrum puede ser el factor clave para la evolución de la distilia en un sistema funcionalmente dioico, es claro que un experimento equivalente donde se evalúen las curvas de adecuación de las plantas pin permitiría confirmar o reevaluar nuestro planteamiento.

Cuatro grupos de datos independientes indican que la transición evolutiva de la bisexualidad a la especialización sexual en *E. havanense* es probable. Primero, a pesar de que se desconoce el sistema genético de determinación del sexo, existe considerable semejanza entre la ruta de desarrollo que conduce a la esterilidad masculina en especies con esterilidad masculina citoplasmática (CMS) y la que se ha caracterizado en el morfo thrum de *E. havanense* (Domínguez et al., 1997). La evidencia teórica y empírica indica que la CMS es la forma más común de esterilidad masculina en las angiospermas y que esta forma de herencia es compatible con el establecimiento de hembras en poblaciones hermafroditas (Lewis 1941; Charlesworth 1981; van Damme y van Delden 1982; van Damme 1983; Couvet et al., 1990; Belhassen et al., 1991; Saumitou-Laprade et al., 1994; Koelewijn y van Damme 1995a, 1995b; Gigord et al., 1999; Bailey et al., 2003). Segundo, la fecundidad

femenina de las plantas thrum puede ser hasta cinco veces superior a la fecundidad de las plantas pin dependiendo de la sincronía reproductiva (Rosas et al., 2005). La reproducción sincrónica incrementa la producción de frutos en ambos morfos. En esta situación la ventaja thrum sobre pin es al menos del doble. Sin embargo cuando la reproducción es asincrónica la magnitud de la compensación thrum se incrementa considerablemente. En esta situación las plantas pin producen muy pocos frutos y funcionan casi exclusivamente como donadores de polen. Esto indica que la influencia de la varianza ambiental puede favorecer la ventaja femenina de thrum sobre pin y probablemente la especialización reproductiva de los morfos florales. Tercero, la esterilidad del polen thrum en 5 poblaciones de *E. havanense* en la región de Chamela, es invariablemente mayor que la del polen pin (Cuevas et al., 2005). En una de estas poblaciones la esterilidad del polen es tan elevada que probablemente las plantas thrum en esta localidad son funcionalmente hembras. Por último, la mayoría de las 250 especies del género *Erythroxylum* son heterostílicas (Ganders 1979), sin embargo al parecer como resultado de evolución posterior en el género también hay varias especies dioicas. *E. rotundifolium* (Kelly 2001) y *E. lucidum* var. *costaricense* (Bawa y Opler 1975), son dos especies claramente dioicas. Pero según Schultz (1931, en Bawa y Opler 1975), ocho especies de la sección Heterogyne del género *Erythroxylum* en la región de las Antillas y Centroamérica son dioicas. A pesar de que estos datos constituyen sólo “información correlativa”, si señalan que la especialización sexual ha evolucionado en este género en más de una ocasión a partir de un estado hermafrodita probablemente distílico.

En conclusión, los resultados de este trabajo señalan que la esterilidad masculina asociada al morfo thrum de *E. havanense* puede ser el factor clave en la evolución de la especialización sexual del sistema reproductivo de esta especie. A diferencia de las dos mutaciones de esterilidad complementaria que implica la evolución de la diecia a partir de especies cosexuales monomórficas, la esterilidad masculina asociada al morfo thrum de *E. havanense* puede resultar en la pérdida automática de la función femenina del morfo pin. Esto se debe a la dependencia reproductiva de los morfos florales que caracteriza a la distilia. En este escenario es muy probable que la selección de la EM thrum resulte en el establecimiento de una población funcionalmente dioica con hembras thrum y machos pin,



sin la necesidad de una segunda mutación complementaria que esterilice la función femenina pin.

### **Literatura citada**

- Ågren, J., y M. F. Willson. 1991. Gender variation and sexual differences in reproductive characters and seed production in gynodioecious *Geranium maculatum*. *American Journal of Botany* 78:470-480.
- Atlan, A., P. H. Gouyon, T. Fournial, y D. Couvet. 1992. Sex allocation in an hermaphrodite plant: the case of gynodioecy in *Thymus vulgaris* L. *Journal of Evolutionary Biology* 5: 189-203.
- Avila-Sakar, G., y C. A. Domínguez. 2000. Parental effects and gender specialization in a tropical heterostylous shrub. *Evolution* 54: 866-877.
- Bailey, M. F., L. F. Delph, y C. M. Lively. 2003. Modeling gynodioecy: novel scenarios for maintaining polymorphism *American Naturalist* 161: 762-776.
- Baker, H.G. 1958. Studies in the reproductive biology of West African Rubiaceae. *Journal of the West African Science Association* 4: 9-24.
- Bassam, B., G. Caetano-Annoles, y P. Gresshoff. 1991. A fast and sensitive silver-staining for DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 196: 80-83.
- Bawa, K. S., y P. A. Opler. 1975. Dioecism in tropical forest trees. *Evolution* 29: 167-179.
- Beach, J. H., y K. S. Bawa. 1980. Role of pollinators in the evolution of dioecy from distyly. *Evolution* 34: 1138-1142.
- Belhassen, E., E. Dommée, B. Atlan, A. Gouyon, P. H. Pomete, D. Assoud, y M. W. Couvet. 1991. Complex determination of male sterility in *Thymus vulgaris*: genetic and molecular analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 82: 137-143.
- Bullock, S. H. 1986. Climate of Chamela, Jalisco, and trends in the south coastal region of Mexico. *Archives for Meteorology, Geophysics, and Bioclimatology* 36: 297-316.
- Campbell, D. R. 1998. Variation in lifetime male fitness in *Ipomopsis aggregata*: test of sex allocation theory. *American Naturalist* 152: 338-353.
- Campbell, D. R. 2000. Experimental tests of sex-allocation theory in plants. *Trends in Ecology and Evolution* 15(6): 227-232.

- Casper, B. B., y E. L. Charnov 1982. Sex allocation in heterostylus plants. *Journal of Theoretical Biology* 96: 143-149.
- Charlesworth, B., y D. Charlesworth. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *American Naturalist* 112: 975-997.
- Charlesworth, D. 1981. A further study of the problem of the maintenance of females in ginodioecious species. *Heredity* 46: 27-39.
- Charlesworth, D. 1989. Allocation to male and female function in sexually polymorphic populations. *Journal of Theoretical Biology* 139: 327-342.
- Charlesworth, D. 1999. Theories of the evolution of dioecy. en: M. A. Geber, T. E. Dawson, and L. F. Delph [eds.], *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*, 33-60. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Charnov, E. L. 1982. *The Theory of Sex Allocation*. Princeton University, Princeton, NJ.
- Cosmides, L. M., y J. Tooby. 1981. Cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict. *Journal of Theoretical Biology* 89: 83-129.
- Couvet, D., A. Atlan, E. Belhassen, C. Gliddon, P. H. Gouyon, y F. Kjellberg. 1990. Co-evolution between two symbionts: the case of cytoplasmic male-sterility in higher plants. en: D. Futuyma, y J. Antonovics [eds.], *Oxford survey in evolutionary biology*, 225-250. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Cuevas, G. E., F. Molina-Freaner, L. E. Eguiarte, y C. A. Domínguez 2005. Patterns of male sterility within and among populations of the distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *Plant Ecology* X: 1-8.
- Darwin, C. 1877. *The different form of flowers of the same species*. John Murray, London, UK.
- Delannay, X., P. H. Gouyon, y G. Valdeyron. 1981. Mathematical study of the evolution of gynodioecy with cytoplasmic inheritance under the effect of a nuclear restorer gene. *Genetics* 99: 169-181.
- Delph, L. F., M. A. Bailey, y D. L. Marr. 1999. Seed provisioning in gynodioecious *Silene acaulis* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* 86: 140-144.
- Dem'yanova, A. E. I. 1985. Distribution of gynodioecy in flowering plants. *Botanicheskii Zhurnal* 70: 1289-1301.

- Domínguez, C. A. 1990. Consecuencias ecológicas y evolutivas del patrón de floración sincrónico y masivo de *Erythroxylum havanense* Jacq. (Erythroxylaceae). Tesis doctoral, Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F., México.
- Domínguez, C. A., G. Avila-Sakar, S. Vázquez-Santana, y J. Márquez-Guzmán. 1997. Morph-Biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany* 84: 626-632.
- Domínguez, C. A., y R. Dirzo. 1995. Rainfall and flowering synchrony in a tropical shrub: variable selection on the flowering time of *Erythroxylum havanense*. *Evolutionary Ecology* 9: 204-216.
- Doyle, J. J., y J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Ellstrand, N. C. 1984. Multiple paternity within the fruits of the wild radish, *Raphanus sativus*. *American Naturalist* 123: 819-828.
- Fisher, R. A. 1958. The genetical theory of natural selection. 2d rev. ed. Clarendon Press, Oxford, U.K.
- Frank, S. A. 1989. The evolutionary dynamics of cytoplasmic male sterility. *American Naturalist* 133: 345-376.
- Ganders, F. R. 1979. Heterostyly in *Erythroxylum coca* (Erythroxylaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 78: 11-20.
- Gigord, L., C. Lavigne, J.A. Shykoff, y A. Atlan. 1999. Evidence for effects of restorer genes on male and female reproductive functions of hermaphrodites in the gynodioecious species *Thymus vulgaris*. *L. Journal of Evolutionary Biology* 12: 596-604.
- Gouyon, P. H., y D. Couvet. 1987. A conflict between two sexes, females and hermaphrodites. en: S. C. Stearns [ed], *The evolution of sex and its consequences*, 245-261. Birkhauser Verlag Basel, Boston.
- Hermanutz, L. A., y D. J. Innes. 1994. Gender variation in *Silene acaulis* (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution* 191: 69-81.
- Jacobs, M. S., y M. J. Wade. 2003. A synthetic review of the theory of gynodioecy. *American Naturalist* 161: 837-851.

- Kelly, L. M. 2001. Erythroxyllaceae Kunth. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán, Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM, Fascículo 33: 1-4.
- Koelewijn, H. P. 2003. Variation in restorer genes and primary sexual investment in gynodioecious *Plantago coronopus*: the trade-off between male and female function. Proceedings of the Royal Society of London B. 270: 1939-1945.
- Koelewijn, H. P., y J. M. M. van Damme. 1995a. Genetics of male sterility in *Plantago coronopus*. I. Cytoplasmic variation. Genetics 139: 1749-1758.
- Koelewijn, H. P., y J. M. M. van Damme. 1995b. Genetics of male sterility in *Plantago coronopus*. II. Nuclear genetic variation. Genetics 139: 1759-1775.
- Koelewijn, H. P., y J. M. M. van Damme. 1996. Gender variation partial male sterility and labile sex expression in gynodioecious *Plantago coronopus*. New Phytologist 132: 67-76.
- Lefort, F., y G. C. Douglas. 1999. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. Annales des Sciences Forestieres 56: 259-263.
- Lewis, D. 1941. Male sterility in natural populations of hermaphrodite plants. New Phytologist 40: 56-63.
- Lewis, P. O., y A. A. Snow. 1992. Deterministic paternity exclusion using RAPD markers. Molecular Ecology 1: 155-160.
- Lloyd, D. G. 1974. Theoretical sex ratios of dioecious and gynodioecous angiosperms. Heredity 32: 11-34.
- Lloyd, D. G. 1975. The maintenance of gynodioecy and androdioecy in angiosperms. Genetica 45: 325-329.
- Lloyd, D. G. 1979. Evolution toward dioecy in heterostylous populations. Plant Systematics and Evolution 131: 71-80.
- Lloyd, D. G. 1984. Gender allocations in outcrossing cosexual plants. En. R. Dirzo y J. Sarukhán [eds.], Perspectives on plant population ecology, 277-300. Sinauer, Sunderland MA USA.
- Lott, E. J., S. H. Bullock, y J. A. Solís-Magallanes. 1987. Floristic diversity and structure of upland and arroyo forest of coastal Jalisco. Biotropica 19: 228-235.

- Maurice, S. 1999. Gynomonoecy in *Silene italica* (Caryophyllaceae): sexual phenotypes in natural populations. *Plant Biology* 1: 346-350.
- Muenchow, G. E., y M. Grebus. 1989. The evolution of dioecy from distyly: reevaluation of the hypothesis of the loss of long long-tongued pollinator. *American Naturalist* 133: 149-156.
- Opler, P. A., H. G. Baker, y G. W. Frankie. 1975. Reproductive biology of some Costa Rican *Cordia* species (Boraginaceae). *Biotropica* 7: 234-247.
- Ornduff, R. 1966. The origin of dioecism from heterostyly in Nymphoides (Menyanthaceae). *Evolution* 20: 309-314.
- Poot, P. 1997. Reproductive allocation and resource compensation in male-sterile and hermaphroditic plants of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). *American Journal of Botany* 84(9): 1256-1265.
- Putrament, A. 1962. Some observations on male sterility in *Geranium sylvaticum* L. var. alpestre Schur. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 31: 723-736.
- Rosas, L. F., J. Pérez-Alquicira, y C. A. Domínguez 2005. Environmentally induced variation in fecundity compensation in the morph-biased male-sterile distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany* 92: 116-122.
- Ross, M.D., y H. R. Gregorius. 1985. Selection with gene-cytoplasm interactions. II. Maintenance of gynodioecy. *Genetics* 109: 427-439.
- SAS. 2001. JMP User's Guide, release 4.0.4. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.
- Saumitou-Laprade, P., J. Cugen, y P. Vernet. 1994. Cytoplasmic male sterility in plants: molecular evidence and the nucleo-cytoplasmic conflict. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 431-435.
- Stevens, D. P., y A. J. Richards. 1985. Gynodioecy in *Saxifraga granulata* L. (Saxifragaceae). *Plant Systematics and Evolution* 151: 43-54.
- van Damme, J. M. M. 1983. Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. II. Inheritance of three male sterility types. *Heredity* 50: 253-273.
- van Damme, J. M. M. 1984. Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. III. Sexual reproduction and the maintenance of male steriles. *Heredity*. 52: 77-93.

- van Damme, J. M. M., y W. van Delden. 1982. Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. I. Polymorphism for plasmon type. *Heredity* 49: 303-318.
- Webb, C. J. 1999. Empirical studies: evolution and maintenance of dimorphic breeding systems. en: M. A. Geber, T. E. Dawson y L. F. Delph [eds.], *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. 61-95. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. F. Livak, J. A. Rafalski, y S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6631-6535.
- Wyatt, R. 1983. Pollinator-plant interactions and the evolution of breeding systems. en: Real L. [ed.], *Pollination biology*. 51-95. Academic Press, New York, USA.

Tabla 1. Frecuencia de hembras y de individuos con esterilidad masculina parcial (EMp) en poblaciones de especies ginodioicas. Se incluyen la media, el ámbito de variación entre poblaciones, el número de poblaciones estudiadas (N) y la adecuación relativa de los fenotipos florales (EM = hembras, EMp y H = hermafroditas). (++) es el promedio de tres familias (++) de cruza inter-poblacionales.

Especie	Frecuencia de hembras	Frecuencia de EMp	Adecuación relativa EM/EMp EM/H		N	Fuente
<i>Geranium silvaticum</i>	9.6 (3.6 – 24.8)	8.2 (4.1 – 15.6)		-----	12	Putramen 1962
<i>Geranium maculatum</i>	3 (0.9 – 5.1)	23.65 (20.2 – 27.1)	1.22	1.56	2	Agren y Willson 1991
<i>Plantago lanceolata</i>	8.2 (0.2 – 23.3)	5.2 (0.2 – 20.4)		-----	27	Van Damme y van Delden 1982
<i>Plantago lanceolata</i>	-----	-----	1.26	1.68	++	Poot 1997
<i>Saxifraga granulata</i>	20.1 (3.7 – 25.5)	3.9 (0-4.6)		-----	3	Stevens y Richards 1985

Tabla 2. Número de loci, número de loci polimórficos y porcentaje de polimorfismo producidos por seis primers de ISSRs en las plantas de *Erythroxylum havanense* analizadas.

Primer	Secuencia (5'-3')	Num loci	Num loci polimórficos	% polimorfismo
809	AGA GAG AGA GAG AGA GG	28	20	71.4
810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	20	14	70
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	11	5	45.5
842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	25	17	68
856	ACA CAC ACA CAC ACA AYA	17	11	64.7
857	ACA CAC ACA CAC ACA CYG	10	5	50
Total		111	72	64.8

Tabla 3. ANCOVA del efecto de la réplica experimental, el grado de esterilidad masculina, la producción de flores y la distancia entre consortes sobre el éxito reproductivo de la función masculina en plantas de morfo thrum de *Erythroxylum havanense* en condiciones experimentales.

Fuente	df	SS	<i>F</i>	<i>P</i>
Réplica	9	0.23	2.64	0.054
Esterilidad	1	0.51	52.5	< 0.001
Flores	1	0.25	26	< 0.001
Distancia	1	0.02	2	0.17
Réplica * Esterilidad	9	0.51	5.88	0.002



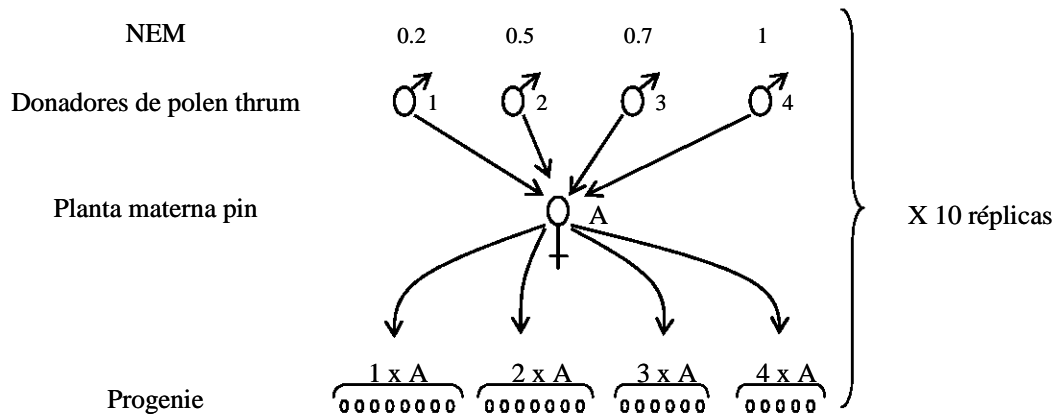


Figura 1. Diseño de cruces entre donadores de polen thrum (1 – 4) con diferente nivel de esterilidad masculina (NEM) y plantas maternas pin (A). En el diseño original se incluyeron dos plantas maternas pin, por simplicidad se muestra sólo una. El experimento se repitió en 10 ocasiones para evaluar el efecto de la variación en la viabilidad del polen sobre el éxito reproductivo de la función masculina del morfo thrum.

Réplicas/Tiempo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	„	„	n	
A		R						Fl														
B					R							Fl										
C									R						Fl							
„																						
„																						
J																				R		Fl

Figura 2. Diseño de riego. Las plantas dentro de cada réplica se regaron (R) al mismo tiempo para hacerlas florecer en sincronía (Fl). Las réplicas experimentales (A – J) se regaron en secuencia para evitar que las plantas de los diferentes grupos florecieran al mismo tiempo.

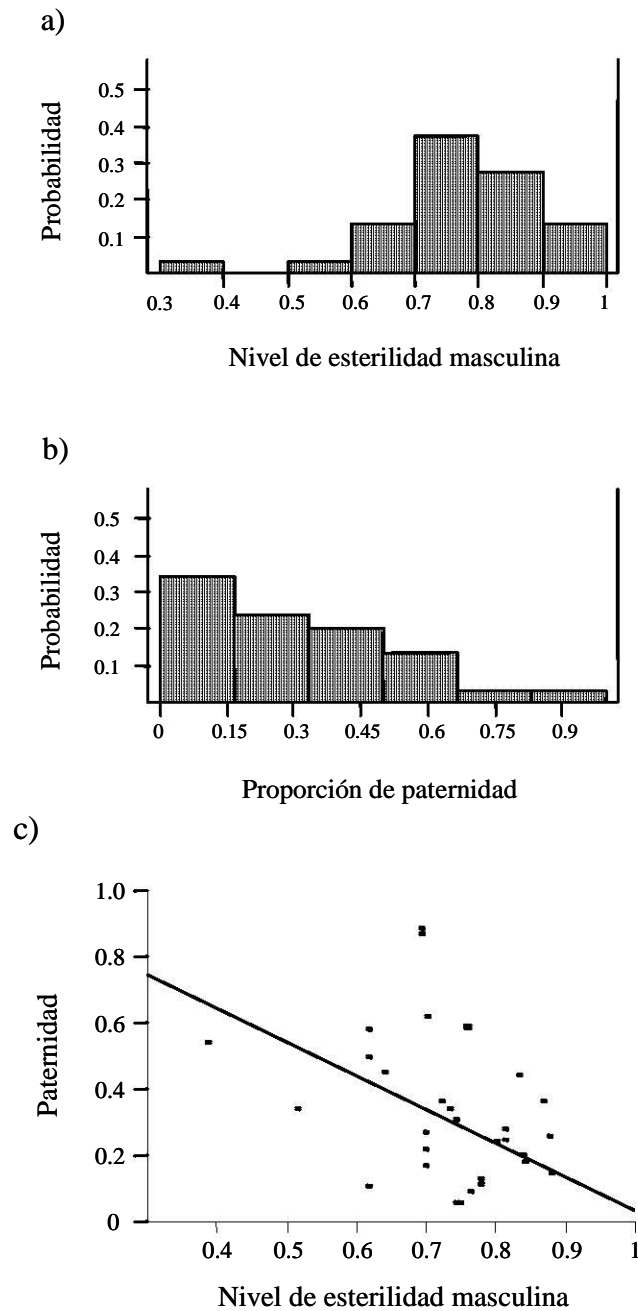
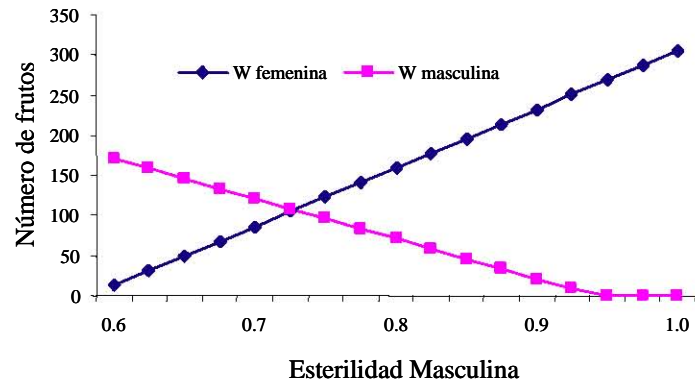


Figura 3. a) Las plantas de morfo thrum muestran niveles de esterilidad del polen por arriba de 50 %. b) La contribución de las plantas thrum a la paternidad de semillas pin varia ampliamente. Las plantas con esterilidad por arriba de 0.9 no contribuyen a la fertilización de óvulos y se podrían considerar funcionalmente hembras. c) En general a medida que la esterilidad del polen de las plantas thrum incrementa, la probabilidad de contribuir a la paternidad de las semillas pin disminuye (paternidad =  $1.06 - 1.02 * NEM$ ,  $R^2 = 0.28$ ).

a)



b)

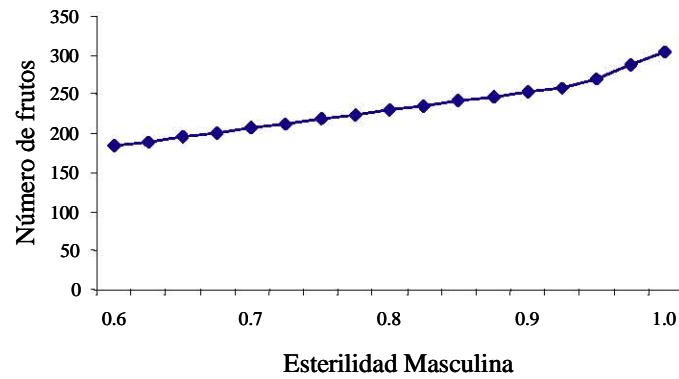


Figura 4. a) Funciones de adecuación masculina y femenina de individuos thrum de *Erythroxylum havanense* en función del nivel de esterilidad masculina. b) Adecuación total (w femenina + w masculina) de plantas thrum en el rango de variación observado de esterilidad masculina. Los valores graficados se calcularon con base en los estimadores estandarizados de dos modelos independientes de la adecuación masculina y femenina en función del NEM de las plantas thrum.

## Capítulo II

Esterilidad masculina parcial y evolución de la especialización sexual en *Erythroxylum havanense*: una evaluación de los efectos paternos en la compensación pos-reproductiva.

Luis Fernando Rosas Pacheco y César A. Domínguez

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
Apartado Postal 70-275, C. P. 04510,  
México Distrito Federal, México.

## Resumen

La propagación de hembras en poblaciones hermafroditas requiere que los individuos estériles compensen la adecuación perdida produciendo más y/o mejores semillas que los individuos hermafroditas. En el arbusto distílico *Erythroxylum havanense* la esterilidad masculina (EM) se expresa en diferente grado y se asocia principalmente a las plantas de morfo thrum. En compensación las plantas thrum producen 46 % más semillas y su progenie crece más rápido y se reproduce primero que la progenie pin. La evolución de la especialización reproductiva de los morfos florales de esta especie requiere que la producción de semillas de los individuos estériles thrum supere la adecuación que las plantas bisexuales del mismo morfo obtienen a través de ambas funciones reproductivas. Esta premisa se ha probado positivamente y se plantea que la evolución de la EM total de las plantas thrum, junto con la dependencia reproductiva de los dos morfos florales podría resultar en un sistema funcionalmente dioico con las plantas pin funcionando exclusivamente como machos. Sin embargo el desempeño de la progenie de cruza entre madres pin y donadores de polen thrum muestra efectos paternos (a ocho años de edad) que podrían reducir la ventaja reproductiva de las plantas estériles, y como consecuencia, frenar la transición evolutiva de la distilia a la diecia que se propone para esta especie. En este trabajo se evalúa si el desempeño y la supervivencia de 363 plántulas distribuidas en 20 familias de padres thrum con diferente (NEM) nivel de esterilidad masculina (9 a 40 plántulas / padre) y anidadas en 10 familias maternas pin (16 a 46 plántulas / madre) expresan efectos paternos. Una correlación positiva entre la fertilidad del polen de los donadores y el desempeño de la progenie, indicaría que las plantas bisexuales thrum tienen una ventaja pos-reproductiva que podría limitar la especialización de las plantas thrum en la función femenina. Los resultados revelaron que el desempeño de la progenie, evaluado desde su establecimiento hasta los primeros cuatro años de edad, es independiente de la identidad de los donadores de polen y por lo tanto de su NEM. Se puede concluir que los efectos paternos thrum en el desempeño de la progenie no alteran la ventaja reproductiva de las plantas estériles, ni representan una restricción a la evolución de la EM del morfo thrum de *E. havanense*.

## Introducción

El surgimiento de mutaciones de esterilidad masculina (EM) en especies hermafroditas se considera un factor clave en la evolución del dioicismo. Un requisito para la evolución de la especialización sexual es que los individuos con EM compensen la adecuación perdida con un incremento en la cantidad y/o la calidad de semillas que producen en comparación con las plantas hermafroditas (Lloyd 1975; Charlesworth y Charlesworth 1978; Gouyon y Couvet 1987). El arbusto distílico *Erythroxylum havanense*, la especie de estudio de este trabajo, tiene esterilidad masculina parcial (EMp) asociada a una ventaja femenina compensatoria en las plantas de morfo thrum (Domínguez et al. 1997). Las plantas pin producen en promedio 1.8 veces más polen viable que los individuos thrum, pero en contraparte las plantas thrum producen más semillas que las plantas pin y su progenie crece y se reproduce con mayor rapidez que la progenie de madres pin (Avila-Sakar y Domínguez 2000). Esta asimetría reproductiva junto con la dependencia reproductiva de los morfos florales que caracteriza a las especies distílicas, se han utilizado para proponer la evolución de un sistema funcionalmente dioico, con las plantas thrum funcionando principalmente como hembras y las pin como machos. Esta transición evolutiva de la distilia a la diecia requiere que la fertilidad femenina de las plantas estériles thrum supere la adecuación de las plantas cosexuales del mismo morfo. Un estudio diseñado para evaluar esta premisa mostró que el nivel de esterilidad masculina (NEM) de las plantas thrum se correlaciona de forma negativa con la contribución a la paternidad de semillas pin, y que las plantas thrum con mayor NEM tienen una ventaja reproductiva que favorece el establecimiento de plantas thrum completamente estériles para la función masculina (Rosas y Domínguez en prep.). Estos resultados indican que la EM total de las plantas thrum se favorece por encima del mantenimiento de la cosexualidad. Sin embargo se ha demostrado que el crecimiento de la progenie de cruza entre madres pin y padres thrum tiene efectos paternos significativos en un periodo de ocho años (Avila-Sakar y Domínguez 2000), lo cual podría modificar la adecuación que obtienen las plantas thrum como donadoras de polen. En este estudio evaluamos si el desempeño de la progenie de cruza entre madres pin y padres thrum con diferente NEM esta relacionada con la identidad de los padres. El objetivo consiste en determinar si los efectos paternos se asocian con el NEM de los

donadores de polen, y establecer si dicha relación puede modificar la adecuación masculina de las plantas thrum y la evolución de la esterilidad masculina total que se plantea para las plantas de este morfo. La existencia de una correlación negativa entre el NEM de los padres y el desempeño de la progenie indicaría que las plantas funcionalmente cosexuales pueden tener una ventaja pos-reproductiva sobre las plantas con mayor grado de esterilidad. En consecuencia, se puede esperar que esta ventaja de las plantas cosexuales frene la evolución de la esterilidad masculina total de las plantas thrum y la especialización sexual de los morfos florales de *E. havanense*.

En diversos taxa se ha mostrado una correlación positiva entre la intensidad de polinización y la calidad de la progenie (Mulcahy y Mulcahy 1975; Ter-Avanesian 1978; Mulcahy et al., 1983). En general se ha mostrado que la progenie producto de polinizaciones con cargas de polen grandes puede tener una ventaja en germinación, crecimiento vegetativo, y mejor desempeño reproductivo sobre la progenie producto de cargas de polen pequeñas (Quesada et al., 1993, 1996, Jóhannsson y Stephenson 1997, pero ver Mitchell 1997). Mulcahy (1974) plantea que la relación entre el vigor de la progenie y el tamaño de las cargas de polen es resultado de competencia polínica. De acuerdo a esta hipótesis cuando hay competencia polínica los granos de polen más vigorosos fertilizarán la mayoría de los óvulos y la progenie resultante tendrá por lo tanto una mayor adecuación. En el caso de *E. havanense* es probable que las cargas de polen de los donadores con diferente NEM varíen en la proporción de polen fértil que contienen, y que por lo tanto provean diferentes ambientes de competencia polínica. Esta situación predice una ventaja en el desempeño de la progenie derivada de cruza con padres cosexuales thrum (menor NEM). En contraste, la calidad de la progenie de cruza con donadores thrum parcialmente estériles (mayor NEM) debería ser menor. Como se mencionó, los resultados de estudios previos muestran que la EM y la especialización de las plantas thrum en la función femenina pueden ser seleccionadas sobre el mantenimiento de una condición cosexual (Avila-Sakar y Domínguez 2000; Cuevas et al., 2005; Rosas y Domínguez en prep). Por lo tanto, si los donadores de polen thrum con bajo NEM tienen una ventaja selectiva por producir progenie de mayor calidad que los donadores thrum con alto NEM, la compensación reproductiva de la EM thrum podría modificarse en etapas posteriores a la

reproducción. Es decir, el mejor desempeño de la progenie de las plantas cosexuales puede reducir la ventaja reproductiva de las plantas thrum con mayor grado de esterilidad, y retrasar o diluir la evolución de la especialización de las plantas thrum en la función femenina.

La expresión más común de la EM en las angiospermas es sin duda el ginodiocismo. Este se caracteriza por la coexistencia de hembras y plantas hermafroditas en la misma población. Por lo tanto los modelos teóricos y la evidencia empírica se han enfocado en determinar como se mantienen los individuos estériles que tienen una evidente desventaja selectiva frente a su contraparte hermafrodita (Delanay et al., 1981; Gregorious y Ross 1984; Frank 1989). En términos generales los individuos estériles tienen que duplicar la cantidad y/o la calidad de las semillas producidas por las hermafroditas para compensar la adecuación perdida (Lewis 1941). Se han propuesto tres hipótesis no mutuamente excluyentes para explicar la mayor calidad de la progenie de las hembras en comparación con la progenie de las hermafroditas. Una hipótesis plantea que las hembras pueden utilizar los recursos que no gastan en la producción de polen para incrementar el aprovisionamiento y la calidad de sus semillas (Darwin 1877; Charlesworth 1989; Koelewijn 1996; Gigord et al., 1999). La segunda explicación es que la progenie de las plantas hermafroditas puede ser producto de autofecundación y sufrir el efecto negativo de la depresión por endogamia (Charlesworth y Charlesworth 1978; Ashman 1992; Delph y Lloyd 1996; Thompson y Tarayre 2000). La tercera hipótesis plantea que debido a que la sexualidad de muchas especies ginodioicas está determinada por genes citoplasmáticos de esterilidad y por genes nucleares que restauran la fertilidad del polen (Hanson 1991; revisado por Saumitou-Laprade et al., 1994), la progenie de las plantas hermafroditas puede expresar los efectos pleiotrópicos negativos (costo) de la restauración (Charlesworth y Ganders 1979; de Haan et al., 1997; Delph y Mutikainen 2003). La evidencia empírica indica que la reasignación de recursos, la depresión por endogamia, y los costos de la restauración pueden contribuir en diferente grado al mantenimiento de hembras en poblaciones hermafroditas (Mutikainen y Delph 1998; Delph et al., 1999; Shykoff 1988; Ashman 1992; Delph y Mutikainen 2003; Koelewijn y van Damme 1995a, 1995b). Sin embargo otros factores diferentes a los mencionados también pueden influir en la calidad de la progenie de los diferentes tipos



sexuales. Por ejemplo, en la planta ginodioica *Silene acaulis* las flores hermafroditas tienen estilos más cortos que las flores pistiladas, y se ha planteado que esta diferencia morfológica podría promover la competencia polínica en los estilos de las flores hembra y explicar las diferencias en la calidad de la progenie entre hembras y hermafroditas (Shykoff 1992). De manera semejante en este trabajo planteamos que los donadores de polen con diferente NEM pueden engendrar progenie que difiere en calidad, y que esto a su vez puede modificar la evolución de la especialización femenina de las plantas thrum de *E. havanense*.

En contraste con la evolución de la especialización sexual dirigida por mutaciones de EM de efecto mayor (ginodiocismo), la presencia de individuos con EMp en *E. havanense* precisa no sólo determinar la ventaja femenina que permitiría el mantenimiento de hembras, sino además requiere evaluar la calidad de la progenie que los fenotipos parcialmente estériles producen a través de la función masculina. Estudios previos de las consecuencias evolutivas de la EMp en *E. havanense* señalan que en términos de la cantidad de progenie producida la selección favorece a los individuos thrum totalmente estériles. Sin embargo no se conoce el efecto que la variación en la calidad de la progenie de padres thrum puede tener en la evolución de la especialización femenina en las plantas de este morfo. Con el fin de establecer cuál es el efecto de la variación en el desempeño de la progenie en el establecimiento de plantas thrum funcionalmente hembras, en este trabajo analizamos la supervivencia y el crecimiento de la progenie derivada de cruces entre receptores pin y grupos de donadores thrum con diferente NEM en un periodo de cuatro años. La evaluación de las consecuencias del NEM de los donadores de polen en la calidad de la progenie y en la compensación de la EM thrum, es relevante ya que la pérdida de la función masculina de las plantas thrum implicaría la pérdida de la función femenina de las plantas pin (debido a la reciprocidad reproductiva de los dos tipos florales), y en consecuencia, el establecimiento de una población funcionalmente dioica donde las plantas del morfo thrum actuarían como hembras y las pin como donadoras de polen.

## **Materiales y Métodos**

### *La planta de estudio*

*Erythroxylum havanense* Jacq. (Erythroxylaceae) es un arbusto distílico que presenta esterilidad masculina asociada principalmente al morfo thrum. Resultados de estudios previos revelan que una fracción importante de la variación en la producción de polen fértil se debe a diferencias permanentes entre individuos (ver Rosas et al., 2005). Las plantas thrum producen en promedio 54 % del polen viable que producen los individuos pin, pero en contraste producen 46 % más semillas y su progenie crece más rápido y se reproduce primero (Domínguez et al., 1997; Avila-Sakar y Domínguez 2000). Está marcada asimetría reproductiva junto a la dependencia reproductiva entre los dos morfos florales hace suponer la evolución de este sistema originalmente distílico en uno funcionalmente dioico (Avila-Sakar y Domínguez 2000).

### *La progenie y las variables analizadas*

La progenie analizada en este trabajo se obtuvo en un estudio previo donde se evaluó experimentalmente el efecto del NEM en la adecuación masculina de individuos thrum en una población natural (ver detalles del diseño experimental y del análisis de la paternidad de la progenie en Rosas y Domínguez en prep.). En este trabajo se analiza el crecimiento y la supervivencia de 363 plántulas en un periodo de cuatro años. Las plántulas crecieron en una exclusión en condiciones naturales donde fueron trasplantadas después de germinar en un diseño completamente aleatorio. La progenie se agrupa en 20 familias de padres thrum (9 a 40 plántulas / padre) anidadas en 10 familias maternas pin (16 a 46 plántulas / familia materna). Para describir el crecimiento y la supervivencia de la progenie se registraron los siguientes componentes de adecuación: la masa de las semillas, el número de hojas al final de las temporadas de lluvia de 1999 al 2002, el diámetro basal, la altura, y el incremento absoluto en número de hojas en el 2003, así como la supervivencia de las plántulas durante un periodo de cuatro años (2000-2003). Debido a que la paternidad se determinó hasta que las plántulas se trasplantaron y produjeron el primer par de hojas verdaderas, fue imposible estimar componentes de adecuación que evalúan la calidad de la progenie en etapas tempranas de desarrollo (i.e., la probabilidad de madurar óvulos fecundados, germinación y

establecimiento como plántula hasta el trasplante). La tasa de crecimiento de la progenie durante los primeros tres años (2000 – 2002) se calculó con base en el número de hojas por planta. Para evaluar el tamaño de los individuos con cuatro años de edad, se midieron la altura, el diámetro basal y el incremento absoluto de hojas. Las curvas de supervivencia de la progenie se estimaron con base en los registros de cuatro censos anuales (2000 – 2003). Avila-Sakar y Domínguez (2000) mostraron que la altura, el diámetro basal y el incremento absoluto en la producción de hojas constituyen descriptores adecuados del crecimiento de las plántulas de *E. havanense* en el corto plazo. Debido a que las hojas de algunas plántulas fueron dañadas por herbívoros y que esto puede resultar en estimadores de crecimiento negativo, se calculó el incremento absoluto del número de hojas como describen estos autores.

#### *Análisis de datos*

El interés principal de este estudio consiste en evaluar si la variación en el desempeño de la progenie esta relacionada con el NEM de los progenitores paternos thrum. Sin embargo el anidamiento de los donadores de polen en las plantas maternas de nuestro diseño de cruza, no permite evaluar de manera independiente el NEM de los progenitores y la identidad paterna. Por lo tanto, primero se requiere detectar un efecto general de la identidad paterna (padres anidados en madre) en las variables de desempeño descritas, y luego de revelar un efecto significativo, evaluar la relación entre el componente de desempeño particular y el NEM de los progenitores (i.e., regresión lineal para casos con varias  $y$ s por cada  $x$ , Sokal y Rohlf 1995 ). El efecto paterno en la tasa de crecimiento (incremento de número de hojas) de la progenie se realizó utilizando un ANOVA de medidas repetidas (JMP, SAS Institute, 2001), debido a que se hicieron varias medidas de las mismas plantas en un periodo de cuatro años. El modelo incluyó el incremento en el número de hojas de la progenie como variable de respuesta, y la identidad de las plantas maternas y a los padres anidados en las plantas maternas como factores. El mismo modelo se utilizó para evaluar los efectos paternos en diferentes atributos relacionados con el desarrollo y desempeño de la progenie; la masa de las semillas, el número de hojas en 1999 (i.e., número de hojas iniciales de las plántulas que sobrevivieron al trasplante), y el diámetro, la altura y el incremento absoluto de hojas de las plántulas con 4 años de edad. Cada componente del crecimiento se analizó

con ANOVAS separados (JMP, SAS Institute, 2001). Debido a que los componentes de crecimiento pueden estar correlacionados se analizó también el tipo y la magnitud de la correlación entre pares de variables. El efecto de la identidad paterna en la supervivencia de la progenie se analizó por medio de un modelo de regresión semi-paramétrico (proportional hazards, Cox 1972, JMP, SAS Institute, 2001). Este método analiza el tiempo de supervivencia en función de los factores de interés. Se utilizaron los datos de cuatro censos realizados de 2000 a 2003 para calcular el tiempo de supervivencia de cada plántula y esta variable se utilizó como variable de respuesta en el análisis. Debido a que los censos únicamente dan información de los individuos que murieron en el periodo evaluado, se incluyó una variable extra para indicar la supervivencia de las plántulas remanentes hasta el censo final. En el modelo se incluyeron como factores el efecto materno y la identidad de los padres anidada en las plantas maternas.

## **Resultados**

### *Identidad de los progenitores y tasa de crecimiento de la progenie*

El análisis de medidas repetidas reveló que la tasa de crecimiento de la progenie derivada de cruces entre madres pin y donadores thrum con diferente NEM, fue influida significativamente por la identidad de las madres pero no presenta efectos paternos en un periodo de cuatro años (Tabla 1). Un resultado previsible fue el efecto significativo del tiempo. En general el número de hojas de las plantas agrupadas en familias maternas incremento de 6.52 en el año 2000, a 15.6 y 16.6 uno y dos años después respectivamente. La interacción entre el tiempo y la identidad de las plantas maternas también tuvo un efecto significativo en el crecimiento de la progenie. Esta interacción indica que el efecto del tiempo en el crecimiento de las plántulas depende de la identidad del progenitor materno.

### *Identidad de progenitores y componentes de adecuación de la progenie*

Los análisis de varianza revelaron que la identidad de las plantas maternas puede afectar la adecuación de la progenie en el corto plazo (Tabla 2). Se detectaron efectos maternos en tres de las cinco variables analizadas: la masa de las semillas, el número de hojas iniciales y el número de hojas al final del periodo de cuatro años (La variación en los atributos

relacionados con el desempeño de la progenie se ilustra en la Figura 1). En contraste con los efectos maternos, no se encontró una influencia significativa de los progenitores paternos en el desempeño de la progenie (únicamente se consideró el efecto de los factores cuando el modelo general fue significativo:  $P < 0.05$ ). La identidad de las madres explica el 72 % de la varianza en la masa de las semillas y esta variación está relacionada con el tamaño (número de flores) de las plantas maternas ( $F_{(1, 8)} = 7.5$ ,  $P < 0.025$ ,  $R^2 = 0.34$ ). Las plantas más grandes producen semillas de mayor tamaño, pero no se encontró que la masa de las semillas se relacione con los demás componentes del crecimiento y la supervivencia que hemos analizado. La identidad de las plantas maternas también explica una pequeña fracción de la varianza total en el número de hojas iniciales (8 %), y de la varianza en el número de hojas de la progenie a los cuatro años de edad (6 %). Además, el número de hojas iniciales se correlaciona de manera positiva con el diámetro basal, la altura y el número de hojas a los cuatro años de edad (0.34, 0.16 y 0.27 respectivamente). Sin embargo no se encontró que estos componentes del desempeño de la progenie se relacionen con algún atributo particular de las plantas maternas.

#### *Identidad de los progenitores y supervivencia de la progenie*

De las 363 plántulas incluidas en el análisis de supervivencia, 70 murieron y 293 sobrevivieron al final del periodo de cuatro años. La fracción de progenie que sobrevivió al periodo de cuatro años varió de 0.7 a 0.9 y de 0.6 a 1 para familias maternas y familias paternas respectivamente. Sin embargo el análisis reveló que esta varianza en la probabilidad de supervivencia de la progenie no es explicada por la identidad de las madres ni de los donadores de polen (Tabla 3).

En general, nuestros resultados señalan que los efectos maternos (probablemente genéticos y ambientales) prevalecen en diversos componentes del crecimiento de la progenie. En contraste, nuestro diseño y análisis revelan que la identidad de los progenitores paternos no afecta el crecimiento ni la supervivencia de la progenie en los primeros cuatro años de vida.

## Discusión

Los resultados de este trabajo revelaron que la progenie de cruzas entre madres de morfo pin y donadores de polen thrum con diferente NEM no muestra efectos paternos en los componentes del crecimiento ni en la probabilidad de sobrevivir durante los primeros cuatro años de vida. En contraste los resultados revelaron que la identidad de las plantas maternas explica parte de la variación observada en la tasa de crecimiento y en tres atributos relacionados con el vigor de la progenie, pero no en la probabilidad de supervivencia. Por lo tanto, parece poco probable que la variación en el desempeño de la progenie de donadores de polen thrum, sea un factor que diluya la ventaja reproductiva que tienen las plantas thrum con mayor grado esterilidad masculina sobre las plantas “hermafroditas” del mismo morfo (ver capítulo 1 de este trabajo).

Los resultados revelaron efectos maternos (pin) en el crecimiento de la progenie, la masa de las semillas, el número de hojas iniciales y el número de hojas a los cuatro años de edad. A pesar de que los componentes de crecimiento de la progenie se correlacionaron en general de manera positiva, únicamente la masa de las semillas se relacionó con una de las características de las madres. Se detectó que la masa de las semillas y el número de flores de las madres se correlacionan positivamente. Esto sugería que podía haber variación genética entre las plantas pin para la obtención, asimilación y asignación de recursos a la función femenina y el aprovisionamiento de semillas. Sin embargo, debido a que la producción de flores se relaciona con el tamaño de las plantas (Rosas et al., 2005) es probable que la variación en la masa de las semillas sea influenciada por el ambiente que experimentan las plantas maternas (varianza ambiental). Además el tamaño de las semillas no se correlaciona con los demás componentes del vigor de la progenie, por lo tanto parece poco probable que la selección favorezca este atributo de la progenie de las madres pin. Probablemente esto contrasta con la relación entre el tamaño de las semillas y el vigor de la progenie que ocurre con frecuencia en plantas. Sin embargo la marcada asimetría reproductiva de los morfos florales de *Erythroxylum havanense* (Avila-Sakar y Domínguez 2000) y la evolución de la esterilidad masculina del morfo thrum (Rosas y Domínguez en prep.), sugieren que en la medida que se pierda la función masculina del morfo thrum, la

inversión en la función femenina pin brindará pocos beneficios. Si además los atributos relacionados con la función femenina pin (producción de óvulos, semillas y frutos) implican un costo, se puede esperar que su mantenimiento sea poco favorecido.

Los resultados de este trabajo se restringen al desempeño de la progenie desde la producción del primer par de hojas verdaderas y el trasplante, hasta la supervivencia a los cuatro años de edad. Sin embargo la identidad del progenitor paterno podría afectar el vigor de la progenie en etapas de desarrollo como la maduración de las semillas, la germinación, o la viabilidad y supervivencia de las plántulas antes del trasplante. Debido a que la paternidad de la progenie se determinó hasta después del trasplante, nuestros datos no permiten detectar efectos paternos antes de dicha etapa. Por ejemplo, en la planta ginodioica *Silene acaulis* las diferencias en supervivencia entre la progenie de los diferentes tipos florales ocurren durante el establecimiento temprano de las plántulas pero no en etapas posteriores (Delph y Mutikainen 2003). Si este es el caso de la progenie analizada en este trabajo, entonces es necesario realizar cruza manuales entre grupos de plantas particulares, y/o establecer la paternidad de las semillas antes de la germinación y del establecimiento de las plántulas. Lo cual resultaría bastante complejo debido a la dificultad para manipular las plantas de esta especie en condiciones naturales.

Por ultimo, en *E. havanense* el NEM de las plantas thrum se relaciona de manera positiva con la adecuación femenina y de manera negativa con la adecuación masculina (Rosas y Domínguez en prep). Esto sugiere que hay una correlación negativa entre las funciones sexuales y que la selección en favor de la función femenina de las plantas thrum podría relacionarse con la reasignación de recursos que incremente la producción de semillas. En especies con EM la determinación del sexo involucra en la mayoría de casos genes citoplasmáticos de esterilidad y genes nucleares que restauran la fertilidad del polen de manera específica (Couvét et al., 1990; Bellhassen et al., 1991; Saumitou-Laprade et al., 1994; de Haan et al., 1997). Una consecuencia de este modo de herencia es que debido al número de genes involucrados y al grado de correspondencia entre genes citoplasmáticos y nucleares (Koelewijn y van Damme 1995a, 1995b; Couvét et al., 1990; Dudle et al., 2001; Bailey y McCauley 2005), se pueden producir individuos parcialmente estériles (Govinda

Raj y Virmani 1988; Koelewijn y van Damme 1996; Gigord et al., 1999). Además en algunos casos se ha reportado que la producción de polen y la inversión en óvulos y semillas en los individuos de sexualidad intermedia se correlacionan de manera negativa (Ågren y Willson 1991; Poot 1997; Koelewijn 2003). Sin embargo, y a pesar de que las mutaciones que afectan la fertilidad del polen en las angiospermas ocurren con alta frecuencia, las consecuencias reproductivas de la EMp y su efecto en la evolución de los patrones de asignación y especialización sexual han sido muy poco estudiadas. En *E. havanense* no se conoce el modo en que se hereda la EM, ni se sabe si la compensación de la adecuación perdida involucra la reasignación de recursos de la producción de polen hacia la producción de semillas. *E. havanense* es un arbusto que florece hasta los ocho años de vida y lo hace de forma sincrónica por un periodo muy reducido cada temporada de lluvia, por lo tanto, la respuesta a estas cuestiones que sin duda requieren de estudios detallados que permitan aclararlas involucra una seria dificultad. Los resultados de este trabajo son consistentes con la evidencia de trabajos relacionados, y en conjunto indican que la evolución de la EM de las plantas del morfo thrum de *E. havanense* es favorecida sobre el mantenimiento de individuos hermafroditas y de sexualidad intermedia.

### **Literatura citada**

- Ågren, J., y M. F. Willson. 1991. Gender variation and sexual differences in reproductive characters and seed production in gynodioecious *Geranium maculatum*. *American Journal of Botany* 78:470-480.
- Ashman, T. L. 1992. The relative importance of inbreeding and maternal sex in determining progeny fitness in *Sidalcea oregana* ssp. *spicata*, a gynodioecious plant. *Evolution* 46: 1862-1874.
- Avila-Sakar, G., y C. A. Domínguez. 2000. Parental effects and gender specialization in a tropical heterostylous shrub. *Evolution* 54: 866-877.
- Bailey, M. F., L. F. Delph, y C. M. Lively. 2003. Modeling gynodioecy: novel scenarios for maintaining polymorphism *American Naturalist* 161: 762-776.



- Belhassen, E., E. Dommée, B. Atlan, A. Gouyon, P. H. Pomete, D. Assoud, y M. W. Couvet. 1991. Complex determination of male sterility in *Thymus vulgaris*: genetic and molecular analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 82: 137-143.
- Charlesworth, B., y D. Charlesworth. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *American Naturalist* 112: 975-997.
- Charlesworth, D. 1989. Allocation to male and female function in sexually polymorphic populations. *Journal of Theoretical Biology* 139: 327-342.
- Charlesworth, D., y F. R. Ganders. 1979. The population genetics of gynodioecy with cytoplasmic-genic male-sterility. *Heredity* 43: 213-218.
- Couvet, D., A. Atlan, E. Belhassen, C. Gliddon, P. H. Gouyon, y F. Kjellberg. 1990. Co-evolution between two symbionts: the case of cytoplasmic male-sterility in higher plants. en: D. Futuyma, y J. Antonovics [eds.], *Oxford survey in evolutionary biology*, 225-250. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Cuevas, G. E., F. Molina-Freaner, L. E. Eguiarte, y C. A. Domínguez 2005. Patterns of male sterility within and among populations of the distylous shrub *Erythroxyllum havanense* (Erythroxyllaceae). *Plant Ecology* 176: 165-172.
- Darwin, C. 1877. *The different form of flowers of the same species*. John Murray, London, UK.
- de Haan, A. A., M. P. J. Hundscheid, y A. van Hinsberg. 1997. Effects of CMS types and restorer alleles on plant performance in *Plantago lanceolata*: an indication of costs of restoration. *Journal of Evolutionary Biology* 10: 803-820.
- Delannay, X., P. H. Gouyon, y G. Valdeyron. 1981. Mathematical study of the evolution of gynodioecy with cytoplasmic inheritance under the effect of a nuclear restorer gene. *Genetics* 99: 169-181.
- Delph, L. F., M. A. Bailey, y D. L. Marr. 1999. Seed provisioning in gynodioecious *Silene acaulis* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* 86: 140-144.
- Delph, L. F., y D. G. Lloyd. 1996. Inbreeding depression in the gynodioecious shrub *Hebe subalpina* (Scrophulariaceae). *New Zealand Journal of Botany* 34: 241-247.
- Delph, L. F., y P. Mutikainen. 2003. Testing why the sex of the maternal parent affects seedling survival in a gynodioecious species. *Evolution* 57: 231-239.

- Domínguez, C. A., G. Avila-Sakar, S. Vázquez-Santana, y J. Márquez-Guzmán. 1997. Morph-Biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany* 84: 626-632.
- Dudle, D. A., P. Mutikainen, y L. F. Delph. 2001. Genetics of sex determination in the gynodioecious species *Lobelia siphilitica*: evidence from two populations. *Heredity* 86: 265-276.
- Frank, S. A. 1989. The evolutionary dynamics of cytoplasmic male sterility. *American Naturalist* 133: 345-376.
- Gigord, L., C. Lavigne, J.A. Shykoff, y A. Atlan. 1999. Evidence for effects of restorer genes on male and female reproductive functions of hermaphrodites in the gynodioecious species *Thymus vulgaris*. L. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 596-604.
- Gouyon, P. H., y D. Couvet. 1987. A conflict between two sexes, females and hermaphrodites. en: S. C. Stearns [ed], *The evolution of sex and its consequences*, 245-261. Birkhauser Verlag Basel, Boston.
- Govinda Raj, K., y S. S. Virmani. 1988. Genetics of fertility restoration of WA type cytoplasmic male sterility in rice. *Crop Science* 28: 787-792.
- Gregorious, H. R., y M. D. Ross. 1984. Selection with gene-cytoplasm interactions. I Maintenance of cytoplasm polymorphisms. *Genetics* 107: 165-178.
- Hanson, M. H. 1991. Plant mitochondrial mutations and male sterility. *Annual Review in Genetics* 25: 461-486.
- Jóhannsson, M. H., y A. G. Stephenson. 1997. Effects of pollination intensity on the vigor of the sporophytic and gametophytic generation of *Cucurbita texana*. *Sex Plant Reproduction* 10: 236-240.
- Koelewijn, H. P. 2003. Variation in restorer genes and primary sexual investment in gynodioecious *Plantago coronopus*: the trade-off between male and female function. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 270: 1939-1945.
- Koelewijn, H. P., y J. M. M. van Damme. 1995a. Genetics of male sterility in *Plantago coronopus*. I. Cytoplasmic variation. *Genetics* 139: 1749-1758.
- Koelewijn, H. P., y J. M. M. van Damme. 1995b. Genetics of male sterility in *Plantago coronopus*. II. Nuclear genetic variation. *Genetics* 139: 1759-1775.

- Koelewijn, H. P., y J. M. M. van Damme. 1996. Gender variation partial male sterility and labile sex expression in gynodioecious *Plantago coronopus*. *New Phytologist* 132: 67-76.
- Koelewijn, H. P., y J. M. M. van Damme. 2005. Effects of seed size, inbreeding and maternal sex on offspring fitness in gynodioecious *Plantago coronopus*. *Journal of Ecology* 93: 373-383.
- Lewis, D. 1941. Male sterility in natural populations of hermaphrodite plants. *New Phytologist* 40: 56-63.
- Lloyd, D. G. 1975. The maintenance of gynodioecy and androdioecy in angiosperms. *Genetica* 45: 325-329.
- Mitchell, R. J. 1997. Effects of pollen quantity on progeny vigor: evidence from the desert mustard *Lesquerella fendleri*. *Evolution* 51: 1679-1684.
- Mulcahy, D. L. 1974. Correlation between speed of pollen tube growth and seedling height in *Zea mays* L. *Nature* 249: 491-493.
- Mulcahy, D. L., P. Curtis, y A. Snow. 1983. Pollen competition in a natural population. en: C. E. Jones y R. J. Litter [eds.], *Handbook of experimental pollination biology*, 330-337. Van Nostrand-Reinhold, New York, NY, USA.
- Mulcahy, D. L., y G. B. Mulcahy. 1975. The influence of gametophytic competition on sporophytic quality in *Dianthus chinensis*. *Theoretical and Applied Genetics* 46: 277-284.
- Mutikainen, P., y L. F. Delph. 1998. Inbreeding depression in gynodioecious *Lobelia siphilitica*: among-family differences override between-morph differences. *Evolution* 52: 1572-1582.
- Poot, P. 1997. Reproductive allocation and resource compensation in male-sterile and hermaphroditic plants of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). *American Journal of Botany* 84: 1256-1265.
- Quesada, M. R., J. A. Winsor, y A. G. Stephenson. 1993. Effects of pollen competition on progeny performance in a heterozygous Cucurbit. *American Naturalist* 142: 694-706.

- Quesada, M. R., J. A. Winsor, y A. G. Stephenson. 1996. Effects of pollen selection on progeny vigor in a *Cucurbita pepo* x *C. texana* hybrid. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 885-890.
- Rosas, L. F., J. Pérez-Alquicira, y C. A. Domínguez 2005. Environmentally induced variation in fecundity compensation in the morph-biased male-sterile distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany* 92: 116-122.
- SAS. 2001. JMP User's Guide, release 4.0.4. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.
- Saumitou-Laprade, P., J. Cugen, y P. Vernet. 1994. Cytoplasmic male sterility in plants: molecular evidence and the nucleo-cytoplasmic conflict . *Trends in Ecology and Evolution* 9: 431-435.
- Shykoff, J. A. 1988. Maintenance of gynodioecy in *Silene acaulis* (Caryophyllaceae): stage-specific fecundity and viability selection. *American Journal of Botany* 75: 844-850.
- Shykoff, J. A. 1992. Sex polymorphism in *Silene acaulis* (Caryophyllaceae) and the possible role of sexual selection in maintaining females. *American Journal of Botany* 79: 138-143.
- Sokal, R. R., y F. J. Rohlf. 1995. *Biometry, The principles and Practice of Statistics in Biological Research*. W. H. Freeman and Company, New York, USA.
- Ter-Avanesian, D. 1978. The effect of varying numbers of pollen grains used in fertilization. *Theoretical and Applied Genetics* 52: 77-79.
- Thompson, J. D., y M. Tarayre. 2000. Exploring the genetic basis and proximate causes of female fertility advantage in gynodioecious *Thymus vulgaris*. *Evolution* 54: 1510-1520.

Tabla 1 Análisis de medidas repetidas que evalúa el efecto de la identidad de madres pin y donadores thrum de *E. havanense* en la tasa de crecimiento de la progenie en un periodo de cuatro años.

Individuos			
Fuente	gl	F	P
Padres (Madres)	10	0.807	0.62
Madres	9	3.72	0.0002
Individuos en tiempo			
Fuente	gl	F	P
Tiempo	2, 334	220.8	0.0001
Tiempo * Padres (Madres)	20, 668	0.803	0.711
Tiempo * Madres	18, 668	1.89	0.01

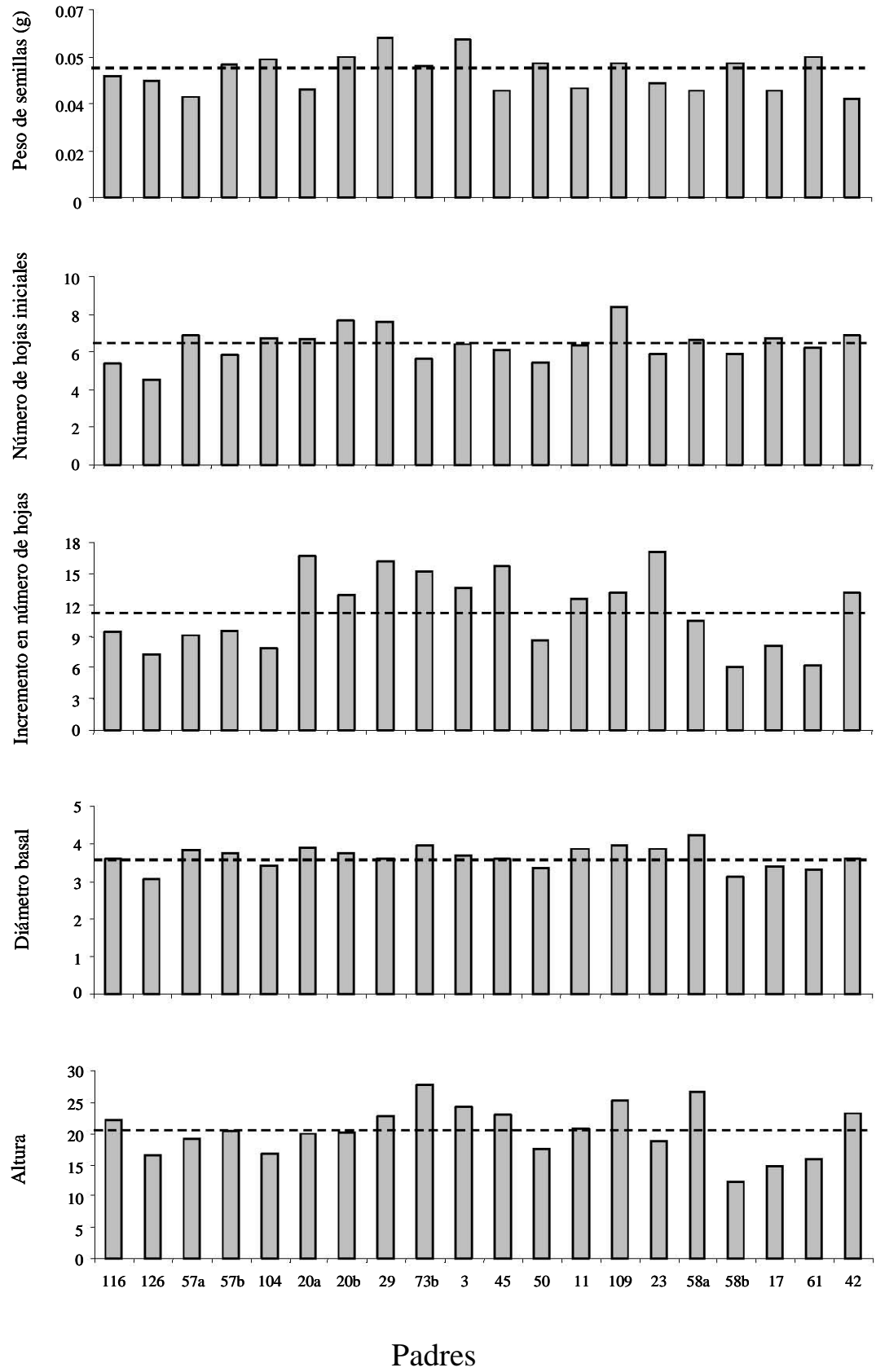
Tabla 2 Efecto de la identidad de los progenitores maternos y paternos (anidados en madres) en cinco atributos relacionados con el desempeño de la progenie.

Carácter	Madres		Padres (Madres)		Modelo general		r <sup>2</sup>
	F	P	F	P	F	P	
Masa de semillas	72.17	0.0001	0.9	0.52	38.92	0.0001	0.7
Núm. de hojas iniciales	4.99	0.0001	0.88	0.55	2.73	0.0002	0.08
Diámetro basal	1.75	0.076	1.17	0.3	1.35	0.147	0.08
Altura	1.59	0.11	1.69	0.08	1.74	0.02	0.04
Núm. de hojas finales	2.76	0.0036	1.084	0.373	1.85	0.01	0.04

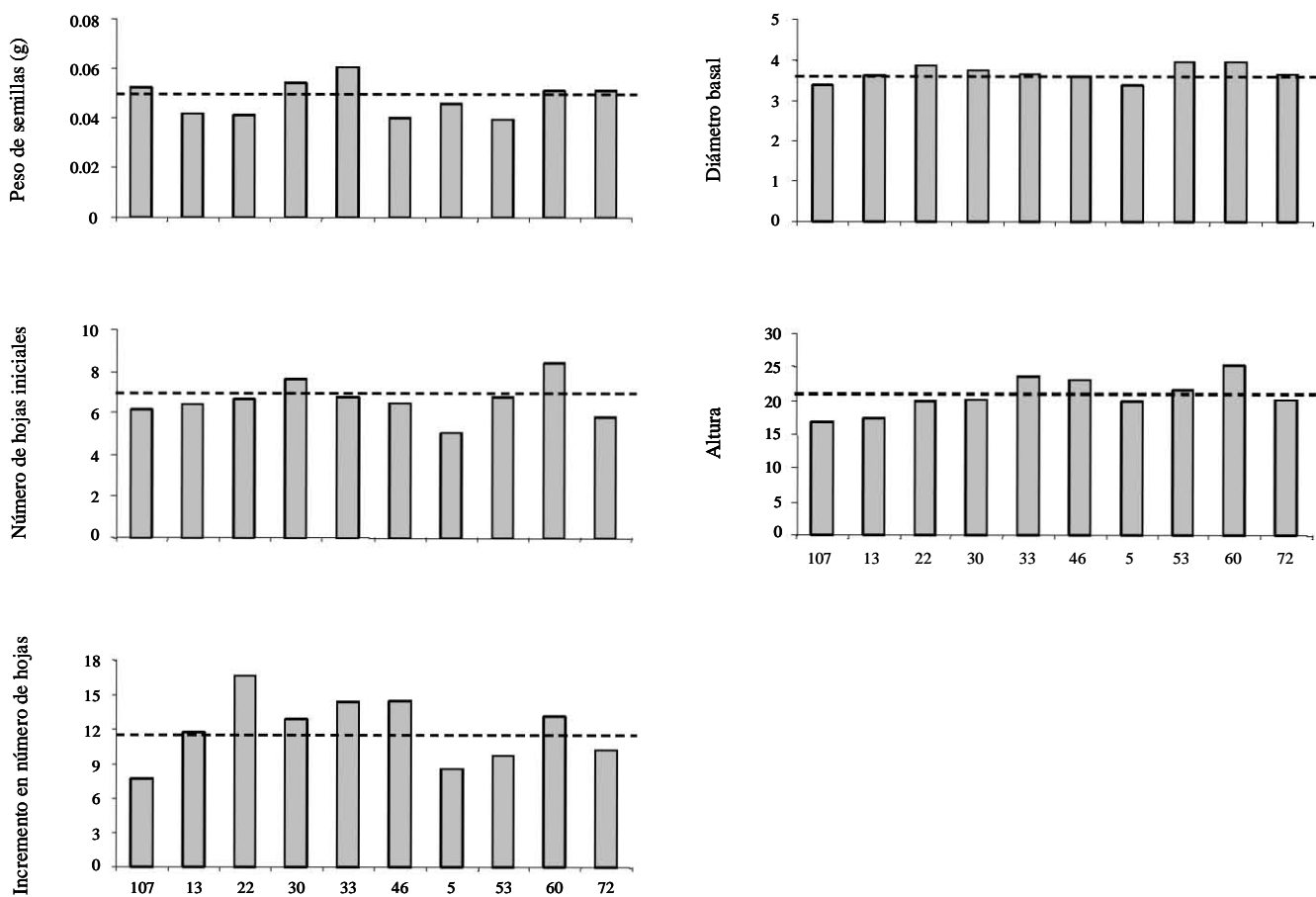
Tabla 3. Resultado del análisis de Chi cuadrada del modelo ajustado (proportional hazards) para evaluar el efecto de la identidad de los progenitores en la supervivencia de la progenie en un periodo de cuatro años.

Fuente	gl	Chi cuadrada (L-R)	P
Padres (Madres)	10	11.7	0.3
Madres	9	12.59	0.18

a)



b)



## Madres

Figura 1. Variación en los atributos del desempeño de la progenie. Se muestra el valor promedio del peso de las semillas, el número de hojas iniciales, el incremento en número de hojas al final del periodo evaluado, la altura y el diámetro basal de las plántulas. a) Las 20 familias paternas se grafican en el gradiente de esterilidad masculina de los padres, que incrementa de izquierda a derecha (de 0.6 a 0.84). b) Progenie agrupada en 10 familias maternas. Las líneas punteadas indican la media total.

# ENVIRONMENTALLY INDUCED VARIATION IN FECUNDITY COMPENSATION IN THE MORPH-BIASED MALE-STERILE DISTYLOUS SHRUB *ERYTHROXYLUM HAVANENSE* (ERYTHROXYLACEAE)<sup>1</sup>

LUIS F. ROSAS, JESSICA PÉREZ-ALQUICIRA, AND CÉSAR A. DOMÍNGUEZ<sup>2</sup>

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, UNAM A.P. 70–275, Mexico D.F. 04510, Mexico

The evolution of male-sterile individuals in hermaphroditic species represents the first step in the evolution of sex specialization. For male-sterile individuals to persist they must have some fitness advantage that compensates for their loss of the male function. Female fecundity also depends on environmental factors as those determining the likelihood of pollination and fertilization. Here we assessed the effects of both male sterility and reproductive synchrony (an environmentally affected trait) on the magnitude of female compensation of *Erythroxylum havanense*, a distylous shrub with morph-biased male sterility. In vitro measurements of pollen germination showed that thrums were more male sterile than pins. The compensatory advantage of thrums changed by a factor of five depending on flowering synchrony. Flowering in synchrony with the population increased fruit production in both morphs. However, because pins that flowered out of synchrony produced almost no fruits, the reproductive compensation of thrums was higher in these circumstances. Because the magnitude of compensation is frequently considered as a key factor in the evolution of sex specialization, the environmentally induced variation in the magnitude of the reproductive compensation of thrum plants may have profound effects on the evolutionary dynamics of the reproductive system of *E. havanense*.

**Key words:** compensatory advantage; distyly; Erythroxylaceae; *Erythroxylum havanense*; flowering synchrony; Mexico; morph-biased male-sterility.

Ever since Darwin (1877) the evolution of sex specialization has been a subject of deep interest among evolutionary biologists. The presence of male sterility in hermaphroditic plants has been considered a key factor influencing the evolution of sexual specialization (Lloyd, 1975; Charlesworth and Charlesworth, 1978; Couvet et al., 1990; Maurice et al., 1993; Schultz, 1994; Webb, 1999), because both theoretical and empirical evidence point out that male sterility in hermaphroditic species may represent the first step in the evolution of dioecy (Kohn, 1988; Weller and Sakai, 1991; Charlesworth, 1991; Mayer and Charlesworth, 1992; Geber et al., 1999; Gigord et al., 1999). Because hermaphroditic plants achieve roughly half of their fitness through the male function, male sterility results in a reproductive disadvantage. Consequently, for females to be maintained within a population, male-sterile individuals must compensate for the fitness loss through the male function (Charlesworth, 1981; Gouyon and Couvet, 1987; Delph et al., 1999). Several theoretical studies have shown that the magnitude of compensation required to maintain male-sterile individuals in the population is determined by the mode of inheritance of male sterility. In the case of nuclear inheritance, females must be more than twice as fecund as hermaphrodites (Ross and Gregorious, 1985; Frank, 1989; Gouyon et al.,

1991). When male sterility is due to a cytoplasmic mutation, females will spread in the population with only a slight reproductive advantage (Lewis, 1941; van Damme, 1983; Belhassen et al., 1991; Koelewijn and van Damme, 1995). If both nuclear and cytoplasmic genes are responsible for male sterility (i.e., the inheritance is nucleocytoplasmic), the magnitude of compensation is expected to be intermediate between that expected for nuclear and cytoplasmic inheritances (Lewis, 1941; Charlesworth, 1981; Gouyon and Couvet, 1987).

Although some part of the variation in fecundity between females and hermaphrodites might be associated with the mode of inheritance and the physiological mechanism of compensation (e.g., genetic variation for resource reallocation), it is well known that female fecundity also depends on several environmental factors (pollinators, resource and pollen limitation, reproductive phenology, seed predation, population sex structure, and metapopulation dynamics). For example, female plants of the gynodioecious *Phacelia dubia* had higher fruit and seed set than hermaphrodites after hand-pollination, but no evidence of compensation was observed in natural conditions (Del Castillo, 1993). Such a result suggests that ecological factors might have a strong influence on the relative fecundities of females and hermaphrodites in natural conditions. Nonetheless, studies evaluating the magnitude of compensation in gynodioecious species usually assume that mating opportunities are equal for all plants within a population, and that the magnitude of female compensation depends exclusively on post-pollination mechanisms. It is therefore reasonable to expect that the extent of compensation could be influenced by ecological factors, particularly those determining the likelihood of pollination and ovule fecundation. For instance, even though male-sterile plants have the ability to produce more or better seeds, pollen or pollinator limitation could reduce the advantages of compensation. In accordance, given

<sup>1</sup> Manuscript received 10 March 2004; revision accepted 23 September 2004.

The authors thank Rubén Pérez Ishiwara, César Abarca, Eduardo Cuevas, and Martha Palomino for field assistance and logistic support. Luis E. Eguiar-te, Juan Fornoni, Francisco Molina, Mauricio Quesada, and two anonymous reviewers made valuable comments on early drafts of the manuscript. This paper was written in partial fulfillment of the requirements for the Ph.D. degree of L.F.R. at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). This study was supported by a Ph.D. grant from CONACYT to L.F.R. and a grant from the PAPIIT program from Universidad Nacional Autónoma de México (IN209600) to C.A.D.

<sup>2</sup> Author for correspondence (E-mail: tejada@servidor.unam.mx).



that the magnitude of female compensation of male-sterile individuals has been considered as a key factor in both the maintenance of gynodioecy and the evolution of dioecy (Gouyon et al., 1991; Maurice et al., 1993, 1994; Schultz, 1994), the influence of environmental variance in the expression of compensation could affect the tempo and mode of the evolutionary trajectory of sex specialization in species with male sterility. Few studies, however, have taken into account the combined effects of male sterility and ecological factors on the magnitude of female compensation (but see Williams and Fenster, 1998; Graff, 1999; Taylor et al., 1999; Marshall and Ganders, 2001; Ramsey and Vaughton, 2002).

In this study we evaluated the effects of both male sterility and reproductive synchrony (a factor influencing pollinator attraction and the availability of mates) on the magnitude of female compensation in a natural population of the distylous shrub *Erythroxylum havanense* Jacq. (Erythroxylaceae), a species with morph-biased male sterility (Domínguez et al., 1997). A study involving five populations showed that pin individuals produce on average 49% more viable pollen than thrums (Cuevas et al., in press). Results from hand-pollination experiments showed that male-sterile thrum plants may have a strong compensatory advantage. The probability to survive to age 8 and reproduce associated to the progeny derived from thrum mothers was 0.092, while this value amounted 0.033 for the progeny derived from pin mothers (a 2.8 reproductive advantage; Avila-Sakar and Domínguez, 2000). Although this advantage is expressed after hand-pollination, we have noticed that the magnitude of compensation under natural conditions may show a striking variation among reproductive seasons (Domínguez et al., 1997; Avila-Sakar and Domínguez, 2000; C. A. Domínguez, personal observation).

On the other hand, it has been shown that female fitness in *E. havanense* is highly influenced by flowering synchrony (Domínguez and Dirzo, 1995). Flowering phenology of *E. havanense* is characterized by a marked intra- and inter-individual flowering synchrony. Selection analyses showed that flowering time explains 20–27% of the individual variance in female fecundity, indicating that fitness is highly dependent on flowering synchrony (Domínguez and Dirzo, 1995). Selection gradients on flowering time for 1987 and 1988 were opposite in sign, indicating the presence of a heterogeneous regime of natural selection. It was further demonstrated that such heterogeneity was a consequence of the annual variation in the patterns of rainfall (Domínguez and Dirzo, 1995).

Hence, *E. havanense* is a species in which mate availability and/or mating likelihood depend on flowering synchrony, an attribute highly influenced by environmental variance (Domínguez and Dirzo, 1995). Moreover, male-sterile thrum individuals show a marked compensatory advantage after hand-pollination (Avila-Sakar and Domínguez, 2000), but whose magnitude varies from year to year in natural conditions (Domínguez et al., 1997). This situation offers the opportunity to evaluate whether or not the expression of compensation in male-sterile plants depends on flowering synchrony. In this study we evaluated the joint effects of male sterility, flower production, and flowering synchrony on the female reproductive success of individuals from a natural population of *Erythroxylum havanense* from the Pacific coast of Mexico.

## MATERIALS AND METHODS

**Study site**—The study was carried out at the Chamela Biological Station located on the Pacific coast of the state of Jalisco, Mexico (19°30' N, 105°03'

W). This site is characterized by a marked dry season from November to May, with 80% of the precipitation falling from July to October (Bullock, 1986). The vegetation is a dense tropical deciduous forest. A detailed description of the flora and climate of the Chamela region can be found in Bullock (1986), Lott et al. (1987), and Noguera et al. (2002).

**Study plant**—*Erythroxylum havanense* is a perennial distylous shrub with complete intramorph incompatibility (i.e., no fruits are produced from crosses within the same morph; Domínguez, 1990). Plants grow on patches of 20–80 individuals. Flowering initiates 7–10 d after the first intense rains that mark the beginning of the wet season when individual flowering thresholds are reached by the increase in soil humidity (Domínguez and Dirzo, 1995). Once flowering is triggered, individual plants flower for a very short period ( $2.8 \pm 0.1$  d, mean  $\pm 1$  SE hereafter). The availability of water for plants depends on a series of highly heterogeneous environmental factors as topographic zone (slopes, plateaus or gullies, aspect; Domínguez and Dirzo, 1995), soil characteristics (texture, organic matter content, infiltration; Domínguez and Dirzo, 1995; Cotler et al., 2002), and rainfall heterogeneity (García-Oliva et al., 1991; García-Oliva et al., 2002). All these environmental attributes interact with each other to produce a complex spatio-temporal dynamics in terms of water availability for plants. Accordingly, flowering phenology may range from synchronous years characterized by short flowering periods ( $5.7 \pm 0.9$  d) in which 84% of the total flower production occurs in two peak flowering days; to asynchronous years with relatively extended flowering periods (up to 20 d) and a more evenly distribution of flower production (Domínguez and Dirzo, 1995). Flowers are small (~1 cm of diameter), and stigma receptivity is limited to the first half of the day. *Erythroxylum havanense* is mainly pollinated by wild bees of the genus *Trigona* (Apidae) and *Xylocopa* (Anthophoridae) (Domínguez et al., 1997). Fruits are ovoid red drupes (1 cm long) that contain only one fertile ovule, and thus are single seeded. As mentioned above, *E. havanense* is also characterized by morph-biased male sterility associated with a compensatory female advantage in thrum plants (Domínguez et al., 1997; Avila-Sakar and Domínguez, 2000). The magnitude of compensation, however, shows a marked temporal variation among reproductive seasons.

**Data collection**—**Reproductive phenology**—During the reproductive season of 2000 we followed the flowering and fruiting phenology of all the reproductive plants from the Ardilla population ( $N = 76$ ). For each plant we made daily censuses to record the number of flowers, immature fruits, and ripe fruits. Censuses were initiated the first day a plant produced flowers (7 June 2000) and finished when all fruits in the population had ripened (12 July 2000).

**Flowering synchrony**—Flowering synchrony in *E. havanense* had been previously measured as the inter-individual variation in flowering initiation day (see Domínguez and Dirzo, 1995). Nonetheless, the extreme flowering synchrony we observed in 2000 (see Results) precluded the usage of this index. Instead, we used an index that accounted for the small differences in the timing of flower production that we observed among the individuals from the Ardilla population in 2000. For each plant we estimated the proportion of its flowers that were produced during the peak flowering day of the population. This value ranges from 1 to 0. Plants with values (synchrony index) close to 1 produced a high proportion of their flowers when a large amount of pollen and ovules were available in the population. Values close to zero indicate plants that produced most of their flowers out of synchrony with the population.

**Male sterility**—To assess the amount of variation in male sterility, as well as to estimate the repeatability of this attribute, we made in vitro pollen cultures during the reproductive seasons of 1998 and 1999 for the same 24 plants. In the 1999 sample, 23 new plants were included for a total of 47 individuals. One day before anthesis several branches on each plant were bagged to prevent pollinator visitation and contamination with pollen from other plants. Pollen collections were made on the day of anthesis between 0900 and 1200. We collected four flowers per plant, and each of four anthers per flower was

rubbed onto the surface of previously prepared culture medium on a microscope slide. The medium was modified from Mazer (1987) and was composed of 250 g/L of sucrose, 0.238 g/L of  $H_3BO_3$ , 0.357 g/L of  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  and 8.33 g/L of agar. Previous experiments have shown this culture medium is adequate for the evaluation of pollen viability in *E. havanense* (Avila-Sakar and Domínguez, 2000; Cuevas et al., in press). Time between pollen collection and initiation of cultures was always less than 5 min. Cultures were incubated in Petri dishes at ambient temperature, and after 12 h of growth they were fixed with FAA (formaldehyde (37–40%), ethyl alcohol (95%), glacial acetic acid, and water; 10 : 50 : 5 : 35 v/v) and sealed with clear nail polish. Using an optical microscope (Olympus model BH 2, with 40 $\times$  optical magnification) we counted the number of germinated and nongerminated pollen grains on every slide. For each plant we calculated the fraction of germinated to total pollen grains from the pooled data (16 slides), and this measure was used as an estimation of the level of male sterility per plant.

**Data analysis—Male sterility**—We first investigated the effect of floral morph on the level of male sterility by means of one-way analysis of variance (JMP 4.0.4., SAS, 2001). Male sterility was arcsine transformed to improve normality of the error distribution. Because of the difficulty of measuring the heritability ( $h^2$ ) of male sterility in *E. havanense* (it takes 8 yr for this species to reproduce), we measured its repeatability through the calculation of the interclass correlation coefficient between levels of male sterility in 1998 and 1999 ( $N = 24$  plants). Repeatability measures the amount of the phenotypic variance in a trait due to permanent differences between individuals. Given that permanent differences can be attributed both to genetic variance and to the local environment, the repeatability of a trait sets an upper limit to the degree of genetic determination (Falconer and Mackay, 1996).

**Effects of morph, flowering synchrony, and flower number on fruit production**—In order to evaluate the differences in fruit production between pin and thrum plants taking into account the variance in flower number and flowering synchrony, we performed a covariance analysis (PROC GLM, SAS, 1989). Morph, flowering synchrony, and flower number were included as the main factors in this analysis. We also included the quadratic terms of flower number, and all the interactions among the three main factors. The significance of the morph term should be indicative of compensation if higher fruit production is associated to the more sterile morph. Flowering synchrony measures the dependence of female fitness on the availability of potential mates and on the likelihood of pollination (i.e., the ecological factors). Because flower number has a strong effect on fruit production (Domínguez and Dirzo, 1995), we included this variable within the analysis. Given that flower number and flowering synchrony were measured in very different scales and because we were interested in comparing their relative effects on fruit production, they were standardized to mean zero and standard deviation 1 prior to analysis ( $(x - \bar{x})/SD$ ). This procedure allowed a direct comparison between these variables because they were expressed in units of standard deviations.

## RESULTS

**Reproductive phenology**—Seventy-six individuals flowered in the Ardilla population after the first heavy rains of the 2000 reproductive season. Altogether, plants produced 51 447 flowers in just three days showing a striking inter-individual synchrony. Most flowers (86.75%) were produced during the first day, 12.95% in the second, and the remainder during the third day. Both pin and thrum plants showed high average values of flowering synchrony ( $0.81 \pm 0.04$  and  $0.75 \pm 0.03$ , respectively) and there were no statistical differences among them ( $F_{1,75} = 1.06$ ,  $P = 0.31$ ). Flower production was highly variable among individuals (range 1–4194 flowers,  $668 \pm 207$  flowers). There were no differences between thrum and pin individuals in flower production ( $771 \pm 275$  and  $532 \pm 318$  flowers, for thrum and pin plants, respectively;  $F_{1,75} = 0.32$ ,  $P = 0.57$ ).

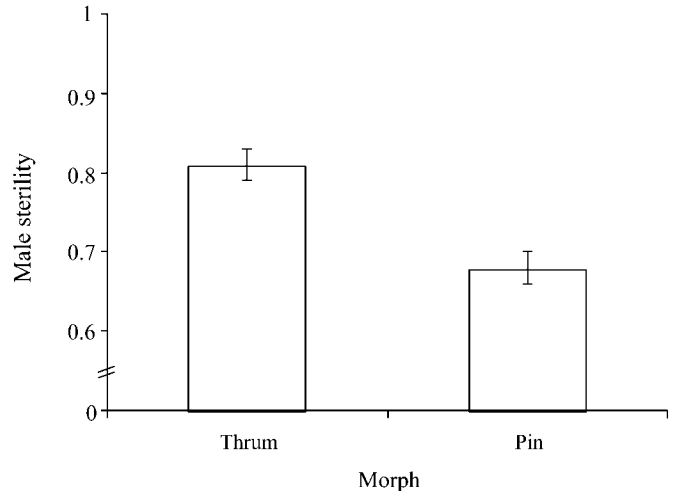


Fig. 1. Average values ( $\pm 1$  SE) for the in vitro estimations of the levels of male sterility for pin and thrum plants of *Erythroxylum havanense* from the Ardilla population.

**Male sterility**—Male sterility ranged from 0.43 to 1, with a mean of  $0.75 (\pm 0.019)$ . Preliminary paternity analysis for the same population investigated in this study showed that plants with levels of male sterility higher than 0.9 sire not a single seed; thus, they can be considered completely male sterile (F. Rosas and C.A. Domínguez, unpublished data). Accordingly, 14% of the plants in the Ardilla population were completely male-sterile. Thrum plants had a higher proportion of completely male-sterile plants (0.23) than pins (0.05), and also a higher level of male sterility ( $0.81 \pm 0.02$  and  $0.68 \pm 0.02$ , for thrum and pin plants, respectively;  $F_{1,45} = 13.56$ ,  $P = 0.006$ ,  $R^2 = 0.21$ ; Fig. 1). The estimated repeatability of male sterility was  $0.47 (\pm 0.11)$ , indicating that a relatively high fraction of the phenotypic variation in male sterility is explained by permanent differences among individuals ( $F_{1,22} = 15.8$ ,  $P = 0.0006$ ,  $R^2 = 0.39$ ). The significant difference in male sterility between floral morphs, along with its constant expression through time (repeatability), suggests that male sterility in *E. havanense* has a heritable component that is independent of environmental variation.

**Effects of morph, flowering synchrony, and flower number on fruit production**—Analysis of covariance revealed that all three main factors had a significant effect on fruit production (Table 1). The interactions between flowers  $\times$  morph and flowers  $\times$  synchrony had also a significant effect (Table 1). The fitted model explained 88% of the variance in fruit production. The significance of the morph term reflects the higher seed production of thrum plants ( $47.5 \pm 11.54$  and  $88.1 \pm 10.2$  fruits, for pin and thrum plants, respectively). In accordance with previous results (Domínguez and Dirzo, 1995), flowering synchrony had a positive and significant effect on fruit production. Flower number had also a positive effect on fruit production, simply indicating that plants with many flowers produce more fruits. The significance of the interaction flowers  $\times$  morph showed that the slope of fruit production on flower number was higher for thrum plants. Hence, the more male-sterile morph (i.e., thrum) was more efficient to mature fruits as the number of flowers per plant increased (Fig. 2). As indicated by the significance of the interaction between flowers  $\times$  synchrony, natural selection favored those plants

TABLE 1. ANCOVA of the effects of morph, flowering synchrony, and flower number on fruit production of *Erythroxyllum havanense* from Chamela, Jalisco, Mexico.

Source of variation	df	MS	F	P
Morph	1	72675.97	20.05	<0.0001
Flowering synchrony	1	161472.39	44.56	<0.0001
Flower number	1	285428.97	78.79	<0.0001
Morph × synchrony	1	647.07	0.1786	0.674
Morph × flower number	1	193429.73	53.38	<0.0001
Synchrony × flower number	1	188463.91	52.01	<0.0001
(Flower number) <sup>2</sup>	1	8926.73	2.46	0.12
Error	68	3623.0		

that produced many flowers and flowered in synchrony with the population. The combined effects of flower number and flower synchrony had a dramatic influence on the reproductive compensation of thrum plants. Because compensation in *E. havanense* may be defined as the relative fecundity of thrum vs. pin individuals, and flowering synchrony had a marked influence on the reproductive output of both morphs, the magnitude of compensation changed as a function of an environmentally induced trait. Based on the model adjusted by the covariance analysis, we produced two different scenarios regarding the effect of flowering synchrony on the magnitude of compensation (expected fruit production of pins = 63.6 +

147.99 × flowers + 86.13 × synchrony + flowers × synchrony × 253.9; and expected fruit production of thrums = 128.62 + 385.98 × flowers + 86.13 × synchrony + flowers × synchrony × 253.9). Figure 2A shows the expected fruit production of pin and thrum plants flowering under relatively high flowering synchrony conditions (synchrony index = 0.5 SD above the population mean). This figure also shows the estimated values of compensation under this scenario (fruit production of thrums/fruit production of pins). Figure 2B, in contrast, illustrates plants flowering out of synchrony with the population (synchrony index = -0.5 SD below the population mean). It is clear from these figures that fruit production is highly dependent on both flower number and flowering synchrony, but, unexpectedly, the magnitude of compensation was higher under low synchrony conditions.

Overall, the results of this study indicate that fruit production is maximized when flowering synchrony produces the conditions that favor pollinator attraction and increase the availability of mates. The expression of compensation followed an opposite pattern, because the unfavorable conditions for reproduction produced by low flowering synchrony resulted in a meager fruit production in pin plants, thus increasing the relative fecundity of thrum plants.

DISCUSSION

We have shown in this study that the magnitude of compensation of the thrum morph of *Erythroxyllum havanense* depends on flowering synchrony. Thrum plants, the morph with higher male sterility, produced more fruits per flower than pin individuals of equivalent size. Flowering synchrony had also a dramatic positive effect on fruit production in both morphs. Moreover, the magnitude of the reproductive compensation of thrum plants ranged up to 5 times depending on the level of flowering synchrony. It should be noted that 2000 was an extremely synchronous year (see Domínguez and Dirzo, 1995), and even so we were able to detect an important difference between synchronous and asynchronous plants. Consequently, it could be expected that the effect of synchrony on the reproductive compensation of synchronous vs. asynchronous thrum plants would be even greater in years allowing a higher variation in flowering times (see Domínguez and Dirzo, 1995).

Although we found a marked effect of flowering synchrony on the compensatory advantage of thrums, the direction of such an effect was opposite to our original expectative. Flowering synchrony decreased, instead of increased, the magnitude of compensation. Because pin individuals produced almost no fruits when they flowered out of synchrony, there was an eightfold difference in fruit production between synchronous and asynchronous pin plants. Contrastingly, synchronous

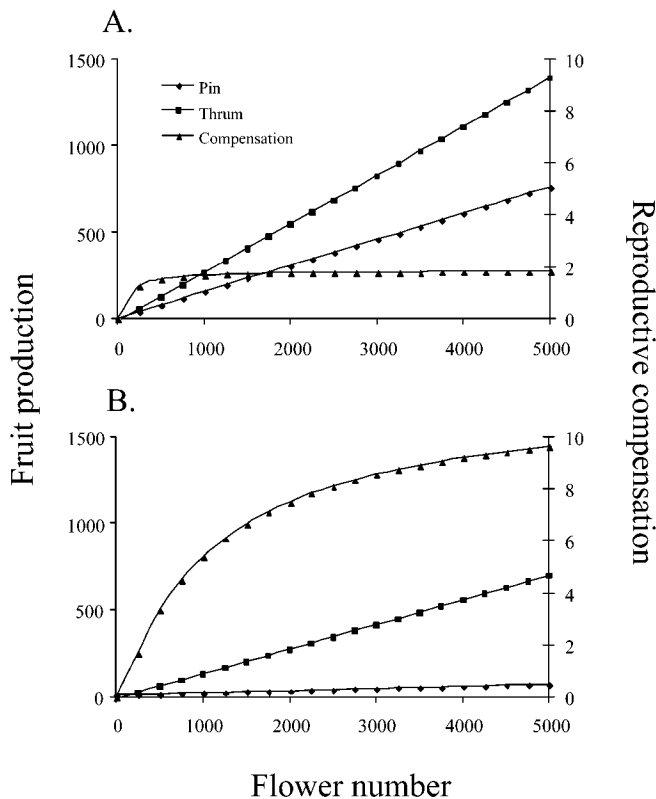


Fig. 2. Adjusted model ( $R^2 = 0.88$ ) describing the relationship between flower number and fruit production for pin and thrum plants of *Erythroxyllum havanense*. Adjustments for plants that flowered in relatively high synchrony (+0.5 SD) with each other (A), and for plants that flowered out of synchrony (-0.5 SD) with the population (B) are presented. The estimated values of the compensatory advantage of thrum plants (fruits of thrums/fruits of pins) are also shown. Plotted values were derived from a covariance model in which we included morph, flowering synchrony and flower number as main factors, as well as the interaction terms.

thrum plants only produced two times as many seeds as thrum individuals flowering out of synchrony (cf. Fig. 2). As a consequence, the magnitude of the compensatory advantage of thrum plants decreased with flowering synchrony. This result should be interpreted with caution because, although the *relative* fecundity of thrums (fruit production of thrums/fruit production of pins) showed an inverse relationship with flowering synchrony, the *absolute* fecundity of both morphs was much higher when plants flowered in synchrony with the population.

The inverse relationship between compensation and synchrony found in this study calls for an explanation. Asynchronous flowering produces a relatively poor reproductive environment (mate, pollen, and pollinator limitation: Augspurger, 1980, 1981; Domínguez and Dirzo, 1995; Domínguez et al., 1997) that reduces the opportunities for successful reproduction of both morphs. Although we actually observed a reduction in fruit production in asynchronous flowering individuals, the negative consequences were more severe on pin than thrum plants. Given that the only difference between the pollen produced by the floral morphs is a higher frequency of abnormal pollen grains in thrum plants (there are no differences in pollen production neither in pollen size, Vázquez-Santana et al., 1996; Domínguez et al., 1997), a load of thrum pollen has a smaller number of viable pollen grains. Hence, pin plants that flowered out of synchrony with the population were exposed to low pollen loads composed of low-quality pollen grains. Thrum plants were also exposed to low pollen loads, but they were pollinated with relatively high-quality pollen. This asymmetry in the qualities of the pollen loads received by each morph could explain the meager fruit production of pin plants and also the elevated value of compensation observed when plants flowered out of synchrony.

Mass flowering has been envisioned as an attribute favored by natural selection because opportunistic pollinators should take advantage of the concentrated amount of rewards that flowering synchrony provides (Gentry, 1974; Augspurger, 1980, 1981; Gross and Werner, 1983; Mori and Pipoly, 1984; Dieringer, 1991). Besides of increasing the attractiveness of a flowering patch to pollinators, flowering synchrony also produces the conditions that maximize the rates of pollen-donation deposition and the opportunities to find mates. This is particularly true for *E. havanense* because this is a self-incompatible species that requires pollinator visitation to produce fruits. In fact, previous studies have shown that flowering in synchrony with the population has marked consequences on the reproductive success of *E. havanense* individuals (Domínguez and Dirzo, 1995).

Accordingly, we think that the differences in the curves describing reproductive compensation as a function of flower number could be explained by the influence of synchrony on the foraging behavior of pollinators. When plants flowered in high synchrony, the curve of compensation reached a plateau at relatively low flower numbers (Fig. 2A). Asynchronous flowering, in contrast, produced a curve in which compensation always increased (Fig. 2B). It is possible that large numbers of flowers confer an important advantage when plants flower out of synchrony, because these plants monopolize most of the few available pollinators. Large pin plants are also expected to attract more pollinators, but because most of the pollen they received is nonviable, their fecundity should be low. When plants flowered in synchrony with the population fruit production increased at a higher rate (number of fruits per flower), but compensation showed an asymptotic behavior

around a value of two. These observations suggest that the high concentration of resources brought about by flowering synchrony reduces the threshold (number of flowers) used by pollinators to discriminate against plants with few flowers. Under these circumstances, both morphs would receive enough viable pollen and fecundity would depend mainly on post-pollination mechanisms.

Obviously the above interpretation depends on the assumption that pollinators discriminate among plants that differ in flower number. Previous studies have shown that the most common species of pollinators of *E. havanense* forage preferentially on plants with many flowers (Domínguez et al., 1997). Moreover, the average fruit set of large plants (those above the mean value of flower number) was significantly higher than that of the small ones ( $0.41 \pm 0.04$  and  $0.22 \pm 0.02$  fruits per flower; for large and small plants, respectively;  $F_{1,75} = 10.48$ ,  $P = 0.001$ ), suggesting that pollinator visitation was more intense in the former than in the latter individuals. Pollen limitation has also been proved to affect female fecundity in the gynodioecious *Silene vulgaris* (McCauley et al., 2000), and in *Wurmbea biglandulosa* (Ramsey and Vaughton, 2002).

Results of this study support previous findings (Domínguez et al., 1997; Avila-Sakar and Domínguez, 2000) indicating that the partial loss of the male function of thrum individuals of *Erythroxyllum havanense* is compensated by a fitness increase through the female function. After hand-pollination thrum individuals outperform pin ones as maternal plants by producing more and better seeds (Avila-Sakar and Domínguez, 2000). However, as this study demonstrates, the expression of compensation in natural conditions depends on flowering synchrony, probably because of its effect on successful pollination. As a consequence, the magnitude of the reproductive compensation of thrum plants of *E. havanense* ranged from zero (in small plants) to almost ten (in the larger plants). Reproductive compensation has been described in other species with male sterility (reviewed in Shykoff et al., 2003), and the magnitude of this parameter is thought to be involved in the maintenance of male-sterile individuals and in the evolution of dioecy (Lewis, 1941; Charlesworth and Charlesworth, 1978; Gouyon and Couvet, 1987; Maurice et al., 1993, 1994; Schultz, 1994; Charlesworth, 1999). Theoretical models predict that in the most stringent conditions (nuclear inheritance), male-sterile individuals should exhibit a twofold compensatory advantage to be maintained in the population (Lewis, 1941; Charlesworth, 1999). Nucleocytoplasmic inheritance, in contrast, requires just a subtle fecundity advantage for polymorphism to be maintained (Couvet et al., 1986; Gouyon and Couvet, 1987; Schultz, 1994). Although we do not know the genetic mechanism determining male sterility in *E. havanense*, our results suggest that this attribute has a heritable component (see also Domínguez et al., 1997). Moreover, independently of the particular mechanism of inheritance, the values of compensation observed in this study were very close, or even much higher, than the most stringent theoretical threshold (under nuclear inheritance) for male-sterile individuals to be maintained in the population. This result suggests that the magnitude of the fecundity compensation (seed production, the quantitative compensation; sensu Alonso and Herrera, 2001) observed in *E. havanense* is high enough as to maintain male-sterile individuals in the population. Given that this species also shows a qualitative compensatory advantage (offspring quality; Avi-

la-Sakar and Domínguez, 2000), the overall value of compensation should be far beyond the theoretical threshold.

Our finding of environmentally induced variation in the expression of the reproductive compensation of *E. havanense* suggests that the selective dynamics of male sterility may change on an annual basis depending on the level of flowering synchrony (Domínguez and Dirzo, 1995). Highly synchronous years would allow maximum fruit production and a relatively low compensatory advantage. Nonetheless, such an advantage is high enough as to favor the permanence of male-sterile individuals. On the other hand, because of the disproportionate effect that pollinator limitation and the scarcity of potential consorts (see Williams and Fenster, 1998; Taylor et al., 1999; Ramsey and Vaughton, 2002) have on the quality of the pollen loads received by pin plants, the compensatory advantage of thrums is boosted during years of low flowering synchrony. Thus, in the particular case of *E. havanense*, male-sterile individuals always enjoy a compensatory advantage whose magnitude changes dramatically depending on flowering synchrony. Given that male sterility in natural populations is considered a key factor in the evolution of sex specialization in hermaphrodite species (Lloyd, 1975; Charlesworth and Charlesworth, 1978; Maurice et al., 1993; Shultz, 1994; Webb, 1999), the potentially intense influence of environmental variance in the expression of compensation could affect the rate of evolution of the reproductive system of *E. havanense*. In general terms, the findings of this study suggest that environmental heterogeneity has the potential to affect the expression of the compensatory advantage of male-sterile individuals in gynodioecious species and, therefore, the evolutionary trajectory of sex specialization.

#### LITERATURE CITED

- ALONSO, C., AND C. M. HERRERA. 2001. Neither vegetative nor reproductive advantages account for high frequency of male-steriles in southern Spanish gynodioecious *Daphne laureola* (Thymelaceae). *American Journal of Botany* 88: 1016–1024.
- AUGSPURGER, C. K. 1980. Mass flowering of a tropical shrub (*Hybanthus prunifolius*): influence on pollinator attraction and movement. *Evolution* 34: 475–488.
- AUGSPURGER, C. K. 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-SAKAR, G., AND C. A. DOMÍNGUEZ. 2000. Parental effects and gender specialization in a tropical heterostylous shrub. *Evolution* 54: 866–877.
- BELHASSEN, E., E. DOMMÉE, B. ATLAN, A. GOUYON, P. H. POMENTE, D. ASSOUD, AND M. W. COUVET. 1991. Complex determination of male sterility in *Thymus vulgaris*: genetic and molecular analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 82: 137–143.
- BULLOCK, S. H. 1986. Climate of Chamela, Jalisco, and trends in the south coastal region of Mexico. *Archives for Meteorology, Geophysics, and Bioclimatology* 36: 297–316.
- CHARLESWORTH, B. 1991. The evolution of sex chromosomes. *Science* 251: 1030–1033.
- CHARLESWORTH, B., AND D. CHARLESWORTH. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *American Naturalist* 112: 975–997.
- CHARLESWORTH, D. 1981. A further study of the problem of the maintenance of females in gynodioecious species. *Heredity* 46: 27–39.
- CHARLESWORTH, D. 1999. Theories of the evolution of dioecy. In M. A. Geber, T. E. Dawson, and L. F. Delph [eds.], *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*, 33–60. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- COTLER, H., E. DURÁN, AND C. SIEBE. 2002. Caracterización morfo-edafológica y calidad de sitio de un bosque tropical caducifolio. In F. Noguera, J. Vega-Rivera, A. García-Aldrete, and M. Quesada-Avedaño [eds.], *Historia Natural de Chamela*, 17–79. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- COUVET, D., A. ATLAN, E. BELHASSEN, C. GLIDDON, P. H. GOUYON, AND F. KJELLBERG. 1990. Co-evolution between two symbionts: the case of cytoplasmic male-sterility in higher plants. In D. Futuyama and J. Antonovics [eds.], *Oxford survey in evolutionary biology*, 225–250. Oxford University Press, Oxford, UK.
- COUVET, D., F. BONNEMAISON, AND P. H. GOUYON. 1986. The maintenance of females among hermaphrodites: the importance of nuclear-cytoplasmic interactions. *Heredity* 57: 325–330.
- CUEVAS, G. E., F. MOLINA-FREANER, L. E. EGUIARTE, AND C. A. DOMÍNGUEZ. In press. Patterns of male sterility within and among populations of the distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *Plant Ecology*.
- DARWIN, C. 1877. *The different form of flowers of the same species*. John Murray, London, UK.
- DEL CASTILLO, R. F. 1993. Consequences of male sterility in *Phacelia dubia*. *Evolutionary Trends in Plants* 7: 15–22.
- DELPH, L. F., M. A. BAILEY, AND D. L. MARR. 1999. Seed provisioning in gynodioecious *Silene acaulis* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* 86: 140–144.
- DIERINGER, G. 1991. Variation in the individual flowering time and reproductive success of *Agalinis strictifolia* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany* 78: 497–503.
- DOMÍNGUEZ, C. A. 1990. Consecuencias ecológicas y evolutivas del patrón de floración sincrónico y masivo de *Erythroxylum havanense* Jacq. (Erythroxylaceae). Doctoral dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.
- DOMÍNGUEZ, C. A., G. AVILA-SAKAR, S. VÁZQUEZ-SANTANA, AND J. MARQUEZ-GUZMÁN. 1997. Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany* 84: 626–632.
- DOMÍNGUEZ, C. A., AND R. DIRZO. 1995. Rainfall and flowering synchrony in a tropical shrub: variable selection on the flowering time of *Erythroxylum havanense*. *Evolutionary Ecology* 9: 204–216.
- FALCONER, D. S., AND T. F. C. MACKAY. 1996. *Introduction to quantitative genetics*. Longman, Edinburgh, UK.
- FRANK, S. A. 1989. The evolutionary dynamics of cytoplasmic male sterility. *American Naturalist* 133: 345–376.
- GARCÍA-OLIVA, F., A. CAMOU, AND J. M. MAASS. 2002. El clima de la región central de la costa del Pacífico mexicano. In F. Noguera, J. Vega-Rivera, A. García-Aldrete, and M. Quesada-Avedaño [eds.], *Historia Natural de Chamela*, 3–10. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- GARCÍA-OLIVA, F., E. EZCURRA, AND L. GALICIA. 1991. Patterns of rainfall distribution in the Central Pacific coast of México. *Geografiska Annaler* 73A: 179–186.
- GEBER, M. A., T. E. DAWSON, AND L. F. DELPH. 1999. *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- GENTRY, A. H. 1974. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61: 728–759.
- GIGORD, L., C. LAVIGNE, J. A. SHYKOFF, AND A. ATLAN. 1999. Evidence for effects of restorer genes on male and female reproductive functions of hermaphrodites in the gynodioecious species *Thymus vulgaris* L. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 596–604.
- GOUYON, P. H., AND D. COUVET. 1987. A conflict between two sexes, females and hermaphrodites. In S. C. Stearns [ed.], *The evolution of sex and its consequences*, 245–261. Birkhäuser, Basel, Switzerland.
- GOUYON, P. H., F. VICHOT, AND J. M. M. VAN DAMME. 1991. Nuclear-cytoplasmic male sterility: single-point equilibria vs. limit cycles. *American Naturalist* 137: 498–514.
- GRAFF, A. 1999. Population sex structure and reproductive fitness in gynodioecious *Sidalcea malviflora malviflora* (Malvaceae). *Evolution* 53: 1714–1722.
- GROSS, R. S., AND P. A. WERNER. 1983. Relationships among flowering phenology, insect visitors, and seed set of individuals: experimental studies on four co-occurring species of goldenrod (*Solidago*: Compositae). *Ecological Monographs* 53: 95–117.
- KOELEWIJN, H. P., AND J. M. M. VAN DAMME. 1995. Genetics of male sterility in gynodioecious *Plantago coronopus*. I. Cytoplasmic variation. *Genetics* 139: 1749–1758.
- KOHN, J. R. 1988. Why be a female? *Nature* 335: 431–433.
- LEWIS, D. 1941. Male sterility in natural populations of hermaphrodite plants. *New Phytologist* 40: 56–63.
- LLOYD, D. G. 1975. The maintenance of gynodioecy and androdioecy in angiosperms. *Genetica* 45: 325–329.
- LOTT, E. J., S. H. BULLOCK, AND J. A. SOLÍS-MAGALLANES. 1987. Floristic

- diversity and structure of upland and arroyo forest of coastal Jalisco. *Biotropica* 19: 228–235.
- MARSHALL, M., AND F. R. GANDERS. 2001. Sex-biased seed predation and the maintenance of females in a gynodioecious plant. *American Journal of Botany* 88: 1437–1443.
- MAURICE, S., E. BELHASSEN, D. COUVET, AND P. H. GOUYON. 1994. Evolution of dioecy: can nuclear-cytoplasmic interactions select for maleness? *Heredity* 73: 346–359.
- MAURICE, S., D. CHARLESWORTH, C. DESFEUX, D. COUVET, AND P. H. GOUYON. 1993. The evolution of gender in hermaphrodites of gynodioecious populations with nucleo-cytoplasmic male sterility. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 251: 253–261.
- MAYER, S. S., AND D. CHARLESWORTH. 1992. Genetic evidence for multiple origins of dioecy in the Hawaiian shrub *Wilkestroemia*. *Evolution* 46: 207–215.
- MAZER, S. J. 1987. Parental effects on seed development and seed yield in *Raphanus raphanistrum*: implications for natural and sexual selection. *Evolution* 41: 355–371.
- MCCAULEY, D. E., M. S. OLSON, AND D. R. TAYLOR. 2000. The influence of metapopulation structure on genotype fitness in a gynodioecious plant. *Evolutionary Ecology* 14: 181–194.
- MORI, S. A., AND J. J. PIPOLY. 1984. Observations on the big-bang flowering of *Miconia minutiflora* (Melastomataceae). *Brittonia* 36: 337–341.
- NOGUERA, F. A., J. H. VEGA-RIVERA, A. N. GARCÍA-ALDRETE, AND M. QUE-SADA-AVENDAÑO. 2002. Historia Natural de Chamela. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.
- RAMSEY, M., AND G. VAUGHTON. 2002. Maintenance of gynodioecy in *Wurmbea biglandulosa* (Colchicaceae): gender differences in seed production and progeny success. *Plant Systematics and Evolution* 232: 189–200.
- ROSS, M. D., AND H. R. GREGORIUS. 1985. Selection with gene-cytoplasm interactions. II. Maintenance of gynodioecy. *Genetics* 109: 427–439.
- SAS. 1989. SAS/STAT user's guide, release 6.08. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.
- SAS. 2001. JMP User's Guide, release 4.0.4. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.
- SCHULTZ, S. T. 1994. Nucleo-cytoplasmic male sterility and alternative routes to dioecy. *Evolution* 48: 1933–1945.
- SHYKOFF, J. A., S. O. KOLOKOTRONIS, C. L. COLLIN, AND M. L. VILLAVI-CENCIO. 2003. Effects of male sterility on reproductive traits in gynodioecious plants: a meta analysis. *Oecologia* 135: 1–9.
- TAYLOR, D. R., D. MCCAULEY, AND S. TRIMBLE. 1999. Colonization success of females and hermaphrodites in the gynodioecious plant *Silene vulgaris*. *Evolution* 55: 745–751.
- VAN DAMME, J. M. M. 1983. Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. II. Inheritance of three male sterility types. *Heredity* 50: 253–273.
- VÁZQUEZ-SANTANA, S., C. A. DOMÍNGUEZ, AND J. MÁRQUEZ. 1996. Embriología de *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae), una especie heterostífica. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 59: 25–33.
- WEBB, C. J. 1999. Empirical studies: evolution and maintenance of dimorphic breeding systems. In M. A. Geber, T. E. Dawson, and L. F. Delph [eds.], Gender and sexual dimorphism in flowering plants. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- WELLER, S. G., AND S. G. SAKAI. 1991. The genetic basis of male sterility in *Schideia* (Caryophyllaceae), an endemic Hawaiian genus. *Heredity* 67: 265–273.
- WILLIAMS, H. L., AND C. B. FENSTER. 1998. Ecological and genetic factors contributing to the low frequency of male sterility in *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 85: 1243–1250.

## Discusión General

El objetivo de este trabajo consistió en determinar las consecuencias reproductivas de la EMp y su papel en la evolución del sistema reproductivo de *Erythroxyllum havanense*. Utilizando la producción de polen viable como medida de la asignación de recursos en la función masculina ( $r$ ) y su inverso como la asignación en la función femenina ( $1-r$ , Charnov 1982), demostramos que la ganancia en adecuación por unidad de inversión en plantas thrum con diferente NEM es mayor para la función femenina que para la función masculina. Bajo el modelo de herencia de la EM núcleo-citoplasmático (el más común), la teoría predice que las mutaciones de esterilidad se pueden propagar siempre y cuando las hembras tengan una ventaja en fecundidad sobre las hermafroditas (Lewis 1941; Charlesworth 1981; Gregorious y Ross 1984; Frank 1989). En *E. havanense* la fecundidad de las plantas thrum con mayor grado de esterilidad es 1.67 veces mayor que la adecuación de las plantas del mismo morfo que mantienen mejor conservada su condición hermafrodita. Acorde a la predicción teórica, el análisis de la paternidad de la progenie demostró que existen plantas thrum completamente estériles. La diseminación de EM en una población hermafrodita monomórfica resulta en el establecimiento de un sistema reproductivo ginodioico, y la eventual evolución del diocismo a partir de esta condición requiere de una segunda mutación que esterilice la función femenina de los hermafroditas remanentes. En contraste, la propagación de hembras thrum en *E. havanense* representa el factor clave en la evolución de dos sexos separados. Debido a la dependencia reproductiva que existe entre los tipos florales, la EM thrum inhabilita de forma automática la función femenina de las plantas pin y resulta en el establecimiento de una población funcionalmente dioica sin necesidad de una segunda modificación genética.

Las hipótesis sobre la evolución del diocismo se basan primordialmente en la existencia de correlaciones taxonómicas entre el diocismo y atributos como los frutos carnosos, el hábito perenne y leñoso, y la presencia de muchas flores pequeñas y poco conspicuas. Los argumentos principalmente ecológicos proponen que estas correlaciones se deben al papel de los dispersores, la cleistogamia y la depresión por endogamia, y la intervención de polinizadores pequeños y generalistas, que podrían modificar las curvas de

adecuación promoviendo la evolución del dioicismo (ver revisión de Thomson y Brunet 1990). Sin embargo aún no se ha demostrado que los mecanismos involucrados produzcan las ganancias aceleradas que promuevan la evolución del dioicismo. Debido en parte a la dificultad para establecer con claridad la forma de las funciones de adecuación masculina y femenina (Campbell 2000), en pocos casos se ha intentado evaluar las predicciones de la teoría de asignación sexual y el éxito reproductivo de ambas funciones sexuales. En contraste con las hipótesis de evolución de la diecia, nuestro planteamiento de evolución del dioicismo a partir de una condición distilica se basa en el análisis explícito de las funciones de adecuación masculina y femenina en un gradiente de inversión de recursos en la función masculina (NEM). El análisis reveló que la inversión de recursos en la función femenina se favorece por encima de la asignación simultánea a las funciones masculina y femenina en las plantas thrum. Es decir, los resultados de este trabajo son una evidencia directa de la evolución de la especialización sexual dirigida por mutaciones que esterilizan la función masculina de sus portadores.

Los resultados de este trabajo junto a la evidencia empírica de EMp (Ågren y Willson 1991; Atlan et al., 1992; Hermanutz y Innes 1994; Koelewijn y van Damme 1996; Gigord et al., 1999) señalan que las mutaciones asociadas a la esterilidad masculina no necesariamente resultan en la presencia de hembras. En contraste con las hembras de sistemas ginodioicos, los fenotipos parcialmente estériles conservan la capacidad de producir semillas y no pierden totalmente la función ni la adecuación masculina. Lo cual indica que la desventaja reproductiva de la EMp en contraste con la EM total en una población hermafrodita debería ser menor. Está reducción de la diferencia en la adecuación de los individuos “invasores” con respecto a los “residentes” puede ser evolutivamente relevante. Los modelos de la dinámica evolutiva del ginodioicismo suponen que la presencia de hembras se debe a mutaciones de esterilidad masculina de efecto mayor que se asocian a una ventaja en fecundidad que permite su propagación. Es decir, si las hembras no tienen una ventaja mínima en fecundidad sobre las hermafroditas su propagación es imposible. De hecho un escenario más restrictivo se presenta cuando la esterilidad se debe a herencia nuclear. En este caso las plantas estériles requieren duplicar su fecundidad para poder solventar “la mitad” de adecuación perdida y coexistir con plantas hermafroditas. Por



lo tanto si la desventaja reproductiva que ocasiona una mutación de EMp es menor a la pérdida que produce una mutación de efecto mayor, la expresión parcial de la EM podría relajar la magnitud de la selección que actúa sobre los fenotipos estériles. En esta situación la propagación de genes de esterilidad y el establecimiento de fenotipos parcialmente estériles podrían facilitarse por factores como la variación en la disponibilidad y asimilación de nutrientes, el servicio de los polinizadores, y el sistema de apareamiento que influyen en la contribución de genes a las siguientes generaciones. Es razonable que inicialmente la adecuación y la frecuencia de los individuos con EMp sean relativamente bajas, pero también es probable que la pérdida de fertilidad del polen seleccione las modificaciones que permitan incrementar la fertilidad de óvulos o la viabilidad de las semillas. Es decir, es probable que la evolución de la EM se deba al ensamble gradual de combinaciones de genes de esterilidad y modificadores de la asignación reproductiva que incrementen su adecuación de manera recíproca. La asociación entre la EMp y la distilia, donde cada individuo se puede entrecruzar únicamente con la mitad de individuos de la población que son del morfo floral complementario, puede ser un factor relevante que facilite la evolución de la esterilidad masculina. En el caso de *E. havanense* la reciprocidad reproductiva de los morfos florales permite “nivelar” la adecuación relativa de las plantas de ambos morfos, y esta situación podría favorecer la evolución gradual de la EM de las plantas del morfo thrum.

Los resultados del análisis del desempeño de la progenie de padres thrum (capítulo II), indican que la identidad de los progenitores paternos no afecta el crecimiento ni la supervivencia de la progenie en los primeros cuatro años de vida. A pesar de las restricciones de dicho análisis, este resultado señala que es poco probable que la función de adecuación masculina de las plantas thrum sea modificada por una ventaja pos-reproductiva de las plantas menos estériles, y que esto represente una restricción a la evolución de la EM del morfo thrum. Asimismo en este trabajo se ha mostrado que la compensación reproductiva de las plantas thrum en condiciones naturales varía considerablemente en función de la sincronía reproductiva. Un efecto general de este atributo que es fuertemente influenciado por la varianza en la humedad del suelo (precipitación), es una ventaja de la fecundidad de las plantas de morfo thrum. Cuando las plantas se reproducen en sincronía la

producción de frutos (fecundidad) se incrementa en ambos morfos y en esta condición las plantas thrum producen casi dos veces más frutos que las pin. En contraste cuando la reproducción es asincrónica la fecundidad de ambos morfos disminuye, pero probablemente debido a la falta de polinizadores y de polen viable la ventaja reproductiva de las plantas thrum sobre las pin puede ser hasta 10 veces mayor. Es decir, la compensación dependiente de la sincronía reproductiva, en conjunto con la dependencia reproductiva entre los morfos florales, favorecen la especialización de las plantas thrum en la función femenina.

En conclusión, los resultados de este trabajo revelaron que la EM thrum se favorece sobre el mantenimiento de su condición hermafrodita original, y que la compensación de las plantas thrum es favorecida en condiciones naturales por efecto de la varianza ambiental en la sincronía reproductiva. Los resultados señalan de manera consistente la evolución de la especialización sexual en *Erythroxulum havanense*, las plantas thrum funcionando como hembras y las pin como machos en un nuevo sistema reproductivo funcionalmente dioico cuyo establecimiento no requiere una segunda modificación genética complementaria.

### **Literatura citada**

- Ågren, J., y M. F. Willson. 1991. Gender variation and sexual differences in reproductive characters and seed production in gynodioecious *Geranium maculatum*. *American Journal of Botany* 78:470-480.
- Atlan, A., P. H. Gouyon, T. Fournial, y D. Couvet. 1992. Sex allocation in an hermaphrodite plant: the case of gynodioecy in *Thymus vulgaris* L. *Journal of Evolutionary Biology* 5: 189-203.
- Campbell, D. R. 2000. Experimental tests of sex-allocation theory in plants. *Trends in Ecology and Evolution* 15(6): 227-232.
- Charlesworth, D. 1981. A further study of the problem of the maintenance of females in ginodioecious species. *Heredity* 46: 27-39.
- Charnov, E. L. 1982. *The Theory of Sex Allocation*. Princeton University, Princeton, N. J.

- Frank, S. A. 1989. The evolutionary dynamics of cytoplasmic male sterility. *American Naturalist* 133: 345-376.
- Gigord, L., C. Lavigne, J.A. Shykoff, y A. Atlan. 1999. Evidence for effects of restorer genes on male and female reproductive functions of hermaphrodites in the gynodioecious species *Thymus vulgaris*. L. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 596-604.
- Gregorious, H. R., y M. D. Ross. 1984. Selection with gene-cytoplasm interactions. I Maintenance of cytoplasm polymorphisms. *Genetics* 107: 165-178.
- Hermanutz, L. A., y D. J. Innes. 1994. Gender variation in *Silene acaulis* (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution* 191: 69-81.
- Koelewijn, H. P., y J. M. M. van Damme. 1996. Gender variation partial male sterility and labile sex expression in gynodioecious *Plantago coronopus*. *New Phytologist* 132: 67-76.
- Lewis, D. 1941. Male sterility in natural populations of hermaphrodite plants. *New Phytologist* 40: 56-63.
- Thomson, J. D., y J. Brunet. 1990. Hypothesis for the evolution of dioecy in seed plants. *Trends in Ecology and Evolution* 5: 11-16.

## Literatura citada

- Ågren, J., y M. F. Willson. 1991. Gender variation and sexual differences in reproductive characters and seed production in gynodioecious *Geranium maculatum*. *American Journal of Botany* 78:470-480.
- Ågren, J., y D. W. Schemske. 1995. Sex allocation in the monoecious herb *Begonia semiovata*. *Evolution* 49: 121-130.
- Ashman, T. L. 1992. The relative importance of inbreeding and maternal sex in determining progeny fitness in *Sidalcea oregana* ssp. *spicata*, a gynodioecious plant. *Evolution* 46: 1862-1874.
- Ashman, T. L. 1999. Determinants of sex allocation in a gynodioecious wild strawberry: implications for the evolution of dioecy and sexual dimorphism. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 648-661.
- Atlan, A., P. H. Gouyon, T. Fournial, y D. Couvet. 1992. Sex allocation in an hermaphrodite plant: the case of gynodioecy in *Thymus vulgaris* L. *Journal of Evolutionary Biology* 5: 189-203.
- Avila-Sakar, G., y C. A. Domínguez. 2000. Parental effects and gender specialization in a tropical heterostylous shrub. *Evolution* 54: 866-877.
- Bailey, M. F., L. F. Delph, y C. M. Lively. 2003. Modeling gynodioecy: novel scenarios for maintaining polymorphism. *American Naturalist* 161: 762-776.
- Beach, J. H., y K. S. Bawa. 1980. Role of pollinators in the evolution of dioecy from distyly. *Evolution* 34: 1138-1142.
- Belhassen, E., E. Dommée, B. Atlan, A. Gouyon, P. H. Pomete, D. Assoud, y M. W. Couvet. 1991. Complex determination of male sterility in *Thymus vulgaris*: genetic and molecular analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 82: 137-143.
- Campbell, D. R. 1997. Genetic correlation between biomass allocation to male and female functions in a natural population of *Ipomopsis aggregata*. *Heredity* 79: 606-614.
- Campbell, D. R. 1998. Variation in lifetime male fitness in *Ipomopsis aggregata*: test of sex allocation theory. *American Naturalist* 152: 338-353.
- Campbell, D. R. 2000. Experimental test of sex allocation theory in plants. *Trends in Ecology and Evolution* 15(6): 227-232.

- Casper, B. B., y E. L. Charnov. 1982. Sex allocation in heterostylus plants. *Journal of Theoretical Biology* 96: 143-149.
- Charlesworth, B., y D. Charlesworth. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *American Naturalist* 112: 975-997.
- Charlesworth, D., y F. R. Ganders. 1979. The population genetics of gynodioecy with cytoplasmic-genic male-sterility. *Heredity* 43: 213-218.
- Charlesworth, D. 1981. A further study of the problem of the maintenance of females in gynodioecious species. *Heredity* 46: 27-39.
- Charlesworth, D. 1999. Theories of the evolution of dioecy. En: M. A. Geber, T. E. Dawson, y L. F. Delph [eds.], *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*, 33-60. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Charnov, E. L. 1982. *The theory of Sex Allocation*. Princeton University, Princeton, N. J.
- Collin, C. L., Pennings, P. S., Rueffler, C., Widmer, J. A., y J. A. Shykoff. 2002. Natural enemies and sex: how seed predators and pathogens contribute to sex-differential reproductive success in a gynodioecious plant. *Oecologia* 131: 94-102.
- Couvet, D., A. Atlan, E. Belhassen, C. Gliddon, P. H. Gouyon, y F. Kjellberg. 1990. Co-evolution between two symbionts: the case of cytoplasmic male-sterility in higher plants. en: D. Futuyma, y J. Antonovics [eds.], *Oxford survey in evolutionary biology*, 225-250. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Darwin, C. 1877. *The different form of flowers of the same species*. John Murray, London, UK.
- de Haan, A. A., M. P. J. Hundscheid, y A. van Hinsberg. 1997. Effects of CMS types and restorer alleles on plant performance in *Plantago lanceolata*: an indication of costs of restoration. *Journal of Evolutionary Biology* 10: 803-820.
- Delannay, X., P. H. Gouyon, y G. Valdeyron. 1981. Mathematical study of the evolution of gynodioecy with cytoplasmic inheritance under the effect of a nuclear restorer gene. *Genetics* 99: 169-181.
- Delph, L. F., y D. G. Lloyd. 1996. Inbreeding depression in the gynodioecious shrub *Hebe subalpina* (Scrophulariaceae). *New Zealand Journal of Botany* 34: 241-247.
- Delph, L. F., M. A. Bailey, y D. L. Marr. 1999. Seed provisioning in gynodioecious *Silene acaulis* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* 86: 140-144.

- Delph, L. F., y P. Mutikainen. 2003. Testing why the sex of the maternal parent affects seedling survival in a gynodioecious species. *Evolution* 57: 231-239.
- Domínguez, C. A., G. Avila-Sakar, S. Vázquez-Santana, y J. Márquez-Guzmán. 1997. Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany* 84: 626-632.
- Elle, E. 1999. Sex allocation and reproductive success in the andromonoecious perennial, *Solanum carolinense* (Solanaceae). I. Female success. *American Journal of Botany* 86: 278-286.
- Fisher, R. A. 1958. The genetical theory of natural selection. 2d rev. ed. Clarendon Press, Oxford, U. K.
- Frank, S. A. 1989. The evolutionary dynamics of cytoplasmic male sterility. *American Naturalist* 133: 345-376.
- Frank, S. A. 2000. Polymorphism of attack and defense. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 167-171.
- Garnier, P., S. Maurice, e I. Olivieri. 1993. Costly pollen in maize. *Evolution* 47: 946-949.
- Geber, M. A., T. E. Dawson, y L. F. Delph. 1999. Gender and sexual dimorphism in flowering plants. 305 pp. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- Gigord, L., C. Lavigne, J.A. Shykoff,, y A. Atlan. 1999. Evidence for effects of restorer genes on male and female reproductive functions of hermaphrodites in the gynodioecious species *Thymus vulgaris*. L. *Journal of Evolutionary Biology* 12: 596-604.
- Gouyon, P. H., y D. Couvet. 1987. A conflict between two sexes, females and hermaphrodites. en: S. C. Stearns (ed.), *The evolution of sex and its consequences*, 245-261. Birkhauser Verlag Basel, Boston.
- Gouyon, P.H., F. Vichot, y J. M. M. van Damme. 1991. Nuclear-cytoplasmic male sterility: single-point equilibria vs. limit cycles. *American Naturalist* 137: 498-514.
- Gregorious, H. R., y M. D. Ross. 1984. Selection with gene-cytoplasm interactions. I Maintenance of cytoplasm polymorphisms. *Genetics* 107: 165-178.
- Hanson, M. H. 1991. Plant mitochondrial mutations and male sterility. *Annual Review in Genetics* 25: 461-486.

- Hermanutz, L. A., y D. J. Innes. 1994. Gender variation in *Silene acaulis* (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution* 191: 69-81.
- Jacobs, M. S., y M. J. Wade. 2003. A synthetic review of the theory of gynodioecy. *American Naturalist* 161: 837-851.
- Koelewijn, H. P., y J. M. M. van Damme. 1995a. Genetics of male sterility in *Plantago coronopus*. I. Cytoplasmic variation. *Genetics* 139: 1749-1758.
- Koelewijn, H. P., y J. M. M. van Damme. 1995b. Genetics of male sterility in *Plantago coronopus*. II. Nuclear genetic variation. *Genetics* 139: 1759-1775.
- Koelewijn, H. P., y J. M. M. van Damme. 1996. Gender variation partial male sterility and labile sex expression in gynodioecious *Plantago coronopus*. *New Phytologist* 132: 67-76.
- Koelewijn, H. P. 2003. Variation in restorer genes and primary sexual investment in gynodioecious *Plantago coronopus*: the trade-off between male and female function. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 270: 1939-1945.
- Levins, R. 1968. *Evolution in Changing Environments*. Princeton University Press. Princeton, N. J.
- Lewis, D. 1941. Male sterility in natural populations of hermaphrodite plants. *New Phytologist* 40: 56-63.
- Linnaeus, C. 1735. *Systema naturae*. Theodorum Haak, Leyden.
- Lloyd, D. G. 1974. Theoretical sex ratios of dioecious and gynodioecous angiosperms. *Heredity* 32: 11-34.
- Lloyd, D. G. 1975. The maintenance of gynodioecy and androdioecy in angiosperms. *Genetica* 45: 325-329.
- Lloyd, D. G. 1979. Evolution toward dioecy in heterostylous populations. *Plant Systematics and Evolution* 131: 71-80.
- Lloyd, D. G. 1984. Gender allocations in outcrossing cosexual plants. en R. Dirzo y J. Sarukhan (eds.), *Perspectives in Plant Populations Ecology*. pp277-300, Sinauer.
- Marshall, M., y F. R. Ganders. 2001. Sex-biased seed predation and the maintenance of females in a gynodioecious plant. *American Journal of Botany* 88: 1437-1443.

- Maurice, S., D. Charlesworth, C. Desfeux, D. Couvet, y P. H. Gouyon. 1993. The evolution of gender in hermaphrodites of gynodioecy populations with nucleo-cytoplasmic male sterility. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 251: 253-261.
- McCauley, D.E., M. S. Olson, y D. R. Taylor. 2000. The influence of metapopulation structure on genotype fitness in a gynodioecious plant. *Evolutionary Ecology* 14: 181-194.
- Muenchow, G. E., y M. Grebus. 1989. The evolution of dioecy from distyly: reevaluation of the hypothesis of the loss of long-tongued pollinator. *American Naturalist* 133: 149-156.
- O'Neil, P., y J. Schmitt. 1993. Genetic constrains on the independent evolution of male and female reproductive characters in the tristylous plant *Lythrum salicaria*. *Evolution* 47: 1457-1471.
- Ornduff, R. 1966. The origin of dioecism from heterostyly in *Nymphoides* (Menyanthaceae). *Evolution* 20: 309-314.
- Poot, P. 1997. Reproductive allocation and resource compensation in male-sterile and hermaphroditic plants of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). *American Journal of Botany* 84: 1256-1265.
- Rademaker, M. C. J., y T. de Jong. 2000. Testing sex allocation theory: flowers vs seeds in hermaphrodite plants. *Oikos* 91: 115-122.
- Ramsey, M., y G. Vauhton. 2002. Maintenance of gynodioecy in *Wurbea biglandulosa* (Colchicaceae): gender differences in seed production and progeny success. *Plant Systematics and Evolution* 232: 189-200.
- Ross, M. D., y H. R. Gregorius. 1985. Selection with gene-cytoplasm interactions. II. Maintenance of gynodioecy. *Genetics* 109: 427-439.
- Saumitou-Laprade, P., J. Cugen, y P. Vernet. 1994. Cytoplasmic male sterility in plants: molecular evidence and the nucleo-cytoplasmic conflict. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 431-435.
- Schultz, S.T. 1994. Nucleo-cytoplasmatic male sterility and alternative routes to dioecy. *Evolution* 48: 1933-1945.
- Smouse, P. E. y T. T. Meagher. 1994. Genetic analysis of male reproductive contributions in *Chamaelirium luteum* (L.) Gray (Liliaceae). *Genetics* 136: 313-322.



- Taylor, D.R., D. McCauley, y S. Trimble. 1999. Colonization success of females and hermaphrodites in the gynodioecious plant *Silene vulgaris*. *Evolution* 55: 745-751.
- Thompson, J. D., y M. Tarayre. 2000. Exploring the genetic basis and proximate causes of female fertility advantage in gynodioecious *Thymus vulgaris*. *Evolution* 54: 1510-1520.
- Thomson, J. D., y B. A. Thomson. 1989. Dispersal of *Erythronium grandiflorum* pollen by bumblebees: implications for gene flow and reproductive success. *Evolution* 43: 657-661.
- Thomson, J. D., y J. Brunet. 1990. Hypothesis for the evolution of dioecy in seed plants. *Trends in Ecology and Evolution* 5: 11-16.
- Williams, C. F., M. A. Kuchenreuther, y A. Drew. 2000. Floral dimorphism, pollination, and self-fertilization in gynodioecious *Geranium richardsonii* (Geraniaceae). *American Journal of Botany* 87: 661-669.
- Williams, H. L., y C. B. Fenster. 1998. Ecological and genetic factors contributing to the low frequency of male sterility in *Chamaecrista fasciculata* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 85: 1243-1250.
- Young, H. J., y M. L. Stanton. 1990. Influences of floral variation on pollen removal and seed production in wild radish. *Ecology* 71: 536-547.