



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

**“Determinación del patrón de herencia de la esterilidad  
masculina en *Erythroxylum havanense*”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A  
LUIS RAMÍREZ TREJO

DIRECTOR DE TESIS: DR. CÉSAR AUGUSTO DOMÍNGUEZ PÉREZ TEJADA

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Dirección General de Estudios Profesionales (DGEPE) las becas que me otorgaron para llevar a cabo mis estudios de maestría.

Agradezco a los miembros de mi jurado porque en varios de ellos observe algunos de los valores que la academia debe atesorar:

Dr. César Domínguez Pérez Tejada, por apoyarme y enseñarme durante tanto tiempo y siempre que lo necesite, y sobre todo por demostrar que la diferencia de opiniones no es un obstáculo para el diálogo (esto parece una obviedad, sólo parece...).

Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, por su amabilidad y atención en la revisión de esta tesis.

Dr. Felipe Cruz García, por su escepticismo y las discusiones y enseñanzas que nutrieron buena parte de las reflexiones con que finalicé este trabajo.

Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns, no he tenido un maestro o jurado más meticuloso. Gracias por haber contribuido a que, pese a las limitaciones, este fuera un trabajo de maestría.

Dr. Mauricio Quesada Avendaño, por sus aportaciones a este trabajo.

## Los otros agradecimientos

Toda obra diseñada, maquinada o hecha por ser humano es una creación colectiva. No hay ningún secreto en la anterior sentencia. Su universalidad se aplica de manera inapelable incluso a las más exquisitas creaciones: las epopeyas quijotescas de Cervantes, los delirios rigurosos de Beethoven, las espaldas sugerentes de Ingres o las intuiciones inquietantes de Darwin. La historia y su contingencia siempre se inmiscuye en cada paso que damos y no sólo conforma nuestras erráticas reacciones: prácticamente nos crea y limita sin que seamos concientes de ello la mayor parte de las veces.

Este humilde trabajo es también producto de las vicisitudes, éstas, las que después de tantos devaneos permitieron que se consumara. El final, no se si bueno o malo, no podía ser otro. Ante él no puedo más que agradecer la realidad tan rica que me permitió terminarlo. La enumeración no puede ser exhaustiva; ninguna lo es. No por ello prescindiré de esta oportunidad:

Gracias César otra vez, nunca voy a olvidar todas las veces que me echaste la mano. Aunque opináramos diferente en varias cosas y aunque me dedicara a escandalizar algunas veces tu laboratorio, siempre hubo una empatía que nos permitía trabajar juntos.

Gracias LIPA de antaño, por las borracheras y las discusiones, las amistades y los (des)amores: Eli, Gume, Jessica, Lau, Lalo, Luc, Martha, Néstor, Pau, Pleonasma, Raúl Rodolfo y Sergio; toda historia compartida es inolvidable, pero las lipeñas tienen vocación de leyenda.

Gracias LIPA de hogaño, porque en mi corto regreso se mostraron siempre solidarios, desmadrosos (que es otra forma de solidaridad) y sonrientes: Adriana, Fernanda, Gabriel, Karina, Lislíe, Lluvia, la otra Pau y Rubik.

Abarquita, una de las ventajas de la amistad es que no requiere corroboraciones continuas, nuestra amistad es un ejemplo de ello, siempre están presentes las ideas, los libros, los sueños y las frustraciones compartidas.

Betza, nadie, nadie, pero nadie, merece más reconocimiento que tú, gracias por joderme para que acabara, leer mi tesis, conseguirme artículos, aguantar las depresiones, madrearme cuando era necesario, etc., etc. etc<sup>n</sup>; gracias por la risa tenaz de ser mi amiga.

En mi corazón están y estarán mis amigos de toda la vida, nos vemos, no nos vemos, nos separamos, pero el río en el que nos recreamos es siempre diferente y siempre el mismo (¡retuércete Heráclito!). Cayito, sé que pese a cualquier cosa seguiré disfrutando de tus travesuras. Cle, tus bálsamos de necia esperanza (¡están bien monos!) son siempre un sortilegio para mis exabruptos de pesimismo, menos mal que puedo seguir abrevando ellos. Cris, corazón, ¡salud!, por nuestras

ya inenarrables expediciones ciudadanas. Ileana, de todo baile, de toda risa, de toda virtud y toda magia, ha participado la oportunidad de no vendernos simulaciones, ¡Gracias! Luis, no conozco muchos matrimonios con la constancia que hemos demostrado. Miguelito, más que tus cafés de consuelo, la certeza permanente de sabernos cerca es un garantía contra las tormentas de vida. Rodrigo, carnal, siempre estaré contigo. Trilambdos, esa nostalgia de sueños sigue en nosotros:  
*¡Carpe Diem!*

A mis padres.  
Érika y Violeta  
A Concha:  
No hay forma de que no  
vayan conmigo...  
Los quiero.

*La naturaleza aprecia el ocultarse.*

Heráclito, Fragmento 123.

## Índice

|  |     |
|--|-----|
| Índice   | 1   |
| Resumen  | 2   |
| Introducción                                   | 4   |
| 1.- Heterostilia                               | 4   |
| 2.- Esterilidad Masculina Citoplasmática       | 15  |
| 3.- Especie en estudio                         | 27  |
| Objetivos                                      | 32  |
| Hipótesis                                      | 33  |
| Material y Métodos                             | 34  |
| Resultados                                     | 42  |
| Discusión                                      | 78  |
| Conclusiones                                   | 85  |
| Sugerencias a partir<br>del análisis molecular | 86  |
| Perspectivas                                   | 87  |
| Apéndices                                      | 89  |
| Referencias                                    | 115 |



## Resumen

La coexistencia de plantas hermafroditas e individuos con esterilidad masculina ha sido interpretada como un estado intermedio entre el hermafroditismo y el diocismo. Las especies que presentan este tipo de diversidad caen en la categoría de las ginodioicas. La esterilidad masculina es con frecuencia resultado de un conflicto entre genes mitocondriales y nucleares. El objetivo de este trabajo es detectar un componente heredable en la esterilidad masculina que presenta *Erythroxylum havanense*, una especie distílica de la cual no sólo hay registros de esterilidad masculina en condiciones naturales, sino probable especialización de género y evolución a la dioecia.

Con el fin de alcanzar nuestro objetivo se utilizaron dos estrategias, una de genética cuantitativa y otra de análisis molecular. En el análisis genético se evaluó la esterilidad masculina de familias genéticas previamente establecidas mediante un diseño dialélico parcialmente recíproco. En el análisis molecular se utilizaron iniciadores de ADN (“primers”) que, en otras especies (arroz, trigo y cebolla), permiten identificar a los individuos estériles.

Aunque los resultados de este trabajo no son concluyentes, se identificaron efectos de tipo paterno y dos fragmentos de ADN (de entre 800 y 900 pares de bases) que fueron resultado de la amplificación con los primers que en el trigo permiten identificar a los individuos estériles. Estos fragmentos presentan pequeñas secciones con altos niveles de semejanza con genes de ADN mitocondrial de varias especies con esterilidad masculina, y posiblemente intervienen o han intervenido en la determinación de la esterilidad masculina en *Erythroxylum havanense*.

## Abstract

The simultaneous presence of hermaphrodites and female (male sterile) individuals in plants has been proposed as an intermediate evolutionary step between hermaphroditism and dioecy. Male sterility is frequently a result of an intragenomic conflict between mitochondrial and nuclear genes. In this study we explore whether male sterility in *Erythroxylum havanense* has a heritable component. This dystylous specie presents male sterility, probable gender specialization and evolution to dioecy.

To this end, we used quantitative genetics and molecular analyses. Based on a partial diallel breeding design we looked for paternal and/or maternal effects on the expression of male sterility in the offspring of genetical families established previously. For molecular analysis we used DNA primers used for identify male sterile individuals in rice, onion and wheat.

In spite of the non conclusive results of this work, we detected paternal effects on male sterility expression and two DNA fragments (between 800 and 900 base pairs) as a result of amplification with primers that in wheat detect male sterile individuals. These fragments have small sections that resemble genes of mitochondrial DNA of various male sterile species and probably intervene or have intervened on the determination of this phenotype in *Erythroxylum havanense*.

# Introducción

## 1. Heterostilia

El estudio de la evolución de los sistemas de reproducción de las plantas es un tema que se ha abordado —de manera intensa y reiterada— a lo largo de la historia de la biología evolutiva. En este ámbito, el interés por la heterostilia se remonta a Darwin, quien aunque en primera instancia sólo utilizó a un sistema heterostílico (*Primula veris*) como modelo de estudio de la evolución de los sistemas de reproducción, rápidamente extendió su interés a varias especies, como *Lythrum salicaria* y *Linum grandifolium* (Darwin, 1877). Sin embargo, fue Hildebrand (1866) quien usó por primera vez el término de heterostilia para referirse a un polimorfismo que, en el caso de la distilia, presenta dos morfos florales (Pin y Thrum) y en la tristilia tres (largo, medio y corto); y que difieren recíprocamente en la longitud de los estilos y los estambres. Darwin restringió el término a aquellas especies que además mostraran autoincompatibilidad e incompatibilidad intramorfo; de tal forma que las únicas cruzas que produjeran frutos fueran las que se dieran entre plantas de distintos morfos (Ganders, 1979). En este sentido Darwin infirió que: “la característica principal de las plantas heterostílicas es que los individuos están divididos en dos o tres grupos, de manera parecida a las hembras y los machos de las plantas dioicas o de los animales superiores, que existen en números aproximadamente iguales y que están adaptados para la fertilización recíproca” (Darwin, 1877).

Así pues, la separación espacial de anteras y de estigmas dentro de las flores y recíproca con respecto de los morfos es crítica y particular de la heterostilia, y es denominada “hercogamia recíproca”. Varios autores piensan que este es el rasgo fundamental de la heterostilia, pues existen especies típicamente heterostílicas (en el sentido morfológico),

que presentan distintos niveles de compatibilidad intramorfo (Ganders, 1979; Lloyd y Webb, 1992a, 1992b). Sin embargo, en opinión de otros autores (Richards y Barret, 1992), la existencia de un sistema de autoincompatibilidad esporofítico dialéctico que evita la fertilización intramorfo e intraplanta, es una característica esencial en la heterostilia. Además, en todas las plantas heterostílicas donde se ha demostrado dicho sistema de incompatibilidad, éste está asociado con la hercogamia recíproca (Dulberger 1974, 1975; Lewis y Jones, 1992). Por otro lado, también existen una serie de diferencias entre los morfos como la forma de la corola, orientación del estigma o de los estambres, color del polen, tamaño de los óvulos, etc., que están presentes en las poblaciones heterostílicas y que han sido denominadas “características adicionales” (Lloyd y Webb, 1992a); estas suelen heredarse de forma asociada a la hercogamia y la incompatibilidad ya mencionadas. El ligamiento entre los caracteres morfológicos y el grupo de incompatibilidad es muy estrecho, de tal forma que son heredados de manera conjunta como si fueran producto de un solo gen en el caso de las plantas distílicas, y dos en las tristílicas (Ganders, 1979). Este fenómeno de segregación ha llevado a postular la existencia de un “supergen” compuesto por al menos tres loci —cada uno con dos alelos— que segregan conjuntamente (Dowrick, 1956; Charlesworth y Charlesworth, 1979). Uno de los loci del supergen controlaría la altura de los estigmas y estambres, otro las reacciones de incompatibilidad y el restante las características adicionales (Richards y Barret, 1992).

La genética de este polimorfismo fue develada muy tempranamente: Bateson y Gregory (1905) establecieron en varias especies de *Primula*, que el factor que determinaba al morfo Thrum (de estilo corto) era dominante con respecto al del morfo Pin. Además, que el morfo Thrum era heterocigótico para dicho factor (“Ss”), mientras el Pin es homocigótico recesivo (“ss”). Este patrón se repite en las aproximadamente 23 especies

de 11 familias en que se ha explorado la dominancia (Lewis y Jones, 1992); sin embargo, se conocen al menos dos excepciones, *Hypericum aegypticum* (Ornduff, 1979) y *Armeria maritima* (Baker 1966).

La heterostilia se ha reportado en 28 familias de angiospermas (Barret 2002), incluidas monocotiledóneas y dicotiledóneas que pertenecen a 18 órdenes distintos según la clasificación de Cronquist (1981). Ya que las familias que presentan especies heterostílicas no forman un grupo estrechamente relacionado, la heterostilia tiene un origen polifilético y debe haber evolucionado varias veces en la historia de las angiospermas (Vuilleumier, 1967; Nettancourt, 1977; Ganders, 1979; Barret, 1992; Lloyd y Webb, 1992a).

### **Origen de la heterostilia**

La secuencia de eventos que dieron origen a este sistema es controvertida. La discusión se centra principalmente en cuál fue el primer rasgo que evolucionó: la hercogamia recíproca, como resultado de un proceso selectivo a favor de la polinización entre anteras y estigmas del mismo tamaño (polinización legítima); o la incompatibilidad intramorfo, donde la selección actuaría para evitar la autofecundación. Pese a que Darwin dio un tremendo énfasis a la interpretación de la heterostilia como un mecanismo que evitaba la autopolinización, él no pensó que ésta fuera la presión de selección que dio origen a este sistema. A su juicio: "...¿cómo podría ser ventajoso para una planta ser estéril con la mitad de sus hermanos, esto es: con todos los individuos pertenecientes al mismo morfo?" (Darwin 1877). Él postula que la hercogamia recíproca evolucionó primero, en respuesta a la presión de selección para incrementar la transferencia de polen de anteras a estigmas de aproximadamente el mismo tamaño, y

que la incompatibilidad y el resto de los caracteres evolucionaron después (Darwin 1877). Acerca del posible origen de la hercogamia recíproca, Barret *et al.* (2000) señalaron que varios autores (Darwin 1877, Lloyd y Yates 1982) apuntan que cuando los estigmas están localizados en la misma posición dentro de la flor, las funciones de recibir y remover polen tienen el potencial de interferirse recíprocamente, lo que conduce a una disminución de las oportunidades de apareamiento. La resolución de este conflicto entre los beneficios de dispersar el polen de manera efectiva y el costo de la interferencia reproductiva, contribuye a que exista una gran variación estructural en la altura relativa de los órganos sexuales entre las plantas con flores (Barret *et al.*, 2000). Así pues, una de las posibles soluciones para evitar este conflicto pudo ser la generación de una estrategia como la hercogamia recíproca o una modificación sutil de ésta “*approach herkogamy*” (ver el párrafo siguiente) y, por supuesto, la efectividad de estas estrategias se exagera en especies autoincompatibles que tienen asegurado el entrecruzamiento a través de mecanismos fisiológicos (Webb y Lloyd, 1986). Por otro lado, algunos autores (Charlesworth y Charlesworth, 1987) han subrayado el hecho de que la separación espacial de los órganos sexuales puede evolucionar en respuesta a la selección en la función femenina para evitar la depresión por endogamia.

A partir de observaciones morfológicas en la familia Rubiaceae, Anderson (1973) apoya la emergencia de la hercogamia recíproca en primer lugar. Lloyd y Webb (1992a) retoman esta idea y la amplían mediante una argumentación de tipo taxonómico: en su opinión el ancestro de la heterostilia presenta un síndrome de hercogamia, en el que las anteras están un poco abajo del nivel del estilo (“*approach herkogamy*”); posteriormente, una variante con la relación inversa entre estilos y anteras propiciaría un escenario en que la transferencia legítima de polen exacerbaría la selección en torno al síndrome, desembocando en la hercogamia recíproca. La depresión por endogamia y la

pleiotropía serían los motores para que después evolucionara el sistema de incompatibilidad y el resto de los caracteres florales (Lloyd y Webb, 1992a). Faivre (2000) pone a prueba esta hipótesis mediante el estudio y la comparación detallada del desarrollo de distintas especies de la familia de las Rubiaceas, y concluye que las transiciones propuestas y graduales por Lloyd y Webb son bastante probables en esta familia. Sin embargo, Sakai y Toquenaga, (2004) publicaron un modelo en el que plantean que la heterostilia pudo establecerse a partir de poblaciones con una variación fenotípica continua tanto en las anteras como los estilos, y no a partir de la “*approach herkogamy*”. Los estudios que verifiquen o rechacen estas hipótesis seguramente tendrán que abundar en la exploración de las características genéticas de este polimorfismo, pues varios de estos modelos descansan en suposiciones aún no probadas de la dinámica hereditaria de los distintos componentes de la heterostilia.

En contraste, Baker (1966) sugiere —a partir de un análisis comparativo en la familia Plumbaginaceae— que partiendo de un ancestro “homostílico”, en primer lugar se origina la incompatibilidad y posteriormente el resto de los rasgos que conforman la heterostilia. Esta tesis fue después apoyada por un modelo cuantitativo elaborado por los Charlesworth y Charlesworth (1979), en el que suponen —en un escenario con alta depresión por endogamia— que la principal presión de selección que originó la evolución de la heterostilia es la prevención de la autopolinización. Así pues, dicha prevención se logra de forma más eficaz con el desarrollo de la autoincompatibilidad que con la hercogamia *per se*. El resto de los caracteres (la hercogamia y los caracteres adicionales) evolucionarían posteriormente para incrementar la eficiencia de polen entre los grupos compatibles y evitar la endogamia.

Por otro lado, se han propuesto otros modelos que han sido mucho menos convincentes:

Mather y de Winton (1941) proponen que tanto la hercogamia recíproca como la incompatibilidad surgieron simultáneamente, pero no ofrecen ningún mecanismo evolutivo que explique su tesis. Muenchow (1982) propone que, en primera instancia, se origina la incompatibilidad dialéctica a partir de la pérdida de alelos en un sistema de incompatibilidad esporofítico multialélico; sin embargo, existen varias líneas de argumentación, tanto taxonómica (Lloyd y Webb, 1992a), como teórica (Gibbs, 1986; Charlesworth, 1982, 1995) y ontogénica (Dulberger, 1992), que demuestran que los sistemas de incompatibilidad esporofítica, dialécticos y multialélicos, tienen orígenes totalmente independientes.

### **Evolución de la heterostilia**

Se han considerado varios factores que pueden influir en el destino evolutivo de la heterostilia. Altos niveles de autofecundación, eventos de colonización y escasez de polinizadores son algunos de los componentes que favorecerían su evolución a la homostilia (Charlesworth y Charlesworth 1978). En sentido opuesto, durante mucho tiempo se ha especulado sobre la posible tendencia de la heterostilia para evolucionar al dioicismo. Durante sus experimentos con *Primula*, Darwin fue el primero que se mostró impresionado por que estos sistemas tendieran naturalmente al dioicismo (Darwin, 1877). Actualmente, la evolución del dioicismo a partir de la heterostilia está bien documentada para un número de familias que presentan especies heterostílicas (Webb, 1999). En todos estos ejemplos, la transición de la distilia al dioicismo se ha inferido por la comparación de taxa estrechamente relacionados (Wyatt, 1983). En la Tabla I se muestran los géneros y familias en que se ha reportado que la dioecia y la distilia coexisten, y que se tiene certidumbre de que la distilia es el carácter ancestral.

**Tabla I.-GENEROS Y FAMILIAS EN QUE COEXISTEN LA DIOECIA Y LA DISTILIA (SIENDO LA DISTILIA ANCESTRAL).**



| Genero, Familia                          | Cita   |
|--|--|
| <i>Nymphoides</i> , Menyanthaceae        | Ornduff, 1966; 1970; Patrap Reddy y Bir Bahadur, 1976; Barret, 1980.           |
| <i>Byrsocarpus</i> , Connaraceae.        | Baker, 1962.   |
| <i>Cordia</i> , Boraginaceae             | Opler <i>et al.</i> , 1975; Lloyd, 1979.                                       |
| <i>Mussaenda</i> , Rubiaceae             | Baker, 1958.   |
| <i>Psychotria</i> , Rubiaceae            | Sohmer, 1977; Vuilleumier, 1967.   |
| <i>Coussarea</i> , Rubiaceae             | Beach y Bawa, 1980.  |
| Otras Rubiaceae                          | Vogel, 1955; Vuilleumier, 1967; Bir Bahadur, 1968; Opler <i>et al.</i> , 1975. |
| <i>Erythroxylum</i> ,<br>Erythroxylaceae | Bawa y Opler, 1975; Ganders, 1979.   |

La primera hipótesis que pretende explicar mecanísticamente el paso de la distilia al dioicismo descansa en la asimetría en la transferencia de polen entre morfos. Estos autores resaltan la importancia de estudiar los sistemas sexuales en plantas (entre ellos la distilia y la dioecia) como fenómenos ecológicos, es decir, explicar su evolución con base en que dichos sistemas son adaptaciones para manipular el movimiento de los polinizadores y el flujo de polen (Bawa y Beach, 1981). En su opinión, un cambio en el régimen de polinizadores podría propiciar que una de las vías legítimas de polen fuera menos efectiva que la otra (Baker, 1958; Beach y Bawa, 1980), y ésto favorecería la especialización funcional de cada uno de los morfos florales para la fase sexual que sí está funcionando, conduciendo finalmente al dioicismo (Ornduff, 1988; Beach y Bawa, 1980). En particular, se ha apoyado la idea de que el cambio en el gremio de polinizadores ocasionaría que las plantas “Pin” no aportaran polen a los estilos de las “Thrum”, por lo que estos últimos funcionarían como machos, mientras los “Pin” acentuarían su función femenina. La evidencia a está hipótesis es únicamente correlativa y en opinión de Muenchow y Grebus (1989) infundada. Sin embargo, uno de los supuestos que implícitamente manejan los modelos que enfatizan la evolución de la heterostilia por el papel que pueden tener los polinizadores, es que la generación de estadios transitorios con dimorfismo en la altura del estigma pero monomórficas con respecto a la altura de los estambres, podría propiciar un flujo de polen más efectivo

entre los morfos en comparación al flujo intramorfo (Charlesworth y Charlesworth, 1979b; Lloyd y Webb, 1992b). Recientemente, Cesaro y Thompson (2004) realizaron observaciones en una especie con estas características (*Narcissus assoanus*) y corroboraron que al menos está condición estipulada es plausible. Esto no sólo apunta que la efectividad en la transferencia del polen entre morfos es fundamental para el mantenimiento de este tipo de polimorfismos florales, sino que también puede jugar un papel importante en la generación de estados transitorios en la evolución de estos sistemas. Estos resultados son importantes si se considera que existen datos (Arroyo *et al.*, 2002) de otro sistema cercano (*Narcissus papyraceus*) en que se ha observado que el dimorfismo en la altura de los estigmas es un polimorfismo que exhibe variación en la frecuencia de los distintos morfos a nivel poblacional.

La hipótesis “ecológica” de Bawa y Beach (1981), surge como contrapeso a las hipótesis genéticas, que tienden a explicar el tránsito evolutivo de un sistema sexual a otro invocando a la selección a favor del entrecruzamiento como la principal fuerza selectiva a considerar. Sin embargo, recientemente se ha sugerido que la transición hacia el dioicismo también podría generarse a partir de fenómenos genéticos, pero en los cuales la selección estuviera actuando en una dinámica análoga a los conflictos "intragenómicos" (ver siguiente sección) observados en las especies ginodioicas (Domínguez, 1995; Domínguez *et al.*, 1997). En los conflictos intragenómicos, los alelos involucrados residen en el mismo individuo, aunque en distintos genomas, por ejemplo: núcleo vs. mitocondria. En este caso específico, la asimetría en los patrones de herencia de genes residentes en el genoma establece un conflicto de intereses, en el que se seleccionarían aquellos alelos que maximizarán su adecuación, aún en detrimento de la adecuación de otros genes del mismo individuo. Un ejemplo claro de este tipo de

conflictos es la esterilidad masculina: en las angiospermas se han documentado casos de genes mitocondriales (que sólo se heredan por vía materna) que producen inviabilidad de polen y por ende esterilidad masculina (Hurst, 1992; Saumitou-Laprade *et al.*, 1994), afectando así la adecuación de los alelos nucleares (que se heredan tanto por vía paterna como materna). Este tipo de aproximaciones abre la puerta a la posibilidad de que la especialización funcional en algunos sistemas heterostílicos sea exactamente inversa a la prevista por los modelos de tipo ecológico (Domínguez *et al.*, 1997) y por supuesto plantea la posibilidad de explorarla con base en otro marco teórico.

Es claro que el origen y destino evolutivo de la heterostilia es un tema en plena controversia y se necesitan nuevas aproximaciones cuyo nivel de análisis ayude a dilucidar las disyuntivas. En este sentido, es de vital importancia la utilización de herramientas moleculares que permitan conocer con más detalle los mecanismos de incompatibilidad y morfología floral propios de los sistemas heterostílicos. Por desgracia son muy pocos los trabajos a este respecto. Recientemente se han obtenido algunos resultados sobre los mecanismos moleculares que producen la incompatibilidad, tanto en plantas homomórficas (de incompatibilidad multialélicas), como heteromórficas (de incompatibilidad dialélica). La estrategia general ha sido identificar proteínas en el pistilo que se espera tengan propiedades de una proteína de incompatibilidad: una localización tisular y celular apropiada y un aumento en su expresión durante el desarrollo de la incompatibilidad en la maduración de brotes (Charlesworth, 1995). Esta estrategia ha permitido la identificación de genes que codifican para estas proteínas en los sistemas multialélicos: esporofítico *Brassica oleraceae* (Nasrallah *et al.*, 1987), gametofítico *Nicotiana glauca* (Anderson *et al.*, 1986), y en *Pyrus serotina* (Sassa, 1993). Al parecer los loci involucrados en los mecanismos de incompatibilidad no son sólo distintos a nivel de secuencia, sino

también a nivel funcional, lo que implica que la incompatibilidad multialélica surgió de forma independiente varias veces en la evolución de las angiospermas (Charlesworth, 1995).

Con respecto a las heterostílicas, Athanasiou y Shore (1997) logran identificar mediante técnicas electroforéticas la existencia de proteínas específicas de los estilos y estambres del morfo Thrum en tres especies del género *Turnera*. La distribución específica de estas proteínas con respecto al morfo y al órgano sexual, indican que puede tratarse de proteínas que participan en el proceso de incompatibilidad. Por su parte Wong *et al.* (1994) descubrieron una proteína específica de las plantas de estilo largo en *Averrhoa carambola* (Oxaliadaceae). En ambos casos no se sabe si estas proteínas son producto de diferentes loci o si se trata de un solo producto proteico modificado postranscripcionalmente. En estas investigaciones las proteínas parecieran tener patrones de expresión totalmente distintos a sus análogos en especies multialélicas, lo que viene a corroborar el escepticismo de varios investigadores (Charlesworth, 1982; Gibbs, 1986; Lloyd y Webb, 1992a) con respecto a la supuesta relación entre los sistemas dialélicos y multialélicos (Muenchow, 1982). Es claro que la secuenciación y mapeo de los loci que codifican para estas proteínas dará nueva luz a varias de las preguntas evolutivas con respecto a la heterostilia. Por el momento, aún no existe ninguna especie en que se haya mapeado los loci que gobiernan las características florales de la heterostilia. Existen avances significativos en la genética de dichos loci en *Primula tommasinii* (Kurian y Richards, 1997), pero sin su caracterización molecular. El uso de marcadores moleculares de ADN como los RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* - DNA polimórfico amplificado al azar) o AFLP (*Amplified Fragment length Polymorphism*-Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados), son probablemente la mejor aproximación para localizar los genes

ligados a la heterostilia y develar sus distintas relaciones (Barret *et al.*, 2000). Otra alternativa es el mapeo con QTLs (Quantitative Trait Locus- *Locus de rasgos cuantitativos*), que ofrecen la posibilidad de analizar caracteres de tipo cuantitativo. En esta vertiente ya hay algunas investigaciones en sistemas no heterostílicos, como *Arabidopsis thaliana*, que indican que varias características florales tienen comportamiento cuantitativo, y que son controladas por diferentes genes con efectos diferenciales sobre los rasgos estudiados (Sakai y Toquenaga, 2004; Juenger *et al.*, 2000). Dichos rasgos exhiben con frecuencia correlaciones altamente positivas, lo que sugiere efectos pleitrópicos o un estrecho ligamiento entre los loci involucrados (Juenger *et al.*, 2000). Por desgracia esta potente herramienta sólo se ha utilizado en sistemas con una caracterización molecular considerable; su utilización en plantas heterostílicas permitirá entender en mayor medida no sólo las características moleculares y genéticas de este sistema, sino el papel de dichas características en la evolución de la heterostilia.

Al margen de todo lo anterior, quizá debamos reconocer que los modelos de evolución revisados descansan en supuestos selectivos, y que existe muy poca evidencia acerca de otras fuerzas evolutivas que pudieran estar actuando; en particular hay algunos reportes en plantas heterostílicas que parecen indicar tamaños efectivos de población más bien pequeños (Richards e Ibrahim, 1978; Lughada y Parnell, 1993), y que por lo tanto sugieren que la deriva génica pudiera ser más importante de lo hasta ahora hemos considerado.

## **2. Esterilidad Masculina Citoplasmática (EMC)**

La esterilidad masculina citoplasmática (EMC) fue detectada en las primeras décadas del siglo pasado. Uno de los redescubridores de las leyes de Mendel, Correns (1908), observó que la esterilidad masculina en varios tipos de plantas no seguía los patrones de herencia mendelianos, sino que mostraba una herencia de tipo materno. Sin embargo, es Lewis (1941) quien llama por primera vez la atención acerca de la importancia y el posible significado evolutivo de este fenómeno. Él señaló que en un cierto número de casos como *Satureia hortensis*, *Cirsium oleraceum* (Correns, 1928) y *Lolium perenne* (Jenkin, 1931), se tenía la certeza de que la esterilidad observada en la función masculina se heredaba por vía materna a través del citoplasma. A partir de entonces este fenómeno ha estado sujeto a una intensa investigación, en gran medida debido a su utilidad en cultivos de importancia agrícola, ya que la utilización de líneas que son naturalmente estériles en su función masculina permite el entrecruzamiento sin necesidad de llevar a cabo procedimientos mucho más costosos como la emasculación (Hanson, 1991), lo que facilita substancialmente la producción de semillas híbridas (Van der Kley, 1955).

La esterilidad masculina puede tener múltiples causas: resultar de condiciones adversas de crecimiento, enfermedad, o mutación (Budar y Pelletier, 2001). Las manifestaciones fenotípicas de la esterilidad masculina más conocidas son: la completa ausencia de órganos masculinos, la incapacidad para desarrollar tejido esporógeno normal, la absorción del polen en cualquiera de sus fases de desarrollo, la ausencia de dehiscencia en los estambres o la incapacidad del polen maduro para germinar en estigmas compatibles (Budar y Pelletier, 2001). Sin embargo, dado que en la mayoría de los casos la esterilidad masculina afecta el desarrollo apropiado del polen (Hanson, 1991; Budar *et al.*, 2003; Eckardt, 2006), actualmente se acepta que la EMC más frecuente en

plantas se define como “la incapacidad heredada maternalmente de producir polen funcional (gametos masculinos) en individuos de especies que de otra forma serían hermafroditas” (Budar *et al.*, 2003). La EMC se ha documentado en aproximadamente 150 especies de 47 géneros de 20 familias (Laser y Lersten, 1972; Levings *et al.*, 1995).

El caso más estudiado de EMC es el de las plantas ginodiocas, cuyas poblaciones están compuestas por individuos hermafroditas e individuos que, teniendo flores perfectas, se comportan como hembras (estériles en su parte masculina) (Ehlers *et al.*, 2005; Budar *et al.*, 2003; Jacobs y Wade, 2003). De acuerdo a Delaney (1978) estas plantas representan aproximadamente el 10 por ciento de las angiospermas y se sabe que el ginodiocismo se encuentra en al menos 543 especies de 178 géneros de 50 familias (Dem’yanova, 1985). La EMC se ha interpretado como uno de los ejemplos más claros de “conflictos intragenómicos” (Cosmides y Tooby, 1981; Hurst *et al.*, 1996; Gouyon y Couvet 1987; Couvet *et al.*, 1990; Frank, 1989). Según Cosmides y Tooby (1981), el punto medular descansa en el énfasis que la biología evolutiva actual da a los componentes génicos como unidades de selección. Estos autores resaltan la utilidad de dividir el genoma en distintos conjuntos de genes que ellos denominan “correplicones”. Cada correplíción está definido por el conjunto de genes que se replican de manera conjunta y que, por lo tanto, su adecuación se maximiza en la misma forma. Por ejemplo, en el genoma de los animales coexisten al menos dos correplicones, los genes integrados en el núcleo y los genes mitocondriales. Bajo este esquema cada correplíción será seleccionado para modificar el fenotipo del organismo en una forma que maximize la propagación de los genes que lo componen, aún a costa de afectar la adecuación de otros correplicones incluidos en el genoma; lo que da lugar al conflicto intragenómico (entre distintos correplicones de un determinado genoma). En consonancia con esta idea, Hurst (1996)

señala que los conflictos intragenómicos ilustran perfectamente la idea de la evolución de elementos “auto-promotores” (“self-promoting elements”), que son unidades hereditarias (genes, conjuntos de genes o correplicones) que se esparcen no porque incrementen la adecuación de sus portadores, sino porque su actividad asegura que estarán sobre-representados en la siguiente generación, aunque esta actividad pueda resultar desventajosa para otras unidades hereditarias existentes en el mismo organismo. Este autor especifica que un conflicto genético se da cuando la diseminación de un alelo de un locus en una población baja la adecuación, ya sea del individuo en el que reside, o la de otros miembros en la misma población. Un punto importante, es que esta expansión del alelo “egoísta” crea el contexto que favorece la aparición de un segundo alelo con efectos específicamente antagónicos.

Para entender como es que la teoría de conflictos intragenómicos se aplica a la EMC, debemos partir del hecho que el genoma de las plantas está conformado por varios componentes de replicación independiente (correplicones); los principales son los genes que residen en el núcleo, que son heredados a través tanto de los gametos masculinos como de los femeninos, y los genes que residen en mitocondrias y cloroplastos, que se heredan de manera exclusiva a través de los gametos femeninos. En esta situación la selección favorecerá aquellas variantes génicas en los organelos que se comporten como elementos autopromotores, es decir, que impulsen una disminución en la producción de polen (por medio de la esterilidad masculina) a cambio de una mayor producción de semillas, ya que los genes de los organelos son transmitidos únicamente a través de estas (Lewis 1941). En muchos sistemas ginodioicos, se ha observado la existencia de variantes mitocondriales que vuelven a los individuos estériles en su parte masculina, y que propician una producción de semillas viables significativamente más alta que la de



los hermafroditas (para una revisión ver Gouyon y Couvet, 1987; Thompson y Tarayre, 2000; Budar *et al.*, 2003). Además, debido a que la transmisión biparental involucra tanto a la adecuación por la vía masculina como por la vía femenina, la reasignación de recursos del polen a las semillas reduce abruptamente la transmisión de los genes nucleares; de manera que para que los genes nucleares que se encuentran en una planta que presenta EMC tengan la misma adecuación de los que están en un individuo hermafrodita, un individuo estéril debe producir más semillas que un individuo fértil (Charlesworth y Charlesworth, 1978; Couvet *et al.*, 1986; De Haan *et al.*, 1997; Gouyon y Couvet, 1987; Frank, 1989). De esta forma se concreta un conflicto de intereses entre los genes de dos correplicones, el núcleo y la mitocondria, sobre la distribución de recursos a la reproducción por vía masculina (polen) y femenina (semillas) (Frank, 1989; Gouyon y Couvet 1985). Este conflicto crea una dinámica evolutiva inestable e interactiva en la que la diseminación de alelos mitocondriales esterilizadores (citotipos), puede bajar la adecuación relativa de otros citotipos no esterilizadores y también la de los alelos nucleares. En este contexto la selección propicia la expansión de alelos nucleares que anulen la acción de los citotipos esterilizadores en una forma sumamente específica, es decir, a cada citotipo esterilizador corresponde un restaurador específico, lo que da lugar a polimorfismos de alta especificidad bioquímica (Frank, 2000).

Recientemente, se han agregado nuevos matices que precisan la naturaleza de este tipo de conflictos. Touzet y Budar (2004) consideran que la EMC puede ser entendida como el producto de un conflicto genético “entre” dos genomas que tienen distintas vías de herencia; lo que lleva a concluir que quizá un nombre más adecuado para este fenómeno es el de “conflictos intergenómicos”, dado que aunque los dos genomas en conflicto residen en la misma célula, son unidades hereditarias independientes.

Los cambios morfológicos asociados a la esterilidad masculina citoplasmática en varios sistemas se dan en diferentes estados de desarrollo. Sin embargo, en un gran número de sistemas uno de los primeros cambios visibles es la degeneración prematura del tapete de la antera (Schnable y Wise, 1998). Aunque los mecanismos moleculares y bioquímicos de este fenotipo permanecen desconocidos en la mayor parte de los casos, se han consolidado dos posiciones, en primera instancia mutuamente excluyentes (Budar *et al.*, 2003). En una de las hipótesis se postula que los genes que promueven este fenotipo interactúan con un factor desconocido que se encuentra de manera específica en el tejido en que se detectan las primeras anomalías (el tapete); esta interacción podría desencadenar una cascada de efectos que, en última instancia, desembocaría en la muerte de las microesporas (Budar *et al.*, 2003). Esta hipótesis tiene la ventaja de explicar la expresión constitutiva de varios genes involucrados en la esterilidad y el fenotipo localizado que se da durante el desarrollo. La mayor parte de los datos que apoyan esta versión provienen de los estudios realizados en el maíz (Wise *et al.*, 1999a). Por desgracia no se ha identificado a la fecha ningún factor que obedezca las condiciones mencionadas.

La otra hipótesis propugna que las mutantes que dan origen a la EMC propician una pérdida de función en aspectos importantes de la fisiología mitocondrial. Esta hipótesis se basa en que, con algunas excepciones como el gen *orf239* identificado en *Phaseolus* (Sarria *et al.*, 1998), los polipéptidos codificados por los genes asociados a la EMC son, en la mayoría de los casos, expresados constitutivamente y en general están asociados a las membranas mitocondriales. Lo anterior permite especular que las proteínas derivadas de los genes que producen la EMC interfieren en la generación de ATP (Levings, 1993), afectando con ello la producción de polen, uno de los mecanismos más

demandantes a nivel energético. Sin embargo, esto no explica que la expresión constitutiva de estos genes no afecte otros procesos igualmente demandantes de las capacidades respiratorias del organismo, como la germinación y la maduración de frutos. Existen evidencias citológicas, moleculares y metabólicas a favor de una alta demanda energética durante la gametogénesis masculina: inmediatamente después de la meiosis, el número de mitocondrias incrementa de manera substancial, tanto en las microesporas como en el tapete (Lee y Warmke, 1979). Los niveles de expresión de los genes mitocondriales y nucleares que codifican las subunidades de las enzimas respiratorias cambian drásticamente durante la maduración del polen (Monéger *et al.*, 1992; Conley y Hanson, 1994; Smart *et al.*, 1994; Lalanne *et al.* 1998; Wen y Chase, 1999) y varios tipos de enzimas involucradas en la producción de energía como la subunidad  $\beta_3$  de la ATP sintetasa mitocondrial (De Paepe *et al.*, 1993), la piruvato descarboxilasa, la alcohol deshidrogenasa (Tadege y Kuhlemeier, 1997) y la aldeído deshidrogenasa (Op den Camp y Kuhlemeier, 1997) son expresadas de manera específica en el polen. Una variante interesante de esta hipótesis sugiere que el mecanismo subyacente de la EMC está asociado a la interferencia en el inicio de la muerte celular programada en el tejido del tapete y su relación con el estrés oxidativo (Balk y Leaver, 2001).

Un punto importante es que casi todas las variantes que producen EMC y que se han caracterizado a nivel molecular, son mutantes que difícilmente podrían sobrevivir y ser seleccionadas en condiciones naturales. Es necesario dirigir esfuerzos para caracterizar a nivel molecular a genes esterilizadores en poblaciones naturales, en que los individuos estériles pueden mantenerse de manera estable en dichas poblaciones (Budar y Pelletier, 2001).

En el caso de los genes restauradores, en la mayoría de los casos la restauración de la fertilidad resulta de una expresión disminuida de los genes asociados a la esterilidad. Aunque es muy amplia la variedad de mecanismos asociados, la mayor parte sugiere una regulación —a nivel post-transcripcional— de los mRNAs provenientes de genes asociados a la EMC (Abad *et al.*, 1995; Wise *et al.*, 1999b; Wen y Chase, 1999; Bellaoui *et al.*, 1999; Koizuka *et al.*, 1998; Koizuka *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1998). La reciente identificación de un gen restaurador de *Petunia*, cuyo producto proteico está compuesto principalmente de 14 fragmentos repetidos de 35 aminoácidos pentatricopéptidos (proteína PPR) (Bentolila *et al.*, 2002), abrió una nueva línea de investigación en torno al papel que esta familia génica puede tener en la regulación de la expresión proteínica a nivel de los organelos (Small y Peters, 2000). En este sentido, recientemente se ha identificado otras proteínas PPR que restauran la fertilidad en arroz (Weng *et al.*, 2006).

Casi todos los sistemas en los que se avanzado de forma considerable en los mecanismos fisiológicos que dan origen a la EMC son cultivos de importancia económica. Por otro lado, las aproximaciones técnicas con la que se estudian los sistemas de EMC en poblaciones naturales, suelen estar alejadas de las usadas en los cultivos comerciales (Budar, *et al.*, 2003; Budar y Pelletier, 2001). La intensificación de la colaboración de ambos campos, seguramente permitirá entender de manera más integral y exacta el funcionamiento ecológico, evolutivo y molecular de este fenómeno.

Además de las convergencias que se observan a nivel fisiológico en las plantas que presentan EMC, se han encontrado elementos comunes a nivel molecular, a través de la utilización de técnicas como la secuenciación, la amplificación (PCR) y la hibridación de sondas interespecíficas. Aunque salvo dos excepciones (L'Homme *et al.*, 1997; Tang

*et al.*, 1996) los genes identificados en la EMC no están relacionados a nivel de secuencia, la mayoría de ellos comparten ciertas características que son relevantes para comprender el fenómeno. Estos genes son derivados de la fusión de porciones de genes conocidos con secuencias que pueden o no ser conocidas previamente, además de que varios de los componentes quiméricos parecen redundantes (Saumitou-Laprade, 1994; Mackenzie *et al.*, 1994; Budar *et al.*, 2003). En la tabla II se muestran los principales genes relacionados con la EMC, junto con los fragmentos reconocidos por medio de las técnicas mencionadas.

TABLA II. SISTEMAS EN QUE SE HAN DETALLADO LOS GENES  
RELACIONADOS CON EMC

| Sistema                             | Nombre de gen               | Componentes involucrados                 | Cita  |
|-------------------------------------|-----------------------------|--|---|
| <i>Zea mays (T)</i>                 | <i>Turf 2H3; urf 13</i>     | 26S rRNA, ATP 6, tRNA-Arg de cloroplasto | Dewey <i>et al.</i> , 1986.                   |
| <i>Zea mays (S)</i>                 | <i>orf355/orf77</i>         | ATP 9, cox I                             | Wen y Chase, 1999.                            |
| <i>Petunia parodii</i>              | <i>Pcf1</i>                 | ATP 9, cox II, urf S, nad3, rps12        | Nivison y Hanson, 1989; Young y Hanson, 1987. |
| <i>Brassica napus (pol.)</i>        | <i>orf 224</i>              | atp 6, atp 8, rps3                       | Singh y Brown, 1991                           |
| <i>Brassica napus(Nap)</i>          | <i>orf 222/nad5c/orf139</i> | atp 6                                    | L'homme <i>et al.</i> , 1997.                 |
| <i>Brassica tournefortii (Tour)</i> | <i>orf 193</i>              | atp 6, nad 5, atp 9                      | Dietrich, 2003                                |
| <i>Brassica napus(Kosena)</i>       | <i>orf 125</i>              | atp 8                                    | Iwabuchi <i>et al.</i> , 1999.                |
| <i>Brassica napus(ogu)</i>          | <i>orf 138</i>              | Atp 8                                    | Bonhomme, 1992.                               |
| <i>Oryza sativa</i>                 | <i>urf—rmc</i>              | atp 6                                    | Kadowaki <i>et al.</i> , 1990.                |
| <i>Shorgum bicolor</i>              | <i>orf 79<br/>orf 107</i>   | atp 9, atp 6                             | Pring <i>et al.</i> , 1995.                   |
| <i>Triticum timopheevi</i>          | <i>orf 256</i>              | cox I                                    | Song y Hedgcot, 1994.                         |
| <i>Phaseolus vulgaris</i>           | <i>Pvs-orf239</i>           | atp $\alpha$ , cob                       | Hervieu <i>et al.</i> , 1993.                 |
| <i>Cajanus cajan</i>                | *                           | atp9                                     | Sivaraakrishnan <i>et al.</i> , 1997.         |
| <i>Helianthus annuus</i>            | <i>orfH522.</i>             | atpA, $\alpha$ , Cob, atp9, atpasa 8     | Kohler <i>et al.</i> , 1991                   |
| <i>Nicotiana glauca</i>             |                             | atpA, atp6, Nad7                         | Hakanson 1993.<br>Kofer <i>et al.</i> , 1991  |
| <i>Allium cepa</i>                  | *                           | Cob                                      | Sato, 1998                                    |
| <i>Daucus carota</i>                | *                           | atp9, cox I                              | Nakajima <i>et al.</i> , 1997                 |

A diferencia del genoma mitocondrial de otros organismos, el de plantas tiene una tasa de substitución nucleotídica comparativamente baja y una extrema variedad en tamaño y estructura (Mackenzie *et al.*, 1994; Palmer *et al.*, 2000; André y Walbot, 1992) producto de la intensa dinámica de recombinación con que evoluciona este genoma (Budar y Pelletier, 2003). Los genes relacionados con la EMC son producto de este tipo de fenómenos recombinatorios y, como puede observarse en la Tabla II, varios

fragmentos que frecuentemente están relacionados con proteínas de la cadena respiratorias, parecen susceptibles de recombinar con mayor frecuencia y producir genes que generen EMC (Mackenzie *et al.*, 1994). Aunque no se conocen los detalles de la fisiología de las proteínas que codifican estos genes, en la mayor parte de los casos poseen dominios hidrofóbicos (Schnable y Wise, 1998) y están asociados a las membranas mitocondriales, lo que apoya la hipótesis de su posible interferencia en la síntesis de ATP y la capacidad respiratoria del organelo.

El estudio de las consecuencias evolutivas que tiene la EMC ha llevado a explorar tanto el mantenimiento de este rasgo en las poblaciones ginodioicas, como su posible papel en la evolución de este sistema reproductivo al dioicismo.

Uno de los problemas que se tiene en este marco teórico, es la heterogeneidad de términos que utilizan los autores. Schultz (1994) establece una categorización que ha recibido el consenso de los trabajos posteriores. Según este autor, el criterio bajo el cual debemos definir si un sistema es citoplasmático, nuclear o núcleo-citoplasmático, es la variabilidad de alelos. Es decir, si existe más de un gen esterilizador y no hay restauradores o en el sistema ya se ha fijado uno de ellos, erosionando la variabilidad de restauradores, el modelo se denomina como de control citoplasmático. Si lo que hay es una gran cantidad de restauradores y sólo un citotipo, ya sea este esterilizador o no, el sistema sigue un modelo de control nuclear. Finalmente, si hay variabilidad tanto en los restauradores nucleares como en los citotipos esterilizadores el sistema es núcleo-citoplasmático.

La estabilidad del ginodioicismo depende en gran medida de que los individuos estériles compensen la adecuación perdida por vía masculina con una ventaja en fertilidad por vía femenina (Charlesworth, 1981; Gouyon y Couvet, 1987; Delph *et al.*, 1999). Esta

ventaja en fertilidad de los individuos estériles no sólo puede deberse a que los individuos con EMC reasignen recursos a gametos femeninos (compensación), sino que también puede consistir en que eviten los efectos adversos de la depresión por endogamia (Gouyon y Couvet, 1987; Thompson y Tarayre, 2000). La magnitud de compensación requerida para que los individuos estériles puedan permanecer, depende de la forma en que se determina la esterilidad masculina. Si la esterilidad es producto del efecto de alelos de origen puramente nuclear, los individuos estériles deben tener una fecundidad de más del doble que los individuos hermafroditas (Ross y Gregorious, 1985; Frank, 1989; Gouyon *et al.*, 1991). Cuando la esterilidad masculina es de origen citoplasmático los individuos estériles necesitan sólo una pequeña ventaja de fecundidad femenina sobre los hermafroditas para mantenerse en la población (Lewis, 1941; van Damme, 1983). Sin embargo, si la esterilidad es producto de la interacción entre alelos nucleares y citoplasmáticos, la magnitud necesaria es intermedia a la requerida en los dos casos previamente citados (Lewis, 1941; Charlesworth, 1981; Gouyon y Couvet, 1987).

De manera relacionada, dado que el ginodioicismo y el diocismo están fuertemente asociados a nivel taxonómico (Heywood, 1978), varios autores han interpretado al ginodioicismo como un sistema transitorio que puede evolucionar al diocismo (Darwin, 1877; Ross, 1982). Los Charlesworth (1978) proponen que para que el diocismo evolucione a partir del hermafroditismo deben tener lugar tres eventos, una mutación que afecte la producción de óvulos, otra que afecte la producción de polen y después un efecto de ligamiento entre ambas mutaciones. Sin embargo, esto no es posible en una dinámica núcleo-citoplasmática, pues no puede haber ligamiento entre los alelos esterilizadores masculinos citoplasmáticos y los esterilizadores de hembras de origen



nuclear. Pese a lo anterior, Schultz (1994) señala correctamente que una dinámica en principio núcleo-citoplasmática puede perder fácilmente la variabilidad en los alelos citoplasmáticos, dejando la expresión del fenotipo bajo control nuclear, lo que permitiría establecer el ligamiento que apuntaban los Charlesworth. De manera paralela Maurice (1992, 1993) señala que, en un escenario en que el ginodiocismo es producto de una interacción núcleo-citoplasmática, las condiciones para que el sistema evolucione al diocismo son mucho menos restrictivas que si el control es puramente nuclear o citoplasmático.

Cualquiera que sea el caso, todos estos modelos resaltan la importancia que tiene el establecer el modo de herencia de la EMC; pues solo así, se podrán contrastar las predicciones teóricas con las observaciones experimentales.

## **Especie en estudio**

*Erythroxylum havanense* es un arbusto distílico, perenne y caducifolio; que puede encontrarse en los bosques tropicales secos de la costa del Pacífico mexicano. Son varios los aspectos ecológicos que se han estudiado en este sistema. En particular, se sabe que tanto la antesis como la producción de hojas es disparada por las primeras lluvias de la temporada (Domínguez, 1990). Normalmente, la producción total de hojas de un año se da en un evento repentino al comienzo de la temporada de lluvias (Domínguez y Dirzo, 1994). Asimismo, esta temporada es el único periodo en el que se dispone de los recursos necesarios para las funciones de crecimiento, reproducción y mantenimiento; por lo tanto, la remoción de follaje durante este periodo por parte de los herbívoros puede tener consecuencias cruciales para la reproducción y sobrevivencia de esta especie. Mediante un diseño experimental de defoliación artificial Domínguez y Dirzo (1994), establecen que la remoción total del follaje en *E. havanense* afecta varios aspectos de la biología reproductiva como crecimiento, tiempo de maduración de los frutos, producción y masa de semillas, y producción total de flores.

Por otro lado, existen estudios (Gryj y Domínguez, 1996) que comprueban que la tasa de remoción de semillas por parte de frugívoros está correlacionada positivamente con el tamaño de cosecha por planta, lo que implica que las semillas de las plantas con una mayor disponibilidad de frutos maduros para los frugívoros se establecen más rápidamente. Además, también se sabe que entre más rápida sea la dispersión de semillas mejor será el desempeño de las plantas durante las etapas tempranas de desarrollo (Avila, 1991).

De manera paralela, se ha detallado el significado adaptativo del patrón de floración sincrónico y masivo intra- e inter-individual que caracteriza a esta especie, así como su relación con los patrones de lluvia del hábitat (Domínguez y Dirzo, 1995). Una posible

interpretación radica en que dicho patrón promueve un mayor éxito en el forrajeo por parte de los polinizadores y de esta forma incide en la adecuación de los individuos de esta especie (Domínguez *et al.*, 2005). Igualmente, la sincronización de la floración produce las condiciones en que las tasas de donación y deposición de polen y las oportunidades de apareamiento, se maximizan. Esto es particularmente importante en *E. havanense*, debido a su carácter auto-incompatible y a su dependencia de polinizadores para la producción de frutos (Rosas *et al.*, 2005).

De manera conjunta, el patrón de floración sincrónico propicia una alta concentración de recursos en términos de polen y semillas disponibles para polinizadores y dispersores, y dado el carácter efímero de este fenómeno, se puede especular que el flujo genético entre poblaciones es reducido, lo que produce, una estructuración genética en poblaciones muy cercanas, e incluso la estructura y altísima variación genéticas observadas a escala muy fina dentro de las poblaciones (Domínguez *et al.*, 2005).

Una de las características más importantes de *E. havanense* es que existe una asimetría en la producción de frutos entre ambos morfos florales. Los individuos Thrum son casi el doble de fecundos que los individuos Pin (Domínguez 1990, Domínguez *et al.*, 1997). Dichas diferencias no se deben a factores ecológicos como el número e identidad de los polinizadores o la transferencia asimétrica del polen (Domínguez 1990, Domínguez *et al.*, 1997). Estudios embriológicos muestran que estas diferencias se deben a un desarrollo anormal en el polen del morfo Thrum (Domínguez *et al.*, 1997; Vázquez-Santana *et al.*, 1996), lo que trae como consecuencia la expresión de un fenómeno de esterilidad masculina que se ha evaluado a través de ensayos de viabilidad de polen (Domínguez *et al.*, 1997). Existe una amplia variabilidad en la expresión de este

fenómeno a nivel poblacional; sin embargo, un estudio detallado de 5 poblaciones en la costa del Pacífico mexicano demostró que en casi todos los casos (4 de 5 poblaciones), el morfo Thrum es significativamente más estéril que el morfo Pin (Cuevas *et al.*, 2005).

El hecho de que en este sistema el morfo Pin produzca aproximadamente el 54% de las semillas que produce el morfo Thrum, y que éste exhiba de manera consistente esterilidad masculina, ha llevado a sugerir que *E. havanense* se encuentra en un proceso de especialización de género y evolución al diocismo (Domínguez *et al.*, 1997; Avila y Domínguez 2000). Es decir que, de manera transitoria, *E. havanense* se comporta de manera parcial como un sistema ginodioico, con el morfo Pin comportándose como hermafrodita y el Thrum como un morfo parcialmente estéril en su función masculina (Domínguez *et al.*, 1997). En apoyo a esta hipótesis se ha documentado un notable parecido entre los patrones anatómicos asociados a la esterilidad masculina en el morfo Thrum y las especies ginodioicas: en ambos casos se altera el desarrollo del tejido esporógeno y el tapete, que son fundamentales para la formación de las paredes primarias del polen (Domínguez *et al.*, 1997). De manera consecuente, se ha propuesto (Domínguez *et al.*, 1997) que este patrón puede explicarse por una dinámica de conflictos intergenómicos análoga a la observada en especies ginodioicas (*Plantago lanceolata*; Van Damme, 1993; *Origanum vulgare*, Kheyr-Pour, 1981 y *Thymus vulgaris*, Couvet *et al.*, 1998); es decir, que la coexistencia de diversos genes restauradores y esterilizadores determinan los niveles de esterilidad en la función masculina. De hecho se ha sugerido que la esterilidad masculina se debe a la interacción entre genes citoplasmáticos que producen la esterilidad masculina (parecidos a los detectados en los sistemas ginodioicos) y el supergen que causa la heterostilia (Avila y Domínguez, 2000). Dado que los individuos Pin son homogaméticos (ss) (Lewis y

Jones, 1992), pudieran tener dos copias de los genes restauradores, y ello les permitiría restaurar la función masculina; bajo la misma lógica, el hecho de que los Thrum sean heterogaméticos (Ss) les impediría restaurar la fertilidad masculina (Avila y Domínguez, 2000).

Una de las condiciones necesarias para que el esquema de especialización de género sea viable es que los individuos que pierden parte de su adecuación debido a la esterilidad masculina, deben compensar dicha pérdida con un incremento en la adecuación por medio de su función femenina (Avila y Domínguez, 2000). En este sentido, Avila y Domínguez (2000) señalan que el morfo Thrum produce un mayor número de semillas que el morfo Pin, y que las probabilidades de maduración y germinación de una semilla y su desempeño vegetativo una vez que se establece como plántula es mayor si pertenece a una progenie derivada de cruces en que la madre es Thrum. De manera consistente, no sólo las plantas Pin producen una mayor proporción de polen viable, sino que los tubos polínicos del polen de plantas Pin crece significativamente más rápido que el polen de plantas Thrum (Avila y Domínguez, 2000).

Por otro lado, se han evaluado los efectos de la esterilidad masculina y la sincronización reproductiva en la magnitud de la compensación a través de la función femenina (Rosas *et al.*, 2005). En este estudio, se comprueba que la magnitud de la compensación depende del grado de sincronización en el desarrollo floral. Además, se pudo observar que los individuos Pin que florecían fuera de sincronía prácticamente no producían frutos; en contraste los Thrum en circunstancias análogas tenían un déficit menos pronunciado, por lo que la compensación reproductiva en los Thrum es mayor en estas circunstancias. La magnitud de la compensación parece ser suficiente para que los individuos estériles se mantengan en las poblaciones, aunque la heterogeneidad

ambiental tiene el potencial de afectar la expresión de la ventaja por compensación de los individuos con esterilidad masculina y, en última instancia, la trayectoria evolutiva de la especialización sexual.

Es evidente que para completar el panorama teórico que rige la evolución de este sistema es necesario entender, lo mejor posible, como se hereda la esterilidad masculina en *E. havanense*.

## **Objetivo General**

Establecer la forma en que se hereda la esterilidad masculina en *Erythroxylum havanense*

## **Objetivos Particulares**

Análisis genético cuantitativo:

Identificar efectos maternos o paternos involucrados en la herencia de la esterilidad masculina en *Erythroxylum havanense*.

Análisis molecular:

Identificar componentes genéticos asociados a la esterilidad en *Erythroxylum havanense*.

## **Hipótesis**

Si existen efectos paternos o maternos asociados a la herencia de la esterilidad masculina análogos a los observados en las especies ginodioicas, el análisis de la progenie de las familias genéticas de un sistema dialélico parcialmente recíproco permitirá identificar dichos efectos. Además, mediante el PCR interespecífico se identificarán genes asociados a la esterilidad en *Erythroxylum havanense*.



## Material y Métodos

### **Análisis genético.**

#### Sitio de estudio.

Esta investigación se llevó a cabo en la Estación de Biología de Chamela, en el estado de Jalisco, México (19°30' N, 105°03' oeste). La precipitación anual en esta zona es de 740 mm y el clima se caracteriza por una temporada de secas que va de noviembre a mayo (Bullock 1986; García 1988).

#### Diseño de cruzas

Durante 1989 Ávila-Sakar y Domínguez (2000), efectuaron cruzas para generar familias genéticas a partir de un sistema dialélico parcialmente recíproco. En este diseño los individuos se desempeñaron como donadores o como receptores de polen (ningún progenitor fungió ambos papeles). Se formaron dos grupos de cruzas, en cada grupo se utilizaron 14 individuos. En el grupo 1, ocho individuos Thrum se desempeñaron como madres y seis Pin como padres. El grupo 2 se formó por ocho receptores de morfo Pin y seis donadores Thrum (Figura 1). La progenie de estas cruzas está formada por hermanos completos, medios hermanos por la vía paterna y medios hermanos por la vía materna

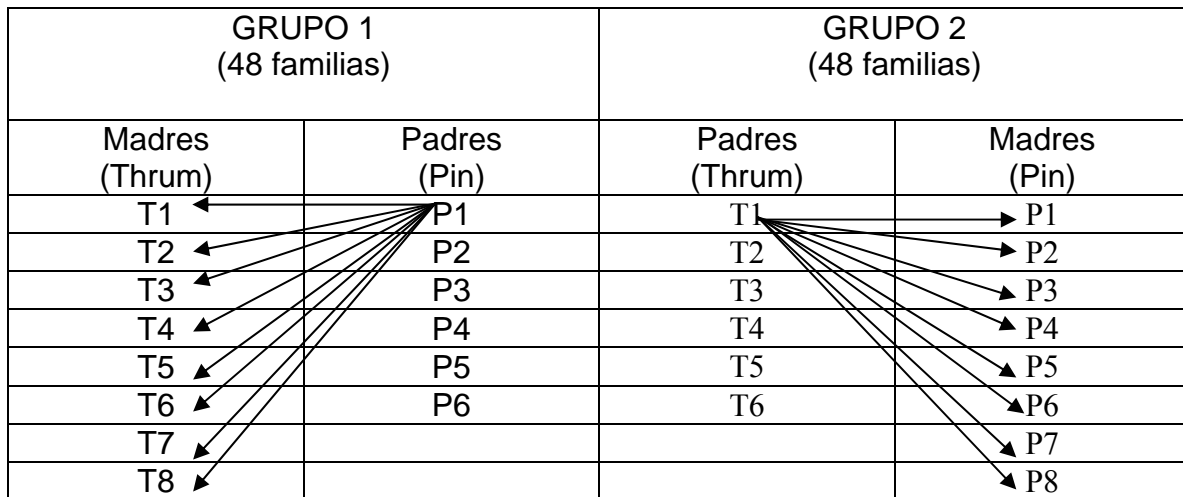


Fig. 1. Diseño de cruzas parcialmente recíproco efectuado con individuos de *E. havanense*. En la figura se muestra como en el grupo 1, el padre Pin 1 genera familias genéticas (denotadas con las flechas) con cada una de las madres Thrum. En total, P1 forma 8 familias genéticas, el mismo procedimiento se sigue con cada uno de los padres (P2, P3...P6). En total se forman 48 familias genéticas en el grupo 1. En el caso del grupo 2 los que funcionaron como padres fueron los individuos Thrum siguiendo el mismo esquema explicado para el grupo 1. Se formaron 96 familias genéticas por los dos grupos. Es importante reiterar que los individuos de un morfo que funcionaron en un papel determinado (madre/padre) en un grupo de cruce, son distintos a los del mismo morfo que funcionaron en el papel opuesto en el otro grupo de cruce.

Los individuos que se eligieron para efectuar las cruzas provienen de parches que están separados en un rango que va de 30 a 600 m (Ávila-Sakar y Domínguez, 2000). El polen de los donadores fue usado de forma simultánea en todas las cruzas, de manera que no hubiera —debido a la distancia entre los distintos progenitores— diferencia en el tiempo de deposición del polen en las plantas receptoras. Las polinizaciones manuales se efectuaron en 20 flores por planta y una vez que se recolectaron los frutos, sus semillas fueron sembradas en un área protegida de 5 X 5 X 2 metros (“la exclusión”).

Durante las estaciones de floración de los años de 2001 y 2002 evaluamos la viabilidad de polen en la progenie que floreció a través del siguiente protocolo: debido a la escasez tanto de individuos que florecieron como del número de flores obtenidas por individuo, se recolectaron el mayor número de flores posibles por planta, de tal forma que hubo individuos en que se tomaron hasta 8 flores y otros en que sólo se pudo recolectar una flor. De cada flor se tomaron cuatro anteras y cada una de estas anteras fue frotada sobre una gota de medio de cultivo depositada en un portaobjetos. El medio de cultivo utilizado consistió de la siguiente fórmula: 42 ml de agua, 10.5 g de sacarosa, 0.35 g de agar bacteriológico, 0.015 g de nitrato de calcio, y 0.01 g de ácido bórico (Cuevas, 2000). Estas preparaciones fueron mantenidas a temperatura ambiente por doce horas, al cabo de este tiempo el crecimiento de los tubos polínicos se detuvo con una gota de FAA (Formaldehído 5 %, Ácido acético 5%, etanol 63% y agua destilada 27%) (Cuevas, 2000).

Posteriormente, se identificaron los granos de polen que mostraran tubos polínicos o al menos indicios de estas estructuras a través de un conteo manual en un microscopio de luz con el objetivo 10x. Se obtuvo la proporción del polen en estas condiciones. Esta proporción se realizó eligiendo el campo que mostrara tubos polínicos en germinación y obteniendo el total de los granos de polen germinados y no germinados en dicho campo.

Análisis estadístico.

Para realizar los análisis estadísticos se obtuvo la suma total de granos de polen en germinación por planta y se dividió entre el total de granos contados en las muestras consideradas. Con este procedimiento obtuvimos una proporción total de granos de polen

germinados por planta, que fue transformado con la raíz cuadrada del arcoseno. Este parámetro fue denominado “fertilidad” y se usó para llevar a cabo todos los análisis efectuados. En los casos en que se considera la totalidad de los individuos (fértil y estériles), las distribuciones de fertilidad no se ajustan a una distribución normal, por lo que se efectuaron pruebas Wilcoxon/ Kruskal–Wallis para evaluar distintas fuentes de variación. La fertilidad se comparó entre morfós, por grupo de cruza, por tipo de cruza: si los progenitores podían considerarse como pertenecientes al mismo parche (cruza intraparche) o de distinto parche (cruza interparche).

Los datos en que se considera únicamente a la progenie fértil sí se ajustan a la normalidad, por lo tanto se llevaron a cabo ANOVAS para evaluar las posibles diferencias entre las variables mencionadas previamente. Asimismo, se utilizaron ANOVAS y regresiones para analizar la posible relación del tamaño y la fertilidad. Todos los análisis se llevaron a cabo en el programa JMP 4.

Por otro lado, con el fin de identificar de forma indirecta posibles efectos maternos o paternos, se llevaron a cabo análisis de varianza en que se anidaron a los individuos que actuaron como madres, en los individuos que actuaron como padres.

También se llevaron a cabo análisis cualitativos para identificar los progenitores que expresaran una fertilidad particularmente baja, dichos análisis obedecen distintos criterios que se explican en la sección de resultados.

## **Análisis molecular.**

Se extrajo ADN total de las hojas de 58 individuos, de manera individual, de ambos morfos de la población “Ardilla” y 48 individuos de la población “Limón”. Estas dos poblaciones están localizadas en la región de Chamela anteriormente referida, y fueron elegidas porque existe evidencia de que la asimetría observada en el grado de fertilidad de los dos morfos es variable entre ambas poblaciones (Cuevas, 2000), lo que permite especular que existe variación en los determinantes genéticos de este fenotipo, presentes en ambas poblaciones.

Se utilizó 1 g de tejido fresco (hojas) y se usó el método de bromuro de cetil-metilamonio (CTAB) (Doyle y Doyle, 1987). Una vez que el ADN se extrajo fue resuspendido en TE (10 mM de tris-HCl pH 8.0, 1 mM de EDTA) y almacenado a -20 °C. La concentración fue medida y ajustada a 25 ng/μl. usando un fluorómetro Hoefer (Dynaquant 200, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA). Se utilizó este ADN como templado para la amplificación de primers que en otras especies (ver Tabla III) permitieron la discriminación entre individuos estériles y no estériles (PCR interespecífico). Para el caso de *Triticum aestivum*, los primers elegidos amplifican el gen *atp 9* en el que difieren una línea aloplásmica estéril y una línea fértil. Fueron diseñados a partir de la secuenciación de este fragmento identificado por medio del uso de una sonda de maíz de *atp 9* para el gen homólogo.

En *Allium Cepa*, los primers fueron diseñados a partir de la secuenciación de clonas de bibliotecas de ADN mitocondrial de una cepa estéril y otra fértil. Estas clonas contenían

el gen de la enzima “*Cob*”, y fueron elegidas dado que se tenía evidencia de la expresión diferencial de este gen entre las cepas mencionadas. Mediante esta metodología se diseñó un primer común para ambas cepas y un primer específico para cada una de las cepas. Estos primers fueron usados para discriminar entre las cepa estéril y fértil por medio de PCR, usando parejas de primers constituidas por el primer común a ambas y el primer específico para cada una de ellas (Sato, 1998). En los PCRs ensayados en ADN total de *E. havanense* se utilizaron las dos combinaciones para probar si había algún fragmento similar a cualquiera de las secuencias amplificadas en *A. cepa*.

En el caso de *Oriza sativa*, los primers usados son específicos para una secuencia (*orf 79*) que se encuentra río abajo del gen *atp6* y fueron usados para discriminar exitosamente individuos estériles de fértiles en la especie de la que provienen.

Las amplificaciones se llevaron a cabo en 25 µl de volumen, con 50 ng de ADN, 1.25 unidades de ADN polimerasa (Perkin-Elmer, Boston, MA, USA), 0.1 mM de cada dNTP (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), y 1 µM de primer (Gibco BRL), en un amortiguador de reacción 1× (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>). Se usó un termociclador “Perkin-Elmer 480 thermal cycler”. El ciclo de amplificación consistió en 3 minutos de desnaturalización a 94 °C, 2 minutos de hibridación a 36 °C y 2 minutos de catálisis a 72 °C. Este ciclo se repitió 44 veces, seguido de una extensión de 10 minutos a 72 °C. Debe señalarse que el hecho de que la temperatura de hibridación sea tan baja (36 °C), obedece al hecho que los primers usados provienen de especies lejanas a *E. havanense*, por lo que se decidió bajar las condiciones de astringencia del PCR interespecífico, con el objetivo de facilitar la amplificación de fragmentos que fueran parcialmente similares a los amplificados en las especies de las cuales provienen los

primers. De hecho para los casos en que se obtuvieron productos de amplificación se intentó repetir el PCR con una temperatura de alineación de 56 °C.

Los productos de la amplificación fueron separados en geles de agarosa a 1.6%, y se uso TBE 1× como amortiguador de corrida (0.09 M Tris, 0.09 ácido bórico, 0.01 M EDTA).

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV. Se probó la reproducibilidad y repetibilidad de las amplificaciones. Se usaron muestras control sin ADN para excluir la posibilidad de autoamplificación de los primers y de contaminación.

**Tabla III Primers usados para tratar de discriminar individuos estériles de los no estériles a partir PCR interespecífico. En el caso de *Allium cepa*, el primer “a” es específico para la variante estéril; “b” es específico para la variante fértil y “c” es común a ambas cepas.**

| Espece                   | Primers usados  | Secuencias asociadas | Cita  |
|--------------------------|---|----------------------|---|
| <i>Triticum aestivum</i> | 5'-GCGAGTAAGGGGCAACCTTTT-3'<br>5'-GAATTCAAATCGAGATTGTGTG-3'   | <i>atp 9, atp A</i>  | Laser <i>et al.</i> , 1995.<br>Bégu <i>et al.</i> , 1989. |
| <i>Allium Cepa</i>       | a) 5'-<br>GTCCAGTTCCTATAGAACCTATCACT-3'<br>b) 5'-TCTAGATGTCGCATCAGTGGAATCC-<br>3'<br>c) 5'-CTTTTCTATGGTGACAACTCCTCTT-<br>3' | <i>cob</i>           | Sato, 1998  |
| <i>Oriza sativa</i>      | 5'-ATGGCAAATCTGGTCCGATG-3'<br>5'-ACTTACTTAGGAAAGACTTAC-3'   | <i>atp 6, orf 79</i> | Akagi <i>et al.</i> , 1995                                |

Con el objetivo de explorar la posibilidad de que las secuencias de los productos de amplificación pudieran ser parecidas a las encontradas en otras especies con EMC, se identificaron las bandas de ADN polimórficas producidas a partir de la separación de los amplificados por electroforesis en gel de agarosa, y se purificaron (ver protocolo de purificación en apéndice I), para ser secuenciadas y comparadas en el programa BLAST-N. Se utilizaron varias herramientas de alineación para comparar los productos entre ellos mismos se alinearon siguiendo el mismo sentido 5'-3'. Además se compararon invirtiendo el sentido para encontrar la máxima similitud. Por otro lado, para comparar las secuencias obtenidas con respecto a las bases de datos de ADN para plantas, se utilizó el algoritmo Megablast. La comparación con genes de origen mitocondrial se llevó a cabo con una herramienta de BLAST que identifica fragmentos pequeños con altos niveles de similitud ("Search for short, nearly exact matches") y se acotó la búsqueda para genes de mitocondria y cloroplasto en plantas.



## Resultados

### Análisis de genética cuantitativa.

El número total de individuos que florecieron durante la temporada 2001 fue de 98 individuos (TABLA IV). Durante la temporada 2002 sólo florecieron 3 individuos, por lo que esta temporada fue excluida del análisis.

**Tabla IV. Distribución de los individuos que florecieron durante la temporada 2001, clasificados por morfo y por grupo**

|         |   | Grupo |    | Totales |
|---------|---|-------|----|---------|
|         |   | 1     | 2  | 1+2     |
| Morfo   | P | 24    | 19 | 43      |
|         | T | 38    | 17 | 55      |
| Totales |   | 62    | 36 | 98      |

La fertilidad promedio fue de 0.115 con una desviación estándar de 0.154. En la Fig. 2 se muestra como la mayor parte de los individuos de la exclusión están concentrados alrededor del 0% de fertilidad.

### Distribución de fertilidad

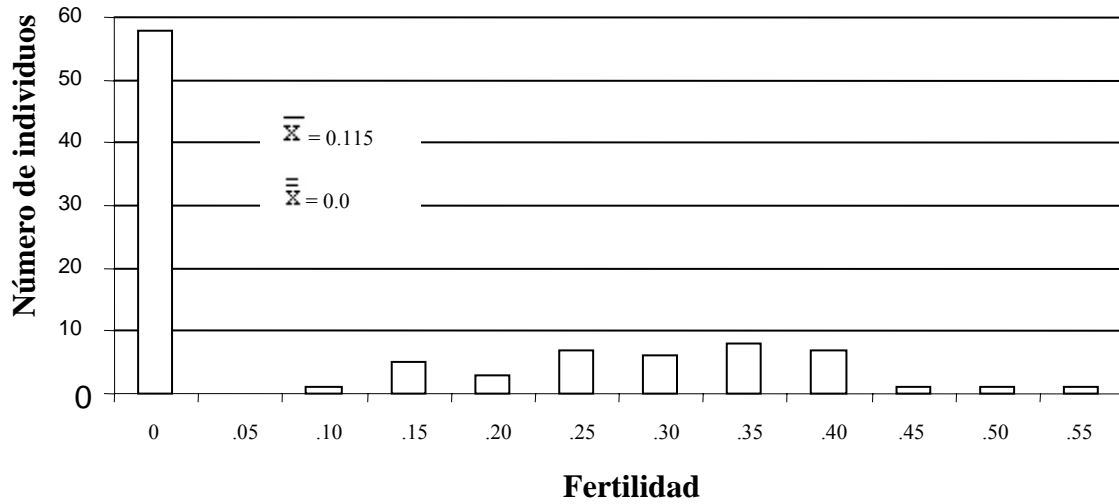


Fig. 2.-Distribución de la fertilidad obtenida en las plantas estudiadas en la exclusión. La distribución no se ajusta a una distribución normal ( $P < 0.0000$ ).  $\bar{x}$  = Media;  $\bar{x}$  = Mediana.

Las distribuciones de fertilidad de cada uno de los morfos considerados por separado mostraron un comportamiento parecido (Fig. 3 y Fig. 4).

### Distribución de fertilidad para individuos Thrum

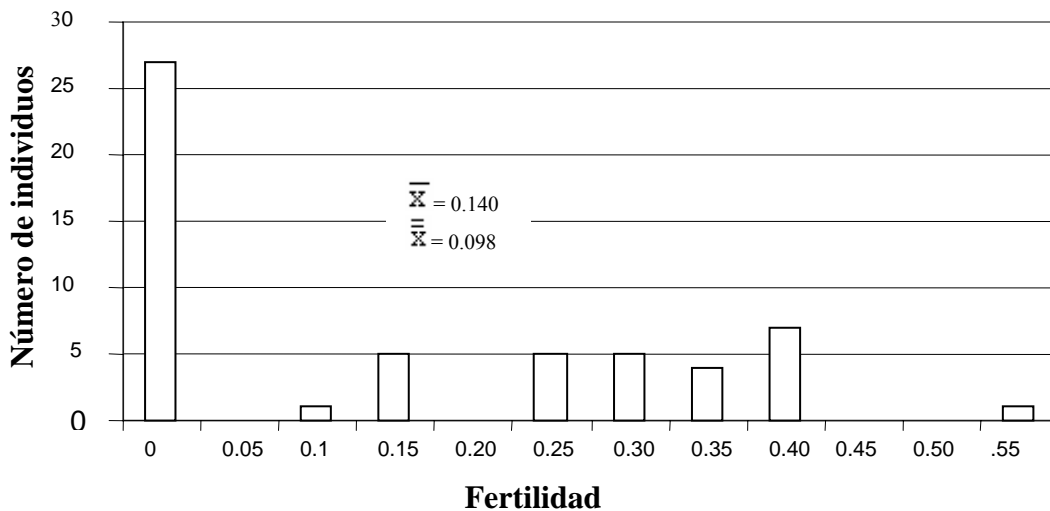


Fig. 3.- Distribución de la fertilidad en los individuos Thrum. La distribución no se ajusta a una distribución normal ( $P < 0.0001$ ).  $\bar{x}$  = Media;  $\bar{x}$  = Mediana.

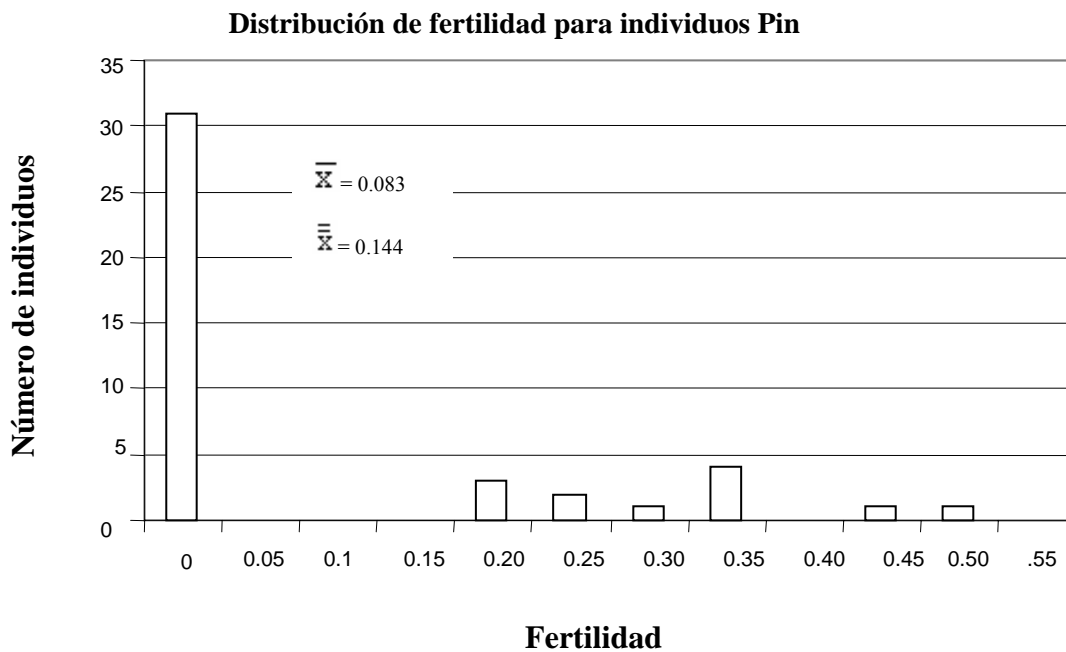


Fig. 4.- Distribución de la fertilidad en los individuos Pin. La distribución no se ajusta a una distribución normal ( $P < 0.0001$ ).  $\bar{x}$  = Media;  $\bar{x}_m$  = Mediana.

El morfo Pin presentó un porcentaje de individuos totalmente estériles (Fertilidad = 0) de 72.09%. El morfo Thrum presento un 49.09% de individuos completamente estériles. Esto contrasta fuertemente con los registros de campo en que el morfo con menos efectividad en su componente masculino es el Thrum.

La distribución de individuos estériles y fértiles por familia genética se muestra en las Fig. 5 y 6. En la Fig. 5 se representan los hijos de cada una de las familias genéticas formadas por las distintas madres. En la Fig. 6 se muestran las familias genéticas correspondientes a los padres. Ambas figuras muestran a los mismos individuos, sólo que distribuidos a partir de las familias genéticas formadas por distinto progenitor (madres o padres).

## Familias genéticas por madres

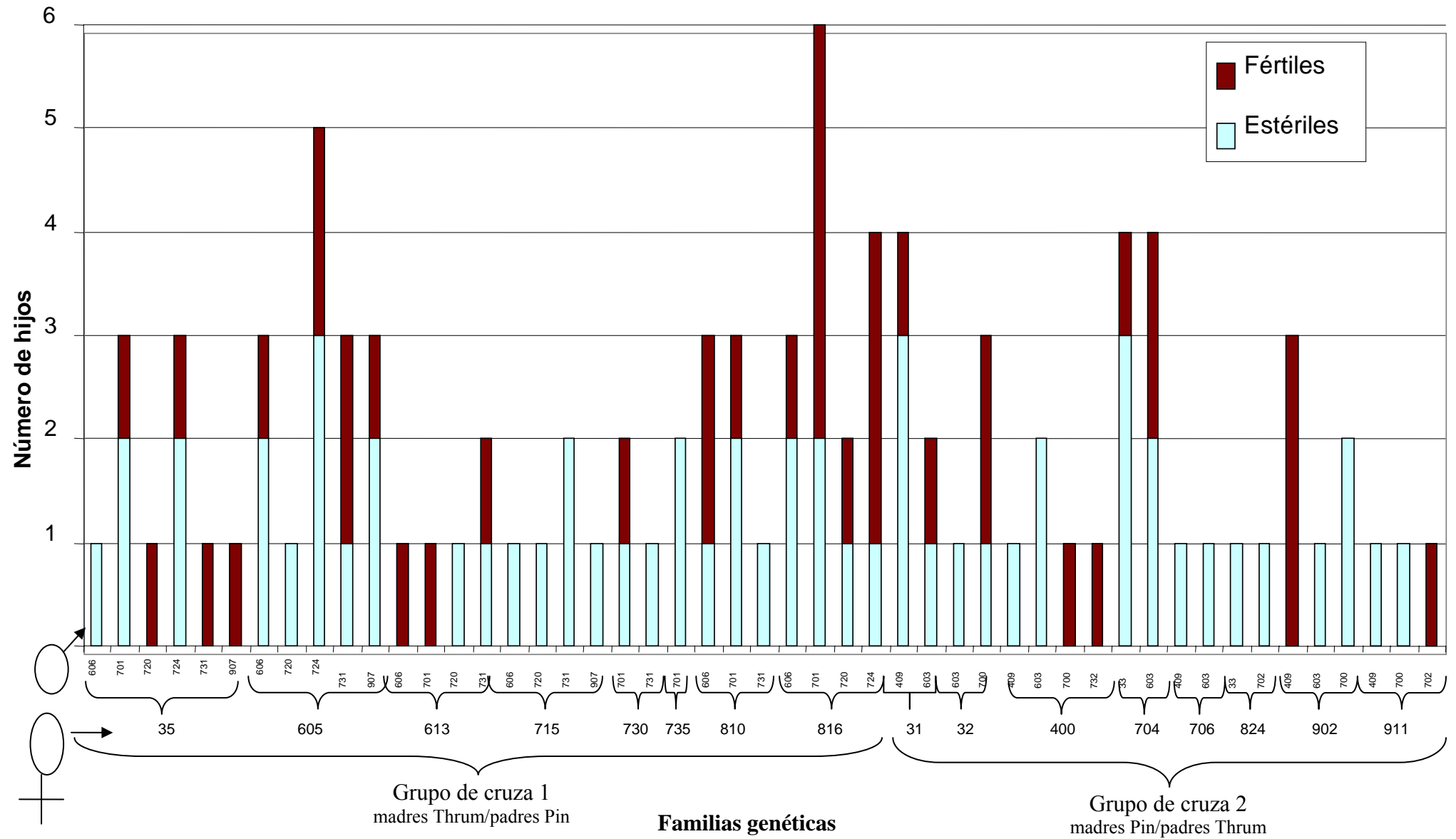
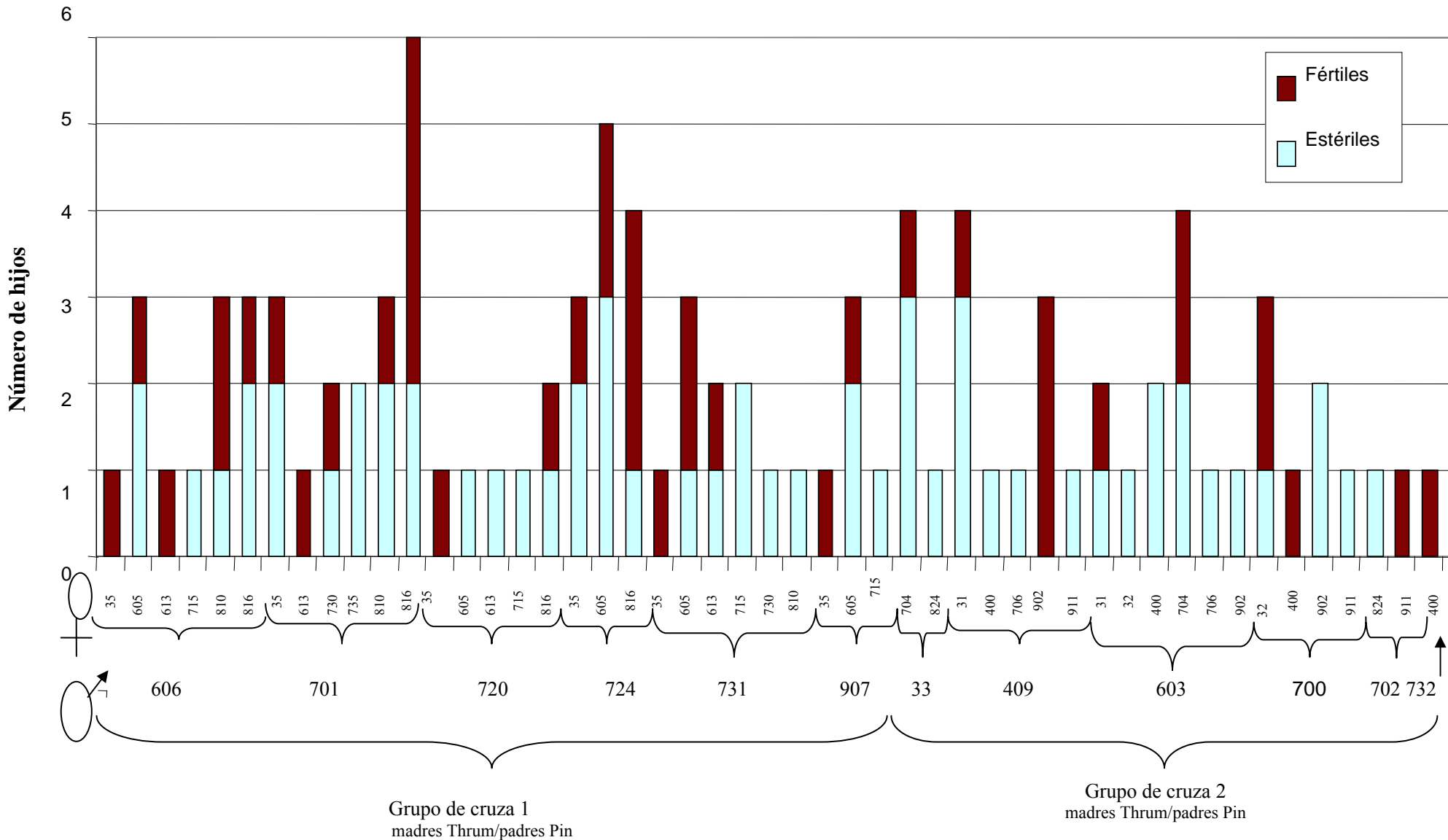


Fig. 5.- Familias genéticas por madres. En el eje de las equis cada madre esta asociada a los padres con los que formó una familia genética. Por otro lado los datos están divididos por grupo de cruz.

### Familias genéticas por padres



La distribución de la fertilidad registrada (Fig. 2, 3 y 4) no se ajusta a una distribución normal por lo que se procedió a evaluar el efecto del morfo, el grupo de cruzas, las diferencias en la progenie de las madres y padres por medio de pruebas no paramétricas (Wilcoxon/ Kruskal–Wallis).

A diferencia de las poblaciones naturales (Cuevas *et al.*, 2005) en que el morfo Pin tiene mayor fertilidad, en la exclusión es el morfo Thrum el que presenta una mayor fertilidad de manera significativa ( $\text{Prob} > |Z| = 0.0362$ ) (Fig. 7). El morfo Pin mostró una fertilidad promedio de 0.083 y un error estándar de 0.023; el morfo Thrum tuvo una fertilidad promedio de 0.141, con un error estándar de 0.020.

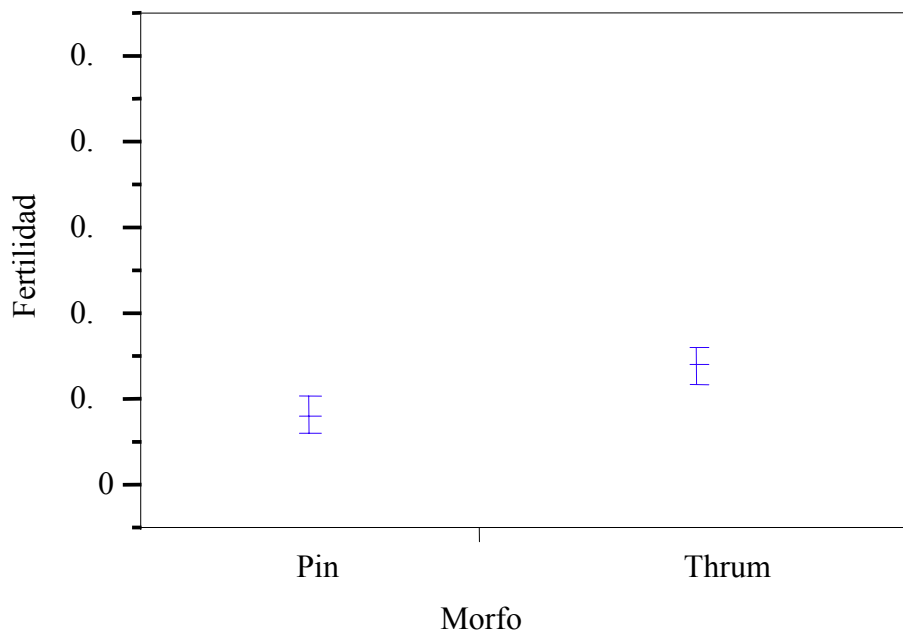


Fig. 7.-Efecto del morfo sobre la fertilidad. En la figura se muestra la fertilidad promedio para cada uno de los morfos ( $\pm 1$  Error estándar). La fertilidad promedio del morfo Pin es de 0.083 y su error estándar de 0.023. El morfo Thrum tuvo una fertilidad promedio de 0.141, con un error estándar de 0.020. El morfo Thrum es significativamente más fértil que el morfo Pin.

Con el fin de detectar si hay diferencias en cuanto a la fertilidad de la progenie y el papel que cada uno de los morfos desempeña (masculino/femenino), evaluamos el

efecto del grupo de cruza sobre esta variable. No se detectaron diferencias significativas a este respecto ( $\text{Prob}>|Z| = 0.3009$ ) (Fig. 8.)

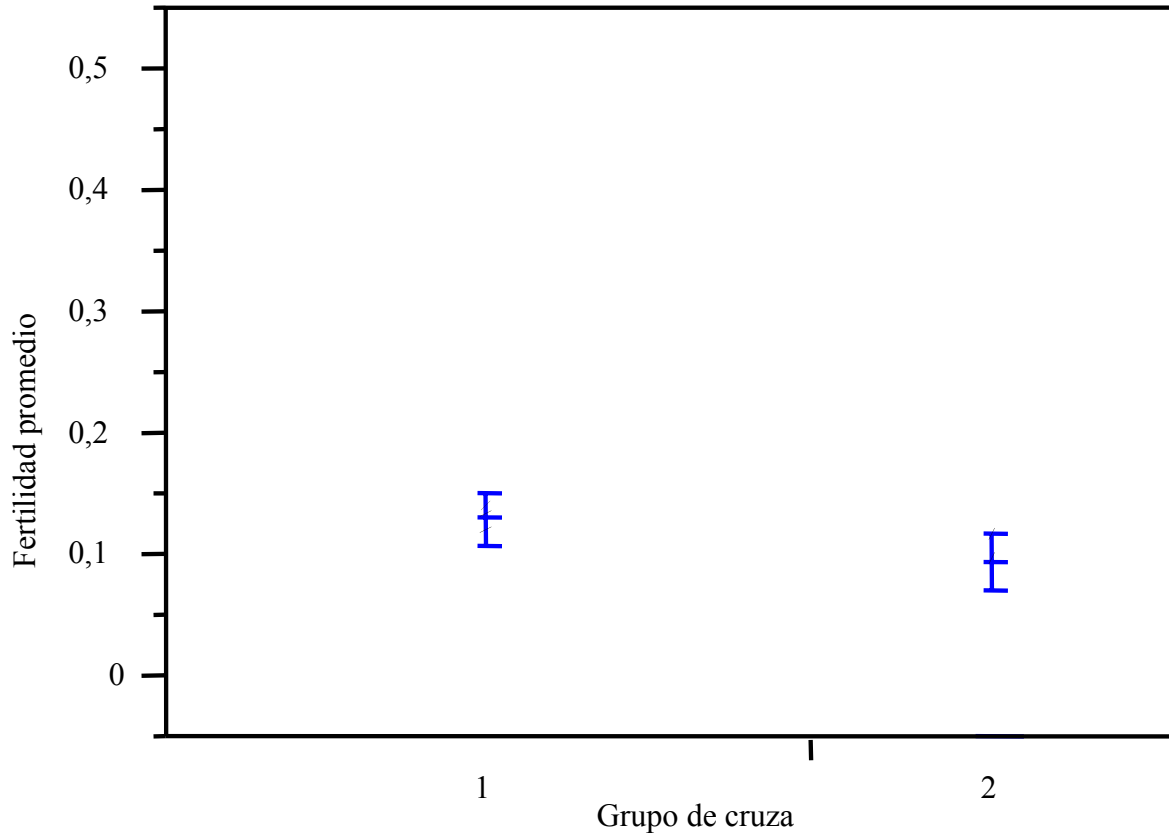


Fig. 8.- Efecto del grupo de cruza en la fertilidad. En el grupo de cruza 1 los individuos Thrum desempeñaron el papel de padres, mientras los Pin desempeñaron el de madres. En el grupo de cruza 2 los morfós desempeñaron los papeles inversos. Se muestran las fertilidades promedio ( $\pm 1$  Error estándar). El grupo de cruza 1 mostró una fertilidad media de 0.128 y un error estándar de 0.020. El grupo de cruza 2 tuvo una fertilidad media de 0.093 y una error estándar de 0.023. No se detectaron diferencias significativas entre estos grupos.

Además, fue imposible detectar efectos significativos que pudieran adjudicarse a alguna madre o padre en particular. Es decir, las progenies de todas las madres ( $\chi^2=0.737$ , g.l=15) y padres ( $\chi^2=0.947$ , g.l=11) tuvieron comportamientos estadísticamente indistinguibles con respecto a la fertilidad (Fig. 9).

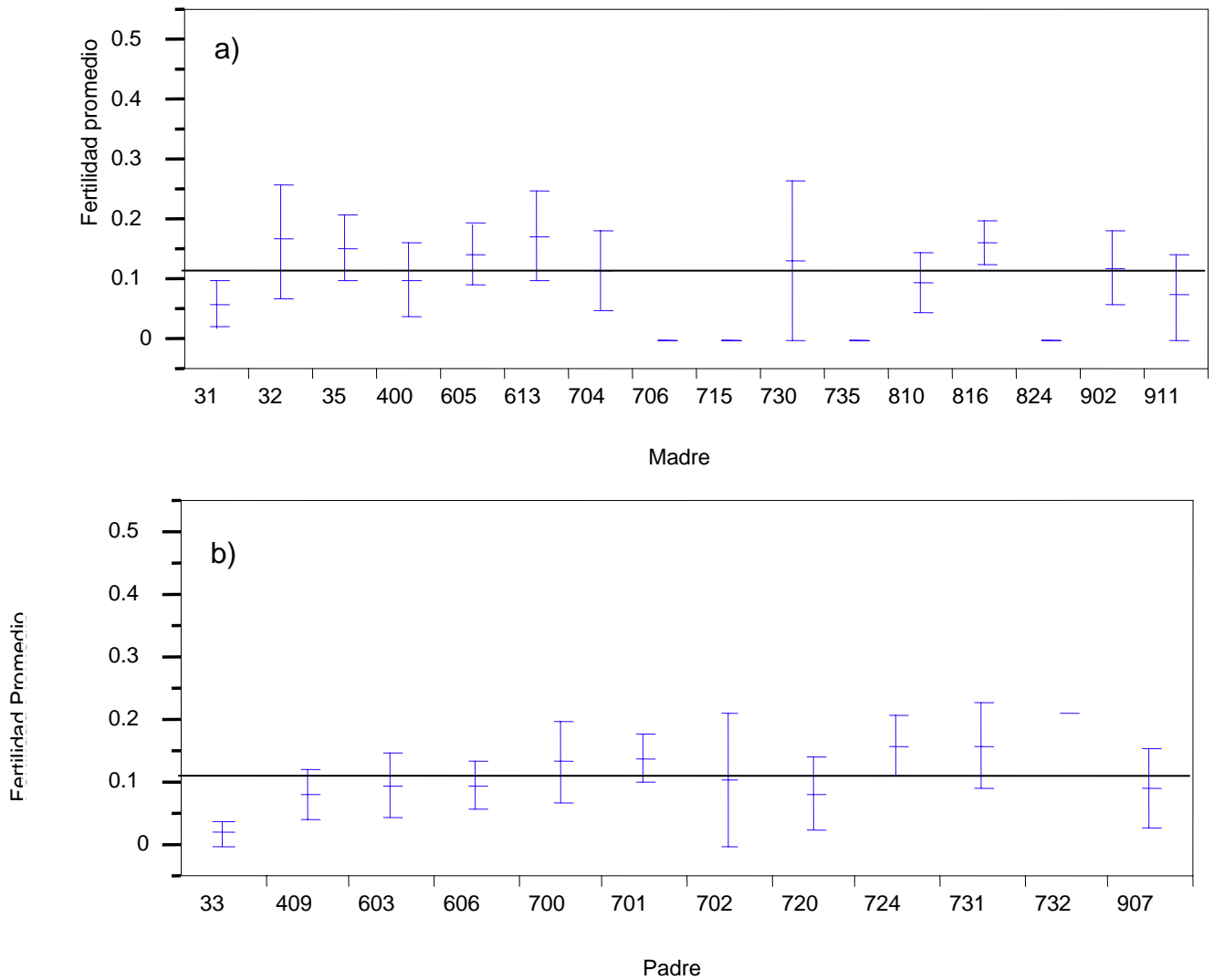


Fig. 9.-Fertilidad promedio de la progenie por madres y por padres. En la figura “a)” se muestra la fertilidad promedio ( $\pm 1$  Error estándar) de la progenie para las distintas madres consideradas en el diseño de cruza. En “b)” se muestran la fertilidad promedio ( $\pm 1$  Error estándar) para las familias genéticas formadas a partir de los padres. En ninguno de los casos se detectaron diferencias significativas. Las líneas que atraviesan las distribuciones de fertilidad representan la media total de los datos y en ambos caso es igual a 0.115.



Para tratar de explicar las discrepancias en el nivel de fertilidad entre las plantas de la exclusión y las poblaciones naturales, se consideró el hecho de que en la exclusión la mayor parte de las plantas son pequeñas. Con el fin de explorar la hipótesis de que el tamaño influye en la fertilidad de una planta, se realizó un análisis de ANOVA con datos de un censo de tamaño de plantas de poblaciones naturales de las que se conocía su nivel de fertilidad, realizado el mismo año en que se llevó a cabo este trabajo. Además, se llevo a cabo una regresión entre el tamaño de las plantas y su nivel de fertilidad. El tamaño por planta fue estimado a través de la magnitud del área de la planta en su base. Este análisis establece que las plantas que son absolutamente estériles difieren significativamente, con respecto al tamaño, de las que son fértiles ( $p=0.0057$ ). Entre más pequeñas son las plantas es mayor su probabilidad de tener una fertilidad nula (Fig. 10).

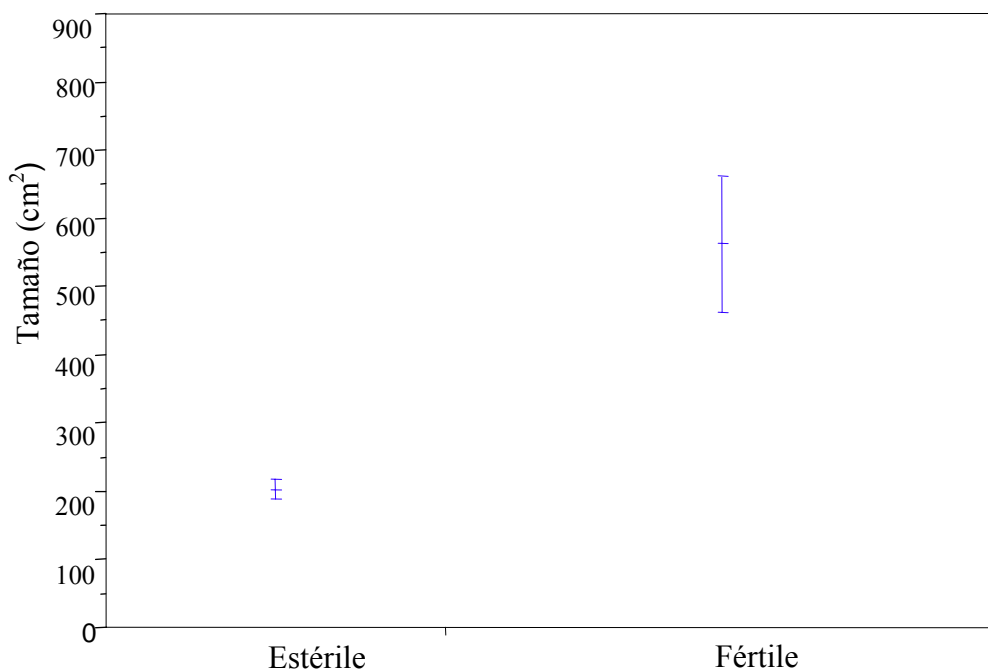


Fig. 10.-Diferencias de tamaño entre individuos estériles y fértiles en poblaciones naturales. En la figura se muestra el tamaño promedio para los individuos estériles y fértiles ( $\pm 1$  Error estándar). Los individuos estériles tienen una media de 203.79 y un error estándar de 98.84, los individuos fértiles tienen una media de 562.025 y un error estándar de 77.64.

Además, la regresión entre el tamaño y la fertilidad (Fig. 11) de las plantas en poblaciones naturales es positiva ( $r^2 = 0.057$ ) y significativa ( $P=0.0376$ )

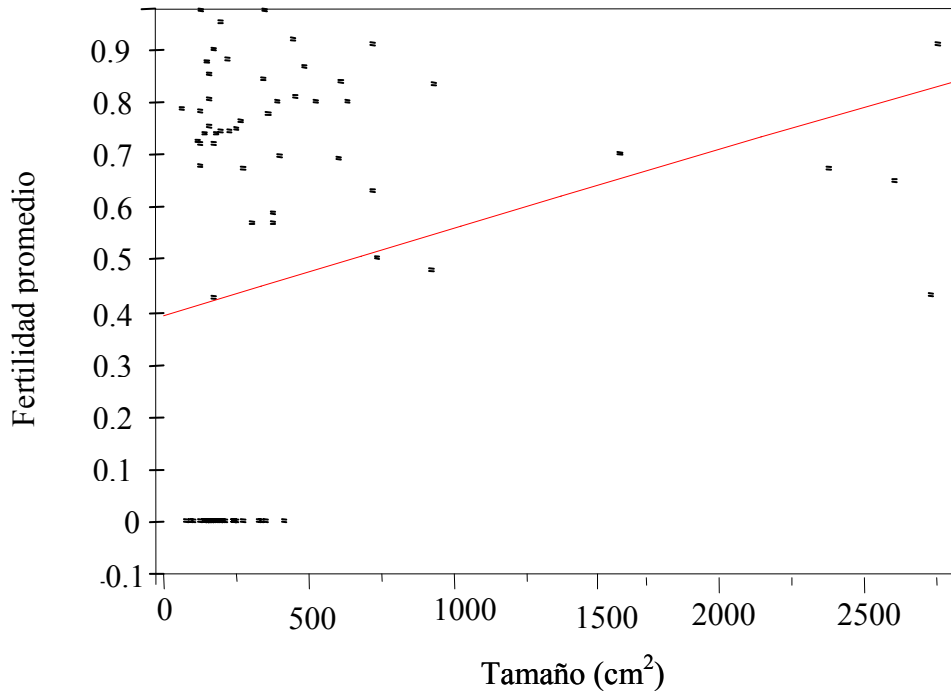


Fig. 11.-Correlación positiva entre el tamaño de la planta y la fertilidad promedio en poblaciones naturales.

De manera complementaria se analizó el nivel de esterilidad por planta obtenido en este trabajo y la estimación de tamaño de un año anterior (2000) de 83 de las 98 plantas estudiadas en la exclusión. Aunque no hubo diferencias significativas entre el tamaño de los individuos estériles y fértiles de la exclusión ( $F=2.67$ ; G.L.=1;  $P=0.106$ ), si se encontró una correlación positiva ( $r^2 = 0.048$ ) y significativa ( $p=0.045$ ) entre el tamaño y el nivel de fertilidad para las plantas de la exclusión (Fig. 12).

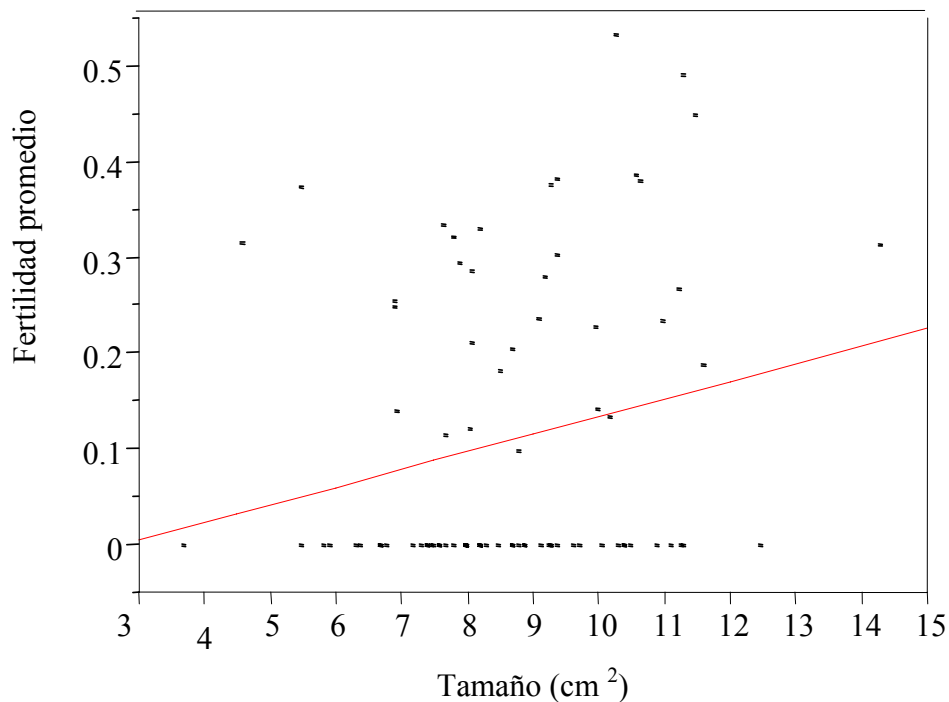


Fig. 12. Correlación positiva entre la fertilidad promedio y el tamaño de las plantas de la exclusión ( $r^2= 0.048$ ,  $p=0.045$ ).

Por lo tanto, es consistente proponer que la baja fertilidad dentro de la exclusión se debe a que la mayor parte de las plantas son demasiado pequeñas como para expresar algún grado de fertilidad.

Sin embargo, la incidencia de individuos totalmente estériles en condiciones naturales es extremadamente rara (Cuevas, 2000). Además, las estimaciones de fertilidad promedio y diferencias entre morfos considerando únicamente los individuos fértiles fueron mucho más cercanas a las observaciones en las poblaciones naturales (ver abajo). Por lo tanto, se asumió que los individuos con 0% de fertilidad no permiten explorar las diferencias en esta variable y se procedió a analizar los datos excluyendo a los individuos de fertilidad nula. La fertilidad media de los individuos fértiles es de 0.283 con una desviación estándar de 0.103 (Fig. 13). Esta fertilidad media es mucho más

parecida a las obtenidas en cinco poblaciones naturales, donde la fertilidad reportada va de 0.45 a 0.06 con una media de 0.23 (Cuevas, 2000; Cuevas et al., 2005) .

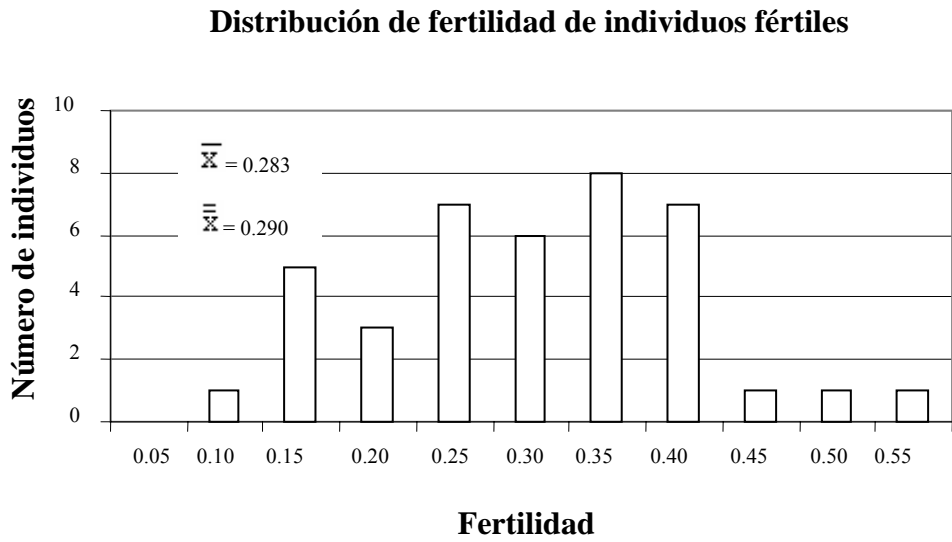


Fig. 13. Distribución de fertilidad promedio para los individuos fértiles. La media y mediana son parecidas a las observadas en poblaciones naturales. La distribución se ajusta a una distribución normal ( $P = 0.631$ ).  $\bar{x}$  = Media;  $\tilde{x}$  = Mediana.

Las distribuciones de fertilidad por cada uno de los morfos tienen un comportamiento similar (Fig. 14 y 15).

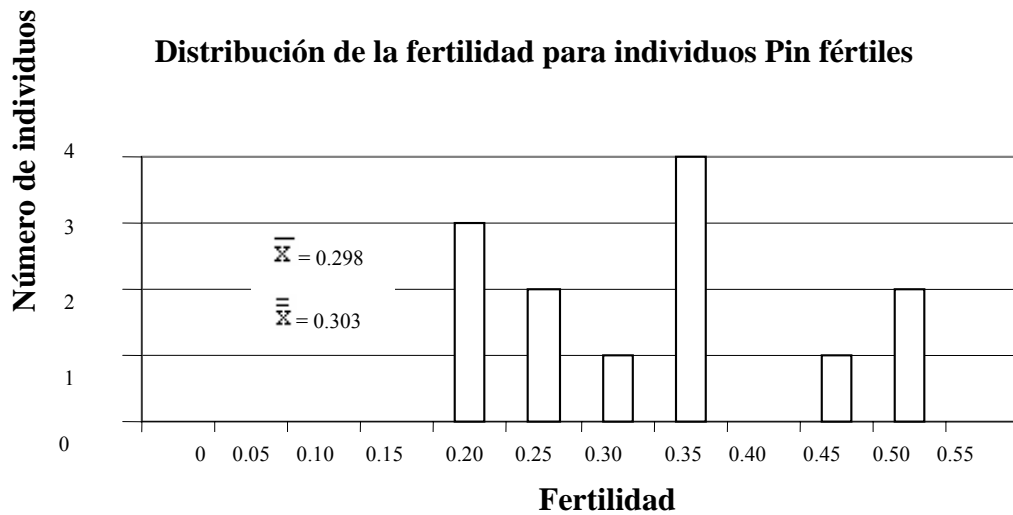


Fig. 14.-Distribución de fertilidad promedio para individuos Pin fértiles. La distribución se ajusta a una distribución normal ( $P = 0.281$ ).  $\bar{x}$  = Media;  $\tilde{x}$  = Mediana.

### Distribución de fertilidad para individuos Thrum fértiles

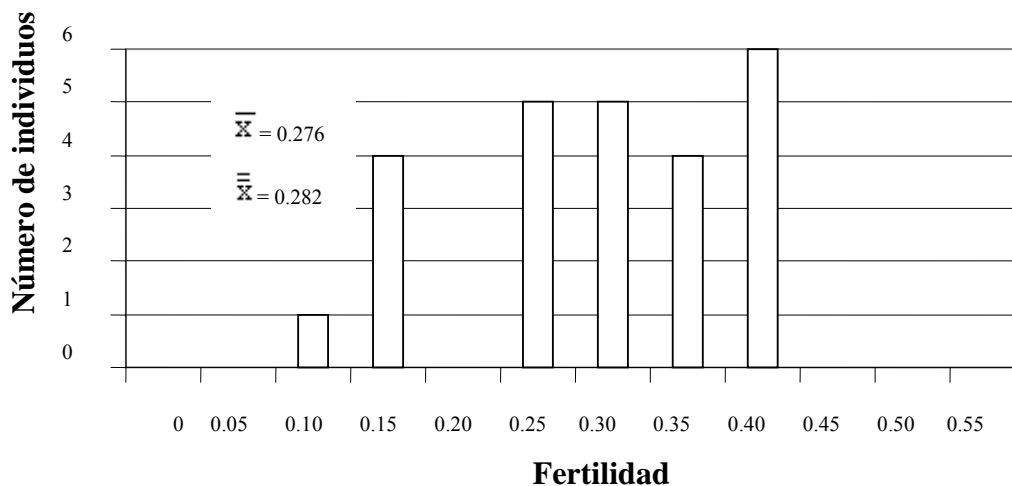


Fig. 15.-Distribución de la fertilidad en la exclusión. La distribución se ajusta a una distribución normal ( $P=0.330$ ).  $\bar{x} =$  Media;  $\bar{x}_{.3} =$  Mediana.

Dado el carácter normal de los datos, se utilizó el análisis de ANOVA para evaluar el efecto de las siguientes fuentes de variación. En ningún caso se pudieron detectar diferencias significativas (Tabla V).

**Tabla V.-Resultados de las ANOVAS para distintos criterios de comparación**

| Fuente de variación | G.L. | Cociente F | P      |
|---------------------|------|------------|--------|
| Morfo               | 1    | 0.3829     | 0.5398 |
| Grupo               | 1    | 1.1516     | 0.2900 |
| Tipo de crusa       | 1    | 0.2588     | 0.6139 |

A diferencia del análisis con todos los individuos (fértiles y estériles) en el que el morfo Thrum fue significativamente más fértil que el morfo Pin, el análisis de ANOVA

únicamente con los individuos fértiles no arrojó diferencias significativas entre morfos

(Fig. 16).

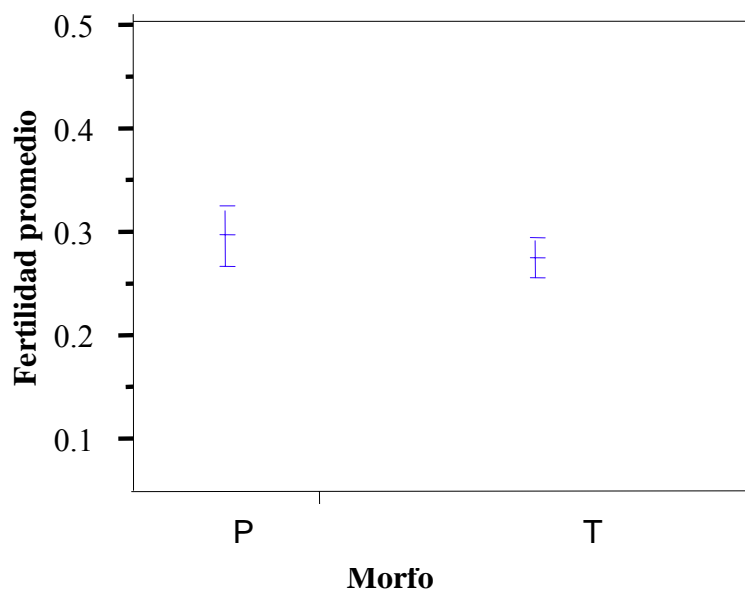


Fig. 16.- Efecto del morfo sobre la fertilidad. En la figura se muestra la fertilidad promedio para cada uno de los morfos ( $\pm 1$  Error estándar). La fertilidad promedio del morfo Pin es de 0.298 y su error estándar de 0.030. El morfo Thrum tuvo una fertilidad promedio de 0.276 con un error estándar de 0.019. No hay diferencias significativas entre los morfos ( $P=0.539$ ).

Los análisis de ANOVA de la fertilidad promedio de la progenie fértil distribuida por progenitor no arrojaron diferencias significativas ni en el caso de los padres ( $F=1.756$ ; G.L.= 11;  $P=0.119$ ) ni en el de las madres ( $F=0.803$ ; G.L.= 11;  $P=0.636$ ) (Fig. 17).

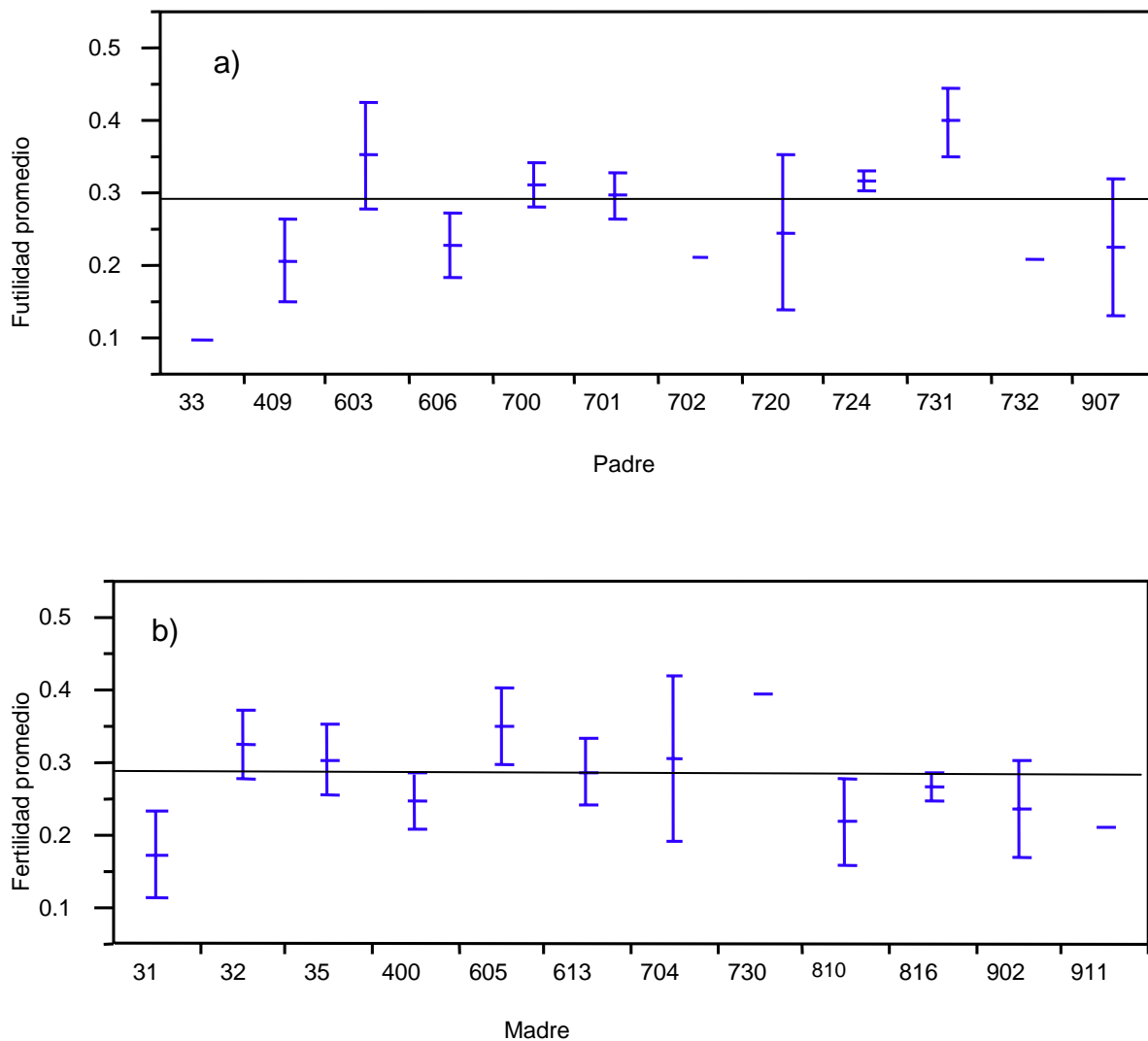


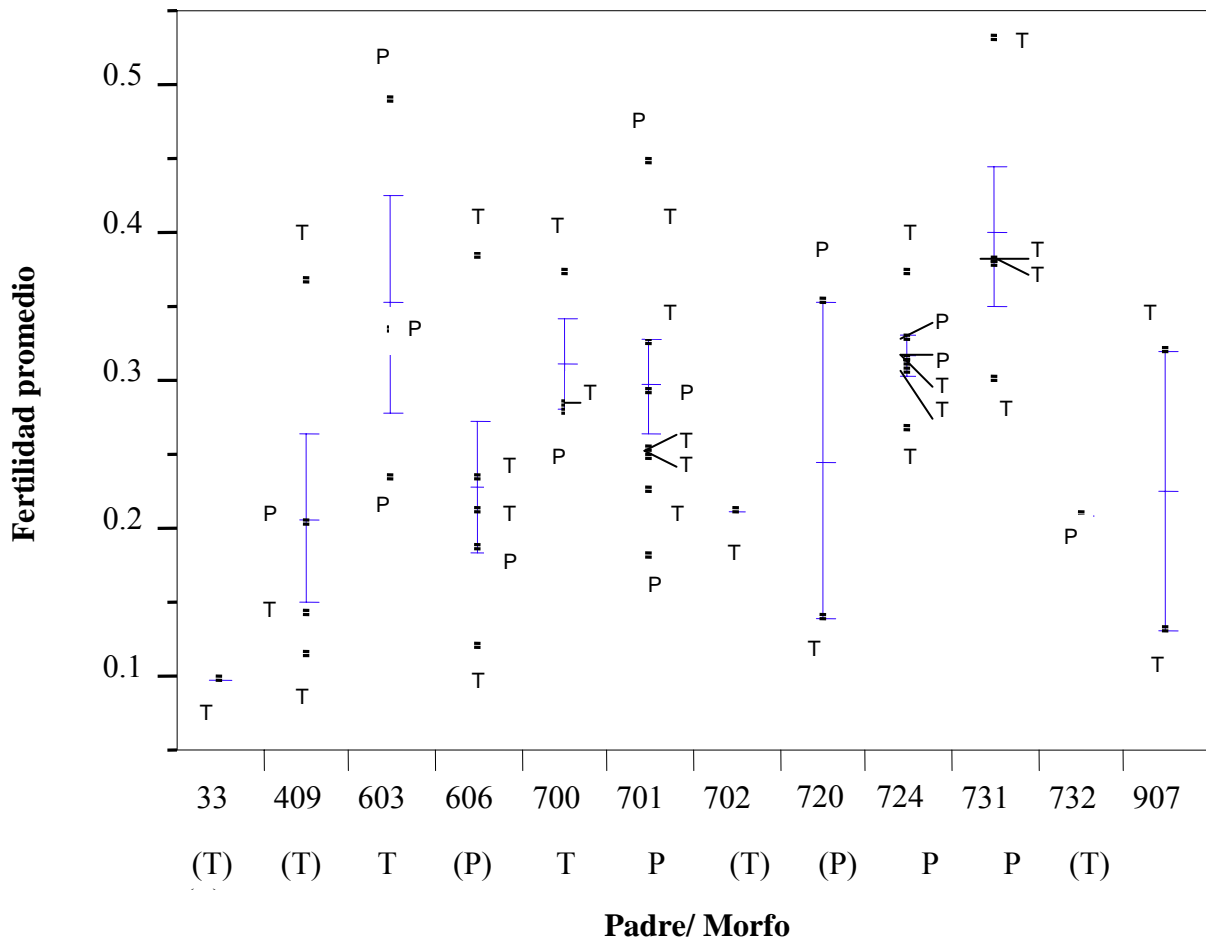
Fig. 17.- Fertilidades promedio de la progenie fértil de padres (a) y madres (b). En la figura se muestra la fertilidad promedio para cada progenie agrupada por progenitor ( $\pm 1$  Error estándar). En ninguno de los casos se detectaron diferencias significativas. La línea que atraviesa las distribuciones en ambas gráficas es la media total de los datos y es igual a 0.282

Para detectar efectos maternos o paternos, se llevo a cabo un análisis de ANOVA con las madres anidadas en los padres (Madre [Padre]). Se detectó un efecto paterno marginalmente significativo (G.L.=11; F=2.357; P=0.07)

Dado el efecto paterno mencionado previamente, se llevó a cabo un análisis cualitativo con el fin de detectar a los padres cuyas progenies fértiles tuvieran un menor nivel de fertilidad. Además, se buscó una asociación entre el morfo de los padres y la fertilidad asociada al morfo de los hijos, para ello, comparamos la distribución de los morfos dentro del rango de fertilidad de la progenie y el morfo de sus respectivos padres.

Las progenies de los padres cuya fertilidad promedio es menor son: 33 (T), 409 (T), 606 (P), 702 (T), 720 (P), 732 (T), 907 (P). No hay una asociación entre el nivel de fertilidad de la progenie y el morfo de los padres (tres de ellos son Pin y cuatro son Thrum). Por otro lado, los morfos se encuentran distribuidos de manera más o menos aleatoria aún dentro del rango de variabilidad de la progenie de cada padre. Es decir, para los padres con más de un hijo no hay una concentración de algún morfo en algún extremo de la variación de fertilidad de sus respectivas progenies. Por lo tanto, es totalmente independiente el morfo y la fertilidad exhibida por un individuo, del morfo de su padre (Fig. 18).





**Fig. 18.-** Fertilidad promedio de las progenies de distintos padres ( $\pm 1$  Error estándar). Cada uno de los puntos es un hijo, la letra adyacente señala el morfo al que corresponde el individuo. Entre paréntesis se muestra el morfo de los progenitores cuyo nivel de fertilidad es menor. No hay relación entre el nivel de fertilidad de la progenie y el morfo del padre, tampoco entre el morfo y el nivel de fertilidad de los hijos dentro de la progenie de cada padre.

Otra estrategia usada fue buscar de manera cualitativa la presencia de algún progenitor cuya progenie fuera, de manera particular, totalmente estéril; para ello se usó la proporción de hijos fértiles por cada progenitor (Hijos fértiles/ Total de hijos). Como puede observarse tanto en la Fig.5 como en la Fig. 6 la mayor parte de las familias genéticas tienen entre 1 y 3 hijos. La escasez de hijos en cada familia genética restringe

las conclusiones de pueden sacarse de este parámetro. En la tabla VI se muestran las proporciones de individuos fértiles de cada una de las progenies de los distintos progenitores y el número total de hijos por progenitor.

**Tabla VI. Proporción de hijos fértiles para padres y madres. “Total de hijos” = hijos fértiles y estériles para determinado progenitor. “P.F.”=Proporción de hijos fértiles (No. de hijos fértiles/ Total de hijos).\* progenitores con una P.F. menor.**

| Madre | Total de hijos | P.F.  | Padre | Total de hijos | P.F.  |
|-------|----------------|-------|-------|----------------|-------|
| 31    | 6              | 0.333 | *33   | 5              | 0.200 |
| 32    | 4              | 0.500 | 409   | 10             | 0.400 |
| 35    | 10             | 0.500 | *603  | 11             | 0.273 |
| 400   | 5              | 0.400 | 606   | 12             | 0.417 |
| 605   | 15             | 0.400 | 700   | 7              | 0.428 |
| 613   | 5              | 0.600 | 701   | 17             | 0.470 |
| 704   | 8              | 0.375 | 702   | 2              | 0.5   |
| *706  | 2              | 0     | 720   | 6              | 0.333 |
| *715  | 5              | 0     | 724   | 12             | 0.5   |
| 730   | 3              | 0.333 | 731   | 10             | 0.4   |
| *735  | 2              | 0     | 732   | 1              | 1     |
| 810   | 7              | 0.428 | 907   | 5              | 0.4   |
| 816   | 15             | 0.600 |       |                |       |
| *824  | 2              | 0     |       |                |       |
| 902   | 6              | 0.500 |       |                |       |
| 911   | 3              | 0.333 |       |                |       |

En el rubro de las madres, la madre 715 (Thrum) con un número total de 5 hijos (3 de morfo Thrum y 2 de morfo Pin), tuvo una proporción de hijos fértiles de 0. Debe señalarse que las madres 706, 735 y 824, tuvieron una proporción igual a la madre mencionada, sin embargo, en estos casos el número total de hijos es de sólo dos individuos y en dos de los casos cada hijo corresponde a una familia genética distinta, por lo que es difícil considerar a estos datos como estimaciones útiles.

En el caso de los padres, el padre 33 (Thrum) tuvo una proporción de individuos fértiles de 0.200, y el 603 (Thrum) tuvo una proporción de individuos fértiles de 0.273. El primero de esto padres tuvo un total de 5 hijos (4 de morfo Thrum y 1 de morfo pin), el segundo de 11 (4 de morfo Thrum y 7 de morfo Pin). Como puede observarse estas

progenies son de las más grandes por lo que puede considerarse que estos padres tienen una proporción de hijos fértiles menor al resto de los padres.

Para explorar la posibilidad de que un progenitor con una alta proporción de hijos con fertilidad nula ( $P.F.=0$ ), tuviera al mismo tiempo hijos fértiles pero con baja fertilidad relativa, se llevó a cabo un análisis de correlación entre la P.F. y la fertilidad promedio de los individuos fértiles. Ni en el caso de las madres ( $p=0.5452$ ) ni en el de los padres ( $p=0.956$ ) se encontró una correlación significativa (Fig 19)

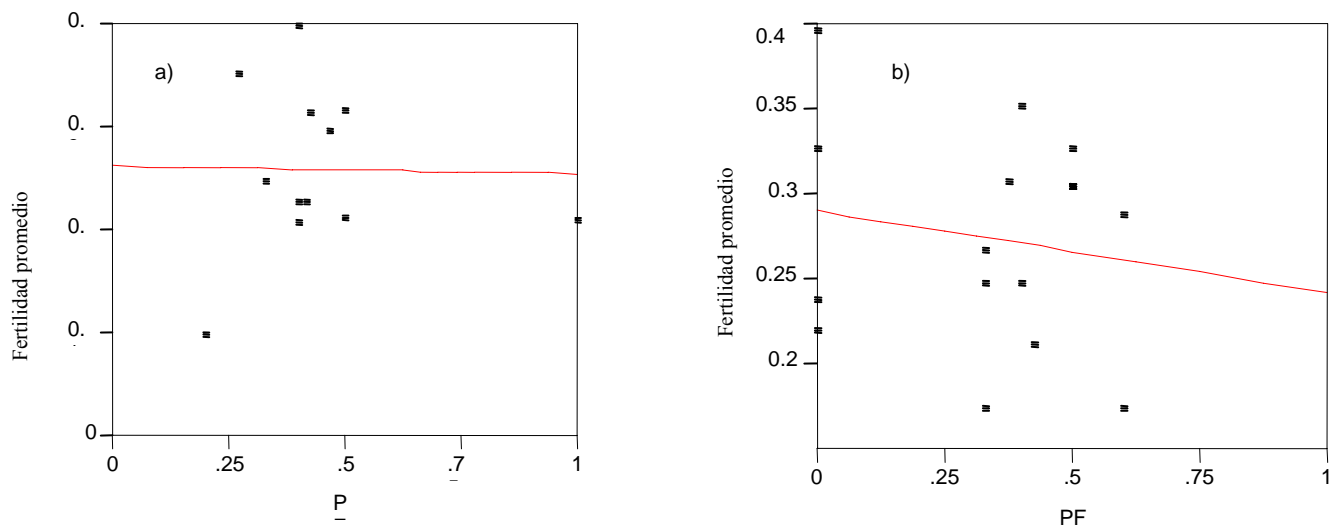


Fig. 19.- En la figura se muestran las correlaciones entre la fertilidad promedio de los individuos fértiles y la PF (proporción de individuos fértiles). En “a” se muestra la correlación no significativa ( $p=0.956$ ) para los padres  $r^2=0.0003$ . En “b” se muestra la correlación no significativa ( $p=0.5452$ ) para las madres,  $r^2=0.026$ .

Con el fin de analizar de forma más fina si había alguna relación entre la fertilidad promedio mostrada por los progenitores y diversas variables como el porcentaje de hijos fértiles, el número de hijos, y su tamaño; se formaron dos grupos a partir de las medias de fertilidad por progenitor. En el primer grupo llamado “A” se agruparon todos los progenitores cuya fertilidad promedio estuviera por encima de la media total de la distribución (“A” alta fertilidad). En el grupo “B” se agruparon todos los progenitores

cuya fertilidad promedio estuviera por debajo de la media total de fertilidad (“B”aja fertilidad). Este procedimiento se llevó a cabo tanto con los datos que incluyen a toda la progenie, como con los datos que incluyen exclusivamente a la progenie fértil. Se realizaron análisis de ANOVA para probar las diferencias entre los dos grupos con las fuentes de variación mencionadas. Debe señalarse que para el parámetro de proporción de hijos fértiles (P.F.) sólo se usaron los datos de progenie fértil, pues la media de fertilidad con individuos de fertilidad absoluta ( $F=0$ ) y la P.F. no son variables independientes. En la tabla VII se muestran los resultados para las madres. La única fuente de variación que mostró diferencias significativas fue la proporción promedio de hijos Thrum (Número de hijos Thrum / Total de hijos) considerando únicamente a la progenie fértil. Esto implica que aquellas madres que tienen una baja fertilidad promedio en su progenie fértil tienen una mayor proporción de hijos Pin (Fig. 20).

**Tabla VII. Diferencias entre madres de baja y alta fertilidad promedio con respecto a distintas fuentes de variación. Los estimadores en sombra corresponden a los análisis considerando únicamente a la progenie fértil. Los no sombreados consideran a toda la progenie. \*Diferencias significativas.**

| Fuente de variación       | G.L. | G.L. | Cociente F | Cociente F | P       | P      |
|---------------------------|------|------|------------|------------|---------|--------|
| P.F.                      | 1    | -    | 0.1039     | -          | 0.754   | -      |
| Total de hijos            | 1    | 1    | 0.0400     | 4.85       | 0.845   | 0.0461 |
| Proporción de hijos Thrum | 1    | 1    | 6.73       | 2.025      | 0.0267* | 0.178  |
| Tamaño                    | 1    | 1    | 1.042      | 0.023      | 0.3314  | 0.819  |

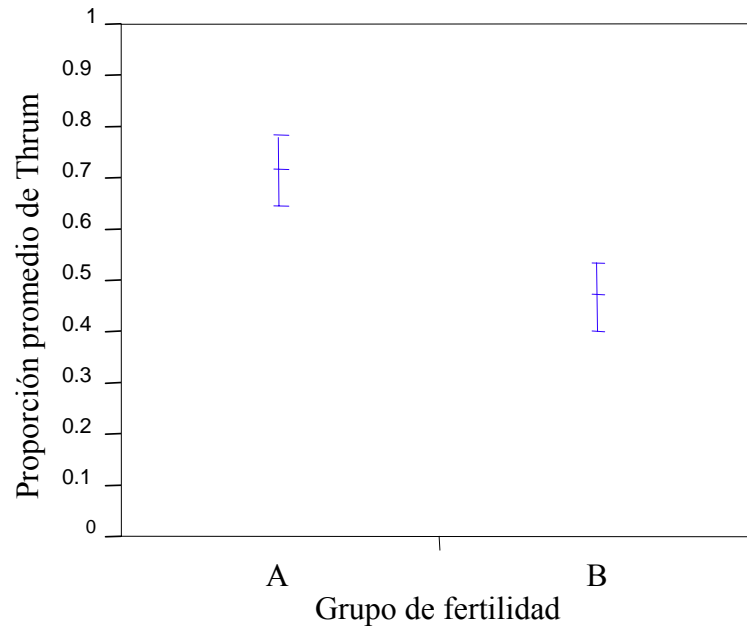


Fig. 20.- Diferencias en la proporción de morfo Thrum entre madres de alta (A) y baja (B) fertilidad en la progenie fértil. En la figura se muestra la proporción de morfo Thrum ( $\pm 1$  Error estándar). La proporción promedio para el grupo “A” es de 0.714 y su error estándar es de 0.066. La proporción promedio para el grupo “B” es de 0.469 con un error estándar de 0.067.

Con respecto a los padres sólo hubo diferencias significativas para el número total de hijos considerando únicamente a la progenie fértil (tabla VIII, Fig. 21). Los padres con un fertilidad media baja para la progenie fértil tienen un número total de hijos menor. Debe señalarse que este número total de hijos se refiere a los individuos que se registraron durante la floración.

**Tabla VIII. Diferencias entre padres de baja y alta fertilidad promedio con respecto a distintas fuentes de variación. Los estimadores en sombra corresponden a los análisis considerando únicamente a la progenie fértil. Los no sombreados consideran a toda la progenie. \*Diferencias significativas.**

| Fuente de variación       | G.L. | G.L. | Cociente F | Cociente F | P      | P      |
|---------------------------|------|------|------------|------------|--------|--------|
| P.F.                      | 1    | -    | 0.176      | -          | 0.684  | -      |
| Total de hijos            | 1    | 1    | 6.052      | 0.58       | 0.034* | 0.4637 |
| Proporción de hijos Thrum | 1    | 1    | 0.154      | 0.2420     | 0.7034 | 0.634  |
| Tamaño                    | 1    | 1    | 0.0004     | 0.3062     | 0.9842 | 0.5922 |

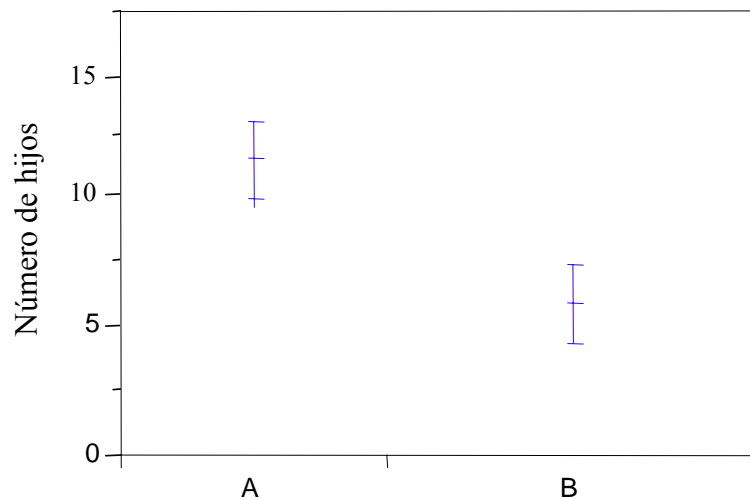


Fig. 21.- Diferencias en el número de hijos entre padres de alta (A) y baja (B) fertilidad en la progenie fértil. En la figura se muestra el número promedio de hijos ( $\pm 1$  Error estándar). El número promedio de hijos para el grupo “A” es de 11.4 y su error estándar es de 1.72. El número promedio de hijos para el grupo “B” es de 5.85 con un error estándar de 1.45.

## Análisis molecular

Se llevaron a cabo PCRs interespecíficos para encontrar marcadores moleculares involucrados en la EM exhibida por *E. havanense*. De los primers usados, los provenientes de *Allium Cepa* y *Oriza sativa* no produjeron ningún producto de amplificación. Sin embargo, con los primers de *Triticum aestivum* se obtuvieron productos de amplificación que fueron consistentes y repetibles a una temperatura de alineación de 36 °C (a 56 °C los PCRs no producen productos de amplificación). Dos de las bandas identificadas en aproximadamente 800 y 900 pb fueron polimórficas con respecto a su presencia o ausencia en las distintas poblaciones, por lo que se eligieron como posibles marcadores. En la tabla VII se muestra el número de individuos en los que se presentaron estas bandas por cada una de las poblaciones estudiadas. El “Total” denota el número de individuos que fueron estudiados para determinada población.

**Tabla IX. Número de individuos que presentaron cada una de los fragmentos identificados divididos por población**

| Población | 800 pb | 900 pb | Total |
|-----------|--------|--------|-------|
| Ardilla   | 11     | 58     | 58    |
| Limón     | 0      | 6      | 48    |

Como puede observarse, las bandas que se observan en la población de Ardilla no se detectaron en la población de Limón. En la Fig. 22 se puede observar la presencia diferenciada de las bandas estudiadas.

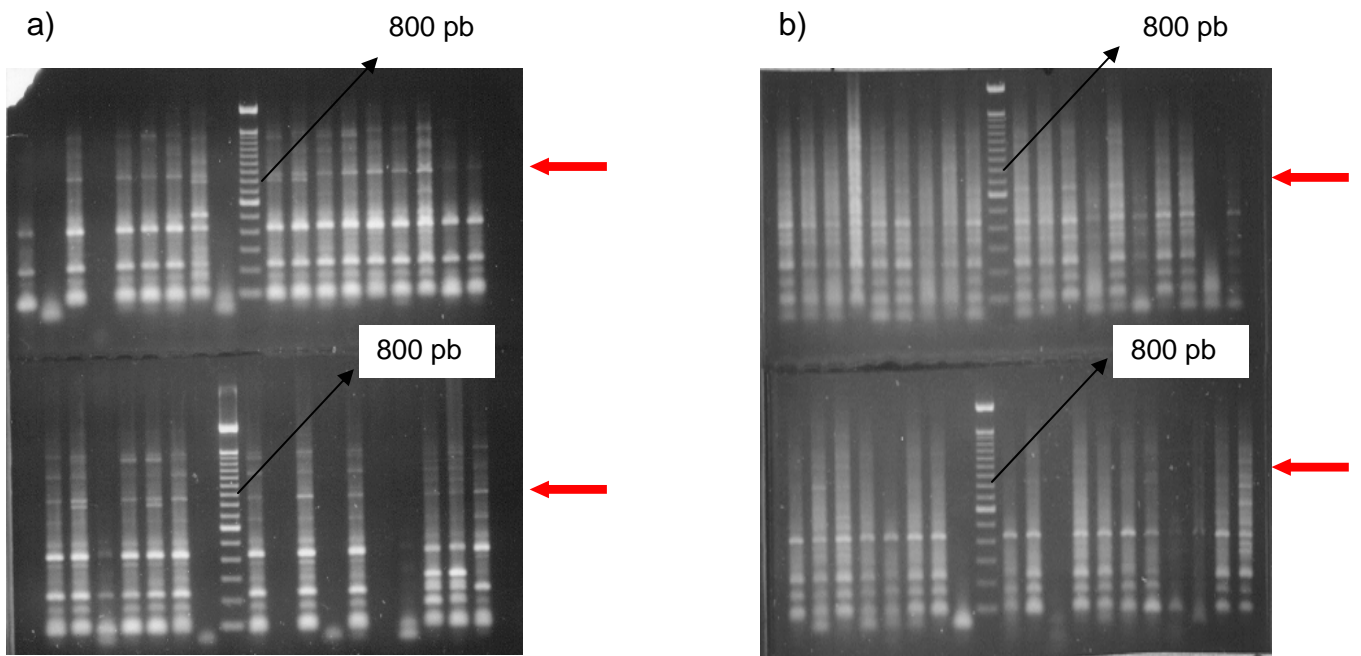


Fig. 22.-La población en “a)” está conformada por individuos de la población de Ardilla y la “b)” por individuos de la población de Limón. Cada carril es un producto de PCR por individuo. Las flechas indican las bandas estudiadas. Estas bandas fueron elegidas porque mostraron polimorfismo en su distribución tanta dentro como entre poblaciones. Ambos geles se corrieron en las mismas condiciones.

Con el fin de conocer las secuencias que conforman estas bandas, se aisló el ADN contenido en ellas (ver apéndice I “protocolo de aislamiento a partir de gel”). La secuencia para la banda de 900 pbs tiene 877 bases, la de 800 pbs tiene 750 bases (apéndice II). Las secuencias se compararon en primera instancia entre ellas mismas.

La alineación de las dos secuencias en la misma dirección 5’-3’ produjo un porcentaje de similitud de 44 % (Fig. 23).





|    |     |   |     |
|----|-----|---|-----|
| S1 | 26  | ATTGCTGAAGATTTGCGGCC-ATTGCTGCAATCAAGTTTCTGGCTTCTGAGGCGTTTTG   | 84  |
| S2 |     |   |     |
|    | 750 | ATTGTTAAAGATTTGCGGCCCATTTGCTGCAATCAAGTT-CNGGCTTCCTAAGGCGTTTTG | 692 |
| S1 | 85  | TTCACATATGGCTCCCCACTGGCGG-CATCAAGAATCTTCATATCATTTAATAACATCCC  | 143 |
| S2 |     |   |     |
|    | 691 | TTCACATATGGTTCCCCACTGNCGGGCATCAAGAATCTTCATATCATTTAATAACATCCC  | 632 |
| S1 | 144 | ATCATAGAAGTACTGAATAAGGAGTTGCTCCGTAATTCATGCTGAGGACAACCTTGCGCA  | 203 |
| S2 |     |   |     |
|    | 631 | ATCATAGAAGTACTGAATAAGGAGTTGCTCNGTAATTCATGCTGAGGACAACCTTGCGCA  | 572 |
| S1 | 204 | AAGGCTCTTGAATCTCTCATAATATTCATACATGTTTTCTGTATCTCTGTCTGATGCC    | 263 |
| S2 |     |   |     |
|    | 571 | AAGGCTCTTGAATCTCTCATAATATTCATACATGTTTTCTG-ATCTCTGTCTGATGCC    | 513 |
| S1 | 264 | ACAAATCTCTCTGCGCAAATTAGTGGCCCTGGAAGCTGGGAAGTATTTTTCTAAAAACAA  | 323 |
| S2 |     |   |     |
|    | 512 | ACAAATCTCTCTGCGCAAATTAGTGGCCCTGGAAGCTGGGAAGTATTTTTCTAAAAACAA  | 453 |
| S1 | 324 | TCGCGCCATATCAGGCCATGTATCCACTGTCCCAGGCGGAAGATAATACAACCAGTCTCT  | 383 |
| S2 |     |   |     |
|    | 452 | TCGCGCCATATCAGGCCATGTATCCACTGTCCCAGGCGGAAGATAATACAACCAGTCTCT  | 393 |
| S1 | 384 | AACTGCACCCTCTAGAGAAAAAGGGAAAGCACGCAATTTCAACTGATCCTCAGTTATGCC  | 443 |
| S2 |     |   |     |
|    | 392 | AACTGCACCCTCTAGAGAAAAAGGGAAAGCACGCAATTTCAACTGATCCTCAGTTATGCC  | 333 |
| S1 | 444 | TCTTGGCTTAAATCCAGAACATACTACATGAAAGTCCTTGAGATGTCTGTTTGGGTCGTC  | 503 |
| S2 |     |   |     |
|    | 332 | TCTTGGCTTAAATCCAGAACATACTACATGAAAGTCCTTGAGATGTCTGTTTGGGTCGTC  | 273 |
| S1 | 504 | AGAAGGTAACCCATGAAATTTGACAACGCCTGAATCAACCCAGCCTTCAACTCAAACCC   | 563 |
| S2 |     |   |     |
|    | 272 | AGAAGGTAACCCATGAAATTTGACAACGCCTGAATCAACCCAGCCTTCAACTCAAACCC   | 213 |
| S1 | 564 | ATCATTGACAGTCTGGTACTGNATACATAGAGGTTGATCCTCTACTGGTGGTGAAGCAT   | 623 |
| S2 |     |   |     |
|    | 212 | ATCATTGACAGTCTGGTACTGTATACATAGAGGTTGATCCTCTACTGGTGGTGAAGCAT   | 153 |
| S1 | 624 | GTCCCTTAGAGTTGCANGAACTCGATTTCTGGCTGGGTTGCGCANGTGGNAATAACTTGC  | 683 |
| S2 |     |   |     |
|    | 152 | GTCCCTTAGAGTTGCAGGAGCTCGATTTCTGGCT-GGTTGCGCAGGTGG-AATAGCTTGC  | 95  |
| S1 | 684 | TGATCTGGCATCTCTGCTTCTTCAAATCTTNCAGTACTCGGTCTTAAAGGCAGGCAAA    | 743 |
| S2 |     |   |     |
|    | 94  | TGATCTGCCATCTCTGCTTCTTCAAATCTTCCACTGACTCGGTCTCAAAGGCAGGCAAA   | 35  |
| S1 | 744 | ATCTCAAGTTTGGATCAGGCAAGACTTGG                                 | 772 |
| S2 |     |   |     |
|    | 34  | TTCTC-AGTTT-GATCAGGCAAGACTTGG                                 | 8   |

Fig 24. Comparación de las secuencias de las bandas de 800 y 900 pb. S1=Banda de 900 pb; S2=Banda de 800 pb. Las bandas no están completas (ver los números de alineación). Se muestra los segmentos que indican una mayor similitud. Además la banda de 800 esta colocada en dirección opuesta (3'-5') a la banda de 900.

La comparación de las dos secuencias, mediante la utilización del Blastn, con una base de datos para plantas arrojó escasos resultados. En la tabla X se muestran los resultados de la comparación de la banda de 900 pbs con las secuencias de plantas. Se escogió la banda de 900s pbs porque dado el grado de identidad entre ambas bandas, la más larga reflejará las similitudes de la pequeña. En todos los casos en que se encontró similitud no hay un gen relacionado con la secuencia identificada

**Tabla X. Secuencias identificadas por medio de la comparación de la banda de 900 pbs con una base de datos para plantas. La secuencia de arriba es de *E. havanense*.**

| Especie                    | Secuencia                   |   |
|----------------------------|-----------------------------|---|
| <i>Vitis vinifera</i>      | 552                         | CAACTCAAACCCATCATTGACA 573<br>                    |
|                            | 19478                       | CAACTCAAACCCATCATTGACA 19499                      |
|                            | 552                         | CAACTCAAACCCATCATTGACA 573<br>                    |
|                            | 19478                       | CAACTCAAACCCATCATTGACA 19499                      |
|                            | 748                         | CAAGTTTGGATCAGGCAAGA 767<br>                      |
|                            | 27643                       | CAAGTTTGGATCAGGCAAGA 27662                        |
|                            | 122                         | TCATATCATTTAATAACAT 140<br>                       |
| 1630                       | TCATATCATTTAATAACAT 1612    |   |
| 215                        | ATCTCTCATAATATTCATA 233<br> |   |
| 26904                      | ATCTCTCATAATATTCATA 26886   |   |
| <i>Corchorus olitorius</i> | 182                         | CATGCTGAGGACAACCTTGCGCAAAGGCTCTTGAATCTCTC 221<br> |
|                            | 240                         | CATGTTGAGGACAATTGGCGCAAAGTTTCTTGAATCTCTC 201      |
| <i>Medicago truncatula</i> | 121                         | TTCATATCATTTAATAACA 139<br>                       |
|                            | 45885                       | TTCATATCATTTAATAACA 45867                         |

La comparación de las bandas mediante una herramienta que busca de manera específica segmentos cortos de alta similitud, en una búsqueda limitada a genomas mitocondriales y de cloroplasto para plantas, permitió identificar 138 fragmentos con alto grado de similitud (al menos 98%) en 26 especies o subespecies. Uno de los resultados más interesantes es que la mitad de esas especies presentan EMC (casi todos los casos fueron mencionados en la introducción). En la tabla XI se muestran las especies encontradas y el número de fragmentos que presentan similitud con las bandas estudiadas. Para revisar las alineaciones particulares por especie ver apéndice III.

**Tabla XI. Especies que tienen fragmentos similares a los encontrados en las bandas de 800 y 900 pbs de *E. havanense*. (E=registro de EMC).**

| Espece                                     | Número de fragmentos con similitud a 900 y 800 | Registros de EMC |
|--|--|------------------|
| <i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>       | 8  | E                |
| <i>Brassica napus</i>                      | 3  | E                |
| <i>Cucumis melo</i>                        | 1  |                  |
| <i>Ficalhoa laurifolia</i>                 | 1  |                  |
| <i>Impatiens parviflora</i>                | 1  |                  |
| <i>Marcgravia sp.</i>                      | 1  |                  |
| <i>Mauloutchia chapelieri</i>              | 1  |                  |
| <i>Myristica fragrans</i>                  | 1  |                  |
| <i>Nicotiana tabacum</i>                   | 7  | E                |
| <i>Norantea peduncularis</i>               | 1  |                  |
| <i>Oryza sativa</i>                        | 6  | E                |
| <i>Ostreococcus tauri</i><br>(mitocondria) | 1  |                  |
| <i>Ostreococcus tauri</i><br>(Cloroplasto) | 1  |                  |

|   |    |   |
|---|----|---|
| <i>Pelliciera rhizophorae</i>                           | 1  |   |
| <i>Pentaphragax euryoides</i>                           | 1  |   |
| <i>Sorghum bicolor</i>                                  | 7  | E |
| <i>Styrax officinalis</i>                               | 1  |   |
| <i>Tripsacum dactyloides</i>                            | 13 |   |
| <i>Triticum aestivum</i>                                | 7  | E |
| <i>Triticum monococcum</i>                              | 6  | E |
| <i>Zea luxurians</i>                                    | 10 | E |
| <i>Zea mays subsp. mays</i><br>genotipo CMS-C           | 17 | E |
| <i>Zea mays subsp. mays</i><br>genotipo CMS-S           | 11 | E |
| <i>Zea mays subsp. mays</i><br>genotipo CMS-T           | 11 | E |
| <i>Zea mays subsp. mays</i><br>genotipo male-fertile NA | 15 | E |
| <i>Zea mays subsp. parviglumis</i>                      | 14 | E |
| <i>Zea perennis</i>                                     | 8  | E |

Además, de entre las 13 especies con quienes los fragmentos de 800 y 900 pbs comparten más similitud (entre 5 y 15), 12 son especies en que se presenta EMC.

De los fragmentos con los que *E. havanense* tiene similitud, 117 pertenecen o están asociados a alguna subunidad de la NADH deshidrogenasa (las subunidades más frecuentes son las 1,2, 5 y7); 7 pertenecen o están asociados a distintas subunidades de la ATPasa 1, beta y 9; 12 a diversas subunidades de la citocromo oxidasa (II, III y c) y el resto a otros genes que se presentan de manera casi única (para ver las asociaciones puntuales entre secuencias y gen ver apéndice IV). Diversos fragmentos de

prácticamente todas las secuencias mencionadas están involucrados en distintos sistemas de EMC (ver Tabla II).

Las bandas de 800 pbs y 900 pbs de *E. havanense* poseen un serie de secuencias que comparte con mucha más frecuencia con otras especies. En la tabla XII. Se muestran estas secuencias junto con las especies que comparten dichos fragmentos (En el apéndice IV se muestran las asociaciones entre especie y secuencia para todas las secuencias). Prácticamente todas las especies y subespecies enlistadas en esta tabla presentan EMC.

**Tabla XII Fragmentos de las bandas de 800 y 900pbs que con más frecuencia son similares a fragmentos de otras especies. No se muestran los números de alineación pues estos difieren de especie a especie ver apéndice III)**

| Secuencia                                 | Gen asociado               | Número de copias | Especie  |
|---|----------------------------|------------------|--|
| GCTGAAGATTTGCG<br>     <br>GCTGAAGATTTGCG | Cox 3.                     | 1                | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-S</i>           |
|   | NADH 2 y 7                 | 1                | <i>Zea luxurians</i>                                 |
|   | NADH 1 y 2                 | 1                | <i>Zea mays subsp. parviglumis</i>                   |
|   | NADH 1 y 5                 | 1                | <i>Zea perennis</i>                                  |
|   | NADH 1, 2                  | 2                | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-C</i>           |
|   | NADH 7                     | 1                | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-T</i>           |
|   | NADH 1,2, cox II, ATPasa 6 | 3                | <i>Zea mays subsp. mays genotipo male-fertile NA</i> |
| TATCTCTCTGTCTG<br>     <br>TATCTCTCTGTCTG | NADH 1                     | 2                | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-S</i>           |
|   | NADH 7                     | 2                | <i>Zea luxurians</i>                                 |
|   | NADH 2 y5                  | 2                | <i>Zea mays subsp. parviglumis</i>                   |
|   | NADH 1 y 2                 | 2                | <i>Zea perennis</i>                                  |
|   | NADH 1 y 2                 | 3                | <i>Zea mays subsp. mays genotipo</i>                 |

|  |  |   |  |
|--|--|---|--|
|  |  |   | <i>CMS-C</i>   |
|  | NADH 1 y5  | 2 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-T</i>           |
|  | NADH 1, 2 y 5  | 2 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo male-fertile NA</i> |
|  | Kinasa Ser/Thre  | 1 | <i>Triticum monococcum</i>                           |
|  | NADH 1   | 3 | <i>Tripsacum dactyloides</i>                         |
| <p>TCTAGAGAAAAAGGGAAA<br/>                <br/> TCTAGACAAAAAGGGAAA</p> | NADH 1   | 1 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-S</i>           |
|  | proteína ribosomal; proteína de transporte de membrana | 1 | <i>Zea luxurians</i>                                 |
|  | NADH 1 y 2   | 2 | <i>Zea mays subsp. parviglumis</i>                   |
|  | NADH 2   | 1 | <i>Zea perennis</i>                                  |
|  | NADH 1 y 2   | 2 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-C</i>           |
|  | NADH 1 y 2   | 1 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-T</i>           |
|  | NADH 1   | 1 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo male-fertile NA</i> |
|  | Atp sintetasa beta                                     | 1 | <i>Myristica fragrans</i>                            |
|  | ATP sintetasa beta                                     | 1 | <i>Mauloutchia chapelieri</i>                        |
|  | NADH 1 y 5.  | 4 | <i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>                 |
|  | NADH 1, 2 y 5  | 2 | <i>Tripsacum dactyloides</i>                         |
|  | NADH 1 y 5   | 2 | <i>Sorghum bicolor</i>                               |
|  | 5S RNA ribosomal (rrn5-2) gene                         | 1 | <i>Cucumis melo</i>                                  |
|  |  |   | 1  |
|  | NADH 1 y 5   | 1 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-S</i>           |
|  | NADH 2 y 7   | 1 | <i>Zea luxurians</i>                                 |
|  | NADH 5 y 7   | 1 | <i>Zea mays subsp.</i>                               |

|  |                       |                              |  |
|--|-----------------------|------------------------------|--|
| <p>TGCCTCTTGGCTTA<br/>      <br/> TGCCTCTTGGCTTA</p>   |                       |                              | <i>parviglumis</i>                                   |
|  | NADH 1 y 7            | 1                            | <i>Zea perennis</i>                                  |
|  | NADH 7                | 1                            | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-C</i>           |
|  | NADH 7                | 1                            | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-T</i>           |
|  | NADH 1 y 5            | 1                            | <i>Zea mays subsp. mays genotipo male-fertile NA</i> |
|  | nad 7                 | 1                            | <i>Triticum aestivu</i>                              |
|  | NADH 1 y 5.           | 2                            | <i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>                 |
|  | NADH 1 y 2.           | 2                            | <i>Tripsacum dactyloides</i>                         |
|  | NADH 7                | 1                            | <i>Brassica napus mitochondrial DNA</i>              |
|  | NADH 5 y 2            | 2                            | <i>Sorghum bicolor -S</i>                            |
|  | NADH 1 y 5            | 1                            | <i>Oryza sativa</i>                                  |
| <p>ATCCTCTACTGGTGG<br/>      <br/> ATCCTCTACTGGTGG</p> | NADH 7                | 1                            | <i>Nicotiana tabacum</i>                             |
|  | Proteína ribosomal S2 | 1                            | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-S</i>           |
|  | ATPasa 9 cox 3        | 1                            | <i>Zea luxurians</i>                                 |
|  | NADH 1 y 2            | 1                            | <i>Zea mays subsp. parviglumis</i>                   |
|  | NADH 1 y 5            | 1                            | <i>Zea perennis</i>                                  |
|  | NADH 1 y 2            | 3                            | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-C</i>           |
|  | NADH 1 y 2            | 2                            | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-T</i>           |
|  | NADH 1,2              | 3                            | <i>Zea mays subsp. mays genotipo male-fertile NA</i> |
|  | Transportador ABC     | 1                            | <i>Triticum monococum</i>                            |
| NADH 1 y 5   | 1                     | <i>Tripsacum dactyloides</i> |  |
| <p>GTGGAATAGCTTGC<br/>      <br/> GTGGAATAGCTTGC</p>   | Citocromo c           | 1                            | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-S</i>           |
|  | NADH 1 y 2            | 1                            | <i>Zea luxurians</i>                                 |
|  | NADH 1                | 1                            | <i>Zea mays subsp. parviglumis</i>                   |
|  | NADH 1 y 5            | 1                            | <i>Zea perennis</i>                                  |
|  | NADH 5                | 2                            | <i>Zea mays subsp.</i>                               |



|   |                       |   |  |
|---|-----------------------|---|--|
|   |                       |   | <i>mays genotipo CMS-C</i>                           |
|   | NADH 1 y 5            | 1 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-T</i>           |
|   | NADH 1 y 2            | 2 | <i>Tripsacum dactyloides</i>                         |
|   | NADH 1                | 1 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo male-fertile NA</i> |
|   | Nad 1y 5              | 1 | <i>Triticum aestivum</i>                             |
| CTTCAAATCTTCCACTGACTC<br>                       <br>CTTCAAACCTTCCACTTACTC | Cox 3, NADH 1         | 2 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-S</i>           |
|   | cox 1, rRNA ribosomal | 1 | <i>Zea luxurians</i>                                 |
|   | NADH 1 y 2            | 3 | <i>Zea mays subsp. parviglumis</i>                   |
|   | NADH 2                | 1 | <i>Zea perennis</i>                                  |
|   | NADH 1 y 2            | 2 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-C</i>           |
|   | NADH 1 y 2            | 1 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-T</i>           |
|   | NADH 1,2              | 2 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo male-fertile NA</i> |
|   | Nad 1y 5;             | 2 | <i>Triticum aestivum</i>                             |

Por otro lado, *E. havanense* presenta similitud con varios fragmentos que de manera particular están asociados con genes que producen esterilidad en otras especies (Tabla XIII). Es importante recordar que los fragmentos detectados en *E. havanense* fueron producto de primers que en *Triticum aestivum* permiten diferenciar a individuos estériles de los no estériles (ver Material y Métodos) mediante la amplificación de un segmento asociado a las atp 1 y 9. En la tabla XIII se muestra que los fragmentos de *E. havanense* guardan similitud con un fragmento asociado a estos genes en *T. aestivum*.

**Tabla XIII Fragmentos encontrados en *E. havanense* que están asociados a genes que producen esterilidad en otras especies. La secuencia de arriba es de *E. havanense*.**

| Fragmento en <i>E. havanense</i>   | Gen asociado que produce EMC   | Especie   |
|--|--|---|
| 600 ATCCTCTACTGGTGG 614<br>   <br>54027 ATCCTCTACTGGTGG 354013   | ATPase 9<br>citocromo c oxidasa 3  | <i>Zea luxurians</i>  |
| 245 TATCTCTCTGTCTG 258<br>   <br>327709 TATCTCTCTGTCTG 327722  | NADH 2   |   |
| 676 CTTCAAATCTTCCACTGACTC 697<br>   <br>59266 CTTCAAATCTTCCACTTACTC 59245  | Proteína ribosomal S2<br>rRNA-26S ARN ribosomal<br>citocromo c oxidasa subunidad 1 | <i>Zea mays subsp. mays</i> genotipo CMS-S  |
| 676 CTTCAAATCTTCCACTGACTCG 698<br>   <br>419030 CTTCAAATCTTCCACTTACTCG 419008  | ARN ribosomal 26s  |   |
| Query 29 GCTGAAGATTGCG 42<br>   <br>Sbjct 686176 GCTGAAGATTGCG 686189  | citocromo c oxidasa 2<br><br>ATPase subunidad 6                                    | <i>Zea mays subsp. mays</i> genotipo male-fertile   |
| 440 TGCCTCTTGGCTTA 453<br>   <br>7199 TGCCTCTTGGCTTA 7186  | NADH 7   | <i>Brassica napus</i>   |
| 440 TGCCTCTTGGCTTA 453<br>   <br>377746 TGCCTCTTGGCTTA 377733<br>399 AGAAAAAGGGAAG 412<br>   <br>301469 AGAAAAAGGGAAG 301456<br>685 GATCTGGCATCTCTGCTTCTTC 706<br>   <br>96228 GATCTGGCATCTTGCCTCTTC 96249 | NADH 7<br><br>NADH d 1   | <i>Nicotiana silvestris</i> .<br><br>Los fragmentos mostrados<br>proviene de <i>Nicotiana</i><br><i>tabacum</i> |
| 700 TCTCAAAGGCAGGC 713<br>   <br>84755 TCTCAAAGGCAGGC 84768<br>700 TCTCAAAGGCAGGC 713<br>   <br>286255 TCTCAAAGGCAGGC 286268   | NADH 2   |   |
| 782 AAAANGGTTGCCCTTACT 800<br>   <br>8369 AAAANGGTTGCCCTTACT 8387  | Atp1 y la atp9,  | <i>Triticum aestivum</i> :  |

Con el fin de determinar si la presencia de estas bandas correlacionaba con el nivel de fertilidad de las plantas pertenecientes a una población natural, se realizó un análisis de ANOVA para 48 individuos de la población Ardilla de los que se conocía su nivel de fertilidad. No se encontraron diferencias significativas ( $F=1.30$ ; G.L. = 3;  $P=0.284$ ) entre la presencia de estas bandas y el nivel de fertilidad de las plantas de ambos morfos (Fig. 25). En la tabla XIV se muestran los parámetros para cada grupo.

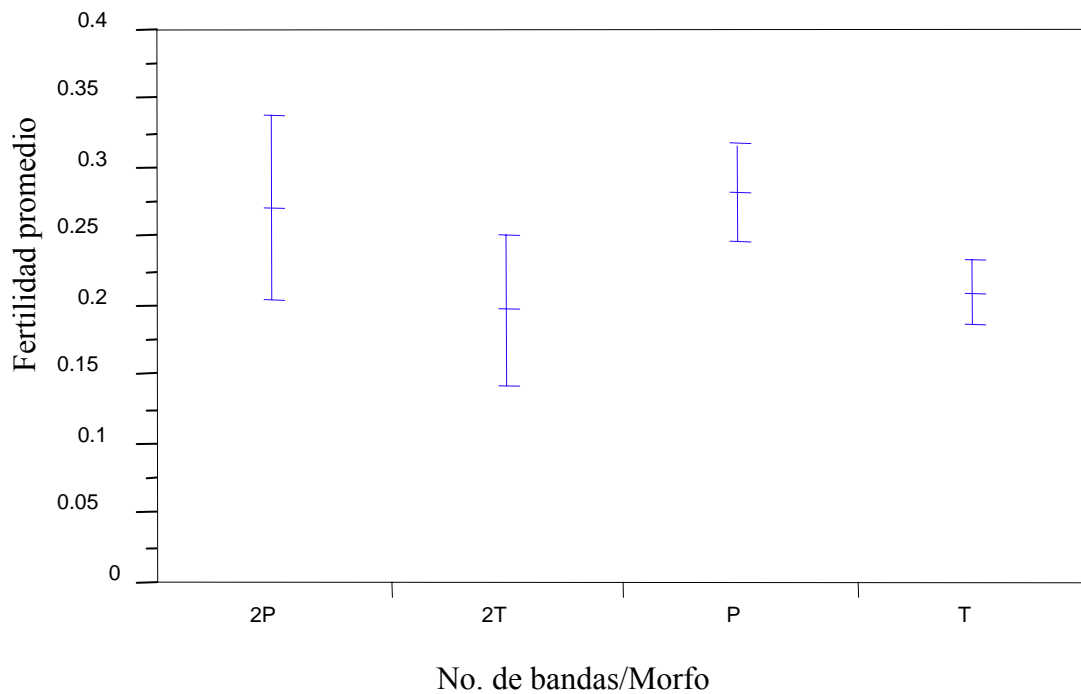


Fig. 25.- Fertilidades promedio de los morfos asociados a la presencia de las bandas de 900 y 800 pbs. 2P= individuos de morfo Pin con las dos bandas. 2T= individuos de morfo Thrum con las dos bandas P= individuos de morfo Pin con la banda de 900 pb. T= individuos de morfo Thrum con la banda de 900 pbs. No se detectaron diferencias significativas.

**Tabla XIV. Parámetros asociados para cada grupo del ANOVA para morfo y presencia de bandas de la población Ardilla**

| Bandas/Morfo | No. de individuos | Media | Error estándar |
|--------------|-------------------|-------|----------------|
| 2P           | 5                 | 0.272 | 0.056          |
| 2T           | 5                 | 0.198 | 0.056          |
| P            | 17                | 0.281 | 0.030          |
| T            | 21                | 0.210 | 0.027          |

## Discusión

Uno de los resultados más importantes de este trabajo es que la fertilidad estudiada en la exclusión es anormalmente menor a la observada en condiciones naturales. En cinco poblaciones naturales la fertilidad reportada va de 0.45 a 0.06, con una media de 0.23 (Cuevas, 2000; Cuevas et al., 2005). En la exclusión la media fue de 0.115. Además, al considerar todos los datos, el efecto del morfo sobre la fertilidad muestra diferencias significativas e inversas a lo observado en las poblaciones naturales, en las que el morfo Pin exhibe un mayor nivel de fertilidad. Esto es resultado de que en la exclusión hay un porcentaje de individuos Pin con fertilidad nula ( $F=0$ ) de 72.09% contra 49.09% del morfo Thrum. Es decir, a diferencia de las poblaciones naturales en las que el morfo Pin suele ser el morfo con una mayor efectividad masculina, en la exclusión es el morfo Thrum el que presenta un mejor desempeño en el papel masculino. Sin embargo, esta tendencia desaparece cuando excluimos del análisis a los individuos con fertilidad de 0. En estas condiciones las medias de fertilidad —tanto de la exclusión como de las poblaciones naturales— son mucho más parecidas (0.283 vs 0.23); adicionalmente, el efecto del morfo sobre la fertilidad no muestra diferencias significativas.

Las causas de las diferencias en los niveles de fertilidad observados en las poblaciones naturales y la exclusión, pueden deberse a varios factores que podrían limitar el desempeño reproductivo masculino de las plantas. Un aspecto sobresaliente a considerar es el estrés fisiológico en que estos ejemplares han crecido. La densidad de población en que se desarrollaron (1920 plantas iniciales en 25 m<sup>2</sup>) es mucho mayor a cualquiera que pueda observarse en la naturaleza. Esto permite especular que una exacerbada competencia sobre recursos como luz, agua y nutrientes, podría haber afectado la expresión de la fertilidad en las plantas y, de manera particular, las plantas del morfo Pin serían más susceptibles a la austeridad de estas condiciones, al menos en lo que

respecta a la proporción de individuos fértiles *versus* estériles. Si esto es cierto, la expresión de la fertilidad habría estado condicionada a la disponibilidad de recursos con que cuenta la planta para su desarrollo. Aunque no sabemos con precisión como es que los factores ambientales pueden afectar la fertilidad, existe evidencia, particularmente con respecto a la temperatura, que demuestra la influencia que puede tener este factor sobre la expresión de la fertilidad (Tatlioglu,-T *et al.*, 1995; Komori,-Toshiyuki, *et al.*, 2005; Senthil-Kumar, *et al.*, 2004; Smith, 2001). Debe resaltarse que estos estudios han sido realizados con especies comerciales, por lo que la relación entre efectos ambientales y expresión de la fertilidad en condiciones naturales aún no ha sido explorada.

Otro aspecto que innegablemente debe considerarse es el tamaño *per se* de los ejemplares estudiados. Tanto los análisis llevados a cabo con plantas en poblaciones naturales como con las de la exclusión demuestran que el tamaño de las plantas influye en el nivel de fertilidad de estas.

Tomando en cuenta la influencia del tamaño sobre la fertilidad y el hecho de que la media de fertilidad de las plantas fértiles de la exclusión y la de las poblaciones naturales son muy parecidas, se puede especular sobre la existencia de un umbral mínimo de tamaño, a partir del cual, las plantas pueden producir polen fértil y reflejar los patrones de fertilidad observados en la naturaleza. La existencia de este umbral es apoyada por el hecho de que tomando a los individuos de poblaciones naturales que están por debajo de la media de fertilidad, no se reproduce la correlación significativa ( $p=0.3983$ ) que documentamos en este trabajo al incluir a todos los individuos. De ser cierta esta especulación, implica que el tamaño y la fertilidad no están asociados de manera gradual, sino que hay un umbral antes del cual la mayor parte de las plantas son

totalmente estériles. Por desgracia el rango de variación en el tamaño de las plantas en las poblaciones naturales es demasiado alto (63.617-2675.851 cm<sup>2</sup>) como para extrapolar algún valor probable para dicho umbral aplicable a la exclusión, ya que las plantas en la exclusión tienen un rango de tamaño mucho menor (3.7-14.3 cm<sup>2</sup>).

Como hemos expuesto reiteradamente, el número total de plantas por familia genética en la exclusión fue muy pequeño, como consecuencia de ello la mayor parte de las fuentes de variación estudiadas (el grupo de cruza, el tipo de cruza, el efecto particular de los progenitores) no arrojaron diferencias significativas.

Pese a lo modesto que fue esta muestra, debe resaltarse que se detectó un componente paterno que fue marginalmente significativo ( $p=0.07$ ). El hecho de que, pese al pequeño tamaño de esta muestra, se haya detectado este componente nos permite proponer que hay un componente paterno en el patrón de herencia de la esterilidad en *E. havanense*. Mas aún cuando el análisis cualitativo permitió identificar a un grupo de padres de baja fertilidad en su progenie fértil, que tienen significativamente menos hijos que los padres de alta fertilidad. Debe señalarse que la cantidad de hijos a los que nos referimos son los individuos en floración que contamos durante este estudio; además, estas diferencias no son debidas a la cantidad de semillas sembradas (G.L.=1;  $F=0.661$ ;  $P=0.4350$ ) ni a diferencias en tamaño entre los grupos de padres (G.L.=1;  $F=0.0004$ ;  $P=0.9842$ ). Una posible interpretación a este fenómeno es que este grupo de padres no sólo expresa una limitada capacidad como padres a través de la baja fertilidad de su progenie fértil, sino que también tienen una progenie que tarda más tiempo en florecer.

Dado que los componentes paternos son producto de la herencia de genes puramente nucleares, de ser cierto este escenario, podemos sugerir que la fertilidad en esta especie está gobernada por la variabilidad de alelos residentes en el núcleo. Ello permitiría establecer lo que Schultz (1994) denomina un sistema de control nuclear. La fertilidad,

en este caso, sería producto de un conflicto núcleo-citoplasmático, y su expresión estaría gobernada por la presencia de restauradores residentes en el núcleo. Dichos restauradores serían específicos para citotipos que en algún momento fueron determinantes genéticos de la esterilidad. Estos restauradores posiblemente estarían ligados al supergen de la heterostilia, produciendo la esterilidad de manera diferenciada entre los morfos. Es decir, posiblemente la esterilidad estaría gobernada por un sistema dialélico recesivo (Domínguez *et al.*, 1997), en que el morfo heterocigoto (Thrum) sólo tendría una copia del restaurador, mientras el homocigoto Pin tendría dos copias y, por lo tanto, presentaría mayores niveles de fertilidad (Fig. 26).

|                                 |     |       |
|---------------------------------|-----|-------|
| <b>Morfo</b>                    | Pin | Thrum |
| <b>Genotipo de heterostilia</b> | Ss  | Ss    |
| <b>Restauradores</b>            | Rr  | Rr    |

Fig 26. Posible relación entre los determinantes genéticos de la heterostilia y la esterilidad

Sin embargo, aunque el efecto paterno es al parecer consistente, la escasez de hijos por familia genética nos impide sacar conclusiones, aún desde el punto de vista cualitativo, de las posibles interacciones entre padres y madres particulares. Así pues, es necesario tomar con cautela el escenario descrito previamente, ya que no se puede excluir la posibilidad de que un diseño con un mayor número de hijos por familia genética revele interacciones que fue imposible detectar en este estudio. Además, si añadimos los factores ambientales ya discutidos, que muy posiblemente están afectando la expresión de la fertilidad, el escenario más probable sería un rasgo cuantitativo con varios determinantes genéticos cuya expresión está siendo permanentemente afectada por



factores ambientales. De ser así, sería mucho más fácil explicar que pese a haber identificado fragmentos de ADN en *E. havanense* que guardan similitud con segmentos mitocondriales que producen esterilidad en varios sistemas, incluyendo *Triticum aestivum* de donde provienen los primers usados en *E. havanense*, no se haya podido correlacionar la distribución de estos fragmentos con el nivel de fertilidad. Encontrar “un” marcador molecular para un rasgo cuantitativo implicaría el uso de técnicas como QTLs que permitan explorar rasgos de este tipo. Aún así, los fragmentos detectados plantean, en sí mismos, nuevas interrogantes. Por un lado, dada la similitud de los fragmentos, sería de gran utilidad verificar si estos fragmentos son producto de una duplicación génica. De ser así, sería interesante explorar el mecanismo mediante el cual se generaron, evidentemente el primer mecanismo candidato sería algún fenómeno de recombinación intramitocondrial.

Por otro lado, y quizá, el punto más sobresaliente: el alto grado de similitud con varios fragmentos de genes mitocondriales que en otros sistemas están involucrados en la determinación de la fertilidad, permite sugerir que estos fragmentos en *E. havanense* están o han estado involucrados en la determinación de este fenotipo. En este punto debe discutirse varios aspectos. Si bien es cierto que la mayor parte de los fragmentos similares a las secuencias en *E. havanense* son pequeños, también es cierto que casi todos pertenecen o están relacionados con genes mitocondriales de la cadena respiratoria, y que estos son justamente los genes que componen a los genes quiméricos que producen esterilidad. Además, la alta similitud en fragmentos cortos es justamente la que se espera en genes mitocondriales de plantas, ya que la evolución de los genes mitocondriales en estos eucariontes se da principalmente por recombinación de fragmentos ya existentes y no por sustitución nucleotídica; lo que da como resultado

genes compuestos por fragmentos altamente conservados aún entre especies filogenéticamente muy alejadas.

De manera paralela, los fragmentos de ADN identificados muestran una distribución claramente heterogénea en las poblaciones, lo que es perfectamente consistente con una dinámica núcleo-citoplasmática que tenga como resultado esquemas de coadaptación independientes y locales, análogos a los observados en otras especies con esterilidad masculina.

Sin embargo, para afirmar que estos fragmentos están relacionados con la esterilidad en *E. havanense* deben solucionarse antes varios problemas metodológicos. El punto más importante es el que se refiere a la temperatura de hibridación usada para su amplificación. Esta temperatura es anormalmente baja y eso asegura amplificación inespecífica, pero fue usada con el propósito de reducir la astringencia del PCR interespecífico. De hecho cuando dicha temperatura se incrementó a 56 °C no se pudo amplificar los fragmentos en estudio, lo que evidentemente refleja una reacción lábil e inespecífica. Una posibilidad para solucionar este problema es diseñar primers específicos a partir de las secuencias de las bandas identificadas, aunque también se podría recurrir a la utilización de estos fragmentos como sondas en hibridaciones ADN-ADN para estudiar su distribución en las poblaciones y su posible relación con la fertilidad.

Aún cuando se comprobara que estos fragmentos están involucrados de manera inequívoca en la expresión de los niveles de fertilidad, quedaría pendiente la aparente paradoja en el escenario de control nuclear expresado en el efecto paterno y la existencia de citotipos esterilizadores. Una alternativa es que los citotipos presentes en las poblaciones estén fijos y que se expresen únicamente cuando no están en presencia de la condición homociga de los restauradores, o que su expresión se de sólo a partir de

ciertas etapas del desarrollo de la planta. En este contexto la esterilidad registrada en las plantas de la exclusión sería debida primordialmente al tamaño y los factores ambientales. La esterilidad producto de los citotipos que se reflejaría en efectos maternos sería detectable en etapas posteriores. La validación de esta hipótesis implicaría estudiar la variabilidad de estos fragmentos con poblaciones de plantas de varios tamaños y de las que se conocieran previamente sus niveles de fertilidad, para tratar de establecer una correlación entre la presencia de estas bandas y la fertilidad a lo largo del desarrollo.

En conclusión, la aplicación de técnicas más detalladas de biología molecular a poblaciones naturales, para estudiar estos y quizá otros fragmentos detectables con técnicas análogas de interespecificidad, (hibridación interespecífica, PCRs interespecíficos con otros primers), podría aportar mucho a dilucidar el papel exacto que desempeñan estos fragmentos en la fertilidad de *E havanense*.

Como punto final, debe mencionarse que son varias las limitaciones de la metodología empleada en este trabajo, quizá la más grave consiste en el hecho de que los estimados de fertilidad por planta provienen de un muestreo sumamente desbalanceado. Esto quiere decir que hubo plantas en las que sólo se pudo obtener una flor y otras en las que se obtuvieron más de 8, lo que de entrada restringe las posibles conclusiones de este trabajo, ya que el número de réplicas por planta es sumamente variable. Por otro lado, el número de réplicas por familia genética fue también muy limitado. Sin embargo, las conclusiones reflejan patrones generales que quizá no se vieron tan afectados por estas limitaciones. Como es evidente la conjunción de los aspectos cuantitativo y molecular abre nuevas líneas de indagación futura.

## Conclusiones

Es muy probable que la expresión de la fertilidad en *E. havanense* esté afectada por factores ambientales relacionados con la disponibilidad de recursos.

Es posible que exista un umbral de tamaño a partir del cual *E. havanense* expresa fertilidad.

El grado de fertilidad que expresa *E. havanense* está influido por el tamaño de las plantas.

La esterilidad masculina en esta especie tiene, de manera probable, un componente paterno que no sólo se expresa en la fertilidad de su progenie fértil sino en el tiempo de floración que tienen sus hijos.

## **Sugerencias a partir del análisis molecular**

Dado la similitud en los fragmentos identificados es posible que sean producto de un fenómeno de duplicación.

Los fragmentos identificados tienen similitud con varios fragmentos que en especies que presentan EMC están involucrados en la determinación de la esterilidad de los sistemas en los que residen.

## Perspectivas

Son varias las líneas de estudio que pueden extenderse a partir de este trabajo. De manera inmediata sería pertinente aclarar el posible papel de los fragmentos identificados en la esterilidad de *E. havanense*. Para ello se sugiere el siguiente procedimiento:

Diseñar primers específicos a partir de las secuencias obtenidas.

Amplificación de los fragmentos en condiciones más específicas (alta de temperatura de alineación).

Clonar y estudiar detalladamente tanto la variabilidad como la distribución de estas secuencias en la exclusión y en las poblaciones naturales.

Estudiar la distribución de estas secuencias en las plantas de la exclusión y en poblaciones de las que se conozca el nivel de fertilidad de las plantas.

De manera complementaria se pueden usar las similitudes identificadas con otros sistemas que presentan EMC para elegir los fragmentos de ADN que guardan mayor similitud y diseñar nuevos primers o utilizar sondas que permitan disectar la naturaleza de los fragmentos identificados.

Para consolidar la evidencia de la influencia del componente paterno en la esterilidad de *E. havanense* se necesita un modelo que asegure un mayor número de hijos por familia,

y en el que se estudie tanto el tiempo de floración por planta, como la expresión de la fertilidad a lo largo de su desarrollo.

# Apéndice I

## I.-PROCEDIMIENTO PARA PURIFICAR DNA EN UN GEL DE AGAROSA CON EL KIT SEPHAGLAS BANDPREP

1. Correr el gel en las condiciones utilizadas para separar la banda de interés.
2. Pesar un tubo eppendorf
3. Con ayuda del transiluminador, cortar una rebanada en el gel lo más cerca posible de la banda deseada. Poner esta rebanada en un parafilm limpio y cortarla en pedacitos muy pequeños que se transfieren al eppendorf para pesarlo nuevamente y así obtener el peso de la rebanada.
4. Añadir 250 microlitros de “gel solubilizer” o “gel solubilizer” modificado en caso de que el gel se haya corrido en TBE (que se prepara agregando por cada 250 microlitros de gel solubilizer, 5 microlitros de ácido acético glacial al 50% preparado en agua destilada). Si la rebanada pesa más de 250 mg, agregar 1 microlitro más de solución por cada miligramo de más que pese la rebanada.
5. Homogenizar con vortex vigorosamente, incubar a 60 grados por 5 a 10 min o hasta que la agarosa se disuelva.
6. Resuspender en el vórtex el frasquito de SEPMAGLAS BP hasta formar una suspensión uniforme. Agregar 5 microlitros de la suspensión (aprox. 5 microlitros por cada microgramo de DNA). Mezclar suavemente con el vórtex. Incubar 5 min. a temp. ambiente, resuspender suavemente cada minuto con el vórtex.
7. Centrifugar 30 seg en una microcentrífuga, remover el sobrenadante cuidadosamente, tratando de no llevarse nada del botón de sephaglas, ya que ahí esta pegado todo el DNA. Repetir el paso 7 para remover todo el líquido que haya quedado, sin llevarse el sephaglas.
8. Agregar 80 microlitros del W ASH BUFFER (o 16 veces el volumen de sephaglas) al botón de sephaglas y resuspender pipeteando varias veces. Centrifugar 30 seg. y remover el sobrenadante sin tocar el botón de sephaglas. Repetir 2 veces más este paso, para un total de 3 lavados.
9. Con el vortex o golpeando el tubo dispersar parcialmente el botón. Invertir el tubo y ponerlo a secar sobre una toalla de papel. Dejar secar al menos 10 mn. Revisar que el vidrio esté completamente seco (no secar al vacío).
10. Agregar 20 microlitros de ELUTION BUFFER (mínimo 20 microlitros o 4 veces el volumen de sephaglas), mezclar cuidadosamente con el vórtex hasta resuspender el botón. Incubar 5 min a temperatura ambiente con agitación periódica.
11. Centrifugar a alta velocidad durante 1 min en una microcentrífuga. Remover cuidadosamente el sobrenadante y ponerlo en un tubo limpio, tratando de no tocar el botón de sephadex. El DNA obtenido se puede almacenar a -20 grados (no almacenar en presencia del sephaglas).
12. Si la concentración de DNA es muy baja para lo que se va a emplear, el DNA se puede eluir en menor volumen (2 veces el volumen del sephaglas adicionado).



## Apéndice II

### Secuencias obtenidas en *E. havanense*

La secuencia de la banda de 900 es la siguiente:

5'NNNAGNNTTTTCGAACGATACCCAAATTGCTGAAGATTTGCGGCCATTGCT  
GCAATCAAGTTTCTGGCTTCTGAGGCGTTTTGTTCACTATGGCTCCCCACT  
GGCGGCATCAAGAATCTTCATATCATTTAATAACATCCCATCATAGAAGTACT  
GAATAAGGAGTTGCTCCGTAATTCATGCTGAGGACAACCTTGCGCAAAGGCT  
CTTGAATCTCTCATAATATTCATACATGTTTTCTGTATCTCTCTGTCTGATGCC  
ACAAATCTCTCTGCGCAAATTAGTGGCCCTGGAAGCTGGGAAGTATTTTTCTA  
AAAACAATCGCGCCATATCAGGCCATGTATCCACTGTCCCAGGCGGAAGATA  
ATACAACCAGTCTCTAACTGCACCCTCTAGAGAAAAAGGGAAAGCACGCAAT  
TTCAACTGATCCTCAGTTATGCCTCTTGGCTTAAATCCAGAACATACTACATG  
AAAGTCCTTGAGATGTCTGTTTGGGTGCGCAGAAGGTAACCCATGAAATTTTCG  
ACAACGCCTGAATCAACCCAGCCTTCAACTCAAACCCATCATTGACAGTCTG  
GTACTGNATACATAGAGTTGATCCTCTACTGGTGGTGCAAGCATGTCCCTTA  
GAGTTGCANGAACTCGATTTCTGGCTGGGTTGCGCANGTGGNAATAACTTGC  
TGATCTGGCATCTCTGCTTCTTCAAATCTTNCCTGACTCGGTCTTAAAGGC  
AGGCAAATCTCAAGTTTGGATCAGGCAAGACTTGGGCNNAAGAAAAANG  
GTTGCCCTTACTTGCAATCCTTAGNGAAATCNCGGGCCGNCTGCANGTCGA  
NCCTTATGGGAAAACCTTCCCACGCCNTTGGANTGCATN-3'

La secuencia de la banda de 800 es la siguiente:

5'TGTTCTGCCAAGTCTTGCCTGATCAAACCTGAGAATTTGCCTGCCTTTGAGAC  
CGAGTCAGTGGAAGATTTTGAAGAAGCAGAGATGGCAGATCAGCAAGCTATT  
CCACCTGCGCAACCAGCCAGAAATCGAGCTCCTGCAACTCTAAGGGACATGC  
TTGCACCACCAGTAGAGGATCAACCTCTATGTATACAGTACCAGACTGTCAA  
TGATGGGTTTGAAGTTGAAGGCTGGGTTGATTCAGGCGTTGTCGAAATTTTCATG  
GGTTACCTTCTGACGACCCAAACAGACATCTCAAGGACTTTCATGTAGTATGT  
TCTGGATTTAAGCCAAGAGGCATAACTGAGGATCAGTTGAAATTGCGTGCTT  
TCCCTTTTCTCTAGAGGGTGCAGTTAGAGACTGGTTGTATTATCTTCCGCCTG  
GGACAGTGGATACATGGCCTGATATGGCGCGATTGTTTTTAGAAAAATACTT  
CCCAGCTTCCAGGGCCACTAATTTGCGCAGAGAGATTTGTGGCATCAGACAG  
AGAGATCAGAAAACATGTATGAATATTATGAGAGATTCAAGAGCCTTTGCGC  
AAGTTGTCCTCAGCATGGAATTACNGAGCAACTCCTTATTCAGTACTTCTATG  
ATGGGATGTTATTAATGATATGAAGATTCTTGATGCCCGNCAGTGGGGGAA  
CCATAGTGAACAAAACGCCTTAGGAAGCCNGAACTTGATTGCAGCAATGGGC  
CGCAAATCTTTAACAAT-3'

### Apéndice III

#### Fragmentos que tienen similitud a las bandas de 800 pb y 900 pb en *E. havanense*

| Bandas                             |   |                                    |  |
|------------------------------------|---|------------------------------------|--|
| 800 pbs                            |   | 900 pbs                            |  |
| Especie                            | Gen relacionado   | Especie                            | Gen relacionado  |
| Secuencia (s)                      | Código de base  | Secuencia (s)                      | Código de base   |
| <i>Pentaptylax euryoides</i>       |   | <i>Pentaptylax euryoides</i>       |  |
| 115 ATCCCATCATAGAAGTACTGAA 136<br> | Subunidad F (ndhF)<br>gen gb AF419241.1                       | 139 ATCCCATCATAGAAGTACTGAA 160<br> | Subunidad F<br>(ndhF) gen<br>gb AF419241.1                       |
| 299 ATCCCAACATAGAAGTACTGAA 278     |   | 299 ATCCCAACATAGAAGTACTGAA 278     |  |
| <i>Ficalhoa laurifolia</i>         |   | <i>Ficalhoa laurifolia</i>         |  |
| 115 ATCCCATCATAGAAGTACTGAA 136<br> | NADH deshidrogenasa<br>(ndhF)<br>gb AF421079.1                | 139 ATCCCATCATAGAAGTACTGAA 160<br> | NADH<br>deshidrogenasa<br>(ndhF)<br>gb AF421079.1                |
| 299 ATCCCAACATAGAAGTACTGAA 278     |   | 299 ATCCCAACATAGAAGTACTGAA 278     |  |
| <i>Pelliciera rhizophorae</i>      |   | <i>Pelliciera rhizophorae</i>      |  |
| 115 ATCCCATCATAGAAGTACTGAA 136<br> | NADH deshidrogenasa<br>(ndhF) gen<br>partialgb AF421069.<br>1 | 139 ATCCCATCATAGAAGTACTGAA 160<br> | NADH<br>deshidrogenasa<br>(ndhF) gen<br>partialgb AF421069<br>.1 |
| 299 ATCCCAACATAGAAGTACTGAA 278     |   | 299 ATCCCAACATAGAAGTACTGAA 278     |  |
| <i>Norantea peduncularis</i>       |   | <i>Norantea peduncularis</i>       |  |
| 115 ATCCCATCATAGAAGTACTGAA 136<br> | NADH deshidrogenasa<br>(ndhF) gen<br>partialgb AF421067.      | 139 ATCCCATCATAGAAGTACTGAA 160<br> | NADH<br>deshidrogenasa<br>(ndhF) gen                             |
| 296 ATCCCAACATAGAAGTACTGAA 275     |   | 296 ATCCCAACATAGAAGTACTGAA 275     |  |

|   |   |   |   |
|---|---|---|---|
|   | 1   |   | partialgb AF421067<br>.1                          |
| Marcgravia sp.  |   | Marcgravia sp   |   |
| 115 ATCCCATCATAGAAGTACTGAA 136<br>               <br>299 ATCCCAACATAGAAGTACTGAA 278   | NADH deshidrogenasa<br>(ndhF)<br>gb AF421065.1                              | 139 ATCCCATCATAGAAGTACTGAA 160<br>               <br>299 ATCCCAACATAGAAGTACTGAA 278 | NADH<br>deshidrogenasa<br>(ndhF)<br>gb AF421065.1 |
| Zea mays subsp. mays genotipo <br>CMS-S   | gb DQ490951.2   | Zea mays subsp. mays genotipo <br>CMS-S   | gb DQ490951.2                                     |
| 575 ATCCTCTACTGGTGG 589<br>               <br>21403 ATCCTCTACTGGTGG 21389             | proteína<br>ribosomal   S2  | 600 ATCCTCTACTGGTGG 614<br>               <br>21403 ATCCTCTACTGGTGG 21389           | citocromo c<br>oxidasa Subunidad<br>3             |
| 676 CTTCAAATCTTCCACTGACTC 697<br>               <br>59266 CTTCAAATCTTCCACTTACTC 59245 | citocromo c<br>oxidasa Subunidad<br>3                                       | 29 GCTGAAGATTGCG 42<br>               <br>19361 GCTGAAGATTGCG 19374                 | citocromo c<br>oxidasa Subunidad<br>3             |
| 369 TCTAGAGAAAAAGGGAAA 386<br>               <br>323083 TCTAGACAAAAAGGGAAA 323066     | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5 | 394 TCTAGAGAAAAAGGGAAA 411<br>               <br>323083 TCTAGACAAAAAGGGAAA 323066   |   |
| 415 TGCCTCTTGGCTTA 428<br>               <br>430014 TGCCTCTTGGCTTA 430027             | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH deshidrogenasa<br>subunidad 5    | 440 TGCCTCTTGGCTTA 453<br>               <br>430014 TGCCTCTTGGCTTA 430027           | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1             |
| 643 GTGGAATAGCTTGC 656<br>               <br>126199 GTGGAATAGCTTGC 126212             | orf77-1<br>citocromo c<br>biogenesis FN                                     | 245 TATCTCTGTCTG 258<br>               <br>402512 TATCTCTGTCTG 402499               |   |
|   |   | 245 TATCTCTGTCTG 258<br>               <br>433520 TATCTCTGTCTG 433533               |   |

|   |   |   |  |
|---|---|---|--|
|   |   | 679 CTTGCTGATCTGGC 692<br>     <br>507673 CTTGCTGATCTGGC 507660   | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1                                |
| <i>Zea luxurians</i>  | gb DQ645537.1   | <i>Zea luxurians</i>  | gb DQ645537.1  |
| 575 ATCCTCTACTGGTGG 589<br>     <br>354027 ATCCTCTACTGGTGG 354013                             | Subunidad 9 de la<br>ATPasa<br>citocromo c oxidasa<br>Subunidad 3           | 600 ATCCTCTACTGGTGG 614<br>     <br>354027 ATCCTCTACTGGTGG 354013 | Subunidad 9 de la<br>ATPasa<br>citocromo c<br>oxidasa Subunidad<br>3 |
| 676 CTTCAAAATCTTCCACTGACTCG 698<br>                 <br>419030 CTTCAAAC TTTCCACTTACTCG 419008 | citocromo c oxidasa<br>Subunidad 1<br>rRNA-26S<br>ribosomal RNA             |   |  |
| 643 GTGGAATAGCTTGC 656<br>     <br>179425 GTGGAATAGCTTGC 179438                               | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 | 29 GCTGAAGATTGCG 42<br>     <br>154489 GCTGAAGATTGCG 154502       |  |
| 415 TGCCTCTTGCTTA 428<br>     <br>313486 TGCCTCTTGCTTA 313473                                 | NADH deshidrogenasa<br>Subunidad 2<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 7 | 440 TGCCTCTTGCTTA 453<br>     <br>313486 TGCCTCTTGCTTA 313473     |  |
| 369 TCTAGAGAAAAGGGAAA 386<br>           <br>478484 TCTAGACAAAAGGGAAA 478501                   | : proteína<br>ribosomal   S4<br>proteína de<br>transporte de<br>membrana    | 245 TATCTCTGTCTG 258<br>     <br>310001 TATCTCTGTCTG 309988       |  |
|   |   | 245 TATCTCTGTCTG 258<br>  | NADH   |

|   |  |   |  |
|---|--|---|--|
|   |  | 327709 TATCTCTGTCTG 327722  | deshidrogenasa<br>Subunidad 7  |
|   |  | 394 TCTAGAGAAAAAGGGAAA 411<br>           <br>478484 TCTAGACAAAAAGGGAAA 478501 | proteína<br>ribosomal   S4<br>proteína de<br>transporte de<br>membrana         |
| <i>Zea mays</i> subsp. <i>parviglumis</i>                                     | gb DQ645539.1  | <i>Zea mays</i> subsp. <i>parviglumis</i>                                     | gb DQ645539.1  |
| 575 ATCCTCTACTGGTGG 589<br>     <br>496344 ATCCTCTACTGGTGG 496330             | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2    | 600 ATCCTCTACTGGTGG 614<br>     <br>496344 ATCCTCTACTGGTGG 496330             | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 |
| 415 TGCCTCTTGCTTA 428<br>     <br>86329 TGCCTCTTGCTTA 86316                   | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 5<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 7    | 245 TATCTCTGTCTG 258<br>     <br>82823 TATCTCTGTCTG 82810                     | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5  |
| 643 GTGGAATAGCTTGC 656<br>     <br>131600 GTGGAATAGCTTGC 131587               | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1   | 440 TGCCTCTTGCTTA 453<br>     <br>86329 TGCCTCTTGCTTA 86316                   | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 7 |
| 369 TCTAGAGAAAAAGGGAAA 386<br>           <br>320403 TCTAGACAAAAAGGGAAA 320386 | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 | 394 TCTAGAGAAAAAGGGAAA 411<br>           <br>320403 TCTAGACAAAAAGGGAAA 320386 | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 |
| 676 CTTCAAAATCTTCCACTGACTC 697<br>  | NADH<br>deshidrogenasa   | 394 TCTAGAGAAAAAGGGAAA 411<br>  | NADH<br>deshidrogenasa   |

|                     |                        |        |  |                     |                    |        |  |
|---------------------|------------------------|--------|--|---------------------|--------------------|--------|--|
| 429319              | CTTCAAACCTTTCCACTTACTC | 429340 | subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 | 467056              | TCTAGACAAAAAGGGAAA | 467039 | subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 |
| 369                 | TCTAGAGAAAAAGGGAAA     | 386    | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1                | 29                  | GCTGAAGATTGCG      | 42     | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1                |
| 467056              | TCTAGACAAAAAGGGAAA     | 467039 | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2                | 494298              | GCTGAAGATTGCG      | 494311 | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2                |
| 676                 | CTTCAAAATCTTCCACTGACTC | 697    | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1                | 679                 | CTTGCTGATCTGGC     | 692    | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1                |
| 534171              | CTTCAAACCTTTCCACTTACTC | 534150 | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2                | 603115              | CTTGCTGATCTGGC     | 603128 | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2                |
|                     |                        |        |  | 245                 | TATCTCTCTGTCTG     | 258    | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2                |
|                     |                        |        |  | 662554              | TATCTCTCTGTCTG     | 662541 |  |
| <i>Zea perennis</i> |                        |        | gb DQ645538.1  | <i>Zea perennis</i> |                    |        | gb DQ645538.1  |
| 575                 | ATCCTCTACTGGTGG        | 589    | NADH deshidrogenasa<br>Subunidad 2                   | 600                 | ATCCTCTACTGGTGG    | 614    | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2                |
| 514549              | ATCCTCTACTGGTGG        | 514563 |  | 514549              | ATCCTCTACTGGTGG    | 514563 |  |
| 643                 | GTGGAATAGCTTGC         | 656    | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1                   | 29                  | GCTGAAGATTGCG      | 42     | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1                |
| 126441              | GTGGAATAGCTTGC         | 126428 | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5                | 177329              | GCTGAAGATTGCG      | 177342 | NADH<br>deshidrogenasa                               |

|  |   |   |  |
|--|---|---|--|
|  |   |   | subunidad 5  |
| 676 CTTCAAAATCTTCCACTGACTC 697<br>                       <br>196251 CTTCAAACCTTCCACTTACTC 196230 | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5 | 245 TATCTCTGTCTG 258<br>                       <br>349366 TATCTCTGTCTG 349353           | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1  |
| 415 TGCCTCTGGCTTA 428<br>                       <br>352879 TGCCTCTGGCTTA 352866                  | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 7 | 440 TGCCTCTGGCTTA 453<br>                       <br>352879 TGCCTCTGGCTTA 352866         | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 7 |
| 369 TCTAGAGAAAAGGGAAA 386<br>                       <br>501683 TCTAGACAAAAGGGAAA 501666          | NADH deshidrogenasa<br>Subunidad 2  | 394 TCTAGAGAAAAGGGAAA 411<br>                       <br>501683 TCTAGACAAAAGGGAAA 501666 | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2  |
|  |   | 245 TATCTCTGTCTG 258<br>                       <br>541155 TATCTCTGTCTG 541142           | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2  |
| <i>Ostreococcus tauri</i>  | emb CR954200.2  | <i>Ostreococcus tauri</i>   | emb CR954200.2   |
| 231 CTGATGCCACAAATC 245<br>                       <br>29935 CTGATGCCACAAATC 29949                |   | 256 CTGATGCCACAAATC 270<br>                       <br>29935 CTGATGCCACAAATC 29949       |  |
| <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> genotipo <br>CMS-C  | gb DQ645536.1   | <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> genotipo <br>CMS-C                                   | gb DQ645536.1  |
| 575 ATCCTCTACTGGTGG 589<br>  | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1  | 600 ATCCTCTACTGGTGG 614<br>   | NADH<br>deshidrogenasa   |

|  |   |   |  |
|--|---|---|--|
| 205484 ATCCTCTACTGGTGG 205498  | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2                                       | 205484 ATCCTCTACTGGTGG 205498   | subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2                           |
| 575 ATCCTCTACTGGTGG 589<br>     <br>340053 ATCCTCTACTGGTGG 340039              | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 | 600 ATCCTCTACTGGTGG 614<br>     <br>340053 ATCCTCTACTGGTGG 340039     | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 |
| 369 TCTAGAGAAAAAGGGAAA 386<br>     <br>93702 TCTAGACAAAAAGGGAAA 93719          | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 | 245 TATCTCTCTGTCTG 258<br>     <br>60507 TATCTCTCTGTCTG 60494         | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1  |
| 676 CTTCAAAATCTTCCACTGACTC 697<br>     <br>167615 CTTCAAACCTTCCACTTACTC 167636 | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 | 29 GCTGAAGATTTGCG 42<br>     <br>207525 GCTGAAGATTTGCG 207512         | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 |
| 369 TCTAGAGAAAAAGGGAAA 386<br>     <br>278272 TCTAGACAAAAAGGGAAA 278289        | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 | 394 TCTAGAGAAAAAGGGAAA 411<br>     <br>93702 TCTAGACAAAAAGGGAAA 93719 | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 |
| 676 CTTCAAAATCTTCCACTGACTC 697<br>     <br>377922 CTTCAAACCTTCCACTTACTC 377901 | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH                                  | 245 TATCTCTCTGTCTG 258<br>     <br>245077 TATCTCTCTGTCTG 245064       | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1  |



|   |   |                               |  |   |   |               |  |
|---|---|-------------------------------|--|---|---|---------------|--|
|   |   | deshidrogenasa<br>Subunidad 2 |  |   | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2             |               |  |
| 643<br>563327   | GTGGAATAGCTTGC<br>     <br>GTGGAATAGCTTGC   | 656<br>563314                 | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 5   | 394<br>278272   | TCTAGAGAAAAAGGGAAA<br>     <br>TCTAGACAAAAAGGGAAA | 411<br>278289 | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 |
| 415<br>679115   | TGCCTCTTGGCTTA<br>     <br>TGCCTCTTGGCTTA   | 428<br>679102                 | NADH deshidrogenasa<br>Subunidad 7   | 29<br>338012  | GCTGAAGATTGCG<br>     <br>GCTGAAGATTGCG           | 42<br>338025  | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 |
|   |   |                               |  | 679<br>494516   | CTTGCTGATCTGGC<br>     <br>CTTGCTGATCTGGC         | 692<br>494503 | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1  |
|   |   |                               |  | 245<br>675609   | TATCTCTGTCTG<br>     <br>TATCTCTGTCTG             | 258<br>675596 | Proteína<br>hipotética   |
|   |   |                               |  | 440<br>679115   | TGCCTCTTGGCTTA<br>     <br>TGCCTCTTGGCTTA         | 453<br>679102 | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 7  |
| <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> genotipo <br>CMS-T |   | gb DQ490953.1                 |  | <i>Zea mays</i> subsp. <i>mays</i> genotipo <br>CMS-T |   | gb DQ490953.1 |  |
| 575<br>309531   | ATCCTCTACTGGTGG<br>     <br>ATCCTCTACTGGTGG | 589<br>309545                 | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 | 600<br>309531   | ATCCTCTACTGGTGG<br>     <br>ATCCTCTACTGGTGG       | 614           | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 |

|  |  |   |  |
|--|--|---|--|
| 643<br>GTGGAATAGCTTGC 656<br>     <br>38042 GTGGAATAGCTTGC 38029               | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 5<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1    | 245 TATCTCTCTGTCTG 258<br>     <br>92860 TATCTCTCTGTCTG 92873         | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1 |
| 676 CTTCAAAATCTTCCACTGACTC 697<br>     <br>271665 CTTCAAACCTTCCACTTACTC 271686 | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 | 394 TCTAGAGAAAAGGGAAA 411<br>     <br>331815 TCTAGACAAAAGGGAAA 331798 | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 |
| 369 TCTAGAGAAAAGGGAAA 386<br>     <br>331815 TCTAGACAAAAGGGAAA 331798          | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2    | 679 CTTGCTGATCTGGC 692<br>     <br>355474 CTTGCTGATCTGGC 355487       | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 |
| 415 TGCCTCTTGGCTTA 428<br>     <br>519694 TGCCTCTTGGCTTA 519681                | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 7  | 29 GCTGAAGATTGCG 42<br>     <br>481320 GCTGAAGATTGCG 481307           | citocromo c<br>biogenesis B<br>proteína<br>ribosomal   S2                      |
|  |  | 245 TATCTCTCTGTCTG 258<br>     <br>516193 TATCTCTCTGTCTG 516180       | proteína<br>hipotética   |
|  |  | 440 TGCCTCTTGGCTTA 453<br>     <br>519694 TGCCTCTTGGCTTA 519681       | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 7  |
| Zea mays subsp. mays genotipo <br>male-fertile NA                              | b DQ490952.1   | Zea mays subsp. mays genotipo <br>male-fertile NA                     | gb DQ490952.1  |
| 575 ATCCTCTACTGGTGG 589  | NADH deshidrogenasa  | 600 ATCCTCTACTGGTGG 614   | NADH   |

|        |                            |        |  |        |                     |        |  |
|--------|----------------------------|--------|--|--------|---------------------|--------|--|
| 111733 | <br>ATCCTCTACTGGTGG        | 111719 | subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 | 111733 | <br>ATCCTCTACTGGTGG | 111719 | deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2 |
| 575    | ATCCTCTACTGGTGG            | 589    | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1                   | 600    | ATCCTCTACTGGTGG     | 614    | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1                                  |
| 240425 | <br>ATCCTCTACTGGTGG        | 240411 | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2                | 240425 | <br>ATCCTCTACTGGTGG | 240411 | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2                                  |
| 676    | CTTCAAAATCTTCCACTGACTC     | 697    | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1                   | 245    | TATCTCTCTGTCTG      | 258    | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1                                  |
| 149540 | <br>CTTCAAACTCTTCCACTTACTC | 149519 | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2                | 68156  | <br>TATCTCTCTGTCTG  | 68143  |  |
| 676    | CTTCAAAATCTTCCACTGACTC     | 697    | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1                   | 29     | GCTGAAGATTGCG       | 42     | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1                                  |
| 278232 | <br>CTTCAAACTCTTCCACTTACTC | 278211 | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2                | 109687 | <br>GCTGAAGATTGCG   | 109700 | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2                                  |
| 369    | TCTAGAGAAAAAGGGAAA         | 386    | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1                   | 29     | GCTGAAGATTGCG       | 42     | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1                                  |
| 438208 | <br>TCTAGACAAAAAGGGAAA     | 438225 |  | 238379 | <br>GCTGAAGATTGCG   | 238392 | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2                                  |
| 415    | TGCCTCTTGGCTTA             | 428    | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1                   | 679    | CTTGCTGATCTGGC      | 692    | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1                                  |
| 581984 | <br>TGCCTCTTGGCTTA         | 581971 | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5                | 394850 | <br>CTTGCTGATCTGGC  | 394837 |  |
| 643    | GTGGAATAGCTTGC             | 656    | NADH deshidrogenasa                                  | 394    | TCTAGAGAAAAAGGGAAA  | 411    | NADH   |

|   |                |   |   |
|---|----------------|---|---|
| 627256<br>     <br>GTGGAATAGCTTGC 627243                          | subunidad 1    | 438208<br>     <br>TCTAGACAAAAAGGGAAA 438225                            | deshidrogenasa<br>subunidad 1   |
|   |                | 245 TATCTCTCTGTCTG 258<br>     <br>578478 TATCTCTCTGTCTG 578465         | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5            |
|   |                | 440 TGCCTCTTGGCTTA 453<br>     <br>581984 TGCCTCTTGGCTTA 581971         | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5            |
|   |                | 29 GCTGAAGATTGCG 42<br>     <br>686176 GCTGAAGATTGCG 686189             | citocromo c<br>oxidasa Subunidad<br>2<br><br>7953 bp at 3'<br>side: ATPasa<br>Subunidad 6 |
| <i>Triticum aestivum</i>  | dbj AP008982.1 | <i>Triticum aestivum</i>  | dbj AP008982.1  |
| 575 ATCCTCTACTGGTGG 589<br>     <br>199497 ATCCTCTACTGGTGG 199511 | nad1<br>nad5   | 782 AAAANGGTTGCCCTTACT 800<br>     <br>8369 AAAAAGGTTGCCCTTACT 8387     | nad1<br>nad5  |
| 643 GTGGAATAGCTTGC 656<br>     <br>81348 GTGGAATAGCTTGC 81361     | nad1<br>nad5   | 842 CTTATGGGAAAACCTCCC 859<br>     <br>234607 CTTATGTGAAAACCTCCC 234624 | nad1<br>nad5  |
| 161 GCTGAGGACAACCT 174<br>     <br>251077 GCTGAGGACAACCT 251064   | nad1<br>nad5   | 185 GCTGAGGACAACCT 198<br>     <br>251077 GCTGAGGACAACCT 251064         | nad1<br>nad5  |

|   |   |   |  |
|---|---|---|--|
| 415 TGCCTCTTGGCTTA 428<br>     <br>412464 TGCCTCTTGGCTTA 412477     | nad7  | 440 TGCCTCTTGGCTTA 453<br>     <br>412464 TGCCTCTTGGCTTA 412477     | nad7   |
|   |   | 600 ATCCTCTACTGGTGG 614<br>     <br>199497 ATCCTCTACTGGTGG 199511   | atp1<br>atp9   |
| <i>Myristica fragrans</i>   | b AF469772.1  | <i>Myristica fragrans</i>   | gb AF469772.1  |
| 394 ATTTCAACTGATCCT 408<br>     <br>1378 ATTTCAACTGATCCT 1392       | ATP sintetasa beta<br>Subunidad secuencia<br>similar                        | 419 ATTTCAACTGATCCT 433<br>     <br>1378 ATTTCAACTGATCCT 1392       | ATP sintetasa beta<br>Subunidad<br>secuencia similar                           |
| <i>Impatiens parviflora</i>   | gb AF421060.1   | <i>Impatiens parviflora</i>   | gb AF421060.1  |
| 115 ATCCCATCATAGAAGTACT 133<br>     <br>299 ATCCCAACATAGAAGTACT 281 | NADH deshidrogenasa<br>(ndhF) gene  | 139 ATCCCATCATAGAAGTACT 157<br>     <br>299 ATCCCAACATAGAAGTACT 281 | NADH<br>deshidrogenasa<br>(ndhF) gene  |
| <i>Mauloutchia chapelieri</i>                                       | gb AF197606.1 AF197<br>606  | <i>Mauloutchia chapelieri</i>                                       | gb AF197606.1 AF19<br>7606   |
| 394 ATTTCAACTGATCCT 408<br>     <br>1363 ATTTCAACTGATCCT 1377       | ATPasa beta<br>Subunidad (atpB)   | 419 ATTTCAACTGATCCT 433<br>     <br>1363 ATTTCAACTGATCCT 1377       | ATPasa beta<br>Subunidad (atpB)  |
| <i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>                         | dbj BA000024.1  | <i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>                         | dbj BA000024.1   |
| 362 TGCACCCTCTAGAGA 376<br>     <br>102815 TGCACCCTCTAGAGA 102801   | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 5<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5 | 387 TGCACCCTCTAGAGA 401<br>     <br>102815 TGCACCCTCTAGAGA 102801   | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5 |
| 362 TGCACCCTCTAGAGA 376<br>     <br>295331 TGCACCCTCTAGAGA 295317   | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 5<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1 | 387 TGCACCCTCTAGAGA 401<br>     <br>295331 TGCACCCTCTAGAGA 295317   | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5<br>NADH<br>deshidrogenasa                |

|   |  |   |  |
|---|--|---|--|
|   |  |   | subunidad 1  |
| 660 TCTGCCATCTCTGCTTCT 677<br>             <br>90621 TCTGCCATGTCTGCTTCT 90604   | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5 | 440 TGCCTCTTGGCTTA 453<br>             <br>124996 TGCCTCTTGGCTTA 124983 | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5 |
| 415 TGCCTCTTGGCTTA 428<br>             <br>124996 TGCCTCTTGGCTTA 124983         | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5 | 307 TATTTTCTAAAAA 320<br>             <br>229503 TATTTTCTAAAAA 229490   | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5 |
| 282 TATTTTCTAAAAA 295<br>             <br>229503 TATTTTCTAAAAA 229490           | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 5<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5    | 440 TGCCTCTTGGCTTA 453<br>             <br>317512 TGCCTCTTGGCTTA 317499 | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1 |
| 660 TCTGCCATCTCTGCTTCT 677<br>             <br>283137 TCTGCCATGTCTGCTTCT 283120 | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 5<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1    | 307 TATTTTCTAAAAA 320<br>             <br>387191 TATTTTCTAAAAA 387204   | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5  |
| 415 TGCCTCTTGGCTTA 428<br>             <br>317512 TGCCTCTTGGCTTA 317499         | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 5<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1    |   |  |

|                              |                            |               |                           |   |               |                            |        |                           |   |
|------------------------------|----------------------------|---------------|---------------------------|---|---------------|----------------------------|--------|---------------------------|---|
| 282                          | TATTTTCTAAAAA 295<br>      | 387191        | TATTTTCTAAAAA 387204      | NADH deshidrogenasa subunidad 5   |               |                            |        |                           |   |
| <i>Triticum monococcum</i>   |                            | gb AF459639.1 |                           | <i>Triticum monococcum</i>  | gb AF459639.1 |                            |        |                           |   |
| 673                          | CTTCTTCAAAATCTT 687<br>    | 214906        | CTTCTTCAAAATCTT 214892    | Transportador ABC   | 700           | CTTCTTCAAAATCTT 714<br>    | 214906 | CTTCTTCAAAATCTT 214892    | Transportador ABC   |
| 268                          | TGGAAGCTGGGAAG 281<br>     | 102482        | TGGAAGCTGGGAAG 102469     | Probable factor de estimulación subunidad 1<br>Kinasa serina /Threonina | 293           | TGGAAGCTGGGAAG 306<br>     | 102482 | TGGAAGCTGGGAAG 102469     | Probable factor de estimulación subunidad 1<br>Kinasa serina /Threonina |
| 654                          | TGCTGATCTGCCATCTCT 671<br> | 153882        | TGCTCATCTGCCATCTCT 153899 | Probable factor de estimulación subunidad 1<br>Kinasa serina /Threonina | 245           | TATCTCTGTCTGATGC 262<br>   | 131053 | TATCTCTATGTCTGATGC 131070 | Probable factor de estimulación subunidad 1<br>Kinasa serina /Threonina |
| 199                          | TAATATTCATACAT 212<br>     | 195866        | TAATATTCATACAT 195853     | Transportador ABC   | 223           | TAATATTCATACAT 236<br>     | 195866 | TAATATTCATACAT 195853     | Transportador ABC   |
| <i>Tripsacum dactyloides</i> |                            | gb DQ984517.1 |                           | <i>Tripsacum dactyloides</i>  | gb DQ984517.1 |                            |        |                           |   |
| 389                          | ACGCAATTCAACT 402<br>      | 119387        | ACGCAATTCAACT 119400      | NADH deshidrogenasa subunidad 1   | 414           | ACGCAATTCAACT 427<br>      | 119387 | ACGCAATTCAACT 119400      | NADH deshidrogenasa subunidad 1   |
| 369                          | TCTAGAGAAAAAGGGAAA 386<br> | 231720        | TCTAGACAAAAAGGGAAA 231703 | NADH deshidrogenasa subunidad 1<br>NADH deshidrogenasa Subunidad 2      | 245           | TATCTCTGTCTG 258<br>       | 121320 | TATCTCTGTCTG 121307       | NADH deshidrogenasa subunidad 1   |
| 643                          | GTGGAATAGCTTGC 656<br>     | 245240        | GTGGAATAGCTTGC 245253     | NADH deshidrogenasa subunidad 1   | 394           | TCTAGAGAAAAAGGGAAA 411<br> | 231720 | TCTAGACAAAAAGGGAAA 231703 | NADH deshidrogenasa   |

|                        |   |  |                        |   |  |
|------------------------|---|--|------------------------|---|--|
|                        |   | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2  |                        |   | subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2                           |
| 415                    | TGCCTCTTGGCTTA 428<br>       <br>281524 TGCCTCTTGGCTTA 281537                 | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 7    | 440                    | TGCCTCTTGGCTTA 453<br>       <br>281524 TGCCTCTTGGCTTA 281537         | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 7 |
| 676                    | CTTCAAAATCTTCCACTGACTC 697<br>       <br>329080 CTTCAAACTCTTCCACTTACTC 329101 | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5    | 245                    | TATCTCTCTGTCTG 258<br>       <br>285098 TATCTCTCTGTCTG 285111         | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1  |
| 369                    | TCTAGAGAAAAAGGGAAA 386<br>       <br>543420 TCTAGACAAAAAGGGAAA 543403         | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5 | 245                    | TATCTCTCTGTCTG 258<br>       <br>299362 TATCTCTCTGTCTG 299375         | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1  |
| 643                    | GTGGAATAGCTTGC 656<br>       <br>556940 GTGGAATAGCTTGC 556953                 | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5    | 394                    | TCTAGAGAAAAAGGGAAA 411<br>       <br>543420 TCTAGACAAAAAGGGAAA 543403 | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5 |
| <i>Sorghum bicolor</i> |   | gb DQ984518.1  | <i>Sorghum bicolor</i> |   | gb DQ984518.1  |
| 415                    | TGCCTCTTGGCTTA 428<br>       <br>184325 TGCCTCTTGGCTTA 184312                 | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5    | 236                    | TGTTTCTGTATCT 249<br>       <br>15546 TGTTTCTGTATCT 15533             | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1  |



|   |  |   |  |
|---|--|---|--|
| 369 TCTAGAGAAAAGGGAAA 386<br>           <br>263794 TCTAGACAAAAGGGAAA 263811 | NADH deshidrogenasa subunidad 1<br>NADH deshidrogenasa subunidad 5 | 236 TGT TTTCTGTATCT 249<br>           <br>128866 TGT TTTCTGTATCT 128853     | NADH deshidrogenasa subunidad 1                                    |
| 389 ACGCAATTCAACT 402<br>           <br>331163 ACGCAATTCAACT 331150         | NADH deshidrogenasa subunidad 5<br>NADH deshidrogenasa Subunidad 2 | 440 TGCCTCTTGGCTTA 453<br>           <br>184325 TGCCTCTTGGCTTA 184312       | NADH deshidrogenasa subunidad 1<br>NADH deshidrogenasa subunidad 5 |
|   |  | 394 TCTAGAGAAAAGGGAAA 411<br>           <br>263794 TCTAGACAAAAGGGAAA 263811 | NADH deshidrogenasa subunidad 1<br>NADH deshidrogenasa subunidad 5 |
|   |  | 414 ACGCAATTCAACT 427<br>           <br>331163 ACGCAATTCAACT 331150         | NADH deshidrogenasa subunidad 5<br>NADH deshidrogenasa Subunidad 2 |
| <i>Cucumis melo</i>   | gb AY357211.1  | <i>Cucumis melo</i>   | gb AY357211.1  |
| 373 GAGAAAAGGGAAA 386<br>           <br>97 GAGAAAAGGGAAA 84                 | 5S ribosomal RNA (rrn5-2) gen                                      | 398 GAGAAAAGGGAAA 411<br>           <br>97 GAGAAAAGGGAAA                    | (rrn5-2) gen 5S ribosomal RNA                                      |
| <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)                               | gb DQ167400.1  | <i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)                               | gb DQ167400.1  |
| 415 TGCCTCTTGGCTTA 428  | NADH deshidrogenasa  | 440 TGCCTCTTGGCTTA 453  | NADH   |

|                          |                     |        |  |                          |                            |        |  |
|--------------------------|---------------------|--------|--|--------------------------|----------------------------|--------|--|
| 88304                    | <br>TGCCTCTGGCTTA   | 88291  | subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5 | 88304                    | <br>TGCCTCTGGCTTA          | 88291  | deshidrogenasa<br>subunidad 1<br>NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5 |
| 389                      | ACGCAATTTCAACT<br>  | 402    | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1                   | 414                      | ACGCAATTTCAACT<br>         | 427    | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1                                  |
| 142403                   | ACGCAATTTCAACT      | 142416 | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5                | 142403                   | ACGCAATTTCAACT             | 142416 | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 5                                  |
| 215                      | TTTCTGATCTCTCT<br>  | 228    |  | 54                       | AATCAAGTTTCTGGCTTC<br>     | 71     |  |
| 386413                   | TTTCTGATCTCTCT      | 386426 |  | 370787                   | AATCAAGCTTCTGGCTTC         | 370804 |  |
| 215                      | TTTCTGATCTCTCT<br>  | 228    | rRNA-26S ribosomal<br>RNA                            | 54                       | AATCAAGTTTCTGGCTTC<br>     | 71     | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 9                                  |
| 467511                   | TTTCTGATCTCTCT      | 467524 |  | 451885                   | AATCAAGCTTCTGGCTTC         | 451902 |  |
| <i>Nicotiana tabacum</i> |                     |        | >dbj BA000042.1                                      | <i>Nicotiana tabacum</i> |                            |        | dbj BA000042.1   |
| 700                      | TCTCAAAGGCAGGC<br>  | 713    | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1                   | 685                      | GATCTGGCATCTCTGCTTCTTC<br> | 706    | NADH<br>deshidrogenasa<br>subunidad 1                                  |
| 84755                    | TCTCAAAGGCAGGC      | 84768  | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2                | 96228                    | GATCTGGCATCTTTGCCTCTTC     | 96249  | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 2                                  |
| 700                      | TCTCAAAGGCAGGC<br>  | 713    | NADH deshidrogenasa<br>subunidad 1                   | 399                      | AGAAAAAGGGAAAAG<br>        | 412    |  |
| 286255                   | TCTCAAAGGCAGGC      | 286268 |  | 301469                   | AGAAAAAGGGAAAAG            | 301456 |  |
| 374                      | AGAAAAAGGGAAAAG<br> | 387    |  | 440                      | TGCCTCTTGGCTTA<br>         | 453    | NADH   |

|   |                                    |  |                                       |
|---|------------------------------------|--|---------------------------------------|
| 301469 AGAAAAAGGGAAAG 301456                                    |                                    | 377746 TGCCTCTTGGCTTA 377733   | deshidrogenasa<br>Subunidad 7         |
| 415 TGCCTCTTGGCTTA 428<br>     <br>377746 TGCCTCTTGGCTTA 377733 | NADH deshidrogenasa<br>Subunidad 7 |  |                                       |
| <i>Brassica napus</i>   | dbj AP006444.1                     | <i>Brassica napus</i>  | dbj AP006444.1                        |
| 415 TGCCTCTTGGCTTA 428<br>     <br>7199 TGCCTCTTGGCTTA 7186     | NADH deshidrogenasa<br>Subunidad 7 | 440 TGCCTCTTGGCTTA 453<br>     <br>7199 TGCCTCTTGGCTTA 7186  | NADH<br>deshidrogenasa<br>Subunidad 7 |
|   |                                    | <i>Styrax officinalis</i>  | gb AF421084.1                         |
|   |                                    | 54 AATCAAGTTTCTGGCTTC 71<br>     <br>452731 AATCAAGCTTCTGGCTTC 452748<br>139 ATCCCATCATAGAAGTACTGAA 160<br>     <br>299 ATCCCAACATGGAAGTACTGAA 278 | NADH<br>deshidrogenasa<br>(ndhF)      |
|   |                                    | <i>Ostreococcus tauri</i>  |                                       |
|   |                                    | 84 GTTCACTATGGCTCCC 99<br>     <br>54307 GTTCACTATGGCTCCC 54322  | Cloroplasto                           |

**Apéndice IV**  
**Secuencias asociadas a genes y número de copias identificadas en *E. havanense***

| Secuencia   | Gen asociado               | Número de copias | Especie  |
|---|----------------------------|------------------|--|
| GCTGAAGATTTGCG<br>     <br>GCTGAAGATTTGCG                 | Cox 3.                     | 1                | <i>Zea mays subsp. mays</i> genotipo CMS-S           |
|   | NADH 2 y 7                 | 1                | <i>Zea luxurians</i>                                 |
|   | NADH 1 y 2                 | 1                | <i>Zea mays subsp. parviglumis</i>                   |
|   | NADH 1 y 5                 | 1                | <i>Zea perennis</i>                                  |
|   | NADH 1, 2                  | 2                | <i>Zea mays subsp. mays</i> genotipo CMS-C           |
|   | NADH 7                     | 1                | <i>Zea mays subsp. mays</i> genotipo CMS-T           |
|   | NADH 1,2, cox II, ATPasa 6 | 3                | <i>Zea mays subsp. mays</i> genotipo male-fertile NA |
| AATCAAGTTTCTGGCTTC<br>     <br>AATCAAGCTTCTGGCTTC         | rRNA-26s                   | 2                | <i>Oryza sativa</i>                                  |
|   | NADH dehidrogenase (ndhF)  |                  | <i>Styrax officinalis</i>                            |
| GTTCACTATGGCTCCC<br>     <br>GTTCACTATGGCTCCC             | Secuencia de cloroplasto   | 1                | <i>Ostreococcus tauri</i>                            |
| ATCCCATCATAGAAGTACTGAA<br>     <br>ATCCCAACATAGAAGTACTGAA | NADH F                     | 1                | <i>Pentaptychium eurycarpum</i>                      |
|   |                            | 1                | <i>Ficalhoa laurifolia</i>                           |
|   |                            | 1                | <i>Styrax officinalis</i> NADH dehidrogenase (ndhF)  |
|   |                            | 1                | <i>Pelliciera rhizophorae</i>                        |
|   |                            | 1                | <i>Norantea peduncularis</i>                         |

|   |                          |                              |  |
|---|--------------------------|------------------------------|--|
|   |                          | 1                            | <i>Marcgravia sp.</i>                                |
|   |                          | 1                            | <i>Impatiens parviflora</i>                          |
| GCTGAGGACAACCTT<br>     <br>GCTGAGGACAACCTT | Nad 1 y 5                |                              | <i>Triticum aestivum</i>                             |
| TAATATTCATACAT<br>     <br>TAATATTCATACAT   | Transportador ABC        | 1                            | <i>Triticum monococcum</i>                           |
| TTTCTGATCTCTCT<br>     <br>TTTCTGATCTCTCT   | rARN-26s                 | 2                            | <i>Oryza sativa</i>                                  |
| CTGATGCCACAAATC<br>     <br>CTGATGCCACAAATC |                          | 1                            | <i>Ostreococcus tauri</i>                            |
| TGTTTTCTGTATCT<br>     <br>TGTTTTCTGTATCT   | NADH 1                   | 2                            | <i>Sorghum bicolor</i>                               |
| TATCTCTCTGTCTG<br>     <br>TATCTCTCTGTCTG   | NADH 1                   | 2                            | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-S</i>           |
|   | NADH 7                   | 2                            | <i>Zea luxurians</i>                                 |
|   | NADH 2 y5                | 2                            | <i>Zea mays subsp. parviglumis</i>                   |
|   | NADH 1 y 2               | 2                            | <i>Zea perennis</i>                                  |
|   | NADH 1 y 2               | 3                            | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-C</i>           |
|   | NADH 1 y5                | 2                            | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-T</i>           |
|   | NADH 1, 2 y 5            | 2                            | <i>Zea mays subsp. mays genotipo male-fertile NA</i> |
|   | Kinasa Ser/Thre          | 1                            | <i>Triticum monococcum</i>                           |
| NADH 1                                      | 3                        | <i>Tripsacum dactyloides</i> |  |
| TGGAAGCTGGGAAG                              | Factor de estimulación 1 | 1                            | <i>Triticum monococcum</i>                           |

|   |  |   |   |
|---|--|---|---|
| <br>TGGAAGCTGGGAAG                                |  |   |   |
| TATTTTTCTAAAAA<br>     <br>TATTTTTCTAAAAA         | NADH 5   | 2 | <i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>                      |
| ACGCAATTTCAACT<br>     <br>ACGCAATTTCAACT         | NADH 1   | 1 | <i>Tripsacum dactyloides</i>                              |
|   | NADH 1 y 5   | 1 | <i>Sorghum bicolor</i>                                    |
|   | NADH 1 y 5   | 1 | <i>Oryza sativa</i>                                       |
| TCTAGAGAAAAAGGGAAA<br>     <br>TCTAGACAAAAAGGGAAA | NADH 1   | 1 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-S</i>                |
|   | proteína ribosomal;<br>proteína de transporte de<br>membrana | 1 | <i>Zea luxurians</i>                                      |
|   | NADH 1 y 2   | 2 | <i>Zea mays subsp. parviglumis</i>                        |
|   | NADH 2   | 1 | <i>Zea perennis</i>                                       |
|   | NADH 1 y 2   | 2 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-C</i>                |
|   | NADH 1 y 2   | 1 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-T</i>                |
|   | NADH 1   | 1 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo male-<br/>fertile NA</i> |
|   | Atp sintetasa beta   | 1 | <i>Myristica fragrans</i>                                 |
|   | ATP sintetasa beta   | 1 | <i>Mauloutchia chapelieri</i>                             |
|   | NADH 1 y 5.  | 4 | <i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>                      |
|   | NADH 1, 2 y 5  | 2 | <i>Tripsacum dactyloides</i>                              |
|   | NADH 1 y 5   | 2 | <i>Sorghum bicolor</i>                                    |
|   | 5S RNA ribosomal (rrn5-<br>2) gene                           | 1 | <i>Cucumis melo</i>                                       |
|   |  | 1 | <i>Nicotiana tabacum</i>                                  |
| AGAAAAAGGGAAAG<br>     <br>AGAAAAAGGGAAAG         | NADH 1 y 2   | 1 | <i>Nicotiana tabacum</i>                                  |

|   |                       |   |  |
|---|-----------------------|---|--|
| TGCCTCTTGGCTTA<br>     <br>TGCCTCTTGGCTTA   | NADH 1 y 5            | 1 | <i>Zea mays subsp. mays</i> genotipo CMS-S           |
|   | NADH 2 y 7            | 1 | <i>Zea luxurians</i>                                 |
|   | NADH 5 y 7            | 1 | <i>Zea mays subsp. parviglumis</i>                   |
|   | NADH 1 y 7            | 1 | <i>Zea perennis</i>                                  |
|   | NADH 7                | 1 | <i>Zea mays subsp. mays</i> genotipo CMS-C           |
|   | NADH 7                | 1 | <i>Zea mays subsp. mays</i> genotipo CMS-T           |
|   | NADH 1 y 5            | 1 | <i>Zea mays subsp. mays</i> genotipo male-fertile NA |
|   | nad 7                 | 1 | <i>Triticum aestivu</i>                              |
|   | NADH 1 y 5.           | 2 | <i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>                 |
|   | NADH 1 y 2.           | 2 | <i>Tripsacum dactyloides</i>                         |
|   | NADH 7                | 1 | <i>Brassica napus</i> mitochondrial DNA              |
|   | NADH 5 y 2            | 2 | <i>Sorghum bicolor -S</i>                            |
|   | NADH 1 y 5            | 1 | <i>Oryza sativa</i>                                  |
|   | NADH 7                | 1 | <i>Nicotiana tabacum</i>                             |
| ATCCTCTACTGGTGG<br>     <br>ATCCTCTACTGGTGG | Proteína ribosomal S2 | 1 | <i>Zea mays subsp. mays</i> genotipo CMS-S           |
|   | ATPasa 9 cox 3        | 1 | <i>Zea luxurians</i>                                 |
|   | NADH 1 y 2            | 1 | <i>Zea mays subsp. parviglumis</i>                   |
|   | NADH 1 y 5            | 1 | <i>Zea perennis</i>                                  |
|   | NADH 1 y 2            | 3 | <i>Zea mays subsp. mays</i> genotipo CMS-C           |
|   | NADH 1 y 2            | 2 | <i>Zea mays subsp. mays</i> genotipo CMS-T           |
|   | NADH 1,2              | 3 | <i>Zea mays subsp. mays</i> genotipo male-fertile NA |
|   | Transportador ABC     | 1 | <i>Triticum monococum</i>                            |
|   | NADH 1 y 5            | 1 | <i>Tripsacum dactyloides</i>                         |
| GTGGAATAGCTTGC<br>                          | Citocromo c           | 1 | <i>Zea mays subsp. mays</i> genotipo CMS-S           |
|   | NADH 1 y 2            | 1 | <i>Zea luxurians</i>                                 |
|   | NADH 1                | 1 | <i>Zea mays subsp. parviglumis</i>                   |
|   | NADH 1 y 5            | 1 | <i>Zea perennis</i>                                  |

|   |                       |   |  |
|---|-----------------------|---|--|
| GTGGAATAGCTTGC  | NADH 5                | 2 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-C</i>           |
|   | NADH 1 y 5            | 1 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-T</i>           |
|   | NADH 1 y 2            | 2 | <i>Tripsacum dactyloides</i>                         |
|   | NADH 1                | 1 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo male-fertile NA</i> |
|   | Nad 1y 5              | 1 | <i>Triticum aestivum</i>                             |
| TCTGCCATCTCTGCTTCT<br>             <br>TCTGCCATGTCTGCTTCT             | NADH 5 y 1            | 2 | <i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>                 |
|   | Kinasa Ser/Thr        | 1 | <i>Triticum monococcum</i>                           |
| CTTCAAAATCTTCCACTGACTC<br>                  <br>CTTCAAACCTTCCACTTACTC | Cox 3, NADH 1         | 2 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-S</i>           |
|   | cox 1, rRNA ribosomal | 1 | <i>Zea luxurians</i>                                 |
|   | NADH 1 y 2            | 3 | <i>Zea mays subsp. parviglumis</i>                   |
|   | NADH 2                | 1 | <i>Zea perennis</i>                                  |
|   | NADH 1 y 2            | 2 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-C</i>           |
|   | NADH 1 y 2            | 1 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo CMS-T</i>           |
|   | NADH 1,2              | 2 | <i>Zea mays subsp. mays genotipo male-fertile NA</i> |
|   | Nad 1y 5; atp 1 y 9   | 2 | <i>Triticum aestivum</i>                             |
| GATCTGGCATCTCTGCTTCTTC<br>                 <br>GATCTGGCATCTTTGCCCTTTC | NADH 1 y 2            | 1 | <i>Nicotiana tabacum</i>                             |
|   |                       |   |  |
| TCTCAAAGGCAGGC<br>             <br>TCTCAAAGGCAGGC                     | NADH 5                | 1 | <i>Beta vulgaris subsp. vulgaris</i>                 |
|   | NADH 1 y 2            | 2 | <i>Nicotiana tabacum</i>                             |
| AAAANGGTTGCCCTTACT<br>              <br>AAAAAGGTTGCCCTTACT            | Nad 1 y 5             | 1 | <i>Triticum aestivum</i>                             |



|   |           |   |                          |
|---|-----------|---|--------------------------|
| CTTATGGGAAAACCTCCC<br>           <br>CTTATGTGAAAACCTCCC | Nad 1 y 5 | 1 | <i>Triticum aestivum</i> |
|---|-----------|---|--------------------------|

## Referencias

- Abad, A.R.; Mehrrens, B.J. y. Mackenzie, S.A. 1995. Specific expression in reproductive tissues and fate of a mitochondrial sterility-associated protein in cytoplasmic male-sterile bean. *Plant Cell* 7: 271–285.
- Akagi-H; Nakamura-A; Sawada-R; Oka-M; Fujimura-T; 1995. Genetic diagnosis of cytoplasmic male sterile cybrid plants of rice. *Theoretical and Applied Genetics* 90 (7-8): 948-951.
- Anderson, W. 1973. A morphological hypothesis for the origin of heterostyly in the Rubiaceae. *TAXON* 22 (5/6): 537-541.
- Anderson, M.A.; Cornish E.C.; Mau, S.L.; Williams, E. G.; Hoggart, R.; Atkinson, A; Gregot, B.; Simpson, R.; Roche, P. J.; Haley, J. D.; Penschow ,J. D.; Niall, H. D.; Tregear, G.; Coghan, H J. P; Crawfor, R. J y. Clarke A. E. 1986. Cloning of cDNA f0l a stylar glycoprotein associated with expression of self-incompatibility in *Nicotiana glauca*. *Nature*, Vol 321, pp. 38-44.
- André, C.; Levy, A. y Walbot, V.1992. Small repeated sequences and the structure of plant mitochondrial genomes. *Trends in Genetics*. Vol. 8 No. 4 . 128 -132
- Arroyo, J.; Barrett, S.C.H. 2002. Evolutionary maintenance of stigma-height dimorphism in *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany*; 89(8): 1242-1249.
- Athanasiou, A. y Shore, J.S. 2001. Pollen tube growth and inhibition in distylous and homostylous *Turnera* and *Piriqueta* (Turneraceae). *Canadian-Journal-of-Botany*; 79 (5): 578-591.
- Avila G. 1991. Efectos maternos y paternos sobre la producción de semillas y el desempeño de la progenie del arbusto heterostílico *Erythroxylum havanense*. Tesis Profesional, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Ávila, G. y Domínguez, C.A. 2000. Parental effects and gender specialization in a tropical heterostylous shrub. *Evolution* 54: 866–877.
- Baker, H.G. 1958. Studies in the reproductive biology of West African Rubiaceae. *Journal of West African Science Association* 4: 9–24.
- Baker, H.G. 1962. Heterostyly in the Connaraceae, with specific reference by *Byrsocarpus coccineus*. *Botanical Gaz. Chicago* 123: 206-211.
- Baker H.G. 1966. The evolution, functioning and breakdown of heteromorphic incompatibility systems. I. The Plumbaginaceae. *Evolution* 20: 349–368.
- Balk, J; Leaver, C.J. 2001. The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release *Plant Cell*, 13 (8) pp. 1803-1818.

- Barrett, S.C.H. 1980. Dimorphic incompatibility and gender in *Nymphoides indica* Menyanthaceae. Canadian Journal of Botany 58: 1938–1942.
- Barrett, S.C.H. 1992. Gender variation and the evolution of dioecy in *Wurmbea dioica* (Liliaceae). Journal of Evolutionary Biology. 5, 423-444.
- Barret, S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. Nature. Vol. 3: 275-284.
- Barrett, S.C.H; Jesson,L,K; Baker, A. 2000. The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. Annals-of-Botany-(London). 85 (Suppl. A): 253-265.
- Bateson, W., y Gregory, R.P. 1905. On the inheritance of heterostyly in *Primula*. Proceedings of the Royal Society. Serie B. 76:581-586.
- Bawa, K.S., y Beach, J.H. 1981. Evolution of sexual systems in flowering plants. Annals of the Missouri Botanical Garden 68: 254-274.
- Bawa, K. S. y Opler, P. A. 1975. Dioecism in tropical forest trees. Evolution 29:167-79.
- Beach, J.H. y Bawa, K.S.1980. Role of pollinators in the evolution of dioecy from distyly. Evolution 34: 1138-1143.
- Bégu, D.; Graves P.; Litvak, S.; y Araya, A. 1989. Nucleotide sequence of the F<sub>0</sub>-ATPase subunit 9genes from two lines of wheat. Nucleic Acids Research. Vol. 17, (22): pp. 9491.
- Bellaoui, M.; Grelon, M; Pelletier G y Budar, F. 1999. The restorer Rfo gene acts post-translationally on the stability of the ORF138 Ogura CMS-associated protein in reproductive tissues of rapeseed cybrids. Plant Molecular Biology. 40(5): 893–902.
- Bentolila, S.; Alfonso, A. y Hanson, M.R. 2002. A pentatricopeptide repeat-containing gene restores fertility to cytoplasmic male-sterile plants. Proceedings of the National Academy of Sciences. 99(16):10887–10892.
- Bir Bahadur.1968. Heterostyly in Rubiaceae a review. Journal of Osmania University Sciences. Golden Jubilee. Vol 207-238.
- Bonhomme. S.; Budar, F.; Lancelin, D.; Small, I.; Defrance, MC; Pelletier, G. 1992. Sequence and transcript analysis of the *Nco2.5* Ogura-specific fragment correlated with cytoplasmic male sterility in *Brassica Cybrids*. Molecular General Genetics. 235:340-348.
- Budar, F. y Pelletier, G. 2001. Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. C R Acad. Sci. III 324 (6):543–550.
- Budar, F.; Touzet, P.; De Paepe, R. 2003. The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited. Genetica 117: 3–16.

- Bullock, S.H. 1986. Climate of Chamela, Jalisco, and trends in the south coastal region of México. *Archives of Meteorology, Geophysics and Bioclimatology Series B* 36: 297–316.
- Cesaro, A.; Thompson, J.D. 2004. Darwin's cross-promotion hypothesis and the evolution of stylar polymorphism. *Ecology-Letters*. 7(12): 1209-1215
- Charlesworth B. 1995. Multiallelic self-incompatibility polymorphism in plants. *Bioessays*, Vol. 17 (1): 31-38
- Charlesworth, D. 1981. A further study of the problem of the maintenance of females in gynodioecious species. *Heredity* 46: 27–39.
- Charlesworth, D. 1982. On the nature of the self-compatibility locus in homomorphic and heteromorphic system. *American Naturalist*. 119:732-735.
- Charlesworth, B., y Charlesworth, D. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *American Naturalist* 112: 975–997.
- Charlesworth D. y Charlesworth B. 1979. A model for the evolution of distyly. *American Naturalist* 114: 467–498.
- Charlesworth B. y Charlesworth D. 1979b. The maintenance and breakdown of distyly. *American Naturalist* 114: 499–513.
- Charlesworth, D. y Charlesworth, B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18, 237–268.
- Charlesworth, D. y Ganders, F. R. 1979. The population genetics of gynodioecy with cytoplasmic-genic male-sterility. *Heredity* 43(2): 213-218.
- Conley, C.A. y Hanson, M.R. 1994. Tissue-specific expression in plant mitochondria. *Plant Cell* 6: 85–91.
- Correns, C. 1908. Die rolle der männlichen Keimzellen bei der Geschlechtsbestimmung der gynodioecischen Pflanzen. *Ber. Dtsch Bot. Ges.* 26 (A): 626–701.
- Correns, C. 1928. Bestimmung, Vererbung und Verteilung des Geschlechtes bei den höheren Pflanzen. *Handb. Vererbungswissenschaft*, 3 (II, C.) Band II.
- Cosmides, L.M. y Tooby, J. 1981. Cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict. *Journal of Theoretical Biology*. 89: 83–129.
- Couvet, D.; Bonnemaison, F.; Gouyon, P.H. 1986. The maintenance of females among hermaphrodites: the importance of nuclear-cytoplasmic interactions, *Heredity* 57: 325–330.

Couvet, D.; Ronce, O. y Gliddon, C. 1998. Maintenance of nucleocytoplasmic polymorphism in a metapopulation: the case of gynodioecy. *Am. Natural.* 152: 59–70.

Couvet, D.; Atlan, A.; Belhassen, E.; Gliddon, C.; Gouyon, P.H. y Kjellberg, F. 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.

Cronquist, A. 1981. An integrated system of clasification of flowering plants. *American Naturalist.* 114: 467-498.

Cuevas, E.; Molina-Freaner, F; Eguiarte, L y Domínguez, C. A. 2005. Patterns of male sterility within and among populations of the distylous shrub *Erythroxyllum havanense* (Erythroxyllaceae). *Plant Ecology.* 176:165-172

Cuevas, E. 2000. Patrones de esterilidad masculina entre poblaciones y morfo de *Erythroxyllum havanense* (Erythroxyllaceae). Tesis Profesional. Facultad de Ciencias UNAM, México.

Darwin, C. 1887. *The different forms of the same species.* Jhon Murray, London. UK

De Haan, A.A.; H.P. Koelewijn, M.P.J.; Hundscheid y Van Damme, J.M.M. 1997. Dynamics of gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. II. Mode of action and frequencies of restorer alleles. *Genetics* 147: 1317–1328.

De Haan, A.A.; M.P.J. Hundscheid y van Hinsberg, A. 1997. Effects of CMS types and restorer alleles on plant performance on *Plantago lanceolata*: an indication for cost of restoration. *Journal of Evolutionary Biology.* 10: 803–820.

De Paepe, R.; Forchioni, A.; Chetrit, P. y Vedel, F. 1993. Specific mitochondrial proteins in pollen: presence of an additional ATP synthase beta subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 90(13): 5934-5938.

Delannay, X.. 1978. La gynodioecie chez les angiospermes. *Natural Belges* 59: 223–235.

Delph, L. F; Bailey, M. y Marr, D.L. 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

Dewey, R.E; Levings III, C.S; Timothy, D.H (1986): Novel recombinations in the maize mitochondrial genome produce a unique transcriptional unit in the Texas male-sterile cytoplasm. *Cell* 44, 439-449.

Dewey, R.E.; Timothy D.H.; y Levings, C.S.I.I.I. 1987. A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA 84: 5374–5378.

Dieterich, J.H., Braun, H.P., and Schmitz, U.K. (2003). Alloplasmic male sterility in *Brassica napus* (CMS 'tournefortii-stiewe') is with a special gene arrangement around a novel *atp9* gene. *Molecular Genetics Genomics* 269, 723–731.

Domínguez, C.A. 1990. Consecuencias ecológicas y evolutivas del patrón de floración sincrónico y masivo de *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). Tesis de doctorado, Centro de Ecología, UNAM. México.

Domínguez, C. A. y Dirzo, R. 1994. Effects of defoliation on *Erythroxylum havanense*, a tropical proleptic species. *Ecology*, 75 (7): 1896-1902.

Domínguez, C. A. y Dirzo, R. 1995. Rainfall and flowering synchrony in a tropical shrub: variable selection on the flowering time of *Erythroxylum havanense*. *Evolutionary Ecology* 9: 204–216.

Domínguez, C.A.; Avila, G.; Vázquez-Santana, S. and Márquez-Guzmán, J. 1997. Morph-biased male sterility in the tropical shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany*. 84, 626-632.

Domínguez, C.A; Abarca, C.; Eguiarte, L. y Molina-Freaner F. 2005. Local genetic differentiation among populations of the mass-flowering tropical shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *New Phytologist* 166: 663–672.

Dowrick, V. P. J. 1956. Heterostyly and homostyly in *Primula obconica* *Heredity* 10: 219-236. citado en: Lewis, L., Jones D.A. 1992. The genetics of heterostyly En: *Evolution and function of heterostyly* (ed. S.C.H. Barrett) Springer-Verlag, Berlin. Alemania, pp. 129–148.

Doyle, J.J. y Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11–15.

Dulberger, R. 1974. Structural dimorphism of stigmatic papillae in distylous *Linum* species. *American Journal of Botany*. 61:238-243.

Dulberger, R. 1975. Intermorph structural differences between stigmatic papillae and pollen grains in relation to incompatibility in *Plumbiginaceae*. *Proceedings of the Royal Society of London Serie B* 188: 257-274.

Dulberg R., 1992. Floral polymorphism and their significance in the heterostylous syndrome. En: *Evolution and function of heterostyly* (ed. S.C.H. Barrett) Springer-Verlag, Berlin. Alemania, pp 41-77.

Eckardt, N. A. 2006. Cytoplasmic Male Sterility and Fertility Restoration. *The Plant Cell*, Vol. 18, 515–517.

- Ehlers, B.K.; Maurice, S. y Bataillon, T. 2005. Sex inheritance in gynodioecious species: a polygenic view. *Proceedings of the Royal Society. B* (2005) 272, 1795–1802
- Faivre, A. 2000. Ontogenetic differences in heterostylous plants and implications for development from a herkogamous ancestor. *Evolution*. 54(3): 847-858
- 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 on Ecology and Evolution*. 15(4): 167–171.
- Ganders F.R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607–635.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema climático de Copen. Limusa, México.
- Gibbs, P. E. 1986. Do homomorphic and heteromorphic self-incompatibilities have the same sporophytic mechanism? *Plant Systematics and Evolution* 154: 285-323.
- Gouyon P.-H., D. Couvet. 1985. Selfish cytoplasm and adaptation: variation in the reproductive success of thyme. En: J. Haeck and J. W. Woldendorp, eds. *Structure and functioning of plant populations*. North Holland Publishing, Amsterdam. Pp. 299–319.
- Gouyon, P.H. y Couvet, D. 1987. A conflict between two sexes, females and hermaphrodites,. En: *The Evolution of Sex and its Consequences*, editado por S.C. Stearns. Birkhäuser, pp. 245–260.
- Gouyon, P. H.; Vichot, F. y Van Damme, J.M.M. 1991. Nuclear-cytoplasmic male sterility: single-point equilibria vs. limit cycles. *American Naturalist* 137: 498–514.
- Gryj E.O. y Domínguez C.A. 1996. Fruit removal and postdispersal survivorship in the tropical dry forest tree *Erythroxylum havanense*: ecological and evolutionary implications. *Oecologia*. 108: 368–374.
- Hakansson, G.; Kofer, W.; Glimelius, K. 1993. Mitochondrial effect of nuclear and mitochondrial restoration of CMS in *Nicotiana*. En: Brennicke A, Kück U (eds) *Plant mitochondria: with emphasis on RNA editing and cytoplasmic male sterility*. VCH Verlagsgesellschaft GmbH, Weinheim, Germany, pp 385–391
- Hanson. M.R. 1991. Plant mitochondrial mutations and male sterility. *Annual Review of Genetics*. 25: 461-486.
- Hervieu, F.; Charbonier, L.; Bannerot, H.; y Pelletier, G. 1993. The cytoplasmic male sterility (CMS) determinant of common bean is widespread in *Phaseolous coccineus* L. and *Phaseolous vulgaris* L. *Current Genetics*. 24: 149-155.
- Heywood, V.H. 1978. *Flowering plants of the world*. Oxford University Press.

- Hildebrand, F. 1866 Ueber den Trimorphisms in der Gattung Oxalis. Monatsberichte der Koniglich Preussische Akademie der Wissenschaften zu Berlin, 1866, 352-374., citado en Anders F.R. 1979. The biology of heterostyly. New Zealand Journal of Botany 17: 607–635.
- Hurst, L.D. 1992. Intragenomic conflict as an evolutionary force. Proceedings of the Royal Society of London B 248, 135-140.
- Hurst, L.D.; Atlan, A. y Bengtsson, B.O. 1996. Genetic conflicts. Quarterly Review of Biology 71(3): 317–364.
- Iwabuchi, M., Koizuka, N., Fujimoto, H., Sakai, T., and Imamura, J. 1999. Identification and expression of the kosena radish (*Raphanus sativus* cv. Kosena) homologue of the Ogura radish CMS-associated gene, orf138. Plant Molecular Biology 39, 183–188.
- Jacobs, M. y Wade, M. 2003. A Synthetic Review of the Theory of Gynodioecy. American Naturalist. vol. 161, no. 6.
- Jenkin, T . J . 1931. Self-fertility in perennial Rye-grass (*Lolium perenne* L.). *Bull. Welsh Pl. Breed. Sta.* H. 12, io8.
- Juenger, T.; Purugganan, M.; Mackay ,T. 2000. Quantitative Trait Loci for Floral Morphology in *Arabidopsis thaliana*. Genetics. 156: 1379–1392.
- Kadowaki, K.; Suzuki, T. y Kazama, S. 1990. A chimeric gene containing the 5 portion of ATP6 is associated with cytoplasmic male-sterility of rice. Molecular General Genetics 224(1): 10–16.
- Kheyr-Pour, A. 1981. Wide nucleo-cytoplasmic polymorphism for male sterility in *Origanum vulgare*. L. Journal of Heredity. 72: 45-51
- Kohler, R.H.; Horn, R.; Lossl, A. y Zetsche, K. 1991. Cytoplasmic male sterility in sunflower is correlated with the co-transcription of a new open reading frame with the *atpA* gene. Molecular General Genetics 227, 369–376.
- Koizuka, N., H. Fujimoto, T. Sakai y J. Imamura, 1998. Translational control of ORF125 expression by a radish fertility restoration gene in *Brassica napus* kosena CMS cybrids. En: Plant Mitochondria: From Gene to Function, editado por I.M. Moller, P. Gardestrom, K. Glimelius y E. Glaser. Backhuys Publishers, Leiden pp.83–86.
- Koizuka, N., R. Imai, M. Iwabuchi, T. Sakai y J. Imamura, 2000. Genetic analysis of fertility restoration and accumulation of ORF125 mitochondrial protein in the kosena radish (*Raphanus sativus* cv. Kosena) and a *Brassica napus* restorer line. Theoretical Applied Genetics. 100: 949–955.
- Kofer, W.; Glimelius, K.; y Bonnet, H. 1991. Modifications of mitochondrial DNA cause changes in floral development in homeotic-like mutants of tobacco. The plant cell, Vol. 3: 759-769.



Kurian-Valsa; Richards-A-J. 1997. New recombinant in the heteromorphy 'S' supergene in *Primula* *Heredity*. 78 (4) 383-390.

L'homme, Y., R.J.; Stahl, X.-Q.; Li, A. H. y Brown G. 1997. Brassica nap cytoplasmic male sterility is associated with expression of a mtDNA region containing a chimeric gene similar to the pol CMS-associated orf224 gene. *Current Genetics* 31:325–335.

Lalanne, E., C. Mathieu, F. Vedel y R. De Paepe. 1998. Tissue specific expression of genes encoding isoforms of the mitochondrial ATPase beta subunit in *Nicotiana sylvestris*. *Plant Molecular Biology* 38(5): 885–888.

Laser, B., G. Oettler y U. Kück, 1995. RNA editing of the mitochondrial ATPA/ATP9 co-transcript of triticale, carrying the timopheevi cytoplasmic male sterility cytoplasm from wheat. *Plant Physiology* 107: 663–664.

Laser, K.D.; y Lersten, N.R. 1972. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male-sterile angiosperms. *Botanical Reviews*. 38: 425-454.

Lee, S. J.; Warmke, H. E. 1979. Organelle Size and Number in Fertile and T-Cytoplasmic Male-Sterile Corn. *American Journal of Botany*, Vol. 66, No. 2. Pp. 141-148.

Levings, C.S.R. 1993. Thoughts on cytoplasmic male sterility in maize. *Plant Cell* 5: 1285–1290.

Levings III C. S.; Vasil. I. K. 1995. The molecular biology of plant mitochondria. Dordrecht; Boston : Kluwer Academic Publishers.

Lewis, D. 1941. Male sterility in natural populations of hermaphrodite plants. *New Phytologist* 40: 56–63.

Lewis, L., Jones D.A. 1992. The genetics of heterostyly En: Evolution and function of heterostyly (ed. S.C.H. Barrett) Springer-Verlag, Berlin. Alemania, pp. 129–148.

Li, X.Q., M. Jean, B.S. Landry y G.G. Brown, 1998. Restorer genes for different forms of Brassica cytoplasmic male sterility map to a single nuclear locus that modifies transcripts of several mitochondrial genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 95: 10032–10037.

Lughada, E.M.N. y Parnell J.A.N. 1989. Heterostyly and gene flow in *Menyanthes trifoliata* L. (Menyanthaceae) *Botanical Journal of the Linnean Society* 100: 337-354.

Lloyd, D. 1979. Evolution towards dioecy in heterostylous populations. *Plant Systematics and Evolution*. 131, 71-80.

Lloyd D.G. y Webb C.J. 1992(a) Evolution of heterostyly. En: Evolution and function of heterostyly (ed. S.C.H. Barrett) Springer-Verlag, Berlin. Alemania, pp. 151–178.

Lloyd D.G. y Webb C.J. 1992(b) The selection of heterostyly. En: Evolution and function of heterostyly. (ed. S.C.H Barrett) Verlag, Berlin, Alemania, pp. 179–205.

- Lloyd, D.G. y Yates, J.M.A; 1982. Intrasexual selection and the segregation of pollen and stigmas in hermaphroditic plants, exemplified by *Wahlenbergia albomarginata* (Campanulaceae) Evolution. 36: 903-913.
- Mackenzie, S.; He, S.; y Lyznik A. 1994. The Elusive Plant Mitochondrion as a Genetic System. Plant Physiology 105: 775-780.
- Mather, K. y de Winton D. 1941. Adaptation and counter-adaptation of the breeding system in *Primula*. Annals of Botanic 5:597-311.
- Maurice, S. 1992. Maintenance of nuclear-cytoplasmic polymorphism under dioecious reproductive systems. Journal of Theoretical Biology 154: 239-247.
- Maurice, S.; Charlesworth, D.; Desfeux, C.; Couvet, D.; y Gouyon, P. H. 1993. The evolution of gender in hermaphrodites of gynodioecy populations with nucleocytoplasmic male-sterility. Proceedings of the Royal Society of London B, Biological Sciences 251:253–261
- Monéger, F., P.Mandaron, M.F. Niogret, G. Freyssinet y R. Mache, 1992. Expression of mitochondrial genes during microsporogenesis in maize. Plant Physiology 99: 396–400.
- Muenchow, G. 1982. A loss of alleles model for the evolution of distyly. Heredity 49: 81-93.
- Muenchow G.E. and Grebus M. 1989. The evolution of dioecy from distyly, reevaluation of the hypothesis of the loss of long tongued pollinators. American Naturalist 133: 149–156.
- Nakajima, Y.; Yamamoto, T.; y Oeda K.1997. Genetic variation of mitochondrial and nuclear genomes in carrots revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD). Euphytica 95: 259-267.
- Nasrallah, J.B.; Kao, T.H.; Chen, C.-H.; Goldberg, M.L., y Nasrallah, M.E. 1987. Amino-acid sequence of glycoproteins encoded by three alleles of the S locus of *Brassica oleracea*. Nature 326, 617-619.
- Nettancourt, D. 1977. Incompatibility in angiosperms. Springer. Berlin. Heidelberg. New York. citado en: Evolution and function of heterostyly (ed. S.C.H. Barrett) Springer-Verlag, Berlin. Alemania, pp. 151–178.
- Nivison, H.; y Hanson, M. 1989, Identification of a mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in *Petunia*. The Plant Cell, Vol. 1: 1121-1130.
- Op den Camp, R.G. y Kuhlemeier, C. 1997. Aldehyde dehydrogenase in tobacco pollen. Plant Mol. Biol. 35(3): 355–365.
- Opler, P., Baker, H. y Frankie, G. 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.
- Ornduff, R. 1970. Incompatibility and the pollen economy of *Jepsonia parryi*. *American Journal of Botany*. 57: 1036-1041.
- Ornduff, R. 1979. The genetics of heterostyly in *Hypericum aegypticum*. *Heredity* 42:271-272.
- Ornduff, R. 1988. Distyly and monomorphism in *Villarsia* (Menyanthaceae) some evolutionary considerations. *Annals of Mo. Bot. Gard.* 75:1180-1206.
- Palmer, J.D.; Adams, K.L.; Cho, Y.; Parkinson, C.L.; Qiu, Y.L. y Song, K. 2000. Dynamic evolution of plant mitochondrial genomes: mobile genes and introns and highly variable mutation rates. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 97(13): 6960–6966.
- Pratap, Reddy, N. y Bur Bahadur. 1976. Heterostyly in *Nymphoides indica*. *Journal of Indian. Botanical. Society* 55: 133-140.
- Pring DR, Tang HV, Schertz KF (1995) Cytoplasmic male sterility and organelle DNAs of sorghum. En: Levings CS III, Vasil IK(eds) *The molecular biology of plant mitochondria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 461-495.
- Richards, J.H. y Barret, S.C.H. 1992. The development of heterostily. En: *Evolution and function of heterostyly*. (ed. S.C.H Barrett) Verlag, Berlin, Alemania, pp. 85-124.
- Richards, A.J. y Ibrahim, H. 1978. The estimation of neighborhood size in two populations of *Primula veris*. En: *The pollination of flowers by insects*. Richards, A. J. (Ed.) Academic Press, New York.
- Rosas, L.; Pérez-Alquicira, J y Domínguez, C. 2005. Environmentally induced variation in fecundity compensation in the morph-biased male-sterile distylous shrub *Erythroxylum havanense*. *American Journal of Botany* 92 (1): 116–122. 2005.
- Ross, M. D., and H. R. Gregorius. 1985. Selection with gene-cytoplasm interactions. II. Maintenance of gynodioecy. *Genetics* 109:427–439.
- Sakai, S. y Toquenaga. Y. 2004. Heterostyly: speciation within a species. *Population Ecology* 46:253–262
- Sarria, R.; Lyznik, A.; Vallejos, E.; Mackenzie, S. 1998. A Cytoplasmic Male Sterility–Associated Mitochondrial Peptide in Common Bean Is Post-Translationally Regulated. *The Plant Cell*, Vol. 10, 1217–1228.
- Sassa, H.; Hirano, H.; Ikehashi, H. 1993. Identification and characterization of stylar glycoproteins associated with self-incompatibility genes of Japanese pear, *Pyrus serotina* *Molecular and General Genetics*- Vol. 241,1:17- 25.

- Sato, Y. 1998. PCR amplification of CMS-specific mitochondrial nucleotide sequences to identify cytoplasmic genotypes of onion (*Allium cepa* L.) Theoretical and Applied Genetics 96: 367-370.
- Saumitou-Laprade, P., J. Cuguen y P. Vernet, 1994. Cytoplasmic male sterility in plants: molecular evidence and the nucleocytoplasmic conflict. Trends on Ecology and Evolution 9: 431–435.
- Schnable, P.S. y R.P. Wise, 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. Trends in Plant Science. 3(5): 175–180.
- Schultz, S. T. 1994. Nucleo-cytoplasmic male sterility and alternative routes to dioecy. Evolution 48: 1933–1945.
- Singh, M., and Brown, G.G. 1991. Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region. Plant Cell 3, 1349–1362.
- Sivaramakrishnan, S.; Seethal, K.; Nageshwar ,A.; y Laxman Singh. 1997. RFLP analysis of cytoplasmic male-sterile lines of pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] developed by interspecific crosses. Euphytica 93: 307-312.
- Small, I.D. y Peters, N. 2000. The PPR motif a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. Trends on Biochemical Science 25: 46–47.
- Smart, C.; Monéger, F. y Leaver, Ch. 1994. Cell-Specific Regulation of Gene Expression in Mitochondria during Anther Development in Sunflower. The Plant Cell, Vol. 6, 811-825
- Sohmer, S.H. 1977. *Psychotria* L. (Rubiaceae) in the Hawaiian islands. Lyonia 1: 103-186.
- Song, J y Hedgcoth, Ch. 1994. A chimeric gene (*orf256*) is expressed as protein only in cytoplasmic. Plant Molecular Biology. 26: 535-539.
- Tadege, M. y Kuhlemeier, C .1997. Aerobic fermentation during tobacco pollen development. Plant Molecular Biology. 35(3): 343–354.
- Tang, H.V.; Pring, D.R.; Shaw, L.C.; Salazar, R.A.; Muza, F.R.; Yan, B. y Schertz, K.F. 1996. Transcript processing internal to mitochondrial open reading frame is correlated with fertility restoration in male-sterile sorghum. Plant Journal 10(1): 123–133.
- Thompson, J.D. y Tarayre, M. 2000. Exploring the genetic basis and proximate causes of female fertility advantage in gynodioecious *Thymus vulgaris*. Evolution 54(5): 1510–1520.
- Touzet, P. y Budar, F. 2004. Unveiling the molecular arms race between two conflicting genomes in cytoplasmic male sterility? Trends in Plant Science Vol.9 No. 12, pp 568-569.

- Van Damme, J.M.M., 1983. Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. II. Inheritance of three male sterility types. *Heredity* 50:253–273.
- Van der Kley, F.K., 1955. Male sterility and its importance in breeding heterosis varieties. *Euphytica* 3: 117–124.
- Vázquez-Santana, S.; Domínguez C.A. y Márquez J. 1996. Embriología de *Erythroxyllum havanense*, Erythroxyllaceae, una especie heterostílica. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 59: 25–33.
- Vogel, S. 1955. Über den Blütendimorphism einiger südafrikanischer. Phanzen. *Oestern Bot. Z.* 102: 486-500, citado en Lloyd D.G. y Webb C.J. 1992(a) Evolution of heterostyly. En: *Evolution and function of heterostyly* (ed. S.C.H. Barrett) Springer-Verlag, Berlin. Alemania, pp. 151–178.
- Vuilleumier, B.S. 1967. The origin and evolutionary development of heterostyly in the Angiosperms. *Evolution.* 210-226.
- Webb, C. 1999. Empirical studies: evolution and maintenance of dimorphic breeding systems. En: *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants* (Geber, M.A. et al., eds), Springer-Verlag. Pp. 61–95
- Webb., C.J. y Lloyd. D.G. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. II Herkogamy.. *New Zealand Journal of Botany* 24:163-178.
- Wen, L. y Chase, C.D. 1999. Pleiotropic effects of a nuclear restorer-of-fertility locus on mitochondrial transcripts in male fertile and S male-sterile maize. *Current Genetics* 35(5): 521–526.
- Weng Zhonghua, Yanjiao Zou, Xiaoyu Li, Qunyu Zhang Letian Chen,<sup>a</sup> Hao Wu,<sup>a</sup> Dihua Su,<sup>a</sup> Yuanling Chen Jingxin Guo, Da Luo, Yunming Long, Yang Zhong, and Yao-Guang Liua, 2006. Cytoplasmic Male Sterility of Rice with Boro II Cytoplasm Is Caused by a Cytotoxic Peptide and Is Restored by Two Related PPR Motif Genes via Distinct Modes of mRNA Silencing *The Plant Cell*, Vol. 18, 676–687.
- Wise, R.P.; Bronson, C.R.; Schnable, P.S. y Horner, H.T. 1999a. The genetics, pathology and molecular biology of T-cytoplasm male sterility in maize. *Advances in Agronomy.* 65: 79–131.
- Wise, R.P.; Gobelman-Werner, K.; Pei, D.; Dill C.L. y Schnable, P.S. 1999b. Mitochondrial transcript processing and restoration of male fertility in T-cytoplasm maize. *Journal of Heredity* 90(3):380–385.
- Wong, K. C.; Watanabe, M.; Hinata K. 1994. Protein profiles in pin and thrum floral organs of distylous *Averrhoa carambola*. *Sexual Plant Reproduction.* Vol 7 (2): 107-115.
- Wyatt, R. 1983. Pollinator-plant interactions and the evolution of breeding systems. En: *Pollination Biology.* Academic Press, N.Y.

Young, E.G., and Hanson, M.R. 1987. A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated. *Cell* 50, 41–49.