



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN**

**TESIS**

**EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN Y VIABILIDAD  
DE POLEN DE MACHOS Y MACHOS FRUCTÍFEROS EN  
POBLACIONES SUBDIOICAS DE JACARATIA MEXICANA**

**Para obtener el grado de**  
Maestro en Ciencias en Biodiversidad y Conservación

**PRESENTA**

Biol. Christian Alan Carpio Hernández

**Director**

Dr. Luis Fernando Rosas Pacheco

**Comité tutorial**

Dra. Claudia Elizabeth Moreno Ortega

Dr. Eduardo Cuevas García

M. en C. Manuel González Ledesma

Mineral de la Reforma, Hidalgo, 2024



# Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

School of Engineering and Basic Sciences

Área Académica de Biología

Department of Biology

Mineral de la Reforma, Hgo., a 28 de febrero de 2024

Número de control: ICBI-AAB/130/2024

Asunto: Autorización de impresión.

## MTRA.OJUKY DEL ROCIO ISLAS MALDONADO DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

El Comité Tutorial del nombre del producto que indique el documento curricular del programa educativo de posgrado titulado **“Evaluación de la producción y viabilidad de polen de machos y machos fructíferos en poblaciones subdioicas de *Jacaratia mexicana*”**, realizado por el sustentante **Christian Alan Carpio Hernández** con número de cuenta **260003** perteneciente al programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

### AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que el sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente  
“Amor, Orden y Progreso”

Dr. Luis Fernando Rosas Pacheco  
Vocal



Dra. Claudia Elizabeth Moreno Ortega  
Presidente

Eduardo Cuevas G.

Dr. Eduardo Cuevas García  
Secretario

M en C. Manuel González Ledesma  
Suplente

LFRP/CIAF

Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184  
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 6640, 6642  
Fax 2112  
aab\_icbi@uaeh.edu.mx



## **Agradecimientos**

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y Colegio de Posgrado, particularmente agradezco al Centro de Investigaciones Biológicas y a la Maestría en Ciencias en Biodiversidad y Conservación, por haber aceptado mi candidatura al programa de posgrado y brindarme la oportunidad de seguirme formando académicamente.

Al Dr. Fernando Rosas, por siempre ayudarme a mejorar, a trabajar en mi mejor versión, exigiéndome, fomentando el aprendizaje y mostrando el camino para ser un buen estudiante. Agradezco también por ayudarme en todo momento a la realización del proyecto, pieza fundamental de esta tesis, todo fue posible gracias a usted, le agradezco mucho Doc.

A los miembros de mi comité tutorial, por sus atinados comentarios en cada reunión, por su amplio conocimiento y retribuir a mi proyecto con él, por su guía en la realización de esta tesis y ser magnos ejemplos a seguir. Agradezco a la Dra. Claudia Moreno, al M. en C. Manuel González, al Dr. Eduardo Cuevas, a todos gracias.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, a Patricia, amiga, enorme apoyo en campo, en experimentación y en vida, a Dieguito, gran colega y asistidor en la realización de mi proyecto, a Ely, por compartirme parte de su amplio conocimiento, a Oli, por su valioso soporte en campo, a Dante, Yesua, Ailyn, Irany y a todo el Laboratorio de Conservación, muchas gracias.

A mi familia, a mi jefa Lupita, a mis hermanas, Cami y Dali, y sobre todo a mi abuelita Conchita, por ser los pilares fundamentales en mi formación como ser humano y mis motores del día a día, sin ustedes yo sería nada. Una dedicatoria especial a Iorito, por hacer dichosos mis días.

A mis amigos, a Citla, por ser el sostén en mi formación como profesional y brindarme su apoyo, a Marquito y Juanitro, por la convivencia, alegrarme y aumentar mi autoestima, y a mi entrañable Kerubin, por su amistad de hace muchísimos años y motivarme como persona, amigos gracias.

Al Sr. Gerardo por la guía en campo y la recolección de frutos, y a los delegados de la estación “El Limón”, gracias.

A Luis Villanueva por su gran apoyo en mi estancia y al Laboratorio del Dr. Mauricio Quesada del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad (IIES-UNAM), Campus Morelia, gracias.

Al CONAHCYT por la beca de maestría CVU 955584 para que este proyecto haya sido posible.

## Índice

|   |    |
|---|----|
| Resumen.....  | 4  |
| Introducción.....                                       | 5  |
| Antecedentes .....                                      | 9  |
| Justificación.....                                      | 14 |
| Objetivos .....   | 14 |
| Hipótesis .....   | 15 |
| <b>Métodos</b>  |    |
| Especie de estudio .....                                | 16 |
| Sitio de estudio.....                                   | 17 |
| Caracterización y contraste de atributos florales ..... | 19 |
| Estimación de la fertilidad.....                        | 20 |
| <b>Resultados</b>                                       |    |
| Caracterización y contraste de atributos florales ..... | 24 |
| Estimación de los rasgos florales .....                 | 26 |
| Estimación de la fertilidad masculina.....              | 29 |
| Discusión.....  | 32 |
| Conclusión.....   | 39 |
| Bibliografía.....                                       | 40 |

## Resumen

En las angiospermas, la coexistencia de machos, hembras y hermafroditas, conocida como subdioicismo, sugiere una etapa tardía en la transición al dioicismo. Planteamientos teóricos indican que los machos requieren de una ventaja del doble o mayor, en la fertilidad masculina sobre los hermafroditas para establecer el dioicismo. Con el objetivo de poner a prueba este planteamiento se estimó la fertilidad masculina de machos y machos fructíferos (i.e. hermafroditas) de *Jacaratia mexicana* en cuatro poblaciones subdioicas de Huautla, Morelos. Se estimó la producción de polen por medio de un contador de partículas y técnica de acetólisis, la viabilidad de polen por germinación in vitro y se realizó un experimento de cruza con polen de ambos morfos para estimar el desempeño del polen en una planta femenina receptora. Además, se caracterizó el tamaño de las flores y las anteras, así como el peso, y número de flores por racimo. Los resultados muestran que los machos producen más flores por racimo (41 vs 32), mientras que los hermafroditas producen flores más grandes (130 vs 101 mm<sup>2</sup>) y de mayor peso (0.15 vs 0.12 g). No se detectaron diferencias entre machos y machos fructíferos en la producción de polen (59900 y 50200), su viabilidad (89 y 91 %) y el número de semillas por fruto que son producidos con polen de ambos morfos (707 y 719). La similitud de las variables que determinan la fertilidad masculina, indica que en *J. mexicana* los machos fructíferos no tienen una desventaja reproductiva frente a los machos puros. Además, debido a que la fertilidad masculina no parece estar restringida por la producción de frutos en los machos fructíferos, los resultados sugieren que el subdioicismo puede representar un sistema estable y no necesariamente una etapa tardía en la transición evolutiva al dioicismo.

## 1. Introducción

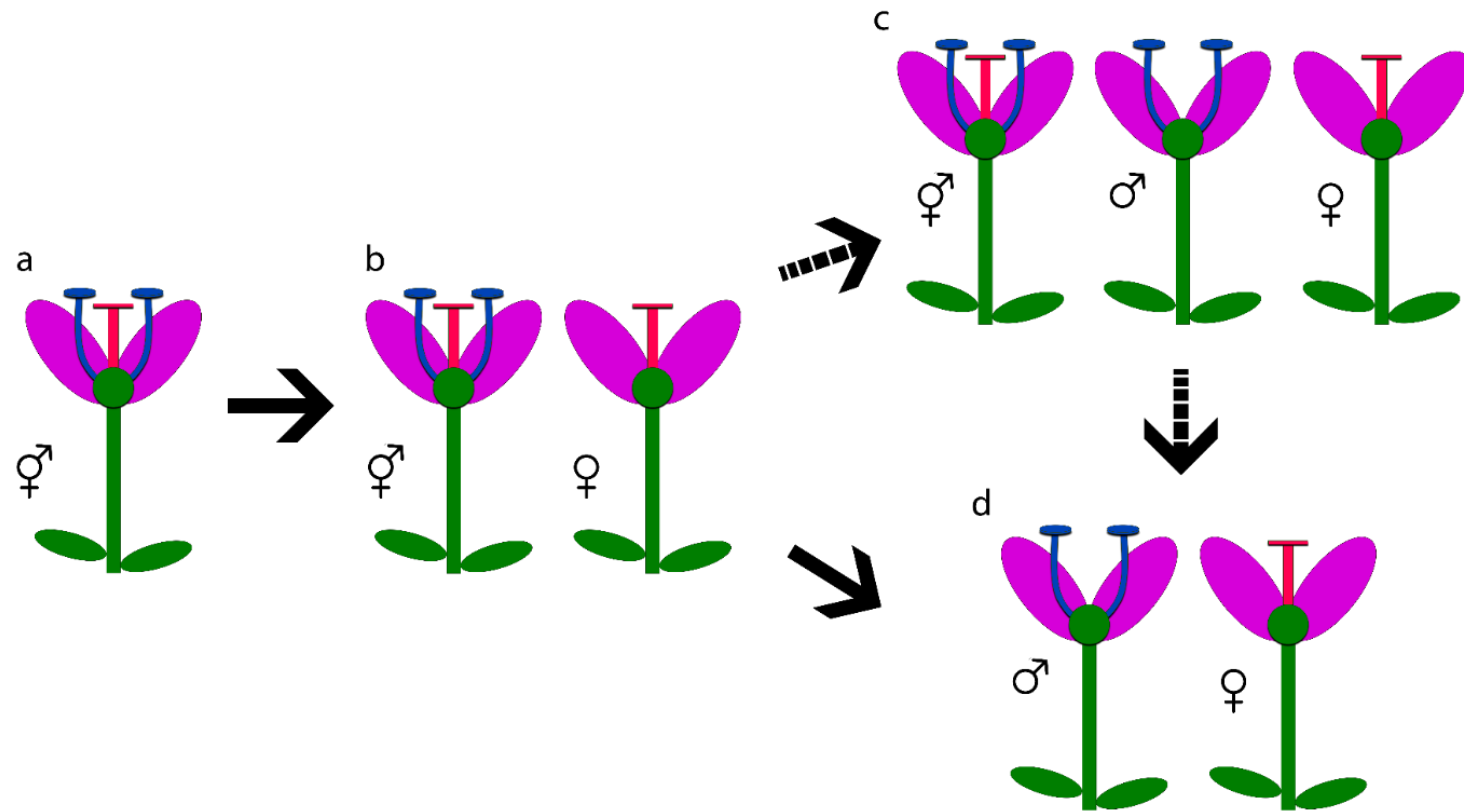
Las angiospermas constituyen un grupo muy diverso con cerca de 350,000 especies, que dominan los ecosistemas terrestres contemporáneos y son un modelo adecuado para estudiar diversos fundamentos biológicos como la reproducción sexual (Soltis et al., 2018). Uno de los elementos que contribuyen a esta diversidad en las angiospermas son los sistemas sexuales, que hacen referencia a la presencia/ausencia de órganos sexuales, y su disposición en diferentes niveles (intrafloral, poblacional y especie). Las flores pueden ser bisexuales con estambres (órganos masculinos) y pistilos (órganos femeninos), o unisexuales, con solo órganos masculinos o femeninos (Cardoso et al., 2018). De acuerdo a la distribución de estos arreglos florales dentro de la población, los sistemas sexuales se clasifican en dos tipos. En primer lugar, se encuentran los sistemas monomórficos, donde todos los individuos (plantas) producen ya sea flores perfectas (hermafroditismo) o bien flores pistiladas y estaminadas (monoicismo) en el mismo individuo. En segundo lugar, se encuentran los sistemas polimórficos, donde plantas con flores pistiladas o estaminadas coexisten con plantas de flores perfectas (ginodioicismo y androdioicismo, respectivamente), o bien donde solo plantas unisexuales con flores estaminadas o pistiladas coexisten en una población, sistema conocido como dioicismo (Barret, 2002; Barret & Crowson, 2016; Cardoso et al., 2018).

Debido a la segregación de las funciones sexuales en plantas individuales, el dioicismo es un sistema que se considera como una adaptación que favorece la polinización cruzada (entrecruza), y planteamientos teóricos proponen que este sistema ha sido el resultado de presiones selectivas que favorecen la especialización sexual de individuos de cada género, machos y hembras (Mangla et al., 2020). A nivel de especie el dioicismo es poco común comparado con el hermafroditismo (sistema sexual predominante en las angiospermas, en el que los individuos de una población presentan flores bisexuales o perfectas), ya que ocurre en cerca del 7% de plantas con flor, aunque está ampliamente distribuido en cerca del 40% de las familias de angiospermas (Renner, 2014).

Existen diferentes vías evolutivas por las que el dioicismo se origina a partir de la cosexualidad (hermafroditismo) en las angiospermas. Una de las principales vías es la conocida como ginodioicismo-dioicismo (G-D). En la fase inicial de esta ruta, una mutación de esterilidad masculina afecta una población hermafrodita, lo que propicia la presencia de hembras dentro de la población, el sistema resultante es conocido como ginodioicismo. En una fase posterior, una mutación de esterilidad femenina invade la población y da origen a los machos, y, eventualmente, los individuos unisexuales reemplazan a los hermafroditas remanentes. Este segundo paso a menudo puede implicar una etapa en la que los hermafroditas coexisten con hembras y machos, sistema sexual conocido como subdioicismo (Figura 1). Este sistema se ha reportado en al menos 37 especies, pero su estabilidad a lo largo del tiempo aún no está del todo clara (Barret & Crowson, 2016; Ehlers & Bataillon, 2007; Spigler & Ashman, 2012; Varga & Soulsbury, 2020).

La evolución al dioicismo (i.e. sexos separados) a partir del hermafroditismo requiere que dos mutaciones de esterilidad independientes afecten la fertilidad masculina y femenina, por ello se plantea que las especies o poblaciones donde ocurre el subdioicismo, representan una etapa de transición posterior a lo largo de la vía evolutiva ginodioicismo-dioicismo (Barret & Crowson, 2016; Charlesworth & Charlesworth, 1978; Darwin, 1877; Ehlers & Bataillon, 2007).





**Figura 1.** Esquema de la ruta evolutiva del ginodioicismo-subdioicismo-dioicismo: a) condición ancestral hermafrodita, b) ginodioicismo, c) subdioicismo, d) dioicismo. Imagen propia basada en Barret & Crowson, 2016.

Trabajos teóricos indican que el mantenimiento de individuos unisexuales, machos y hembras en poblaciones subdioicas, se debe a que estos presenten una ventaja en la fertilidad con respecto a los hermafroditas como forma de compensación de la pérdida de una función sexual. En general, la magnitud de dicha ventaja en el éxito reproductivo depende de la forma en que se heredan los genes de esterilidad. Bajo el modelo de herencia de esterilidad nuclear de la sexualidad, las hembras y los machos deben duplicar la adecuación femenina y masculina, respectivamente, frente a los hermafroditas. Esto se debe fundamentalmente a que las plantas unisexuales, en contraste con las hermafroditas contribuyen con genes a la siguiente generación exclusivamente por una de las dos vías sexuales. Debido a que los machos solo son capaces de donar polen, se espera que su fertilidad masculina sea al menos del doble que la de los hermafroditas (Ashman, 2006; Charlesworth & Charlesworth, 1978; Cuevas & Abarca, 2006; Lewis, 1941; Lloyd, 1975; McCauley & Brock, 1998; Panell, 2002; Spigler & Ashman, 2012).

Los componentes que determinan la fertilidad masculina involucran la producción y viabilidad de polen por antera, flor o planta, el número de flores, el éxito como donadores de polen y la sobrevivencia de su progenie (Ashman & Penet, 2007; Spigler & Ashman, 2012). El polimorfismo reproductivo que implica el subdioicismo con frecuencia involucra variación en las flores de los morfos sexuales de estos sistemas, y se ha mostrado que los atributos florales pueden estar correlacionados con una variación en la producción de granos de polen en machos y hermafroditas (Humeau et al., 2000; Ramsey & Vaughton, 2001; Phillipp et al., 2009; Wang et al., 2019; Wang et al., 2021).

Por lo tanto, la evaluación de los rasgos florales y de los componentes intrínsecos que determinan la fertilidad masculina de hermafroditas en contraste con la de machos puros en especies subdioicas, contribuye a una evaluación clara del éxito reproductivo de las plantas donadoras de polen, machos y hermafroditas (Mangla et al., 2019; Maurice & Fleming, 1995; Renner, 2014).

## 2. Antecedentes

Teóricamente, los individuos unisexuales requieren de una ventaja en la adecuación sobre los individuos hermafroditas para establecer satisfactoriamente el dioicismo a partir del subdioicismo. Sin embargo, existe muy poca evidencia empírica que dilucide estas ventajas en la fertilidad en sistemas subdioicos (Lewis, 1941; Lloyd, 1974, 1975; Ross, 1982; Spigler & Ashman, 2012).

Para conocer la información disponible en la literatura científica sobre la fertilidad de hembras, machos y hermafroditas de especies subdioicas, se realizó una búsqueda para el periodo 1990-2022 en el motor EBSCO-UNAM-Web Of Science. La búsqueda se implementó con las siguientes palabras clave: “subdioecy OR subdioecious OR polygamy OR polygamous OR trioecy OR trioecious AND pollen AND viability AND stamen AND germination AND fruit OR seed”. Se utilizaron los términos “trioecy, polygamy” dado que se han utilizado como sinónimos de subdioicismo para describir sistemas sexuales donde se presentan hembras, machos y diversas expresiones de hermafroditismo. Se encontraron 23 estudios en los que se estima y contrasta la fertilidad femenina y masculina, y se registró si se presentan ventajas por parte de los individuos unisexuales sobre los hermafroditas. Las publicaciones se relacionan principalmente con especies arbustivas o herbáceas perennes y de ambientes templados (Tabla 1).

**Tabla 1.** Evaluaciones de los componentes de la fertilidad de los tres morfos sexuales en poblaciones subdioicas. Wf (adecuación femenina), Wm (adecuación masculina); (X) Indica que no hay ventaja, (✓) Indica que existe una ventaja en la fertilidad por parte del morfo unisexual en contraste con los hermafroditas, (NE) Indica medición no evaluada. Método de medición: (\*) Producción de polen por antera o flor, (°) Viabilidad de polen, (°) Producción de estambres, (|) Producción de óvulos, (+) Producción de frutos, peso, tamaño y/o número de semillas, (-) Éxito parental, (=) Número de flores, (#) Biomasa asignada a la producción de polen y semillas. Los rasgos florales son estimados como tamaño de la corola, ovario, antera o estigma.

| Especie (Familia)                  | Wf  | Wm  | Forma de medición | R. florales |     | Forma de vida | Ciclo de vida | Tipo de clima | Referencia                                 |
|------------------------------------|-----|-----|-------------------|-------------|-----|---------------|---------------|---------------|--|
|                                    | ♀>♂ | ♂>♀ |                   | ♀>♂         | ♂>♀ |               |               |               |  |
| <b>Cactaceae</b>                   |     |     |                   |             |     |               |               |               |  |
| <i>Opuntia robusta</i>             | X   | ✓   | *                 | NE          | NE  | Cactácea      | Perenne       | Semidesértico | Del Castillo & Argueta, 2009               |
| <i>Pachycereus pringlei</i>        | ✓   | ✓   | * +               | X           | X   | Cactácea      | Perenne       | Desértico     | Fleming et al.,1994                        |
| <b>Caricaceae</b>                  |     |     |                   |             |     |               |               |               |  |
| <i>Jacaratia mexicana</i>          | ✓   | X   | + °               | ✓           | X   | Árbol         | Perenne       | Tropical      | Aguirre et al., 2007, 2009<br>Lezama, 2018 |
| <b>Caryophyllaceae</b>             |     |     |                   |             |     |               |               |               |  |
| <i>Silene acaulis</i>              | ✓   | ✓   | * = -             | ✓           | X   | Hierba        | Perenne       | Templado      | Phillipp et al., 2009                      |
| <i>Silene acaulis var. cenisia</i> | ✓   | X   | * ° +             | X           | X   | Hierba        | Perenne       | Ártico        | Maurice et al., 1998                       |
| <i>Schiedea globosa</i>            | ✓   | X   | *   +             | ✓           | X   | Arbusto       | Perenne       | Templado      | Sakai & Weller, 1991                       |
| <b>Clusiaceae</b>                  |     |     |                   |             |     |               |               |               |  |
| <i>Garcinia indica</i>             | X   | X   | °                 | X           | X   | Árbol         | Perenne       | Tropical      | Joseph & Murthy, 2014                      |
| <i>Clusia nemorosa</i>             | X   | X   | °                 | NE          | NE  | Árbol         | Perenne       | Tropical      | Lopes & Machado, 1998                      |
| <b>Colchicaceae</b>                |     |     |                   |             |     |               |               |               |  |

|                             |    |    |         |    |    |         |         |             |  |
|-----------------------------|----|----|---------|----|----|---------|---------|-------------|--|
| <i>Wurmbea dioica</i>       | ✓  | ✓  | * +     | ✓  | ✓  | Hierba  | Perenne | Templado    | Ramsey & Vaughton, 2001                |
| <b>Elaeagnaceae</b>         |    |    |         |    |    |         |         |             |  |
| <i>Hippophae rhamnoides</i> | ✓  | ✓  | * +     | NE | NE | Arbusto | Perenne | Templado    | Mangla et al., 2019                    |
| <b>Euphorbiaceae</b>        |    |    |         |    |    |         |         |             |  |
| <i>Mercurialis annua</i>    | ✓  | ✓  | #       | NE | NE | Hierba  | Añual   | Subtropical | Perry et al., 2012                     |
| <b>Malvaceae</b>            |    |    |         |    |    |         |         |             |  |
| <i>Dombeya ciliata</i>      | ✓  | ✓  | * ‘     | ✓  | ✓  | Árbol   | Perenne | Tropical    | Humeau et al., 2000                    |
| <b>Oleaceae</b>             |    |    |         |    |    |         |         |             |  |
| <i>Fraxinus excelsior</i>   | ✓  | ✓  | * +     | NE | NE | Árbol   | Perenne | Templado    | Albert et al., 2013                    |
| <i>Fraxinus excelsior</i>   | NE | ✓  | -       | NE | NE | Árbol   | Perenne | Templado    | Morand et al., 2003                    |
| <b>Pentaphragaceae</b>      |    |    |         |    |    |         |         |             |  |
| <i>Eurya japonica</i>       | ✓  | ✓  | * + -   | NE | NE | Arbusto | Perenne | Templado    | Wang et al., 2016<br>Wang et al., 2015 |
| <b>Plantaginaceae</b>       |    |    |         |    |    |         |         |             |  |
| <i>Hebe subalpina</i>       | ✓  | NE | +       | ✗  | NE | Arbusto | Perenne | Templado    | Delph, 1990                            |
| <b>Polygonaceae</b>         |    |    |         |    |    |         |         |             |  |
| <i>Coccoloba cereifeira</i> | ✓  | ✓  | * + ‘   | NE | NE | Arbusto | Perenne | Tropical    | Silva et al., 2008                     |
| <b>Resedaceae</b>           |    |    |         |    |    |         |         |             |  |
| <i>Ochradenus baccatus</i>  | ✓  | ✓  | # +     | NE | NE | Arbusto | Perenne | Desértico   | Wolfe & Shmida, 1997                   |
| <b>Rosaceae</b>             |    |    |         |    |    |         |         |             |  |
| <i>Dasiphora glabra</i>     | ✓  | ✗  | * +   = | ✗  | ✓  | Arbusto | Perenne | Templado    | Wang et al., 2021                      |
| <i>Dasiphora fruticosa</i>  | ✓  | ✓  | * +     | NE | NE | Arbusto | Perenne | Templado    | Wang et al., 2019                      |
| <b>Saxifragaceae</b>        |    |    |         |    |    |         |         |             |  |
| <i>Astilbe biternata</i>    | ✓  | NE | + “     | NE | NE | Hierba  | Perenne | Templado    | Olson, 2001<br>Olson & Ontonovics 2000 |

La fertilidad femenina se ha evaluado en hembras y hermafroditas mediante el contraste de la producción de óvulos y frutos (tamaño y peso), semillas (número y tamaño) y el éxito (viabilidad y germinabilidad) de la progenie (Spigler & Ashman, 2012). De un total de veinte estudios donde se evaluó la fertilidad femenina, en 18 las hembras presentan una ventaja sobre los hermafroditas, que en la mayoría de los casos (10) es de más del doble (Aguirre et al., 2007; Delph, 1990; Lezama, 2018; Mangla et al., 2019; Olson & Antonovics, 2000; Ramsey & Vaughton, 2001; Sakai & Weller, 1991; Silva et al., 2008; Wang et al., 2015; Wolfe & Shmida, 1997).

Por otra parte, la fertilidad masculina de machos y hermafroditas, ha sido evaluada considerando la asignación de recursos a la producción de flores y el número de anteras por flor. Evaluaciones más elaboradas han estimado múltiples componentes, como la producción y viabilidad de polen, o, mediante el uso de marcadores genéticos, la asignación de la paternidad de la progenie (Spigler & Ashman, 2012; Wang et al., 2016).

De todos los estudios (19) en los que se evalúa la fertilidad masculina de machos y hermafroditas, sólo en 13 casos los machos presentan una ventaja sobre los hermafroditas, dicha ventaja varía de 1.4 hasta ~10 veces (Del Castillo & Argueta, 2009; Fleming et al., 1994; Mangla et al., 2019; Maurice et al., 1998; Perry et al., 2012; Phillipp et al., 2009; Ramsey & Vaughton, 2001; Silva et al., 2008; Wang et al., 2019; Wang et al., 2021). Mediciones recientes de la fertilidad masculina en herbáceas (*Silene acaulis*) han mostrado que los machos pueden producir significativamente más granos de polen (1.21 más) y casi el doble (1.7) de granos de polen bien desarrollados (i.e. de mayor calidad) que los hermafroditas (Phillipp et al., 2009). Por su parte, Del Castillo & Argueta (2009), encontraron que en la cactácea *Opuntia robusta* los machos pueden tener hasta 6.5 veces mayor producción de polen por flor que los hermafroditas. En poblaciones del arbusto *Eurya japonica* los machos, presentan una ventaja de 1.41 en el éxito parental, con respecto de los hermafroditas (Wang et al., 2016). En contraste, en *S. latifolia*, se reportó que los hermafroditas presentan una alta especialización masculina, reflejada en una mayor producción de polen que los machos, pero no necesariamente de mayor calidad (Aonuma et al., 2021).

Los pocos estudios en los que se han evaluado ambos componentes de la fertilidad en los hermafroditas, es decir, tanto función masculina como femenina (Mangla et al., 2019; Olson, 2001; Olson & Ontonovics, 2000; Ramsey & Vaughton, 2001; Wang et al., 2016) revelan que puede existir una disyuntiva (i.e. tradeoff) entre funciones sexuales, particularmente un aumento en la fertilidad masculina puede conducir a una disminución en la función femenina (especialización sexual).

En 3 estudios en los que se evalúan rasgos florales relacionados con la fertilidad masculina, evidencian que el tamaño de anteras o corola pueden ser correlacionados positivamente con la ventaja en la fertilidad de los machos sobre los hermafroditas (Humeau et al., 2000; Ramsey & Vaughton, 2001; Wang et al., 2021).

En el caso particular de *Jacaratia mexicana* se ha encontrado que las hembras tienen una clara ventaja sobre los machos fructíferos (i.e. hermafroditas), específicamente producen un mayor número de frutos y semillas (hasta tres veces más), y mayor germinación y viabilidad de la progenie (Aguirre et al., 2007; Lezama, 2018) esto sugiere que el primer requisito en la transición al dioicismo, que requiere una ventaja en la fertilidad femenina de las hembras sobre los hermafroditas, se cumple.

Sin embargo, no existen estudios que examinen las diferencias en la fertilidad masculina, como producción y viabilidad de polen, de machos y hermafroditas en especies de árboles tropicales, donde se ha reportado que el dioicismo ocurre con mayor frecuencia (Renner, 2014; Vamosi & Vamosi, 2004). La evaluación de estos componentes de la fertilidad en árboles tropicales como *J. mexicana* permite conocer la magnitud de la fertilidad masculina y su variación entre morfos, discutir las implicaciones relacionadas con el mantenimiento (subdioicismo) o la especialización reproductiva de estas plantas (dioicismo), y a mejorar nuestra comprensión de la segregación de las funciones sexuales en plantas tropicales.

### **3. Justificación**

Las poblaciones subdioicas de *Jacaratia mexicana* en Huautla, Morelos constituyen un modelo adecuado para explorar planteamientos teóricos de especialización sexual masculina en poblaciones subdioicas y sus implicaciones evolutivas en el dioicismo. Particularmente en estas poblaciones se puede evaluar la producción y viabilidad de polen de machos y hermafroditas para contrastar la ventaja teórica en la fecundidad masculina de machos sobre hermafroditas. Los resultados del estudio pueden contribuir a mejorar la comprensión de la especialización sexual masculina de árboles tropicales, donde la segregación de las funciones sexuales ocurre con mayor frecuencia, tal como ocurre en la familia Caricaceae.

### **4. Objetivos**

#### **General**

Obtener estimaciones de la fertilidad masculina relativa de machos y machos fructíferos a través de la producción y viabilidad de polen que permitan evaluar la magnitud de la ventaja teórica en la fertilidad masculina de machos sobre hermafroditas.



## **Específicos**

- Caracterizar y comparar los atributos florales relacionados con la producción de polen de machos y hermafroditas.
- Estimar el peso y número de flores de machos y hermafroditas.
- Estimar la producción y la viabilidad de ambos morfos.
- Contrastar los estimadores de la fertilidad de ambos morfos sexuales para obtener un estimador de la fertilidad masculina relativa.

## **5. Hipótesis**

La presencia de hembras receptoras de polen en las poblaciones favorece la selección de hermafroditas como donantes de polen. Por lo tanto, se espera que, debido a esta especialización en la función masculina, la producción y viabilidad de polen de hermafroditas sea similar en magnitud a la de los machos. Pero si la producción de frutos limita el ejercicio de ambas funciones sexuales, se puede esperar que la fertilidad masculina (producción y viabilidad) sea menor en las hermafroditas en contraste con la de los machos.

## 6. Métodos

### Especie de estudio

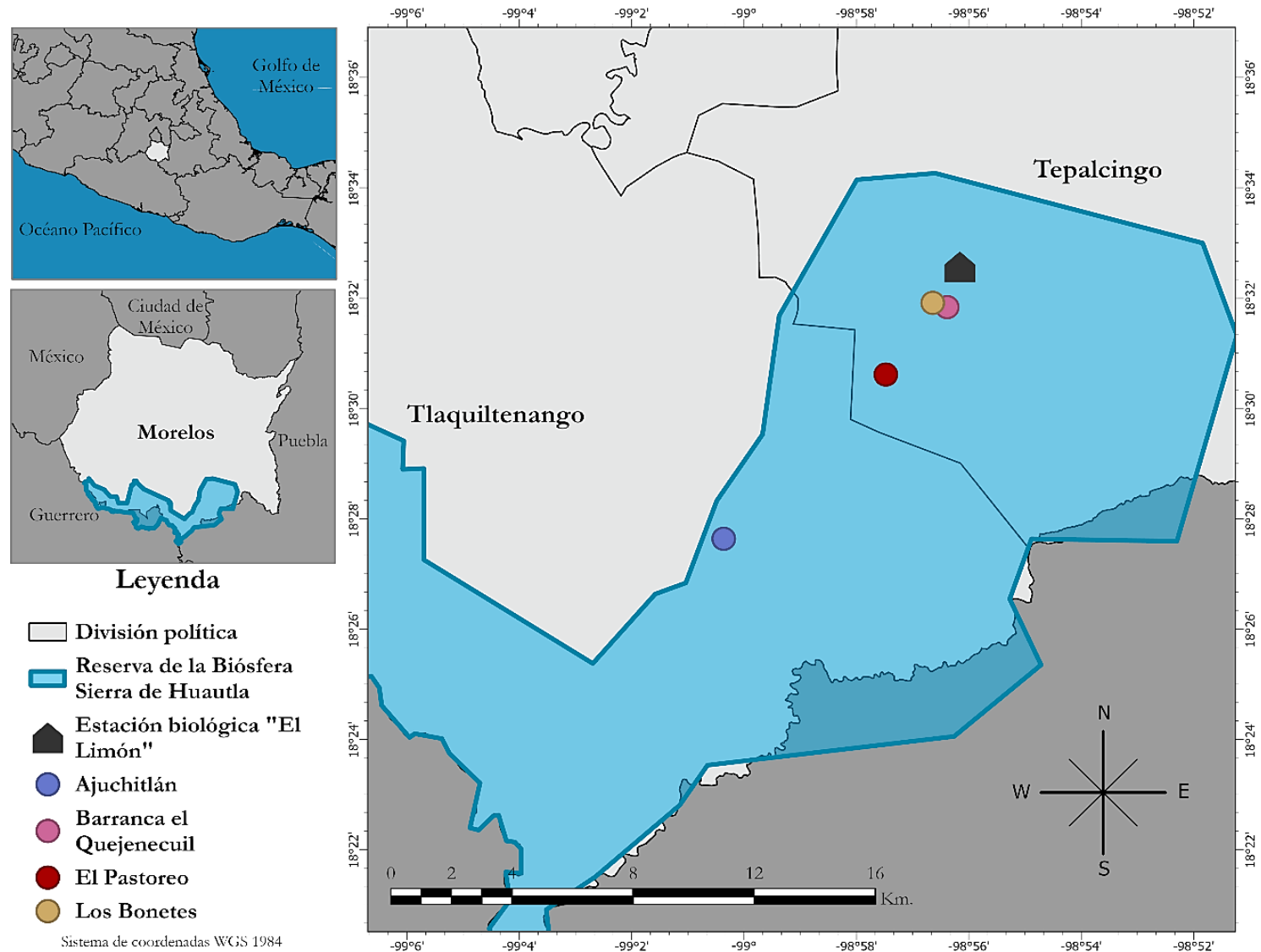
La familia Caricaceae (Brassicales) comprende seis géneros y cerca de 35 especies, e incluye a *Jacaratia mexicana*. Los miembros de esta familia se encuentran distribuidos principalmente en las zonas tropicales de América, desde México, hasta Argentina y Chile, con la excepción de un solo género en África central (*Cylicomorpha*). La familia comprende árboles, arbustos y hierbas perenes de frutos carnosos, en los que los sistemas sexuales varían, en su mayoría son dioicas, aunque raramente subdioicas. En el margen norte del área de distribución de la familia, es decir, en México, *Jarilla*, *Horovitzia* y *J. mexicana* crecen en bosques tropicales caducifolios (Kubitzki, 2003).

*Jacaratia mexicana* es una especie de árbol tropical descrito como dioico, nativo de los bosques tropicales caducifolios en el sur y centro de México, distribuido en los estados de Campeche, Chiapas, Colima, Guerrero, Michoacán, Morelia, Oaxaca, Yucatán y Veracruz. De hasta 20 m de alto y tallo de hasta 80 cm de diámetro (Pennington & Sarukhán, 2005). La floración ocurre de noviembre a febrero cuando los árboles han perdido todo su follaje. Existen diferencias significativas en el tamaño de las flores estaminadas y pistiladas, donde las femeninas son hasta tres veces más grandes que las masculinas. Las flores masculinas son las únicas que producen pequeñas cantidades de néctar y ambos tipos de flor producen similares fragancias. Observaciones muy generales señalan que los principales visitantes florales son las polillas esfíngidas (Sphingidae) y abejas nocturnas (Megalopta, Halictidae). La fructificación ocurre de enero a mayo y los frutos son de color verde cuando maduran (Aguirre et al. 2009).

A pesar de ser una especie arbórea dioica, con individuos unisexuales hembras y machos, en la Sierra de Huautla, Morelos, se presentan poblaciones subdioicas, donde coexisten tres morfos sexuales, hembras, machos y hermafroditas o “machos fructíferos”. Las poblaciones se distribuyen principalmente en alturas que van desde los 1093 a los 1276 msnm, en parches asociados a cañadas y cauces de arroyos estacionales (Aguirre et al., 2007). De acuerdo a Aguirre et al., (2009) los árboles femeninos poseen flores solo pistiladas en la parte apical de ramas reproductivas; los árboles masculinos presentan solo flores estaminadas dispuestas en panículas, y los machos fructíferos presentan tres tipos de flores: perfectas, pistiladas y estaminadas.

### **Sitio de estudio**

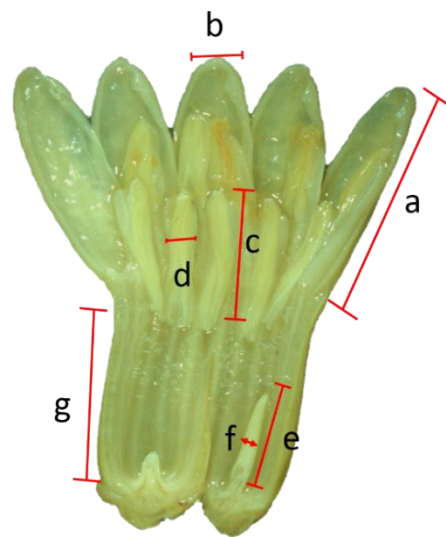
En este estudio se evalúan los componentes de fertilidad masculina de machos y machos fructíferos de *Jacaratia mexicana* de cuatro localidades: Los Bonetes, Barranca El Quejenecuil, Ajuchitlán y El Pastoreo (Figura 2) en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla (REBIOSH) del estado de Morelos, México. La reserva tiene una superficie de 59,030 hectáreas, presenta clima cálido subhúmedo, régimen de lluvias de verano y canícula, oscilación de temperaturas medias entre 7° y 14°C, con la temperatura más alta en mayo que oscila entre 26° y 27°C. En la región predomina la selva baja caducifolia, bosque tropical caducifolio o selva seca (CONANP, 2005).



**Figura 2.** Ubicación geográfica de la Reserva de la Biósfera Sierra de Huautla, Morelos, con las cuatro localidades muestreadas. Imagen propia.

### Caracterización y contraste de atributos florales

Se caracterizaron atributos de flores estaminadas relacionados con la producción de polen de machos y machos fructíferos de *Jacaratia mexicana*. Esta caracterización se realizó con material previamente colectado en las localidades de Los Bonetes, Barranca el Quejenecuil, Ajuchitlán, y El Pastoreo en la temporada de floración del 2019. Las muestras incluían tres flores de cada uno de tres individuos por morfo en cada localidad, para un total de 72 flores. Con el empleo de un microscópico estereoscópico y el programa tpsDig versión 2.31, para cada flor se midió el largo y ancho de los sépalos, el número de anteras por flor, el ancho y largo de las anteras, así como el largo y ancho del pistilo rudimentario (Figura 3). Además, se calculó el tamaño de los sépalos, de las anteras y del pistilo rudimentario mediante la multiplicación del largo por el ancho, y se realizó un análisis de varianza (en un modelo donde se examina el efecto del morfo y del morfo anidado en el sitio) para cada rasgo floral medido y la prueba post hoc de Tukey-Kramer para comparar las medias. Se empleó el programa JMP® Pro versión 16 (2021) para esta y las demás pruebas estadísticas realizadas en este estudio.



**Figura 3.** Corte longitudinal de flor estaminada de macho. a) Longitud del sépalo, b) Ancho de la punta del sépalo, c) Longitud de la antera superior e inferior, d) Ancho de la antera superior e inferior, e) Longitud del pistilo rudimentario, f) Ancho del pistilo rudimentario, g) Longitud del tubo de la corola, mediciones en micrómetros. Fotografía: Dr. Fernando Rosas.

## **Estimación de la fertilidad**

### *Producción de flores (peso y número de flores por racimo)*

Como primer acercamiento a la fertilidad se realizó una estimación del número de flores por racimo en la temporada de floración de 2022. Para ello se colectaron 3 racimos de aproximadamente la misma longitud (10 cm) de 5 individuos por morfo en cada localidad, que se utilizaron para contar el número de flores en un total de 120 racimos. De dichos racimos se colectaron 200 flores en total, cinco flores por individuo de cada morfo por localidad. Las flores fueron pesadas y se conservaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml con FAA (Formaldeído, Alcohol, Ácido acético) para ocuparlas posteriormente en las estimaciones de producción y viabilidad de polen. El peso y número de flores se analizaron mediante la prueba de ANOVA (en un modelo que explora el efecto del morfo y del morfo anidado en la localidad).

### *Estimación de la cantidad de polen*

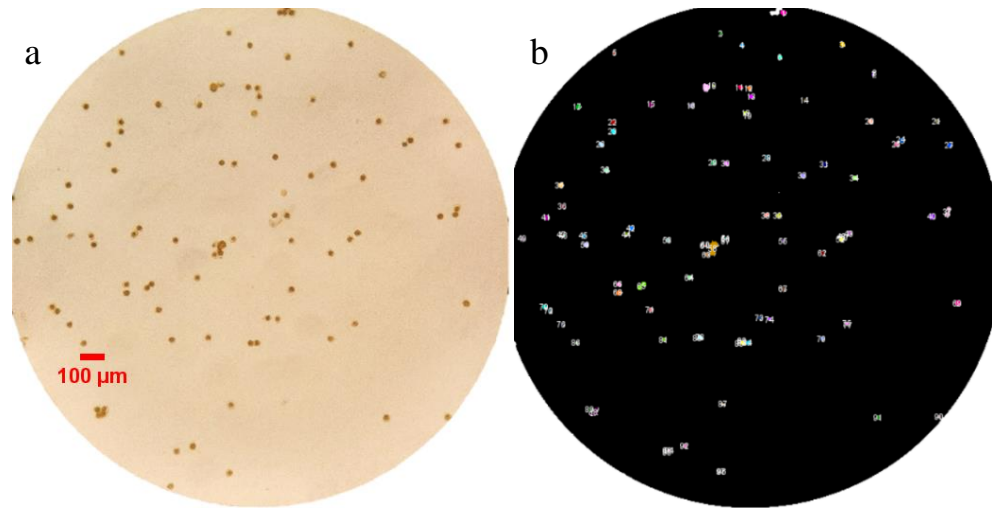
Para la producción de polen se implementaron un par de estimaciones utilizando muestras florales de dos temporadas reproductivas diferentes (2019 y 2022), pero provenientes de las mismas localidades. Este ejercicio permite verificar la consistencia de las estimaciones de la producción de polen y su comparación entre morfos.

### *Temporada 2019*

Para esta estimación se utilizaron 96 flores de la temporada de floración de 2019, 3 flores de 4 individuos por morfo en cada localidad. Se estimó la cantidad de polen contenido en suspensión de una antera por flor mediante la técnica de acetólisis (Erdtman, 1969, modif. Fonnegra, 1989) y conteo de granos por fotografías.

Mediante la técnica de acetólisis se extrajeron los granos de polen de una antera en tubos de Eppendorf que contenían una mezcla de ácido sulfúrico y anhídrido acético.

De cada tubo resultante se resuspendió el contenido en 0.5 ml de agua y se tomó una alícuota de 5 microlitros que se colocó sobre un portaobjetos. Posteriormente, se realizó un conteo de los granos de polen mediante el empleo de un microscopio óptico a 20x, se realizaron 5 réplicas y se tomó una fotografía por preparación. El conteo de granos de polen por imágenes fue realizado con apoyo del programa ImageJ versión 1.53 que realiza el conteo de manera automática (Figura 4).



**Figura 4.** a) Fotografía de los granos de polen de macho de *Jacaratia mexicana* contenidos en una alícuota, aumento 20x. b) Fotografía procesada en ImageJ señalizando el conteo. Imagen propia.

### *Temporada 2022*

Para una estimación más completa de la producción de polen, en la temporada reproductiva de 2022 se colectaron y se utilizaron 96 flores procesadas bajo el mismo método que el apartado anterior. A estas se les extrajo el polen de la siguiente manera: se extirparon 2 anteras por cada flor, mismas que fueron puestas en tubos Eppendorf de 1.5 ml y secadas en un SpeedVac por 30 minutos a secado alto. Posteriormente se agitaron en un Vortex por 10 minutos a 3600 rpm, se removieron las anteras y luego pasaron por una microcentrífuga Eppendorf por 15 minutos a 13500 rpm hasta que quedó un pellet con los granos de polen en el fondo. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Ecología Evolutiva en la IIES-UNAM donde a los tubos se les añadió 1.5

ml de solución salina al 2%. Una vez hidratadas las muestras se colocaron en una copa con 150 ml de la misma solución para ser analizadas en el contador de partículas Elzone II 5390. El contador succiona 12 ml en 30 segundos por lo que se tomaron 3 medidas repetidas por cada muestra para analizar el número de granos de polen. Se tomó el promedio de las tres medidas y se extrapoló a la medida de 150 ml del vaso. El diámetro del grano de polen de *Jacaratia mexicana* oscila de 20 a 40 micras por lo que el conteo de granos de polen en cada muestra considera únicamente los valores dentro de este rango.

Los datos de ambas estimaciones de polen se analizaron utilizando un modelo de ANOVA o la prueba no paramétrica equivalente de Wilcoxon y Kruskal-Wallis para probar el efecto del morfo y del morfo anidado en el sitio sobre las variables de respuesta.

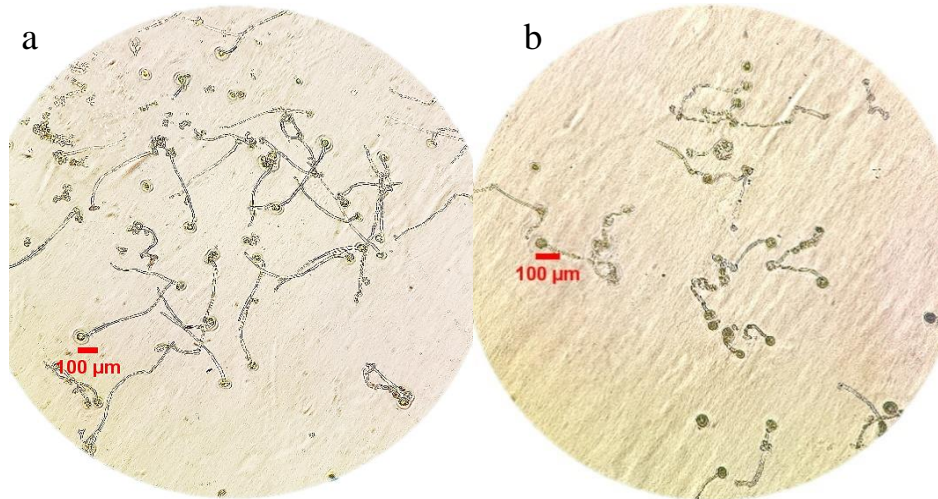
#### *Estimación de la viabilidad de polen por germinación in vitro*

Para obtener estimaciones de la viabilidad del polen y de la fertilidad de los donadores de polen, de las flores empleadas en el apartado anterior se utilizaron 80, 5 flores de 2 individuos por morfo sexual en cada localidad que fueron sometidas a una prueba de viabilidad *in vitro* utilizando el medio de cultivo BrewBaker & Kwack (1963). Dicho medio contiene una base de agua destilada con sacarosa al 5%, 200 mg de CaNO<sub>3</sub>, 100 mg de MgSO<sub>4</sub>, 200 mg de KNO<sub>3</sub> y 100 mg de ácido bórico, sobre una base de agar al 1% (Cohen et al., 1989).

A cada flor se le extrajo el polen golpeando suavemente las anteras tres veces con la ayuda de un palillo y asegurándose de colocarlo sobre el medio de cultivo sólido dentro de cajas Petri. Las cajas se dejaron cerradas a una temperatura ambiente de 20 a 24°C por 24 horas, después se procedió con el conteo de granos de polen. El conteo se realizó donde se esparcieron los granos de polen en el medio de cultivo y estos se consideraron como fértiles si emitían un tubo polínico de igual o mayor magnitud que el diámetro del grano de polen, de lo contrario se consideraron no fértiles (Figura 5) (Ordoñez, 2014; Rodríguez & Dafni, 2000).



Finalmente, se obtuvieron los porcentajes de germinación que se analizaron mediante pruebas estadísticas no paramétricas de Wilcoxon y Kruskal-Wallis para evaluar el efecto del morfo y la localidad.



**Figura 5.** Granos de polen de a) macho y b) macho fructífero de *Jacaratia mexicana* en medio de cultivo emitiendo tubos polínicos, aumento 20x. Imagen propia.

#### *Cruzas manuales con polen de machos y machos fructíferos*

Para examinar la fertilidad del polen de una manera más directa y conocer cómo es la progenie de machos y machos fructíferos cuando su polen es usado en cruzas, se llevó a cabo un experimento donde se realizaron 16 cruzas manuales, 8 cruzas con polen de macho y 8 con polen de macho fructífero. Como planta receptora se seleccionó una hembra en la que se implementaron las polinizaciones manuales utilizando polen de un macho y de un macho fructífero de cada una de las cuatro localidades estudiadas.

Para las cruzas se excluyeron 16 botones florales usando bolsas de organza para evitar que fueran polinizados de manera natural. Una vez que los botones abrieron y el estigma era receptivo, se suministró polen de tres flores por donador con sumo cuidado de cubrir totalmente el estigma. Después de realizar la polinización manual, las bolsas se cerraron y se esperó a la producción de frutos con semillas fecundadas por un solo progenitor paterno de identidad conocida.

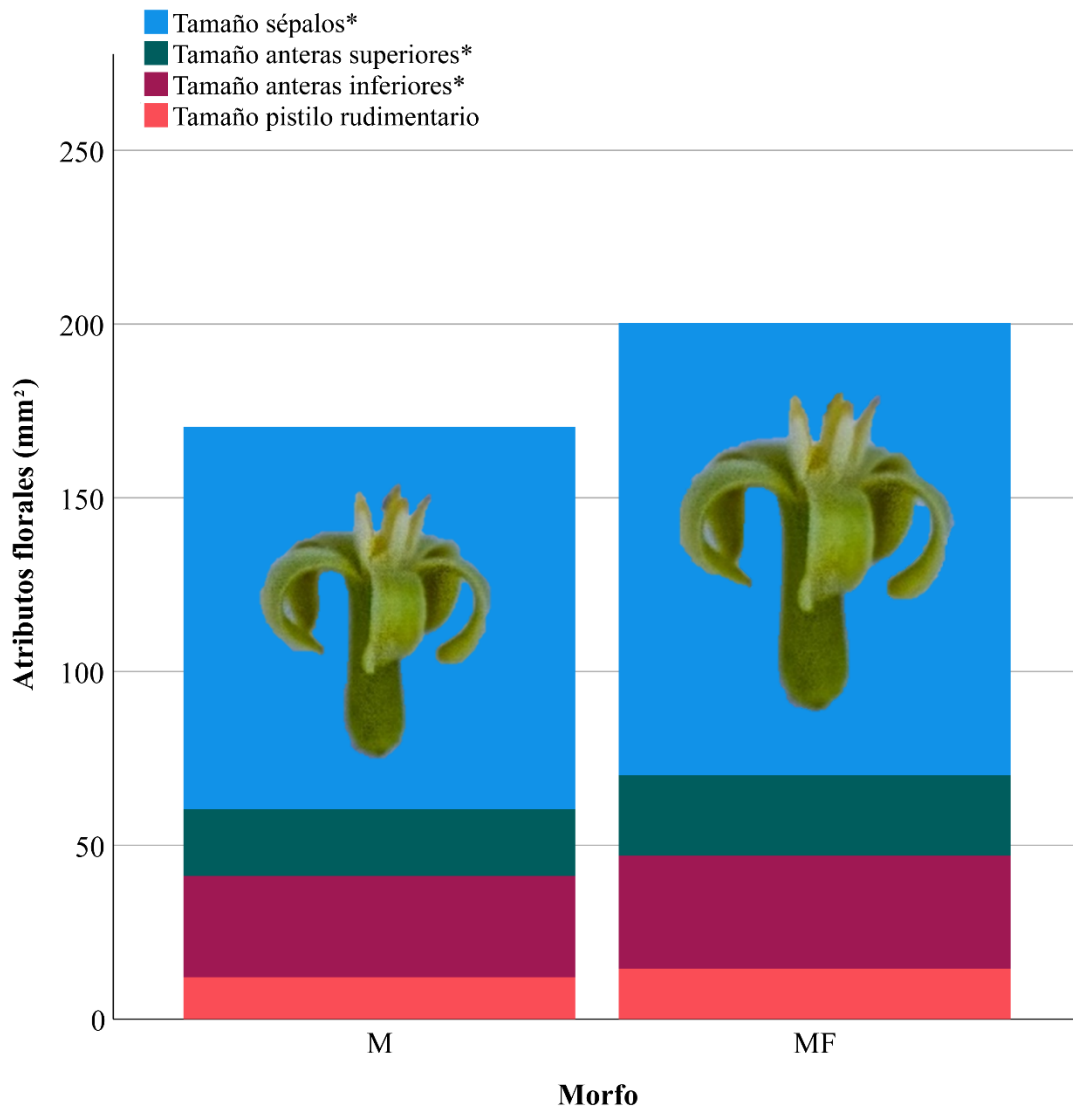
Durante la temporada de fructificación, aproximadamente 6 meses después de la polinización manual, se colectaron los frutos derivados de las cruas manuales, y se registró su peso y el número de semillas por fruto. Asimismo, se extrajeron 20 semillas de cada fruto que se pesaron individualmente para obtener un estimado de la biomasa de semillas paternizadas por machos y machos fructíferos.

## 7. Resultados

### Caracterización y contraste de atributos florales

La medición de las flores estaminadas revela que los machos fructíferos tienen flores que son ligeras pero significativamente de mayor tamaño que las flores de los machos (Figura 6). Para tres de cuatro atributos florales el análisis de varianza mostró un ajuste significativo del modelo utilizado ( $F_{7,71} \geq 2.3$ ,  $p < 0.05$ , en los tres casos). El análisis muestra que el morfo, pero no el morfo anidado en la localidad tiene un efecto significativo en el tamaño de los sépalos, así como en el tamaño de las anteras superiores e inferiores ( $F_{1,64} \geq 6.7$ ,  $p < 0.05$  en los tres casos). El tamaño de los sépalos y de las anteras son significativamente más grandes en las flores de los machos fructíferos ( $t > 1.9$ ,  $p < 0.05$ ) que en las flores de los machos puros.

El único rasgo floral que varió significativamente entre localidades (localidad[morfo]) fue el tamaño de los sépalos ( $F_{6,64} = 5.61$ ,  $p < 0.05$ ), específicamente los machos fructíferos de Los Bonetes tienen flores con sépalos que son hasta 1.8 veces más grandes que los observados en los machos de Ajuchitlán ( $p < 0.05$ ).



**Figura 6.** Comparación de los rasgos florales de machos y machos fructíferos de *J. mexicana*. La estimación del “tamaño” de los atributos florales está descrita en los métodos y representa el área en mm<sup>2</sup>. M=machos, MF= machos fructíferos. \*Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

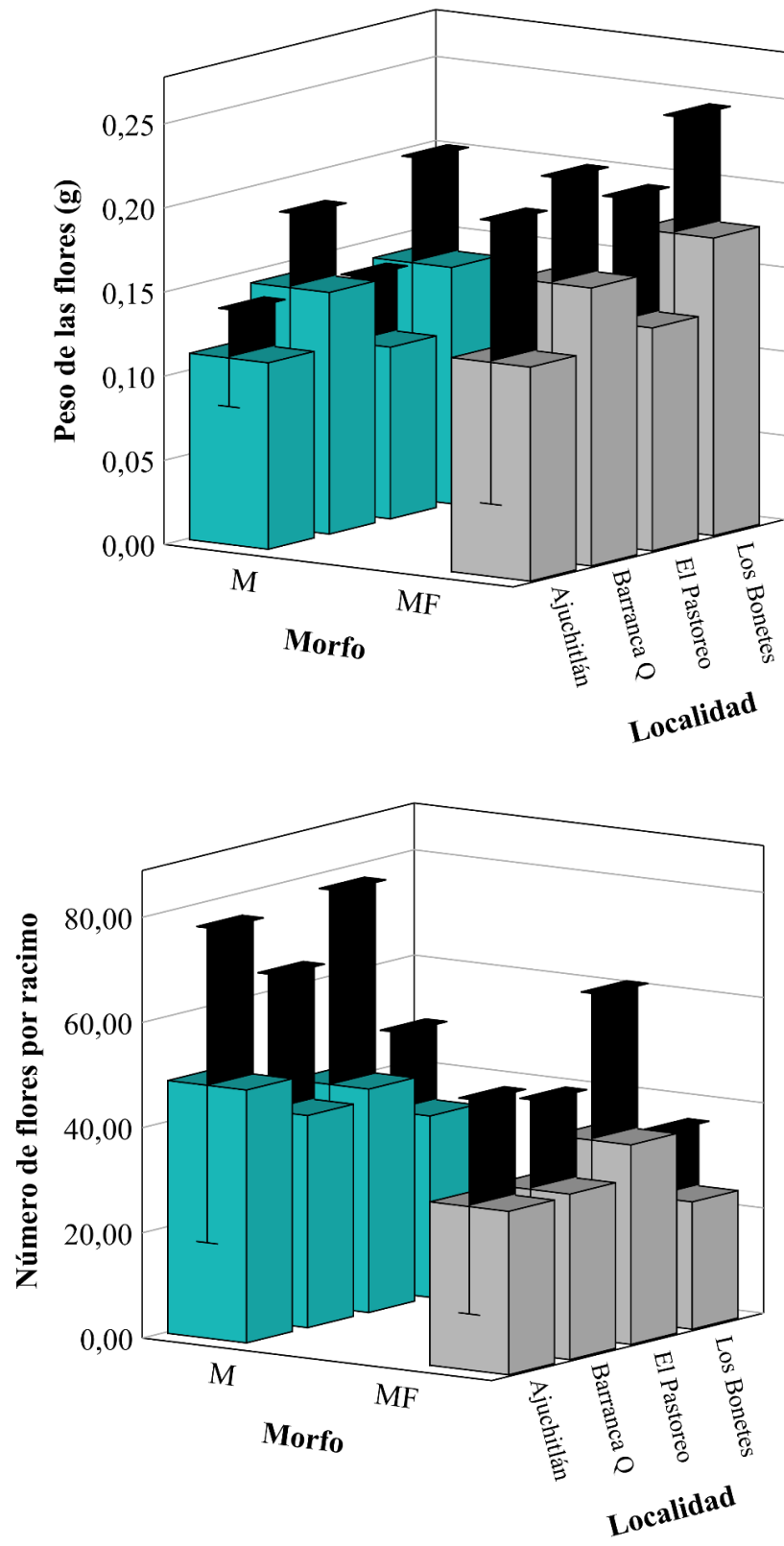
## Estimación de los rasgos florales

### *Peso y número de flores por racimo*

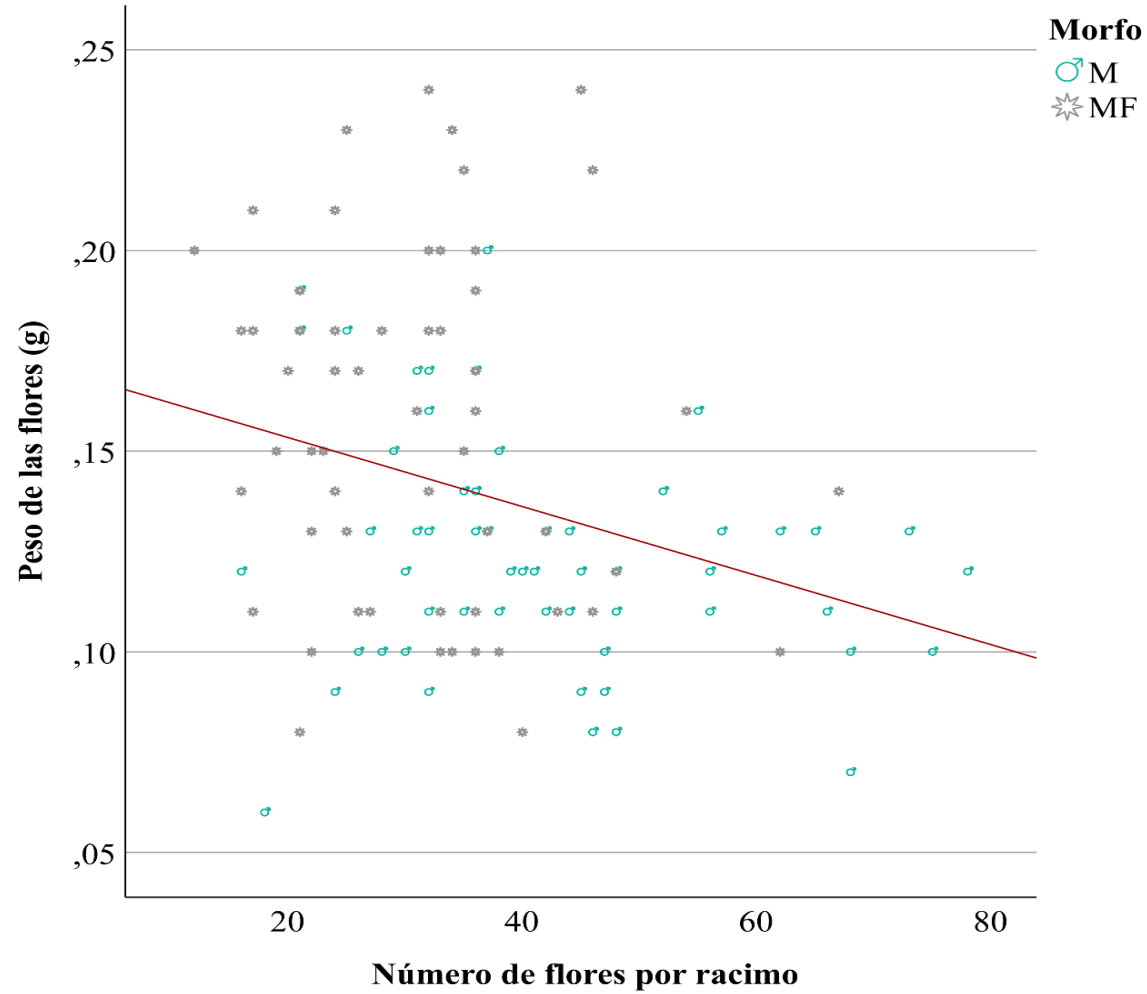
Los datos del peso de las flores fueron transformados (SHASH “seno-arcoseno”) para realizar el análisis de ANOVA. El modelo implementado mostró un ajuste significativo ( $F_{7,199}=17.52$ ,  $p<0.05$ ). El análisis de los factores muestra que el morfo tiene un efecto en el peso de las flores ( $F_{1,192}=18.17$ ,  $p<0.05$ ), pues este es significativamente mayor (Figura 7) para las flores estaminadas de los machos fructíferos (0.15 g) que para las flores de los machos (0.12 g) ( $t=1.97$ ,  $p<0.05$ ). De igual manera el análisis revela que la localidad (localidad[morfo]) tiene un efecto significativo ( $F_{6,192}=15.75$ ,  $p<0.05$ ), la prueba de contraste (Tukey-Kramer) muestra que los machos fructíferos de Los Bonetes pueden producir flores que son hasta 1.65 veces más pesadas que las de los machos de El Pastoreo ( $p<0.05$ ).

Para el número de flores por racimo se utilizó el logaritmo natural de los datos para realizar el análisis de ANOVA. El modelo reveló un ajuste significativo ( $F_{7,119}=5.75$ ,  $p<0.05$ ). El análisis de varianza muestra que el morfo tiene un efecto significativo ( $F_{1,112}=21.49$ ,  $p<0.05$ ) en el número de flores por racimo (Figura 8). Los machos tienen significativamente más flores ( $t=1.98$ ,  $p<0.05$ ) que los machos fructíferos, 41 y 32, respectivamente. El modelo también revela que existe un efecto significativo ( $F_{6,112}=3.11$ ,  $p<0.05$ ) asociado a la localidad (localidad[morfo]). La prueba posterior Tukey-Kramer deleva que los machos de Ajuchitlán tienen racimos con hasta 1.9 veces más flores que los racimos de machos fructíferos de Los Bonetes ( $p<0.05$ ).

Además, debido a que difícilmente se pueden incrementar al mismo tiempo el peso y el número de flores en un racimo, se exploró la forma en que ambas variables se relacionan. Se encontró una correlación negativa débil pero significativa ( $F_{1,118} = 11.99$ ,  $p<0.05$ ,  $R^2=0.1$ ) entre el peso de las flores y el número de flores por racimo (Figura 9), lo que sugiere la existencia de una disyuntiva en la cantidad de recursos que se pueden asignar para la producción vs el tamaño de las flores.



**Figura 7 y 8.** Peso de las flores (g) y número de flores por racimo de *Jacaratia mexicana* por localidad y por morfo sexual. Se reporta la media y la desviación estándar ( $\pm$ DE).



**Figura 9.** Gráfico de dispersión que muestra la correlación entre el peso de las flores (g) y el número de flores por racimo de machos y machos fructíferos en *Jacaratia mexicana*. Se muestra una relación negativa relativamente débil pero significativa ( $R^2=0.1$ ,  $F_{1,118} = 11.99$   $p<0.05$ )

## **Estimación de la fertilidad masculina**

### *Estimación de la cantidad de polen/ antera*

En los ejemplares colectados y analizados en la temporada de floración de 2019, el número promedio de granos de polen por alícuota fue de 101 y 96 para machos y machos fructíferos respectivamente. La prueba de Wilcoxon revela que no existen diferencias significativas entre morfos ( $Z=0.69$ ,  $p>0.05$ ), sin embargo, la prueba de Kruskal-Wallis muestra que la localidad tiene un efecto significativo ( $X_{i3}=10.30$ ,  $p<0.05$ ). La comparación múltiple no paramétrica de Wilcoxon deleva que el número de granos de polen por muestra es 1.3 y 1.2 veces mayor, respectivamente, en Ajuchitlán y Los Bonetes que en Barranca El Quejenecuil y El Pastoreo ( $p<0.05$ ).

En las muestras colectadas y analizadas en la temporada de floración de 2022 y utilizando un contador de partículas, se observó un resultado que es consistente con el obtenido con base en las muestras de la temporada de floración de 2019. El número de granos de polen por antera fue de 5 990 y 5 022 para machos y machos fructíferos. Si el número de granos de polen por antera es relativamente constante para las diez anteras de una flor, entonces la cantidad estimada de polen por flor es de 59 900 y 50 200 para machos y machos fructíferos respectivamente. El modelo de ANOVA mostró un ajuste significativo ( $F=7, 95= 11.44$ ,  $p<0.05$ ), donde el morfo no tiene efecto en el número de granos de polen ( $F_{1,88}=2.58$ ,  $p>0.05$ ) pero sí el morfo anidado en la localidad (localidad[morfo]) ( $F_{6,88}=12.92$ ,  $p<0.05$ ). La prueba posterior (Tukey-Kramer) deleva que los machos y machos fructíferos de Los Bonetes producen en promedio hasta 3 veces más granos de polen que los machos y machos fructíferos de El Pastoreo ( $p<0.05$ ) (Figura 10).

### *Estimación de la viabilidad de polen por germinación in vitro*

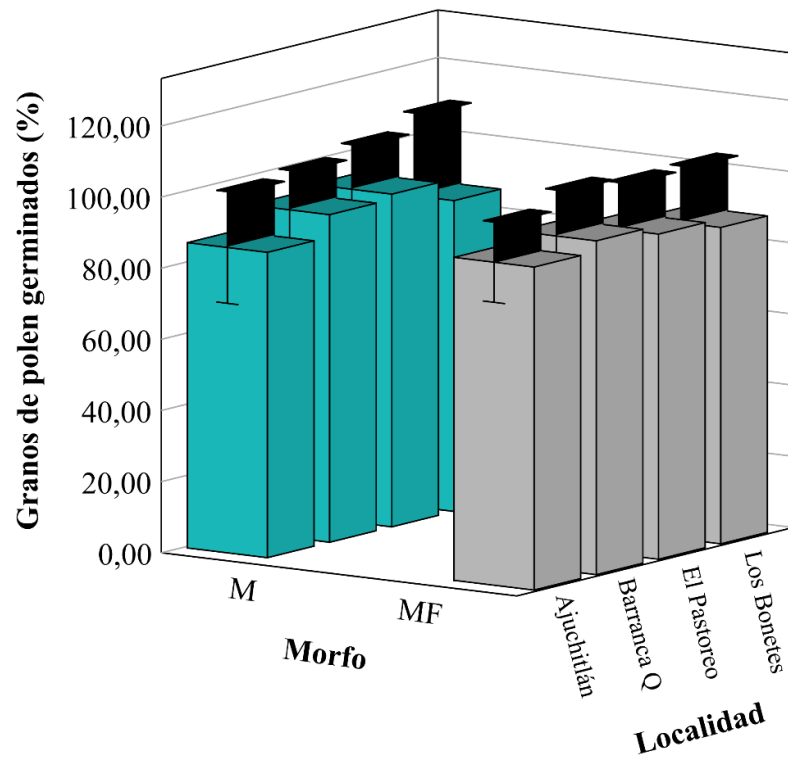
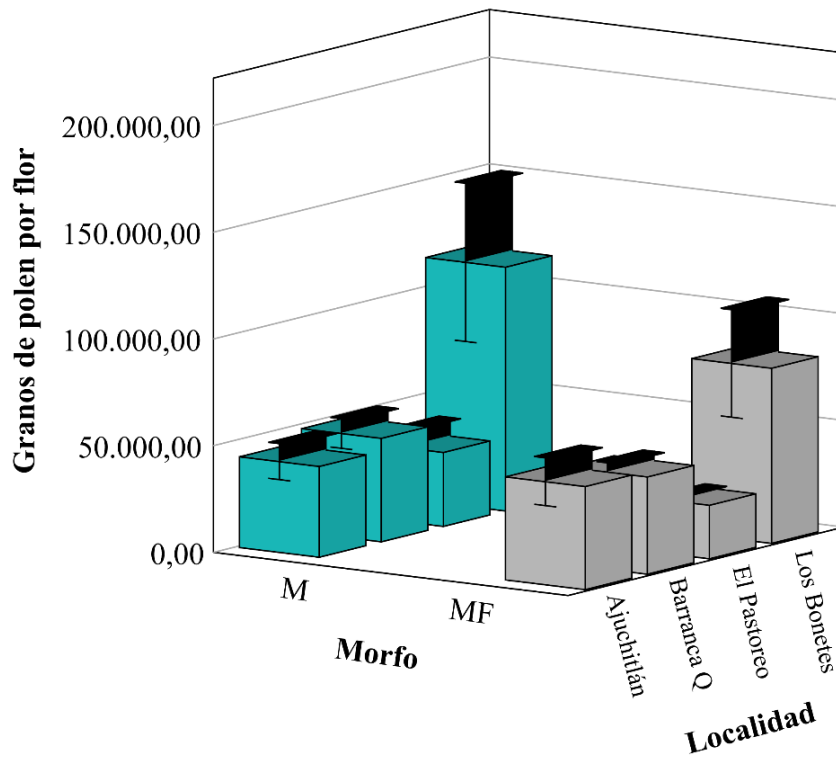
La viabilidad del polen se estimó como el número de granos de polen que producen tubo polínico entre el número total de granos de polen por muestra (ver métodos). El polen de los machos y machos fructíferos tuvo en promedio 89.7% y 91.3% de germinación respectivamente (Figura 11). La prueba de Wilcoxon revela que no existen diferencias significativas relacionadas con el morfo ( $Z=0.70$ ,  $p>0.05$ ), pero la prueba de Kruskal-Wallis muestra que existe variación significativa asociada a la localidad ( $\chi^2=11.8$ ,  $p<0.05$ ). La comparación múltiple no paramétrica de Wilcoxon, muestra que la germinación de polen es hasta 1.05 veces mayor en Barranca El Quejenecuil y El Pastoreo sobre la de Ajuchitlán y Los Bonetes ( $p<0.05$ ).

### *Cruzas manuales con polen de machos y de machos fructíferos*

Del experimento de cruzas controladas se recuperaron 11 frutos, 4 de polinización con polen de machos y 7 de polinización con polen de machos fructíferos.

El peso de los frutos fue 426 g para los producidos con polen de machos y 430 g para los producidos con polen de machos fructíferos, mientras que el número de semillas por fruto fue 707 y 719, para las producidas con polen de machos y machos fructíferos respectivamente. Ninguna de estas dos variables difiere significativamente entre ambos morfos ( $t_9= 0.09$  y  $0.4$ , respectivamente y  $p > 0.05$  en ambos casos) pero las semillas derivadas de cruzas con polen de machos son significativamente ( $t_{218}=1.97$ ,  $p<0.05$ ) más pesadas (0.08g) que las producidas con polen de machos fructíferos (0.07g).





**Figura 10 y 11.** Número de granos de polen por flor y porcentaje de germinación de los granos de polen en cada localidad y por morfo sexual de *Jacaratia mexicana*. Se reporta la media ( $\pm$ DE).

## 8. Discusión

### *Fertilidad masculina*

En este trabajo se encontró que la producción de polen por flor, y la viabilidad de los granos de polen no difieren entre machos y machos fructíferos. Esto sucede, a pesar de que las flores estaminadas de los machos fructíferos son significativamente más grandes y tienen anteras de mayor tamaño que las flores de los machos. Debido a que el número de granos de polen y la viabilidad no difiere entre estos dos morfos florales, las anteras de mayor tamaño en las flores de los machos fructíferos podrían estar relacionadas con la producción de granos de polen de mayor tamaño. Sin embargo, la medición de los granos de polen que se implementó previo al conteo de polen, no mostró que los granos de polen de ambos morfos difirieran en tamaño. Por lo tanto, la variación intermorfo observada en el tamaño floral no parece relacionarse con la producción ni la viabilidad de los granos de polen de machos y machos fructíferos de *J. mexicana*.

Resultados de estudios previos con especies subdioicas han mostrado que no hay una correlación clara entre atributos florales y la fertilidad de machos y hermafroditas. En *Dasiphora glabra* las flores de los machos son de mayor tamaño, pero la producción de polen es similar entre morfos (Wang et al., 2021). De manera parecida, en *Schiedea globosa* y *Garcinia indica* las flores de hermafroditas son de mayor tamaño, pero la producción de polen es semejante en ambos morfos (Joseph & Murthy, 2014; Sakai & Weller, 1991). En *Clusia nemorosa* y *Silene acaulis* (Lopes & Machado, 1998; Maurice et al., 1998) los hermafroditas tienen inflorescencias más grandes que los machos, pero la viabilidad del polen no difiere entre unos y otros. Asimismo, en *Vasconcellea pubescens*, otra especie de la familia Caricaceae, donde también se ha documentado la ocurrencia de subdioicismo, se ha reportado que la viabilidad del polen es similar entre morfos (Salvatierra & Jana, 2016) aunque los estambres de machos pueden ubicarse más al fondo de la corola floral (Laily et al., 2022).

La producción y viabilidad de polen pueden ser semejantes dado que los hermafroditas, al igual que los machos, son favorecidos por la presencia de hembras, si producen más y mejor polen para fecundar óvulos (Sakai & Weller, 1991). En *Jacaratia mexicana* la proporción de hembras en las localidades estudiadas siempre es mayor del 40% (Lezama, 2018), lo cual indica que la disponibilidad de plantas receptoras de polen es abundante, favoreciendo el mantenimiento de la función masculina en plantas hermafroditas. Además, las flores estaminadas de machos y machos fructíferos de *J. mexicana* son morfológicamente indistinguibles (Aguirre et al., 2009), y es probable que la semejanza fenotípica de las flores refleje la “calidad funcional” del polen de ambos morfos. En un estudio con *Carica papaya* var. cartagena amarilla se ha reportado que la expresión del hermafroditismo varía de forma gradual, y en dicha gradación los hermafroditas con flores fenotípicamente más semejantes a las de machos, también tienen niveles de producción y viabilidad de polen más parecidos a los de estos (Parés et al. 2006). En *V. pubescens* las flores de machos y hermafroditas tienen las mismas características y su polen tiene una capacidad de germinación similar (Salvatierra & Jana, 2016). Esto sugiere que en *J. mexicana* existe una correlación entre la semejanza en la morfología floral con la producción y viabilidad de polen de machos y machos fructíferos. Sin embargo, es necesario realizar evaluaciones que permitan establecer la relación funcional entre la morfología floral con la fertilidad masculina de las plantas productoras de polen en sistemas subdioicos.

La única variable relacionada con la fertilidad masculina que difiere significativamente entre machos y machos fructíferos es el peso de las semillas producto de fecundación con polen de cada morfo (el número de semillas por fruto no difirió significativamente). Existen escasos estudios en los que se realiza un experimento similar al realizado en esta investigación para evaluar la capacidad del polen de paternizar semillas. En *Fraxinus excelsior*, mediante experimentos de competencia de polen, el polen de machos engendra más progenie que el de hermafroditas, lo cual reflejaría la mayor cantidad de polen producida por machos (Morand et al., 2003). En *S. acaulis*, mediante un experimento similar al anterior, el polen tanto de machos como hermafroditas engendra una cantidad

de semillas que no difiere estadísticamente a pesar de que los machos producen más y mejor polen (Phillipp et al., 2009). En *Eurya japonica*, Wang et al., (2016) reportan que el polen de machos engendra más semillas que el de hermafroditas, mientras que el polen de hermafroditas engendra semillas más pesadas que el polen de machos.

El número de semillas en los frutos derivados de cruza con polen de machos y machos fructíferos no difiere, lo cual podría ser un reflejo de que la cantidad de polen por antera y la viabilidad de polen son similares entre ambos morfos. En contraste, el mayor peso de las semillas producidas con polen de machos sugiere que la progenie de machos puede ser de mayor calidad que la de machos fructíferos, pues la biomasa de las semillas es con frecuencia un indicador de mayor cantidad de nutrientes necesarios para la germinación (Nik et al., 2011). El único estudio (Wang et al., 2016) que reporta la viabilidad de las semillas engendradas por ambos morfos en especies subdioicas, menciona que esta no difiere significativamente entre morfos a pesar de que los hermafroditas engendran semillas más pesadas que los machos. Por lo tanto, es necesario realizar experimentos que pongan a prueba la capacidad del polen de machos y hermafroditas para determinar su éxito reproductivo como donadores de polen en condiciones naturales.

#### *Atributos florales*

Aunque en trabajos anteriores (Aguirre et al., 2009) se ha reportado que las flores masculinas de los machos fructíferos son idénticas a las de los machos, los resultados del análisis implementado en este trabajo muestran que el peso y el tamaño de las flores de los machos fructíferos son significativamente mayores que en las flores de los machos. En contraste, los machos producen más flores por racimo que los machos fructíferos. Lo cual indica que es necesario implementar evaluaciones que brinden una caracterización más precisa del polimorfismo floral de sistemas subdioicos de *J. mexicana*. Evaluaciones de las estructuras reproductivas en especies subdioicas como *F. excelsior* e *Hippophae rhamnoides* reportan que el número de flores puede ser mayor en los

hermafroditas (Albert et al., 2013, Mangla et al., 2018) como en este estudio. Mientras que en *D. glabra* ocurre lo contrario (Wang et al., 2021).

Teóricamente, el peso de las flores producidas puede restringir el número de flores que se producen cuando los recursos disponibles para la reproducción son limitados (Sargent et al., 2007). Estimaciones de atributos florales en *Pachycereus pringlei* (Fleming et al., 1994), muestran que los hermafroditas producen flores más grandes y de mayor peso, pero producen menor número de flores que los machos, lo que apoyaría el citado planteamiento teórico. Los resultados obtenidos en *J. mexicana* sugieren que los recursos disponibles para la reproducción son acotados, y que esta restricción condiciona la producción de flores, ya sea de muchas flores pequeñas, en el caso de los machos, o un menor número de flores más grandes para los machos fructíferos. En este sentido se halló una correlación negativa débil pero significativa entre estos rasgos (Figura 9), lo que sugiere la existencia de una disyuntiva entre número y tamaño de flores, y en relación a esta divergencia de atributos reproductivos, diferentes estrategias para ejercer la función masculina son favorecidas en ambos morfos florales.

#### *Disyuntiva en la fertilidad masculina y femenina de los machos fructíferos*

Un estudio (Lezama, 2018) en las mismas localidades de *J. mexicana*, reporta que los machos fructíferos poseen una fertilidad femenina inferior en contraste con las hembras, pues producen significativamente menos frutos. Si se toman en cuenta las estimaciones de la fertilidad femenina de dicho estudio y la fertilidad masculina estimada en este estudio, la producción de frutos parece no limitar la producción y viabilidad de polen de los machos fructíferos.

Planteamientos teóricos indican que la ausencia de una disyuntiva en la asignación de recursos a las funciones sexuales puede favorecer el mantenimiento del hermafroditismo (Silvertown, 1989). Esto es posible, si los recursos destinados a una de las funciones sexuales no se superponen y no restringen la asignación de recursos a la otra función sexual. Por ejemplo: si la función femenina requiere una asignación mínima de nitrógeno

y, después de producir flores, queda una reserva de nitrógeno, esta podría ser utilizada a través de la función masculina (Dorken & Van Drunen, 2018). En una circunstancia similar, de no existir una restricción en la asignación de recursos a las funciones sexuales en los machos fructíferos de *J. mexicana*, esto contribuiría a que su adecuación total se vea favorecida por la contribución que obtendrían a través de la producción de semillas como sugieren Ramsey & Vaughton, (2001).

#### *Variación en la fertilidad masculina entre localidades*

En este trabajo se encontró que la producción y viabilidad de polen, como estimadores de la fertilidad masculina, varían significativamente entre localidades. Existe limitada evidencia que demuestre algo similar en especies subdioicas. Humeau et al., (2000) y Ramsey & Vaughton, (2001) reportan variación interpoblacional significativa en la producción/viabilidad de polen que se asocia con diferencias en las condiciones ambientales locales como la elevación, la precipitación y la disponibilidad de recursos que limitan la reproducción. Se ha demostrado que esta variación es frecuente en las plantas (Delph et al., 1997) ya que las condiciones de cada sitio alteran la composición, producción y desempeño del polen (Barret, 1992; Delph & Wolf, 2005; Lau & Stephenson et al., 1994). Incluso el grado de sequía y el nivel de herbivoría frecuentemente afectan la producción de polen (Maurice et al., 1998; Quesada et al., 1995).

Un patrón de variación en la producción de polen entre sitios ya ha sido demostrado en localidades de *J. mexicana*, al menos para poblaciones dioicas (Contreras, 2018) pues la producción de polen de los machos varía en función de la integridad del ambiente.

En contraste con la variación interpoblacional observada en la producción de polen, en este trabajo no se detectaron diferencias significativas en los estimadores de la fertilidad masculina de machos y machos fructíferos. El patrón de variación observado en la producción de polen de los árboles de *Jacaratia mexicana*, sugiere que los factores que determinan la producción y viabilidad de polen, impactan relativamente con la misma

fuerza a machos y machos fructíferos a nivel local, pero que varían significativamente entre localidades. Este planteamiento es consistente con la amplia variación intra e interpoblacional que se ha observado en especies con sistemas reproductivos polimórficos en su rango de distribución geográfica (Fleming, 1998; Varga & Soulsbury, 2020; Vaughton & Ramsey, 2004; Yang et al., 2014). Además, los resultados de este trabajo sugieren que al menos una fracción de la variación observada en la producción y viabilidad de polen, debe tener un componente genético heredable. Las flores de los machos fructíferos son, en todas las localidades, de mayor tamaño y peso que las flores de los machos. Un patrón similar de variación entre las flores de morfos productores de polen se conoce en *Carica papaya*, donde además se ha documentado la evolución incipiente de cromosomas que determinan la sexualidad de machos (XY) y de hermafroditas (XYh) (Wang et al., 2012).

#### *Estabilidad del subdioicismo como un sistema reproductivo*

Los machos requieren de una ventaja teórica en la fertilidad masculina cuya magnitud sea el doble o mayor sobre los hermafroditas para establecer el dioicismo (Charlesworth & Charlesworth, 1978; Lewis, 1941; Lloyd, 1975). Sin embargo, los resultados de este trabajo no brindan evidencia que apoye este planteamiento teórico. Por el contrario, se destaca una serie de estrategias de cada morfo productor de polen que pueden favorecer el ejercicio de la función masculina y contribuir a su mantenimiento en poblaciones subdioicas estables.

El tamaño y peso de las flores, son mayores para los machos fructíferos mientras que el número de flores por racimo y el peso de las semillas engendradas, son mayores para los machos. Los machos, al poseer más flores pueden aumentar la cantidad de polen disponible para exportar en más parejas y engendrar progenie (Barbot et al. 2022). Las semillas que son producto de fecundación con polen de machos son más pesadas, lo cual puede representar progenie de mayor calidad (Nik et al., 2011). Además, los machos al solo poseer una función sexual están obligados a la entrecruza, sistema de apareamiento

que promueve la diversidad genética, el flujo de genes y evita la depresión endogámica (Guibert et al., 2009; Hamrick & Godt, 1996; Linhart & Grant, 1996).

Los machos fructíferos por su parte, poseen flores significativamente de mayor tamaño lo que es sinónimo de una mayor atracción de polinizadores (Eckhart, 1999; Vaughton & Ramsey, 1998), con lo cual la exportación del polen aumentaría. Conjuntamente poseen la función femenina lo que significa que pueden ser receptores de polen, producir algunos frutos y contribuir a su éxito reproductivo (Lezama, 2018). Incluso la función femenina confiere a los machos fructíferos la capacidad de autofecundación, lo que representa un seguro reproductivo, en escenarios con ausencia de polinizadores.

También, es probable que, debido a la semejanza floral, los vectores de polen no diferencien entre flores de machos y machos fructíferos y, por lo tanto, ambos morfos funcionen como donadores de polen de manera relativamente equitativa. Además, se ha encontrado que la sequía puede actuar como un estresor ambiental que “masculiniza” a los individuos hermafroditas monoicos, como los de este estudio (Golenberg & West, 2013). Este planteamiento es apoyado por una revisión que apunta que las condiciones ambientales pueden actuar como señales que controlen el sexo, no solo a nivel poblacional o individual, sino modular, como en el caso de las especies del género *Arisaema* (Pannell, 2017).

Dado que la familia Caricaceae se compone en su mayoría por especies dioicas se ha sugerido que el dioicismo es el sistema ancestral de esta familia (Charlesworth, 2013). Además, puesto que en *Carica papaya* se ha propuesto que el hermafroditismo es reciente (Lardon et al. 1999), la presencia de sistemas subdioicos se ha sugerido como una reversión al hermafroditismo, situación que no se excluye que ocurra en nuestras localidades. Dichas reversiones al hermafroditismo parecen ser más frecuentes de lo que se estima (Kafer, 2017), lo que explicaría el por qué en Caricaceae, se encuentran localidades con sistemas subdioicos en especies originalmente dioicas como en *Carica papaya*, *Vasconcellea pubescens* o *Jacaratia mexicana* (Aguirre et al., 2007; Ming et al., 2007; Salvatierra & Jana, 2016).



## 9. Conclusión

El sistema reproductivo de *J. mexicana* se compone de machos, hembras y machos fructíferos. La estimación de la fertilidad masculina a través de la producción y viabilidad de polen no difiere significativamente entre machos y machos fructíferos, por lo que, al parecer, los machos fructíferos no tienen una desventaja reproductiva frente a los machos puros.

Debido a que la fertilidad masculina no parece estar restringida por la producción de frutos en los machos fructíferos, los resultados sugieren que el subdioicismo puede ser estable bajo circunstancias similares a las de las localidades de Huautla, Morelos. Sin embargo, existen otros factores como la endogamia, la limitación y dispersión de polen, que también influyen en la persistencia de los morfos en las poblaciones, los cuales son desconocidos para *J. mexicana*.

Se destaca la necesidad de estudios futuros que permitan esclarecer la ocurrencia del subdioicismo en otras especies dioicas como *J. mexicana*, tales como estudios de determinación del sexo, genético o cromosómico.

## 10. Bibliografía

- Abejide, D., Dangana, M. & Lateef, A. (2013). Assessment of pollen production, viability and germinability in three sesame cultivars. *International Journal of Applied Biological Research*, 5(1), 62-71.
- Aguirre, A., Vallejo-Marín, M., Salazar-Gorozieta, L., Arias, D. & Dirzo, R. (2007). Variation in sexual expression in *Jacaratia mexicana* (Cariaceae) in Southern Mexico: frequency and relative seed performance of fruit-producing males. *Biotropica*, 39, 79-86.
- Aguirre, A., Vallejo-Marín, M., Piedra-Malagón, E., Cruz-Ortega, R. & Dirzo, R. (2009). Morphological variation in the flowers of *Jacaratia mexicana* A. DC. (Caricaceae), a subdioecious tree. *Plant Biology*, 11(3), 417-24.
- Albert, B., Morand, M. É., Brachet, S., Gouyon, P. H., Frascaria-Lacoste, N. & Raquin, C. (2013). Sex expression and reproductive biology in a tree species, *Fraxinus excelsior* L. *Comptes Rendus Biologies*, 336(10), 479-485.
- Aonuma, W., Kawamoto, H., Kazama, Y., Ishii, K., Abe, T. & Kawano, S. (2021). Male/female trade-off in hermaphroditic Y-chromosome deletion mutants of the dioecious plant *Silene latifolia*. *Cytologia*, 86(4), 329-338.
- Ashman, T. L. (2003). Constraints on the evolution of males and sexual dimorphism: Field estimates of genetic architecture of reproductive traits in three populations of gynodioecious *Fragaria virginiana*. *Evolution*, 57(9), 2012-2025.
- Ashman, T. L. (2006). The evolution of separate sexes: a focus on the ecological context. *Ecology and Evolution of Flowers*, Oxford University Press, 11, 419-465.
- Ashman, T. & Penet, L. (2007). Direct and indirect effects of a sex-biased antagonist on male and female fertility: Consequences for reproductive trait evolution in a gender-dimorphic plant. *The American Naturalist*, 169(5), 595–608.

Barbot, E., Dufay, M., Tonnabel, J., Godé, C. & De Cauwer, I. (2022). On the function of flower number: disentangling fertility from pollinator-mediated selection. *Proceedings of the Royal Society B*, 289(1987), 20221987.

Barrett, S. (2002). The evolution of plant sexual diversity. *Nature reviews genetics*, 3(4), 274-284.

Barrett S. & Crowson, D. (2016). Mating systems in flowering plants. *Encyclopedia of Evolutionary Biology*, Oxford Academic Press, 2, 473-479.

Brewbaker, J. L. & Kwack, B. H. (1963). The essential role of calcium ion in pollen germination and tube growth. *American Journal of Botany*, 50, 859-865.

Cardoso, J., Viana, M., Matias, R., Furtado, M., Caetano, A., Consolaro, H. & Brito, V.L. (2018). Towards a unified terminology for angiosperm reproductive systems. *Acta Botanica Brasilica*, 32(3), 329-348.

Charlesworth, B. & Charlesworth, D. (1978). A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *The American Naturalist*, The University of Chicago Press, 112(988), 975-997.

Charlesworth, D. (2013). Plant sex chromosome evolution. *Journal of Experimental Botany*, 64(2), 405-420.

Cohen, E., Lavi, U. & Spiegel-Roy, P. (1989). Papaya pollen viability and storage. *Scientia Horticulturae*, 40(4), 317-324.

CONANP. (2005). Programa de conservación y manejo de la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla, México. Dorado, O., Maldonado, B., Arias, D., Sorani, V., Ramírez, R., Leyva, E. & Valenzuela, D. (Eds). Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) 1, 1-207.

Contreras, J. (2018). "Efecto de la fragmentación de un bosque tropical caducifolio en el sistema de apareamiento y éxito reproductivo de un sistema dioico: *Jacaratia mexicana*

(Caricaceae)". [Tesis de Maestría, UNAM]. Repositorio Institucional de la UNAM: <https://repositorio.unam.mx/contenidos/9338>.

Cronk, Q. (2022). The distribution of sexual function in the flowering plant: from monoecy to dioecy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 377(1850), 20210486.

Cuevas, E. & Abarca, C. A. (2006). Origen, mantenimiento y evolución del ginodioicismo. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 78, 33-42.

Cuevas, E., Jiménez, R. & Lopezaraiza-Mikel, M. (2013). Sex-specific reproductive components and pollination ecology in the subdioecious shrub *Fuchsia microphylla*. *Plant Biology*, 16(6), 1096-103.

Darwin, C. (1877). *The different forms of flowers on plants of the same species*. London, John Murray.

Do Amaral, A., dos Santos, J., Câmara, T., Duarte, L. & Barbosa, G. (2013). Polen storage methodology in sugarcane. *Embrapa Tabuleiros Costeiros-Comunicado Técnico*, 129, 1678-1937.

Delph, L. F. (1990). Sex-differential resource allocation patterns in the subdioecious shrub *Hebe subalpina*. *Ecology*, 71(4), 1342-1351.

Delph, L. F., Johannsson, M. H. & Stephenson, A. G. (1997). How environmental factors affect pollen performance: ecological and evolutionary perspectives. *Ecology*, 78(6), 1632-1639.

Delph, L. F. & Wolf, D. E. (2005). Evolutionary consequences of gender plasticity in genetically dimorphic breeding systems. *New Phytologist*, 166(1), 119-128.

Del Castillo, R. F. & Argueta, S. T. (2009). Reproductive implications of combined and separate sexes in a trioecious population of *Opuntia robusta* (Cactaceae). *American Journal of Botany*, 96(6), 1148-1158.

- Dorken, M. E. & Van Drunen, W. E. (2018). Life-history trade-offs promote the evolution of dioecy. *Journal of evolutionary biology*, 31(9), 1405-1412.
- Eckhart V. M. (1999). Sexual dimorphism in flowers and inflorescences. Geber MA, Dawson TE, Delph LF (Eds). *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*, Springer, 1, 123–148.
- Ehlers, B. K. & Bataillon, T. (2007). ‘Inconstant males’ and the maintenance of labile sex expression in subdioecious plants. *New Phytology*, 174(1), 194–211.
- Erdtman, G. (1969). *Handbook of Palynology*. Hafner publishing.
- Eti, S. (1991). Determination of pollen viability and germination abilities in some fruit species and varieties with the help of various in vitro tests. *Journal of Çukurova University Faculty of Agriculture*, 6, 69-81.
- Fleming, T. H., Maurice, S., Buchmann, S. L. & Tuttle, M. D. (1994). Reproductive biology and relative male and female fitness in a trioecious cactus, *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *American Journal of Botany*, 81(7), 858-867.
- Fleming, T. H., Maurice, S. & Hamrick, J. L. (1998). Geographic variation in the breeding system and the evolutionary stability of trioecy in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Evolutionary Ecology*, 12(3), 279–289.
- Fruchard, C. & Marais, G. (2021). The evolution of sex determination in plants. Nuño de la Rosa L., Müller G.B. (Eds). *Evolutionary Developmental Biology*, Springer, 1, 683–696.
- Golenberg, E. M. & West, N. W. (2013). Hormonal interactions and gene regulation can link monoecy and environmental plasticity to the evolution of dioecy in plants. *American Journal of Botany*, 100(6), 1022-1037.
- Guibert, C., Civeyrel, L. & Linder, P. (2009). Male and female separation event trapped in a species tree. *Taxon*, 58, 172–180.

- Hamrick, J.L. & Godt M.J. (1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*. 351, 1291–1298.
- Humeau, L., Pailler, T. & Thompson, J. D. (2000). Variation in gender and flower-size dimorphism in the dioecious tree *Dombeya ciliata*, an Endemic to La Reunion Island. *Biotropica*, 32(3), 463-472.
- JMP®, Pro version 16 (2021). SAS Institute Inc., Cary, NC, 1989-2021.
- Joseph, K. S. & Murthy, H. N. (2014). Sexual system of *Garcinia indica* Choisy: geographic variation in trioecy and sexual dimorphism in floral traits. *Plant Systematics and Evolution*, 301(3), 1065–1071.
- Käfer, J., Marais, G. A. & Pannell, J. R. (2017). On the rarity of dioecy in flowering plants. *Molecular Ecology*, 26(5), 1225-1241.
- Kearns, C. & Inouye, D. (1993). *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado.
- Kubitzki, K. (2003). *Caricaceae*. Flowering plants, Dicotyledons, Malvales, Capparales and Non-betalain Caryophyllales, Springer, 1, 57–61.
- Laily, A. N., Daryono, B. S., Purwantoro, A. & Purnomo, P. (2022). Various macro and micro-morphological characters of three sex types of highland papaya (*Vasconcellea pubescens*) in Java, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(12), 6238-6246.
- Lardon, A., Georgiev, S., Aghmir, A., Merrer, G. L. & Negrutiu, I. (1999). Sexual dimorphism in white campion: complex control of carpel number is revealed by Y chromosome deletions. *Genetics* 151, 1173–1185.
- Lau, T. C. & Stephenson, A. (1994). Effects of soil phosphorus on pollen production, pollen size, pollen phosphorus content, and the ability to sire seeds in *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). *Sexual Plant Reproduction*, 7(4), 215-220.

Lewis, D. (1941). Male sterility in natural populations of hermaphrodite plants. The equilibrium between females and hermaphrodites to be expected with different types of inheritance. *The New Phytologist*, 40(1), 56-63.

Lezama, E. (2018). Diversidad de sistemas reproductivos en angiospermas; un estudio de la frecuencia y la adecuación femenina de machos fructíferos en poblaciones subdioicas de *Jacaratia mexicana* A. DC. (Caricaceae). [Tesis de maestría. UAEH]. Repositorio: <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/handle/231104/2337>.

Linhart, Y. B. & Grant, M. C. (1996). Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 27, 237–277.

Lloyd, D. (1974). Theoretical sex ratios of dioecious and gynodioecious angiosperms. *Heredity* 32, 11–34.

Lloyd, D. G. (1975). The maintenance of gynodioecy and androdioecy in angiosperms. *Genetica*, 45(3), 325-339.

Lopes, A. V. & Machado, I. C. (1998). Floral biology and reproductive ecology of *Clusia nemorosa* (Clusiaceae) in northeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution*, 213(1), 71-90.

McCauley, D. E. & Brock, M. T. (1998). Frequency-dependent fitness in *Silene vulgaris*, a gynodioecious plant. *Evolution*, 52(1), 30-36.

Marks, G. E. (1954). An aceto-carminic glycerol jelly for use in pollen fertility counts. *Stain Technology*, 29(5), 277.

Mangla, Y., Das, K., Bali, S., Ambreen, H., Raina, S. N., Tandon, R. & Goel, S. (2019). Occurrence of subdioecy and scarcity of gender-specific markers reveal an ongoing transition to dioecy in Himalayan seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* ssp. *turkestanica*). *Heredity*, 122(1), 120-132.

Mangla, Y., Tandon, R. & Goel, S. (2020). Dynamics of eco-evolutionary forces in shaping dioecy. *Reproductive ecology of flowering plants: Patterns and processes*. Springer, 1, 173-196.

Maurice, S. & Fleming, T.H. (1995). The effect of pollen limitation on plant reproductive systems and the maintenance of sexual polymorphisms. *Oikos*, 74, 55–60.

Ming, R., Yu, Q. & Moore, P. H. (2007). Sex determination in papaya. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 18(3), 401–408.

Morand, M. E., Raquin, C., Shykoff, J. A. & Frascaria, N. (2003). Males outcompete hermaphrodites for seed siring success in controlled crosses in the polygamous *Fraxinus excelsior* (Oleaceae). *American Journal of Botany*, 90(6), 949-953.

Nik, M. M., Babaeian, M. & Tavassoli, A. (2011). Effect of seed size and genotype on germination characteristic and seed nutrient content of wheat. *Scientific Research and Essays*, 6(9), 2019-2025.

Olson, M. & Antonovics, J. (2000). Correlation between male and female reproduction in the subdioecious herb *Astilbe biternata* (Saxifragaceae). *American Journal of Botany*, 87(6), 837-844.

Ordoñez, B. (2014). Determinación de la viabilidad y fertilidad del polen. Lima (Perú). Centro Internacional de la Papa (CIP), 8.

Pannell, J. R. (2002). The evolution and maintenance of androdioecy. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 33(1), 397-425.

Pannell, J. R. (2017). Plant sex determination. *Current Biology*, 27(5), 191-197.

Pennington, T. D. & Sarukhán, J. (2005). Árboles tropicales de México: Manual para la identificación de las principales especies. Universidad Autónoma de México, Fondo de Cultura Económica, 527(1).



- Perry, L. E., Pannell, J. & Dorken, M. E. (2012). Two's company, three's a crowd: Experimental evaluation of the evolutionary maintenance of trioecy in *Mercurialis annua* (Euphorbiaceae). *PLoS One*, 7(4), 35597.
- Phillipp, M., Jakobsen, R. B. & Nachman, G. (2009). A comparison of pollen-siring ability and life history between males and hermaphrodites of subdioecious *Silene acaulis*. *Evolutionary Ecology Research*, 11(5), 787-801.
- Quesada, M., Bollman, K. & Stephenson, A. G. (1995). Leaf Damage Decreases Pollen Production and Hinders Pollen Performance in *Cucurbita texana*. *Ecology*, 76(2), 437–443.
- Ramsey, M. & Vaughton, G. (2001). Sex expression and sexual dimorphism in subdioecious *Wurmbea dioica* (Colchicaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 162(3), 589-597.
- Renner, S. S. (2014). The relative and absolute frequencies of angiosperm sexual systems: dioecy, monoecy, gynodioecy, and an updated online database. *American Journal of Botany*, 101(10), 1588-1596.
- Rodriguez, T. & Dafni, A. (2000). A new procedure to assess pollen viability. *Sex Plant Reproduction*, 12, 241–244.
- Ross, M. (1982). Five evolutionary pathways to subdioecy. *American Naturalist* 119, 297–318.
- Sakai, A. & Weller, S. (1991). Ecological aspects of sex expression in subdioecious *Schiedea globosa* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany*, 78(9), 1280-1288.
- Sakai, A. & Weller, S. (1999). Gender and sexual dimorphism in flowering plants: A review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates, and phylogenetic approaches. Gender and sexual dimorphism in flowering plants. In Geber, M.A., Dawson, T.E., Delph, L.F. (Eds). *Gender and Sexual Dimorphism in Flowering Plants*. Springer, 1-31.

- Salvatierra, M. & Jana, C. (2016). Floral expression and pollen germination ability in productive mountain papaya (*Vasconcellea pubescens* A.DC.) orchards. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 76(2), 136-142.
- Sargent, R., Goodwillie, C., Kalisz, S. & Ree, R. (2007). Phylogenetic evidence for a flower size and number trade-off. *American Journal of Botany*, 94, 2059-2062.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.
- Silva, C., Oliva, M., Vieira, M. & Fernandes, G. (2008). Trioecy in *Coccoloba cereifera* Schwacke (Polygonaceae), a narrow endemic and threatened tropical species. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(5), 1003-1010.
- Silvertown, J. (1987). The evolution of hermaphroditism: an experimental test of the resource model. *Oecologia* 72, 157-159.
- Soltis, D., Soltis, P., Endress, P., Chase, M., Manchester, S., Judd, W., Majure, L. & Mavrodiev, E. (2018). *Phylogeny and evolution of the angiosperms: revised and updated edition*. Chicago, University of Chicago Press.
- Spigler, R. B. & Ashman, T. L. (2012). Gynodioecy to dioecy: are we there yet?. *Annals of botany*, 109(3), 531–543.
- Vamosi, J.C. & Vamosi, S.M. (2004). The role of diversification in causing the correlates of dioecy. *Evolution* 58, 723–731.
- Varga, S. & Soulsbury, C. D. (2020). Environmental stressors affect sex ratios in sexually dimorphic plant sexual systems. *Plant Biology*, 22(5), 890-898.
- Vaughton, G. & Ramsey, M. (1998). Floral display, pollinator visitation and reproductive success in the dioecious perennial herb *Wurmbia dioica* (Liliaceae). *Oecologia*, 115(2), 93–101.

- Vaughton G. & Ramsey M. (2004) Dry environments promote the establishment of females in monomorphic populations of *Wurmbea biglandulosa* (Colchicaceae). *Evolutionary Ecology*, 18, 323–341.
- Wang, H., Matsushita, M., Tomaru, N. & Nakagawa, M. (2015). Differences in female reproductive success between female and hermaphrodite individuals in the subdioecious shrub *Eurya japonica* (Theaceae). *Plant Biology*, 17(1), 194-200.
- Wang, H., Matsushita, M., Tomaru, N. & Nakagawa, M. (2016). High male fertility in males of a subdioecious shrub in hand-pollinated crosses. *AOB Plants*, 8, 067.
- Wang, J., Na, J. K., Yu, Q., Gschwend, A. R., Han, J., Zeng, F., Aryal, R., Van Buren, R., Murray, J., Zhang, W., Navajas-Pérez, R., Feltus, F., Lemke, C., Tong, E., Chen, C., Man Wai, C., Singh, R., Wang, M., Min, X., Alam, M., Charlesworth, D., Moore, P., Jiang, J., Paterson, A. & Ming, R. (2012). Sequencing papaya X and Yh chromosomes reveals molecular basis of incipient sex chromosome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(34), 13710-13715.
- Wang, L. L., Zhang, Z. Q., Yang, Y. P. & Duan, Y. W. (2019). The coexistence of hermaphroditic and dioecious plants is associated with polyploidy and gender dimorphism in *Dasiphora fruticosa*, *Plant Diversity*, 41(5), 323-329.
- Wang, L. L., Yang, N. C., Chen, M. Y., Yang, Y. P. & Duan, Y. W. (2021). Polyploidization and sexual dimorphism of floral traits in a subdioecious population of *Dasiphora glabra*. *Journal of Plant Ecology*, 14(2), 229-240.
- Wolfe, L. M. & Shmida, A. (1997). The ecology of sex expression in a gynodioecious israeli desert shrub (*Ocbradenus baccatus*). *Ecology*, 78(1), 101–110.
- Yang J., Hu L., Wang Z., Zhu W. & Meng L. (2014) Responses to drought stress among sex morphs of *Oxyria sinensis* (Polygonaceae), a subdioecious perennial herb native to the East Himalayas. *Ecology and Evolution*, 4, 4033–4040.