



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

“CONSECUENCIAS ECOLÓGICAS DEL
DIOICISMO EN PLANTAS: CRECIMIENTO,
DEFENSA Y HERBIVORÍA EN TRES
ESPECIES SIMPÁTRICAS DE
CHAMAEDOREA EN LOS TUXTLAS,
VERACRUZ”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

VERÓNICA CEPEDA CORNEJO

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. RODOLFO DIRZO MINJAREZ

COMITÉ TUTOR: DR. ZENÓN CANO SANTANA
DR. EDUARDO MORALES GUILLAUMÍN
TUTOR(A) INVITADO: DR. VÍCTOR LUIS BARRADAS MIRANDA

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2011



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

“CONSECUENCIAS ECOLÓGICAS DEL
DIOICISMO EN PLANTAS: CRECIMIENTO,
DEFENSA Y HERBIVORÍA EN TRES
ESPECIES SIMPÁTRICAS DE
CHAMAEDOREA EN LOS TUXTLAS,
VERACRUZ”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

VERÓNICA CEPEDA CORNEJO

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. RODOLFO DIRZO MINJAREZ

COMITÉ TUTOR: DR. ZENÓN CANO SANTANA
DR. EDUARDO MORALES GUILLAUMÍN
TUTOR(A) INVITADO: DR. VÍCTOR LUIS BARRADAS MIRANDA

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE, 2011



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 01 de agosto de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna CEPEDA CORNEJO VERONICA con número de cuenta 90203400 con la tesis titulada: "CONSECUENCIAS ECOLÓGICAS DEL DIOICISMO EN PLANTAS: CRECIMIENTO, DEFENSA Y HERBIVORIA EN TRES ESPECIES SIMPATRICAS DE CHAMAEDOREA EN LOS TÚXTLAS, VERACRUZ", realizada bajo la dirección del DR. RODOLFO DIRZO MINJAREZ:

Presidente:	DRA. MARÍA GUADALUPE ANTONIA PALOMINO Y HASBACH
Vocal:	DRA. KARINA BOEGE PARÉ
Secretario:	DR. EDUARDO MORALES GUILLAUMIN
Suplente:	DR. ISAÍAS HAZARMABETH SALGADO UGARTE
Suplente	DR. ZENÓN CANO SANTANA

El Comité Académico, aprobó que la integración del jurado se realizara a solicitud del alumno, con cinco sinodales, en apego a la nueva normatividad, acogiéndose al artículo QUINTO TRANSITORIO, con base en lo establecido en el Artículo 31 del Reglamento General de Estudios de Posgrado (29 septiembre de 2006).

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 22 de noviembre de 2011.

María del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente de la interesada.

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la oportunidad que me brindó para formarme en “La máxima casa de estudios”.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) (No. de becario 158257) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por el apoyo económico que me permitió realizar mis estudios de doctorado.

A mi tutor principal el Dr. Rodolfo Dirzo Minjarez por su constante apoyo académico y moral desde los inicios de mi formación en el laboratorio de interacción planta-animal. Gracias porque tu dedicación a la ciencia fué y es mi mejor ejemplo, y porque a pesar de la distancia espacial que nos separó, siempre estuviste cerca.

A los miembros del comité tutorial y miembros del jurado, los doctores Zenón Cano Santana y Eduardo Morales Guillaumin, por su buena disposición para orientarme desde los inicios del desarrollo intelectual de este trabajo y por sus atinadas correcciones.

Al Dr. Víctor Barradas, tutor invitado, por el apoyo logístico para la medición de carbono y sus incontables asesorías en la elaboración del manuscrito correspondiente.

Agradecimientos a título personal:

A la Dra. Guadalupe Palomino por las facilidades otorgadas para desarrollar el trabajo experimental del capítulo cinco de esta tesis en el Laboratorio de Citogenética del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM. Gracias por su paciencia y buena disposición para resolver mis constantes dudas, así como por las correcciones para mejorar esta tesis.

A la Dra. Karina Boege Paré, por las facilidades para concluir la escritura de este trabajo en el Laboratorio de Interacción Planta-Animal. Gracias por sus atinadas correcciones a esta tesis.

Al Dr. Isaias Hazarmabeth Salgado Ugarte, por el entrenamiento y la valiosa orientación en el uso de los Estimadores de Densidad Kernel y sus correcciones a la tesis.

A la Dra. Rocío Cruz por las facilidades otorgadas en la determinación de fenoles totales en el laboratorio de alelopatía.

Al Dr. Ignacio Méndez por su enorme gentileza para enseñarme a utilizar los programas estadísticos y compartirme sus valiosos conocimientos.

A Patricia Martínez, Lilia Jiménez y al Dr. Armando Rodríguez del Posgrado en Ciencias Biológicas por su enorme apoyo en los trámites administrativos, becas y titulación.

A mi familia: A mi madre por el enorme cariño incondicional que siempre me ha brindado, por sus cuidados y enseñanzas. A Manuel por ayudarme a forjar mi destino. A mis hermanas: Carmen por su apoyo moral en los momentos difíciles, además de su valiosa ayuda en campo, y a Gudelia por su compañía. A mi sobrino Adrián por ser esa pequeña sonrisa que me alumbra y que siempre me acompaña.

A Alejandro González y Daniel Valle del departamento de cómputo quienes con amabilidad y buena disposición me solucionaron problemas técnicos e instalaciones de software.

A Rocío Graniel por la búsqueda de información bibliográfica.

A Emilio García por los años felices que compartimos y por su gran ayuda en campo.

A la Biól. Rosa María del Carmen Gómez por su amistad y por el enorme apoyo técnico en campo y en la cuantificación de fenoles.

A los miembros del laboratorio de Citogenética: A la Biól. Miriam Laad por su persistencia y tesón en la cuantificación del contenido de ADN. A Francisco Javier Martínez por las incontables asesorías en la separación e identificación de los cromosomas. A la Biól. Ingrid Brunner por el apoyo logístico en el desarrollo de este trabajo, su amistad y valiosos consejos.

Al Dr. Francisco Vergara por su amistad, sus valiosos consejos, atenciones y revisiones al manuscrito.

A Florencia Briones y Humberto Correa por su amistad, sus consejos y paciencia para escucharme.

Al personal administrativo del la estación de Biología Tropical Los Tuxtlas por las facilidades otorgadas y por hacer agradable mi estancia. A José Luis Paxtián, Braulio Gómez e Isaac Gómez quienes colaboraron en la toma de datos en campo.

A los miembros del laboratorio de Interacción Planta-Animal: al M. en C. Rubén Pérez Ishiwara por su apoyo logístico y técnico en el desarrollo de este trabajo, Al Dr. Juan Fornoni por aclarar mis dudas en estadística. A Betsabé Ruiz, Santiago Benítez y Etzel Garrido por su amistad y las correcciones al manuscrito. A mis compañeros y amigos que dieron a mi estancia en el laboratorio alegría y buen humor: Sofía Ochoa, Blanca Mejía, Angélica Hernández, Augusto Alonso, Paula Sosenski, Fernanda Baena, Xochitl, Diego Carmona, Guadalupe Andraca, Luz Palestina y Carlos Bustos. Particularmente quiero agradecer a Miguel Castañeda y Sergio Ramos su amistad, bromas y gratas pláticas que me reanimaron en los momentos más difíciles. A Violeta Méndez por los consejos y la confianza que compartimos. A Jessica Pérez por los ratos de sano esparcimiento.

A todos mil gracias, porque con su ayuda logré concluir una etapa valiosa e importante de mi vida.

DEDICATORIA

**A mi madre quien afrontó todas las
adversidades y me brinda lo mejor de sí misma**

ÍNDICE

Resumen de tesis.....	1
Abstract.....	3
Introducción general.....	5
1. Sex-Related Differences in Reproductive Allocation, Growth, Defense and Herbivory in Three Dioecious Neotropical Palms.....	14
2. Estimación del esfuerzo reproductivo mediante asimilación de carbono en <i>Chamaedorea alternans</i>.....	24
3. Efectos de la defoliación experimental en el crecimiento y formación de estructuras reproductivas en tres especies de <i>Chamaedorea</i>.....	60
4. Crecimiento, defensa y herbivoría en plantas pre-reproductivas de tres especies simpátricas dioicas del género <i>Chamaedorea</i>.....	92
5. Intersexual comparison of DNA content by flow cytometry, and chromosome number in four dioecious <i>Chamaedorea</i> palms from Mexico.....	125
Discusión general.....	146
Láminas 1 y 2.....	150

RESUMEN

Las plantas dioicas se caracterizan por la producción de flores estaminadas (masculinas) y flores pistiladas (femeninas) en organismos separados. Esta separación de las funciones reproductivas en plantas separadas tiene diversas implicaciones. Una de las más prominentes es la asignación diferencial (intersexual) de recursos. Los recursos se destinan a tres funciones primordialmente: la reproducción, el crecimiento y el mantenimiento (entre los que se cuenta a la defensa). En las plantas dioicas planteamos la existencia de dos fuertes conflictos de asignación de recursos: a) reproducción vs. crecimiento y b) crecimiento vs. defensa. Las plantas femeninas asignan un porcentaje elevado de sus recursos a la reproducción, limitando la cantidad de recursos disponibles para crecer. Ante esta limitación de recursos para asignar al crecimiento vegetativo, y disminución en la tasa de recambio foliar en las plantas femeninas, con respecto a las plantas masculinas, se espera un aumento en la concentración de compuestos secundarios como una defensa efectiva contra los herbívoros y consecuentemente menos daño por herbivoría.

El estudio fue realizado en los alrededores de la Estación de Biología Los Tuxtlas, Veracruz, México. Las especies de estudio fueron *Chamaedorea alternans*, *C. ernesti-augusti* y *C. pinnatifrons*. Únicamente en el capítulo quinto se incluyó a *C. tepejilote*.

En el capítulo uno, se abordan los conflictos de asignación a la reproducción, crecimiento y defensa, así como sus consecuencias en la herbivoría de las plantas adultas (reproductivas). Las plantas femeninas realizaron una asignación a la reproducción, en biomasa, tres veces más elevada con respecto a las plantas masculinas. Las plantas masculinas presentaron una tasa de crecimiento (altura, tasa de producción foliar y producción de biomasa) más elevada. Las plantas femeninas de las tres especies mostraron rasgos (dureza foliar y concentración de fenoles totales) que sugieren una mayor inversión en la defensa. De acuerdo con lo anterior, las plantas femeninas tuvieron entre 48-87% menor tasa de herbivoría.

En el capítulo dos, estimamos el esfuerzo reproductivo en términos de asimilación durante la fotosíntesis y consumo de carbono durante la respiración, en plantas masculinas y femeninas de *Chamaedorea alternans*. Las estimaciones del esfuerzo reproductivo mediante la respiración y la fotosíntesis reproductiva no mostraron diferencias entre sexos. No

obstante, en términos de biomasa, las plantas femeninas destinaron hasta 3.3 veces la biomasa que destinaron las plantas masculinas para la producción de flores.

En el capítulo tres, se evaluó el impacto que tiene la defoliación experimental en la asignación de recursos a la reproducción y el crecimiento. Se aplicaron tres tratamientos: 1) 0% de defoliación, 2) 25% de defoliación y 3) 50% de defoliación. La longitud y peso de las inflorescencias de las plantas con los tratamientos con 25 y 50% de defoliación, disminuyó significativamente con respecto a plantas sin defoliación. Las plantas femeninas sin defoliación produjeron significativamente más frutos cuajados, 1.48 veces, que el tratamiento con 25% de defoliación. La producción de biomasa disminuyó en las plantas femeninas de *C. pinnatifrons* con 25 y 50% de defoliación.

En el capítulo cuarto se analizó el patrón de distribución de las variables asociadas al crecimiento, defensa y herbivoría de cien individuos pre-reproductivos por cada una de las tres especies de estudio. Se analizó el patrón de distribución del incremento en altura del tallo, la producción de biomasa nueva en tallo y hojas, y la tasa de crecimiento relativa (RGR del inglés Relative Growth Rate) del tallo. Estas cuatro variables fueron analizadas en las tres especies, para un total de 12 comparaciones. Ocho de estas doce comparaciones mostraron un comportamiento unimodal. La concentración de compuestos secundarios fue también unimodal en las tres especies, así como la herbivoría puntual de las tres especies. Sin embargo, la tasa de herbivoría de *C. alternans* presenta una distribución multimodal. Estos resultados sugieren que durante la fase pre-reproductiva no hay diferencias intersexuales en el crecimiento y la defensa, como fue demostrado en las plantas reproductivas adultas.

Finalmente, en el capítulo quinto se exploró un posible método de separación del género en estado previo a la reproducción. El estudio abordó la comparación del contenido de ADN entre plantas masculinas y femeninas en cuatro especies del género *Chamaedorea*. El contenido de ADN en picogramos fue estadísticamente indistinto entre plantas masculinas y femeninas, aunque existe una clara diferencia entre especies.

Los resultados de este trabajo nos permiten abordar la importancia de la asignación diferencial de recursos a la reproducción en la ontogenia de las plantas, y sus implicaciones en los patrones de asignación a otras funciones. La herbivoría juega una presión de selección importante en los patrones de asignación.

ABSTRACT

Dioecious plants present contrasting resource allocation patterns between sexes. Male plants produce staminate flowers, and female plants produce both pistillate flowers and fruits. This sexual asymmetry in plants provides an excellent opportunity for examining the tradeoffs in resource allocation. In general, plants allocate resources among three major conflicting functions: reproduction, growth and maintenance (i.e., metabolism or defense) and, typically, female plants allocate a greater fraction of their resources to reproductive structures than their male counterparts. This is due to the investment in fruit and seed production, which limits the resources available for growth. Allocation theory predicts a growth-defense tradeoff leading to the hypotheses that male plants would: grow faster, be less defended against herbivores and exhibit higher herbivory than female plants. In addition, we hypothesized that juvenile plants, not having such a differential resource allocation to reproduction, would exhibit a unimodal inter-individual variation in growth, herbivory and defense.

To address these relationships, I examined the ecology of three dioecious, sympatric species. The study was conducted at the Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, a field station of the National University of México (UNAM). Three species of *Chamaedorea* were included in this study: *C. alternans*, *C. ernesti-augusti* and *C. pinnatifrons*. Beyond these, an additional species, *C. tepejilote*, was included only in one chapter.

In chapter one, predictions derived from the resource allocation tradeoffs between 1) reproduction and growth, and 2) growth and defense were tested in adult plants. We found that allocation to reproduction (proportional biomass) was consistently higher in *Chamaedorea pinnatifrons*, similar to what has been found for the other two species. Using an adult male-female paired design with three sympatric *Chamaedorea* species (*C. alternans*, *C. ernesti-augustii* and *C. pinnatifrons*), we found that growth (height, leaf production rate and biomass production) was higher in male plants of all three species. Female plants of the three species had 4-16% tougher leaves, and 8-16% higher total phenolic compounds. Accordingly, female plants sustained 49-87% lower herbivory rates than male plants.

In chapter two, reproductive effort of male and female plants was estimated using carbon as currency. Biomass, respiration and photosynthesis were measured in reproductive structures and leaves of male and female plants. The reproductive effort in terms of biomass

was 3.3-times higher in female than male plants. However, reproductive effort in terms of respiration or reproductive photosynthesis did not show significant differences between sexes.

In chapter three, the prediction that herbivory would have differential consequences on the performance of male and female plants, with female plants resulting more negatively affected, a defoliation experiment was conducted. Three defoliation treatments were applied: 1) 0%, 2) 25% and 3) 50% in both sexes. Defoliation had negative effects on the growth and reproductive structures. The length and weight of the inflorescences of treatments with defoliation 25 and 50%, significantly decreased compared to plants without defoliation. Female plants with defoliation 25 % had a lower number of fruit set in relation to female plants without defoliation. Biomass production decreased in female plants of *C. pinnatifrons* with defoliation 25 and 50%. I therefore conclude that herbivory could be a selection pressure for defenses production.

In chapter four, the pattern of phenotypic distribution of variables associated with growth, defense and herbivory of 100 plants in pre-reproductive stage was analyzed. The frequency distribution of growth (increase in stem height, biomass production of new stem and leaves, and relative growth rate of the stem) were unimodal in most comparisons. The frequency distribution of defense and herbivory were unimodal in three species of *Chamaedorea*. The absence of a significant bi-modal distribution of these characteristics suggest a lack of asymmetry among sexes in the pre-reproductive stage.

In chapter five, with the goal of discriminate between male and female plants in pre-reproductive stage of *Chamaedorea* palms, DNA content and chromosome number were analyzed in four sympatric *Chamaedorea* species. Flow cytometric analysis of DNA content was performed using nuclei isolated from young leaves of male and female plants. *C. tepejilote* and *C. alternans* with $2n = 2x = 32$, $x = 16$ and *C. pinnatifrons* and *C. ernesti-augusti*, with $2n = 2x = 26$, $x = 13$. Nuclear 2C DNA content was 5.95 pg in *C. tepejilote*, 6.67 pg in *C. pinnatifrons*, 8.26 pg in *C. ernesti-augusti* and 12.34 pg in *C. alternans*. DNA content did not vary significantly between male and female plants.

The results of this study through some light on the ecological and evolutionary significance of plant dioecy, by highlighting the importance of the differential allocation of resources to reproduction at different stages of ontogeny in plants and their implications in patterns of allocation to other functions and its consequences on herbivory.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El ambiente físico y biótico donde crecen las plantas demanda de ellas mecanismos de supervivencia y defensa, lo que determina muchas de las características de las plantas. Entre los componentes del ambiente biótico resaltan los animales que consumen tejido vegetal, como muchos insectos y mamíferos. En particular, la interacción entre las plantas y los insectos ha recibido especial atención. La diversidad y abundancia de insectos herbívoros es enorme. Existen más de 400 000 especies de insectos de este tipo que se alimentan de aproximadamente 300 000 especies de plantas (Schoonhoven *et al.*, 2006). Tal es la importancia de esta interacción que cuando Ehrlich y Raven (1964) detectaron la estrecha relación entre las mariposas y las plantas de las que se alimentan, concluyeron que las plantas y los fitófagos han coevolucionado y diversificado, en parte, en respuesta a su interacción.

Numerosas características de las plantas pudieron haber surgido como una respuesta evolutiva ante la acción de los herbívoros (Marquis 1992). La distribución de los compuestos secundarios en diferentes partes de la planta (McKey, 1979; Schoonhoven *et al.*, 2006), así como las diferencias en cantidad y tipos de compuestos secundarios entre especies (Rhoades y Cates, 1976; Coley *et al.*, 1985; Schoonhoven *et al.*, 2006), son algunos de los atributos que testifican el impacto de la herbivoría en las plantas. La presencia casi universal en el reino vegetal de barreras físicas y químicas antiherbívoro sugiere que estos atributos evolucionaron en respuesta a una importante fuerza selectiva que ha operado en el pasado.

Existe evidencia que prueba que hay una asociación positiva entre la presencia de los herbívoros y los rasgos de resistencia. La composición química secundaria es un rasgo defensivo que puede influir en el nivel de daño, y varía con el genotipo y el ambiente en el que las plantas crecen (Dirzo y Harper, 1982; Marquis, 1992). Sin embargo, debido a que estos

rasgos aparecieron hace mucho tiempo, no es posible afirmar que fueron producidos por la acción selectiva de los herbívoros o patógenos. Es posible que estos mismos rasgos evolucionaran para cumplir una función alternativa como la protección contra radiaciones u otras (Marquis, 1987).

Sin embargo, desde hace algunas décadas se ha sugerido que los compuestos secundarios (llamados así porque no parecen tener un papel directo en el metabolismo primario) protegen a las plantas del consumo de los herbívoros (Fraenkel, 1959; Rhoades y Cates, 1976; McKey, 1979; Rhoades, 1979; Coley *et al.*, 1985; Tuomi *et al.*, 1988). Ciertamente, las plantas han evolucionado un conjunto de defensas físicas (Stevenson *et al.*, 1993) y químicas (Feeny, 1976; Rhoades y Cates, 1976; Rhoades, 1979), bajo condiciones abióticas diversas, y diferentes teorías han sido creadas para explicar el surgimiento de la defensa en las plantas (Stamp, 2003).

Algunas de las principales hipótesis de la defensa son: 1) la hipótesis de la defensa óptima, 2) la hipótesis del balance Carbono-Nutriente y 3) la hipótesis de la tasa de crecimiento.

La hipótesis de la defensa óptima fue la primera en ser creada. Esta hipótesis postula que a) los organismos asignan defensas que maximicen su adecuación, b) las defensas evolucionan en proporción directa al riesgo de depredación y en proporción inversa al costo de la defensa, c) las defensas disminuyen cuando los enemigos están ausentes y se incrementan cuando están presentes y d) existe un conflicto entre la defensa y otras funciones de la planta (crecimiento y reproducción) (Rhoades, 1979). La herbivoría es la fuerza selectiva primaria para la producción de metabolitos secundarios y las defensas reducen la herbivoría son los supuestos de esta teoría. La hipótesis de la apariencia es una hipótesis derivada de esta teoría (Feeny, 1976; Rhoades y Cates, 1976). Las plantas aparentes son de lento crecimiento y por lo

tanto son fáciles de encontrar por los herbívoros. Las defensas costosas llamadas “cuantitativas” o de alto peso molecular, como los fenoles son producidos por estas plantas llamadas aparentes. En contraste, las plantas no aparentes son de rápido crecimiento y frecuentemente escapan a los herbívoros especialistas. Las defensas poco costosas llamadas “cualitativas” son relativamente de bajo peso molecular, como los alcaloides, los glucosinolatos y los glucósidos cianogénicos.

La hipótesis del balance Carbono:Nutriente describe como el aporte de carbono y nutrientes en el ambiente influyen en la expresión fenotípica de la defensa por las plantas. El carbono es asignado al crecimiento siempre que haya suficientes nutrientes minerales. El carbono en exceso o que esta por arriba de los niveles requeridos para crecer, es asignado a diferentes aleloquímicos basados en carbono y/o almacenaje de carbohidratos (Bryant *et al.*, 1983; Tuomi *et al.*, 1988). La hipótesis del balance Carbono:Nutriente asume que la herbivoría es la fuerza de selección primaria para los metabolitos secundarios constitutivos y que las defensas reducen la herbivoría, aunque no asume que la cantidad y tipo de defensa sean seleccionados por la herbivoría (Tuomi *et al.*, 1988).

La hipótesis de la Tasa de Crecimiento o hipótesis de la Disponibilidad de Recursos de Coley (*et al.* 1985), explica el patrón de defensa para grupos de especies altamente contrastantes en sus tasas de crecimiento y formas de vida. Las plantas de crecimiento rápido (p. ej., las especies pioneras o de sucesión primaria) están adaptadas a ambientes con abundancia de recursos, mantienen una tasa de crecimiento elevada, con lo que se favorece la tasa de reparación de daño foliar y, los niveles en la defensa química son generalmente bajos. En el segundo grupo están las especies de crecimiento lento (p. ej., las especies de sucesión tardía), ellas están adaptadas a ambientes pobres en recursos, se caracterizan por presentar bajas tasas de crecimiento y la reparación del daño foliar es reducida. Esta hipótesis asume que

la herbivoría es una importante fuerza de selección para la producción de metabolitos secundarios y que la defensa tiene un costo.

Ante este escenario, sería interesante estudiar el papel de la herbivoría en los sistemas sexuales, concretamente en un sistema dioico. La herbivoría podría tener una función importante en la evolución de los sistemas sexuales (Ashman, 2002).

En particular, el dioicismo se caracteriza por presentar plantas con flores estaminadas y plantas con flores pistiladas (Sakai y Weller, 1999). Típicamente las plantas masculinas de especies dioicas producen un mayor número de flores, con lo cual incrementan la dispersión de polen y con esto su adecuación (Armstrong y Irvine, 1989; Otero-Arnaiz y Oyama, 2001). Las plantas femeninas, en cambio, aunque producen menos flores, originan frutos de gran tamaño que pueden ser dispersados por animales (Bawa, 1980b, a; Delph, 1990). Este dimorfismo sexual que existe entre plantas dioicas genera diferencias muy marcadas en los patrones de asignación de recursos (Lloyd y Webb 1977). Las plantas femeninas invierten una proporción relativamente mayor de recursos para la maduración de los frutos que las plantas masculinas (Bullock, 1984; Oyama y Dirzo, 1988; Popp y Reinartz, 1988; Obeso, 1997; Rocheleau y Houle, 2001; Turcotte y Houle, 2001; Obeso y Retuerto, 2002; Dudley, 2006; Ueno *et al.*, 2006). En cambio las plantas masculinas destinan un menor porcentaje de su energía a la reproducción y aportan un alto porcentaje al crecimiento vegetativo (Boecklen *et al.*, 1990; Jing y Coley, 1990; Elmqvist *et al.*, 1991; Obeso, 1997; Montesinos *et al.*, 2006). Se esperaría que tales diferencias en el dimorfismo reproductivo (Lloyd y Webb 1977) tuviesen efectos que se manifestaran además de los conflictos de asignación de recursos, en la herbivoría.

La evidencia mostrada por la literatura no es contundente; si bien en algunos casos las plantas masculinas presentan una mayor tasa de crecimiento (Boecklen *et al.*, 1990; Jing y Coley, 1990; Elmqvist *et al.*, 1991; Obeso, 1997; Montesinos *et al.*, 2006; Stevens y Esser,

2009) y una menor concentración de metabolitos secundarios (Boecklen *et al.*, 1990; Jing y Coley, 1990; Elmqvist *et al.*, 1991), existen estudios que demuestran un mayor crecimiento en las plantas femeninas o que no existen diferencias intersexuales (Faria y Fernandes, 2001; Espirito-Santo *et al.*, 2003). Al parecer, la mayoría de los estudios en plantas dioicas demuestran la preferencia de los herbívoros por el follaje de las plantas masculinas (Jing y Coley, 1990; Hjalten, 1992; Boecklen y Hoffman, 1993; Cornelissen y Stiling, 2005).

Los conflictos de asignación prácticamente no han sido explorados en plantas que no han iniciado la reproducción debido a la falta de estructuras que permitan identificar el género. Es posible que los conflictos de asignación se manifiesten a partir de que inicia la reproducción. Sin embargo también es factible que los conflictos de asignación se manifiesten antes del primer evento reproductivo. Las diferencias intersexuales en la tasa de crecimiento, y la concentración de compuestos químicos en el sentido en que ocurren en las plantas adultas podrían manifestarse antes de iniciar la reproducción, causando diferencias intersexuales en palatabilidad y consecuentemente en la herbivoría. Sin embargo, se sabe que en la mayoría de las plantas dioicas, las plantas femeninas asignan un alto porcentaje de recursos a la reproducción. También podría ocurrir que antes de iniciar la reproducción, las plantas femeninas almacenen recursos a una tasa más acelerada con respecto a las plantas masculinas. De esta forma, las plantas femeninas podrían tener un almacenamiento suficiente de recursos para destinar a la reproducción. Bajo este escenario se esperaría que la tasa de crecimiento de las plantas pre-reproductivas fuese distinta en las plantas femeninas que en plantas masculinas.

En este estudio contrastamos los patrones de asignación a la reproducción al crecimiento, la defensa y sus consecuencias en herbivoría en plantas adultas. La distribución de las variables asociadas al crecimiento, la defensa y la herbivoría, fué explorada en plantas que no han iniciado la reproducción; y exploramos un posible método de identificación del género

que consistió en comparar el contenido de ADN nuclear mediante citometría de flujo entre plantas masculinas y femeninas de palmas dioicas del género *Chamaedorea*.

LITERATURA CITADA

- Armstrong, J.E., y Irvine, A.K. (1989) Flowering, sex ratios, pollen-ovule ratios, fruit set, and reproductive effort of a dioecious tree, *Myristica insipida* (Myristicaceae) in two different rain forest communities. *American Journal of Botany*, 76, 74-85.
- Ashman, T.L. (2002) The role of herbivores in the evolution of separate sexes from hermaphroditism. *Ecology*, 83(5), 1175-1184.
- Bawa, K.S. (1980a) Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 11, 15-39.
- Bawa, K.S. (1980b) Mimicry of male by female flowers and intrasexual competition for pollinators in *Jacaratia-dolichaula* (D Smith) woodson (Caricaceae). *Evolution*, 34(3), 467-474.
- Boecklen, W.J., y Hoffman, M.T. (1993) Sex-biased herbivory in *Ephedra-trifurca* - the importance of sex-by-environment interactions. *Oecologia*, 96(1), 49-55.
- Boecklen, W.J., Price, P.W., y Mopper, S. (1990) Sex and drugs and herbivores - sex-biased herbivory in arroyo willow (*Salix-lasiolepis*). *Ecology*, 71(2), 581-588.
- Bryant, J.P., Chapin III, F.S., y Klein, D.R. (1983) Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos*, 40, 357-368.
- Bullock, S.H. (1984) Biomass and nutrient allocation in a neotropical dioecious palm. *Oecologia*, 63(3), 426-428.
- Coley, P.D., Bryant, J.P., y Chapin, F.S. (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, 230(4728), 895-899.
- Cornelissen, T., y Stiling, P. (2005) Sex-biased herbivory: a meta-analysis of the effects of gender on plant-herbivore interactions. *Oikos*, 111(3), 488-500.
- Delph, L.F. (1990) Sex-differential resource-allocation patterns in the subdioecious shrub *Hebe subalpina*. *Ecology*, 71(4), 1342-1351.
- Dirzo, R., y Harper, J.L. (1982) Experimental studies on slug-plant interactions. III. Differences in the acceptability of individual plants of *Trifolium repens* to slugs and snails. *Journal of ecology*, 70, 101-117.
- Dudley, L.S. (2006) Ecological correlates of secondary sexual dimorphism in *Salix glauca* (Salicaceae). *American Journal of Botany*, 93(12), 1775-1783.
- Ehrlich, P.R., y Raven, P.H. (1964) Butterflies and plants: a study in coevolution. En *Foundations of ecology classic papers with commentaries* (L.A. Real, y J.H. Brown, eds), Chicago: The University of Chicago Press, pp. 362-384.
- Elmqvist, T., Cates, R.G., Harper, J.K., y Gardfjell, H. (1991) Flowering in males and females of a Utah willow, *Salix-rigida* and effects on growth, tannins, phenolic glycosides and sugars. *Oikos*, 61(1), 65-72.
- Espirito-Santo, M.M., Madeira, B.G., Neves, F.S., Faria, M.L., Fagundes, M., y Fernandes, G.W. (2003) Sexual differences in reproductive phenology and their consequences for

- the demography of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), a dioecious tropical shrub. *Annals of Botany*, 91(1), 13-19.
- Faria, M.L., y Fernandes, G.W. (2001) Vigour of a dioecious shrub and attack by a galling herbivore. *Ecological Entomology*, 26(1), 37-45.
- Feeny, P.P. (1976) Plant apparency and chemical defense. En *Coevolution of animals and plants* (L.E. Gilbert, y P.H. Raven, eds), Austin, Texas: Texas University Press., pp. 3-19.
- Fraenkel, G.S. (1959) The raison d'être of secondary plant substances. *Science*, 129, 1466-1470.
- Hjalten, J. (1992) Plant sex and hare feeding preferences. *Oecologia*, 89(2), 253-256.
- Jing, S.W., y Coley, P.D. (1990) Dioecy and herbivory: the effect of growth rate on plant defense in *Acer-negundo*. *Oikos*, 58(3), 369-377.
- Marquis, R.J. (1987) Variación en la herbivoría foliar y su importancia selectiva en *Piper arieianum* (Piperaceae). *Revista de Biología Tropical*, 35 35 (Suppl.), 133-149.
- Marquis, R.J. (1992) Selective impact of herbivores. En *Plant resistance to herbivores and pathogens. Ecology, evolution, and genetics*, Chicago, U.S.A: The University of Chicago Press, pp. 301-325.
- McKey, D. (1979) The distribution of secondary compounds within plants. En *Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites* (G.A. Rosental, y D.H. Janzen, eds), Nueva York: Academic Press, pp. 56-133.
- Montesinos, D., De Luis, M., Verdu, M., Raventos, J., y Garcia-Fayos, P. (2006) When, how and how much: Gender-specific resource-use strategies in the dioecious tree *Juniperus thurifera*. *Annals of Botany*, 98(4), 885-889.
- Obeso, J.R. (1997) Costs of reproduction in *Ilex aquifolium*: Effects at tree, branch and leaf levels. *Journal of Ecology*, 85(2), 159-166.
- Obeso, J.R., y Retuerto, R. (2002) Sexual dimorphism in holly *Ilex aquifolium*: cost of reproduction, sexual selection or physiological differentiation? *Revista Chilena de Historia Natural*, 75, 67-77.
- Otero-Arnaiz, A., y Oyama, K. (2001) Reproductive phenology, seed-set and pollination in *Chamaedorea alternans*, an understorey dioecious palm in a rain forest in Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, 17, 745-754.
- Oyama, K., y Dirzo, R. (1988) Biomass allocation in the dioecious tropical palm *Chamaedorea tepejilote* and its life history consequences. *Plant Species Biology*, 3, 27-33.
- Popp, J.W., y Reinartz, J.A. (1988) Sexual dimorphism in biomass allocation and clonal growth of *Xanthoxylum americanum*. *American Journal of Botany*, 75(11), 1732-1741.
- Rhoades, D.F. (1979) Evolution of plant chemical defense against herbivores. En *Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites* (G.A. Rosental, y D.H. Janzen, eds), New York: Academic Press, pp. 1-55.
- Rhoades, D.F., y Cates, R.G. (1976) Toward a general theory of plant anti-herbivore chemistry. En *Biochemical interaction Between Plants and Insects* (J.W. Wallance, y E.L. Mansell eds), Nueva York: Plenum Press, pp. 168-213.
- Rocheleau, A.F., y Houle, G. (2001) Different cost of reproduction for the males and females of the rare dioecious shrub *Corema conradii* (Empetraceae). *American Journal of Botany*, 88(4), 659-666.
- Sakai, A.K., y Weller, S.G. (1999) Gender and sexual dimorphism in flowering plants: A review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates, and phylogenetic

- approaches. En *Gender and Sexual dimorphism in flowering plants* (M.A. Geber, T.E. Dawson, y L.F. Delph, eds), Berlin: Springer-Verlag, pp. 1-31.
- Schoonhoven, L.M., van Loon, J.J.A., y Dicke, M. (2006) *Insect-Plant Biology*. Nueva York: oxford university Press, 421 pp.
- Stamp, N. (2003) Out of the quagmire of plant defense hypotheses. *The Quarterly Review of Biology*, 78(1), 23-55.
- Stevens, M.T., y Esser, S.M. (2009) Growth-defense tradeoffs differ by gender in dioecious trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Biochemical Systematics and Ecology*, 37(5), 567-573.
- Stevenson, P.C., Blaney, W.M., Simmonds, M.J.S., y Whightman, J.A. (1993) The identification and characterization of resistance in wild species of *Arachis* to *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of Entomological Research*, 83, 421-429.
- Tuomi, J., Niemelä, P., Chapin III, F.S., Bryant, J.P., y Sirén, S. (1988) Defensive responses of trees in relation to their carbon/nutrient balance. En *Mechanisms of woody plant defenses against insects: search for pattern* (W.J. Mattson, J. Levieux, y C. Bernard-Dagan, eds), New York: Springer-Verlag, pp. 57-72.
- Turcotte, J., y Houle, G. (2001) Reproductive costs in *Salix planifolia* ssp *planifolia* in subarctic Quebec, Canada. *Ecoscience*, 8(4), 506-512.
- Ueno, N., Kanno, H., y Seiwa, K. (2006) Sexual differences in shoot and leaf dynamics in the dioecious tree *Salix sachalinensis*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 84(12), 1852-1859.

Capítulo 1

Sex-Related Differences in Reproductive Allocation, Growth, Defense and Herbivory in Three Dioecious Neotropical Palms

Sex-Related Differences in Reproductive Allocation, Growth, Defense and Herbivory in Three Dioecious Neotropical Palms

Verónica Cepeda-Cornejo^{1*}, Rodolfo Dirzo^{1,2}

¹ Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, México, Distrito Federal, México, ² Department of Biology, Stanford University, Stanford, California, United States of America

Abstract

Background: Frequently, in dioecious plants, female plants allocate more resources to reproduction than male plants. Therefore it is expected that asymmetrical allocation to reproduction may lead to a reproduction-growth tradeoff, whereby female plants grow less than male plants, but invest more in defenses and thus experience lower herbivory than male plants.

Methodology/Principal Findings: We tested these expectations by comparing resource allocation to reproduction, growth and defense and its consequences on herbivory in three sympatric dioecious *Chamaedorea* palms (*C. alternans*, *C. pinnatifrons* and *C. ernesti-augusti*) using a pair-wise design (replicated male/female neighboring plants) in a Mexican tropical rain forest. Our findings support the predictions. Biomass allocation to reproduction in *C. pinnatifrons* was 3-times higher in female than male plants, consistent with what is known in *C. alternans* and *C. ernesti-augusti*. Growth (height and leaf production rate and biomass production) was higher in male plants of all three species. Female plants of the three species had traits that suggest greater investment in defense, as they had 4–16% tougher leaves, and 8–18% higher total phenolic compounds concentration. Accordingly, female plants sustained 53–78% lower standing herbivory and 49–87% lower herbivory rates than male plants.

Conclusions/Significance: Our results suggests that resource allocation to reproduction in the studied palms is more costly to female plants and this leads to predictable intersexual differences in growth, defense and herbivory. We conclude that resource allocation to reproduction in plants can have important consequences that influence their interaction with herbivores. Since herbivory is recognized as an important selective force in plants, these results are of significance to our understanding of plant defense evolution.

Citation: Cepeda-Cornejo V, Dirzo R (2010) Sex-Related Differences in Reproductive Allocation, Growth, Defense and Herbivory in Three Dioecious Neotropical Palms. PLoS ONE 5(3): e9824. doi:10.1371/journal.pone.0009824

Editor: Anna Traveset, Institut Mediterrani d'Estudis Avançats (CSIC/UIB), Spain

Received: November 20, 2009; **Accepted:** February 26, 2010; **Published:** March 23, 2010

Copyright: © 2010 Cepeda-Cornejo, Dirzo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIT) IN229002 (<http://www.unam.mx>). The National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT), the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), the Instituto de Ecología (UNAM) and the Dirección general de Estudios de Posgrado (DGE-UNAM), provided financial support for graduate studies to V.C.C. Field work of R.D was supported by a CONACYT grant. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: vcepeda@ecologia.unam.mx

Introduction

The Resource Allocation Principle states that if resources are limited, two or more functions compete directly and an increase in resources allocated to one function will result in a decrease in resources allocated to the other(s) [1]. In general, plants allocate resources among three major conflicting functions: reproduction, growth, and maintenance (i.e., metabolism or defense) [2]. In general, natural selection should favor individuals exhibiting higher lifetime reproductive values. However, one reproductive event can have costs, and these are usually quantified as reduced future fecundity and/or survival [3] and reduced growth [4]. This situation can be reflected, for instance, within individual plants. In *Ilex aquifolium*, the branches that produce fruits grow less than non fruiting branches [5], which demonstrates a tradeoff between growth and reproduction.

Dioecious plants (with staminate flowers produced on some plants and pistillate flowers on other plants) provide an excellent opportunity for examining the tradeoffs in resource allocation related to plant reproduction. In these species, resource allocation to reproduction is frequently asymmetrical between individuals of the two sexes [6]. Typically, female plants allocate a greater fraction of their resources (commonly measured as proportional biomass) to reproductive structures than their male counterparts [7,8], including some of our study species, *Chamaedorea* palms [9,10]. It is known that, in comparison to female plants, male plants produce more flowers [11,12], which demand a significant use of nutrients [13,14]. However, when the full reproductive season is considered, female plants incur in a considerably higher investment in reproduction, largely due to the ripening of fruits and seeds [8,15]. In female plants of dioecious species deploying greater allocation of resources to reproduction than male plants, a

tradeoff between reproduction and growth can occur, negatively impacting growth because part of the resources that could be used for the production of new leaves, stems and roots, are shifted to the production of flowers, fruits and seeds. In female plants investing a higher amount of nutrients (P, N, Mg, Ca) in reproduction than male plants, the decrease in nitrogen levels limits the production of new leaves [15,16]. Given this predominant tradeoff, female plants are expected to protect their limited growth potential against tissue loss via herbivory. Increased allocation to defense in female plants is crucial, and feasible, particularly if plants produce Carbon-based defensive compounds, a resource that is not so limited, in comparison to other scarcer nutrients [17]. In contrast, male plants have a comparatively higher availability of resources that can be deviated to growth, rather than to defense. Increased growth in male plants does not demand a high investment in defense, as these plants can compensate for tissue lost to herbivory. Differences in resource allocation to deploy resistance and tolerance traits should result in differences in herbivory damage between sexual morphs: male plants should exhibit higher levels of herbivory than female plants [18,19].

Resource allocation tradeoffs between reproduction and growth in female plants have been documented in a variety of species, including herbaceous plants, shrubs and trees (e.g., *Silene alba*: [20], *Corema conradii*: [15], *Ilex aquifolium*: [13], respectively). Independently of assessing differential reproductive allocation, some studies have shown that male plants of several dioecious species exhibit greater growth than female plants [21–23].

In addition to the growth-reproduction tradeoff, there are reasons to expect a tradeoff between growth and defense. Some precursor molecules are needed for both synthesis of proteins and secondary (defensive) metabolites [17]. Thus a tradeoff between growth and defense may be inevitable. Given that herbivory represents an important factor affecting plant fitness, anti-herbivore traits, such as secondary compounds [24], and physical defenses, such as trichomes [25] and toughness [26,27], have been regarded as adaptive responses of plant species to deal with such challenges (see [28]). Therefore, in dioecious species, patterns of differential resource allocation to reproduction between male and female plants may play an important role in determining the patterns of defense and herbivory in the field.

The tradeoffs between reproduction, growth and defense, and their consequences on herbivory of dioecious plants in the wild, have attracted the attention of researchers for years. Recently, Cornelissen & Stiling [19] performed a comprehensive meta-analysis involving 54 studies and found evidence that, overall, male plants exhibited significantly higher growth, had lower levels of putatively defensive attributes, and sustained more damage by herbivores than female plants. Surprisingly, the authors's meta-analysis did not detect significant differences in reproductive effort between male and female plants, an important premise for the deployment of the expected relationships among growth, defense and herbivory [29]. Furthermore, most studies have assessed tradeoffs between two functions and to our knowledge resource allocation tradeoffs among reproduction, growth and defense, and their herbivory levels, have been investigated only in two species of dioecious plants. In one of them, with *Baccharis halimifolia*, the authors considered only the number of flowers as a measure of allocation to reproduction [30]. This measure may not represent the total allocation to female reproduction, as fruit ripening is not taken into account. In the other study, with *Chamaedorea alternans*, resource allocation to defense was assessed only qualitatively (presence or absence of secondary compounds) [10,31,32]. Thus, further research simultaneously assessing tradeoffs among reproduction, defense and growth, and the reflection of that on

herbivory should provide both a more integrated view of allocation conflicts and evidence to help us understand the apparent lack of consistency in the reported cases in the literature.

To this end, we compared three sympatric species of dioecious palms (*Chamaedorea* spp.) from a Mexican tropical rain forest. We first assessed differences in biomass allocation to reproduction and then monitored growth for several years, measured defensive traits and estimated herbivory. We made an effort to control for the possible confounding effects of spatial heterogeneity, apparency, and phenology. We used these three sympatric congeneric species because they present detectable variations in herbivory, habitat distribution and abundance—variables that may potentially lead to local divergence in response. In a recent phylogenetic analysis of *Chamaedorea*, including a total of 63 species, the three studied species were placed in different clades [33]. This provides a means to assess if, despite the contrasting ecological conditions in which the species grow, and their phylogenetic positions, the predicted patterns of allocation and their consequences on growth and plant-herbivore interactions are consistent.

The specific questions we asked were: i) Compared to male plants, do female plants exhibit a greater biomass allocation to reproduction? ii) Do differences in allocation translate into differences in growth, defense and herbivory? iii) Are there consistent responses among the three sympatric species despite the fact they exhibit interspecific contrasts in natural levels of herbivory, microhabitat distribution, and abundance?

Methods

Study site

This study was conducted at the Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, a field station of the National University of Mexico (UNAM) (18°34'–18°36' N, 95°04'–95°09' W, 150 m a.s.l.), in the state of Veracruz, Mexico. The predominant vegetation of the area is tropical rain forest, with trees up to 35 m tall. Understorey vegetation is dominated by palms, a crucial component of the structure and diversity of the forest [34], mainly *Astrocaryum mexicanum*, and *Chamaedorea* spp. Mean annual rainfall is 4700 mm and mean monthly temperature is 23.4°C [35]. Details of the natural history and ecology of the study zone can be found in González-Soriano *et al.* [36].

Study species

The genus *Chamaedorea* includes 107 species, distributed from Mexico to Brazil and Bolivia [37], all of them dioecious. At the study site there are six sympatric species of *Chamaedorea*, including the three selected for this study: *Chamaedorea alternans* H. Wendl., *Chamaedorea pinnatifrons* (Jacq.) Oerst., and *C. ernesti-augusti* H. Wendl. The three species show a gradient in the degree of natural herbivory in the direction *C. alternans* > *C. pinnatifrons* > *C. ernesti-augusti*. These species also vary in their abundance, showing the same ranking as herbivore damage. In addition, the species have a distinguishable degree of microhabitat separation, with *C. alternans* and *C. pinnatifrons* distributed in sites of lower elevation, while *C. ernesti-augusti* typically occurs in sites of slightly higher elevation (400 m above sea level) (R. Dirzo, unpub. data). The foliage of the three species is consumed by small Chrysomelid beetles. *C. alternans* is the main food source of larvae and adult *Calythocephala marginipennis* (Chrysomelidae: Casidinae) [32]; *C. pinnatifrons* is consumed by the larvae of the same species, while *C. ernesti-augusti* shows leaf damage by an unidentified beetle (V. Cepeda-Cornejo, unpub. data).

Resource allocation to reproduction

In order to assess resource allocation to reproduction, we used available data from the literature for two of the species. Resource

allocation to reproduction in terms of proportional biomass allocated to reproductive structures had been measured previously in *C. ernesti-augusti*, by Bullock [9], and in *C. alternans*, by Oyama and Dirzo [10]. Such studies represent an ideal source of information for the present work, as they were carried out with two of our study species, *C. alternans* (formerly known as *C. tepejilote* but now assigned to its correct identity of *C. alternans* [38]), and *C. ernesti-augusti*. Such studies were carried at our study site, and specifically in the general area where we conducted this work. Furthermore, such available data allowed us not to have to destructively sample whole plants from our study populations in the Los Tuxtlas preserve. In the case of *C. pinnatifrons* we assessed biomass allocation to reproduction following the same general methodology as in the other two studies, using plants available in a population adjacent to the preserve. Six male and six female plants of *C. pinnatifrons* were harvested during the peak of the reproductive season of 2002. Plant height ranged from 1.16 m to 2.42 m in female plants and from 1.17 m to 1.74 m in male plants. Plants were dug out, taking care not to damage the roots and each plant was separated into vegetative structures (roots, stem and leaves) and reproductive structures (flowers and inflorescences in the case of male plants, and fruits and infructescences in the case of female plants). All plant materials harvested were kept at 80°C in a drying oven for 48 h, until dry weight was constant, after which they were weighed. With the dry weights of each structure we calculated the proportional allocations in the same way as in the previous studies with the other two species [9,10].

Field sampling design

In order to measure growth, leaf toughness and herbivory in the three study species we randomly chose 15 male-female pairs of plants for *C. alternans* and *C. ernesti-augusti*, and 12 pairs for *C. pinnatifrons* in March, 2001. We used a pair-wise sampling protocol to control for spatial heterogeneity. Pairs of plants were chosen to match plant height, as much as possible. Indeed, the initial height was statistically indistinguishable between members of pairs (paired *t*-tests: *C. alternans*, $t_{14} = 1.07$; $P = 0.30$; *C. pinnatifrons*, $t_{11} = 1.15$; $P = 0.27$; *C. ernesti-augusti*, $t_{14} = 1.08$; $P = 0.30$). In addition, the distance between plants of each pair was short, less than 3 m, which reduced possible heterogeneity in soil, light, humidity and local herbivore abundance. These plants were used to measure growth in terms of height increment and leaf production. An additional set of 15 male-female pairs of plants for *C. alternans*, 15 pairs for and *C. ernesti-augusti*, and 14 pairs for *C. pinnatifrons* was established in June, 2005, using the same protocol as in the first group of plants, to measure relative growth rate in terms of estimated above-ground biomass production. Again, the initial height was statistically indistinguishable between the pairs of this second group (paired *t*-tests: *C. alternans*, $t_{14} = 0.13$; $P = 0.89$; *C. pinnatifrons*, $t_{13} = -1.85$; $P = 0.09$; *C. ernesti-augusti*, $t_{14} = 0.087$; $P = 0.44$).

For each plant we measured initial height, basal diameter, number of leaves and, for the plants selected in June, 2005, length of rachis of each one of the leaves. Initial height was measured as the distance between the basal diameter (Figure 1C) and the point of departure of the newest leaf from the apical meristem (Figure 1A). Initial basal diameter was measured with a digital caliper to the nearest 0.01 mm. Leaf production rate was measured as the number of new leaves produced, as a function of the initial number of leaves. To monitor growth and calculate growth metrics (see below), the initial leaves and the points of initial measurement of basal diameter were marked with permanent, water proof ink.

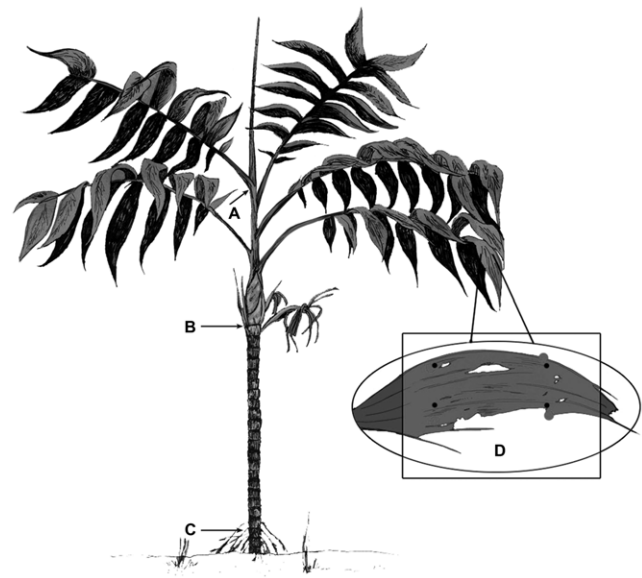


Figure 1. Schematic representation of *Chamaedorea alternans*. Distance between points A and C represents total height. Distance between A and B represents stem height. D indicates demarcated area (encompassed by the four dots) to measure herbivory rate. doi:10.1371/journal.pone.0009824.g001

Growth metrics

We used several metrics to describe growth of male and female plants.

Total height increment (THI) was calculated from 2001 to 2002, using the increment in stem height (see Figure 1A-C), as $THI = (\ln H_{final} - \ln H_{initial})/t$, where H = height and t = time in years [39].

Leaf production rate (LPR) was calculated both from 2001 to 2002 and again from 2005 to 2007 as: $LPR = \text{newly produced leaves}/(\text{initial number of leaves}/t)$, where t = time in years.

Relative growth rate (RGR) was assessed as the change in aboveground biomass (stems and leaves) from the initial time (2005) to the final time (2007). We first measured stem length from the basal diameter (Figure 1A) to the distal point of the most recently produced metamer (Figure 1B); therefore, this variable considers the addition of new metamers and the elongation of internodes. RGR was calculated using non-destructive estimates of plant biomass through allometric equations (see below) as $RGR = (\ln W_{final} - \ln W_{initial})/t$, where W = biomass in dry weight and t = time in years [39]. Since this metric does not take into account leaves that fall during the interval, we estimated leaf mass based on all the produced leaves from each plant during the two years of study.

Net biomass production (BP) in both stem and leaves was calculated from 2005 to 2007 as: $BP = \text{above-ground biomass produced}/(\text{initial above-ground biomass}/t)$ where t = time in years. Plant biomass was calculated by allometry, calculating regression equations for stems and leaves (in dry weight). Given that the development of these equations required destructive harvesting we deemed necessary to use plants independent from our matched pairs to avoid damage in these plants used for long-term monitoring. We developed regression equations by harvesting plants of different sizes, of all three species, located outside the reserve, and measuring lengths and diameters of stems, and lengths of rachis of leaves of plants of different sizes (see [40]). We dried these materials at 60°C in an oven for at least 96 h (until

constant weight) and measured dry weight of these structures. Data were fitted to regression equations (linear for stem, and quadratic for leaves), using JMP, vers. 6.0. Best fitting was assessed using the highest coefficient of determination (R^2). The resulting equations, which were used to estimate biomass (weight in g) from standing measurements of height (cm), diameter (mm), and rachis length of leaf (cm) are shown in Table 1 (only the best fitting equations are shown).

Defense

In the three study species, we used two independent variables to estimate defense, leaf toughness [24] and secondary metabolites. In particular, for the latter, we quantified total phenolic compounds concentration, as it is known that these defensive compounds are present in the study species [32] and because theory predicts that the study species, being shade tolerant, slow growth species, are likely to use Carbon-based defenses of high molecular weight [41,42]. To measure toughness we randomly selected two leaflets from leaf # 2 on the phyllotaxis in each plant of the 15 selected (male-female) pairs in 2001. We took three measures for each leaflet in different points (basal, middle and apical) using a 500 g leaf penetrometer (Chatillon, Gauge-R CATL 516–500).

To measure total phenolics concentration, we collected leaves from a selected group of 17–22 plants (different from the pairs used for growth, to prevent alterations of the growth of such paired plants) of each sex, of each species. Two randomly selected leaflets were collected from leaves in positions #2 and #3 in the plant's phyllotaxis. This material was kept in liquid nitrogen and transported to the laboratory, where a fraction (1 g) was macerated with 50 ml of liquid nitrogen in a mortar. The extraction of the phenolic compounds was made in 80% aqueous methanol for 24 h, and the Price and Butler method, modified by Graham, was used to assess total phenolics [43]. The Prussian blue reaction was measured at 720 nm in a spectrophotometer (Genesis 20), and was compared to a standard curve obtained from tannic acid.

Herbivory

An initial estimation of herbivory was obtained by calculating standing levels of damage in the 15 pairs of plants of each species selected in 2001. To this effect, for each plant we collected four randomly selected leaflets from the 3rd leaf in the plant's phyllotaxis. The leaflets were pressed and dried. Digital images were taken and analyzed using the software WinDias ver. 2.0 (Delta-T Devices) to calculate percentage leaf area damaged. WinDias software measures the actual (remaining) leaf area (ALA), and estimates the potential leaf area (PLA) (undamaged) by drawing out the contours and filling in the spaces of damaged areas. When damage was very extensive we estimated PLA by

matching the remaining area with a comparable intact leaflet of the same species. Leaf herbivory (H), defined as the percentage of leaf area damaged, was calculated as: $H = (PLA-ALA/PLA)*100$. The H average of all leaves sampled from each plant was used to estimate herbivory per plant.

In addition, we complemented such standing measures of damage by measuring the rates of herbivory, using the damage accumulated in 286 days (September 30, 2001–July 13, 2002) on plants from the 15 pairs. Four intact leaflets from a leaf at position #2 in the phyllotaxis were randomly selected. A section of the leaflet was marked out by four indelible-ink points painted on the underside of the leaflet, to demarcate a rectangle of 3×18 cm in *C. alternans*, 2.6×9 cm in *C. pinnatifrons*, and a square 10×10 cm in *C. ernesti-augusti*. Onto this demarcated area, we placed a transparent grid (2 mm squares) to count the number of intact squares and squares with herbivory and the ratio of squares with damage:total squares was used to measure leaf damage. After 286 days we measured the percentage of leaf area damaged and calculated the rates of herbivory (HR) as:

$HR = (\% \text{ damaged area}_{\text{final}} - \% \text{ damaged area}_{\text{initial}})/t$, where t = time in days.

Statistical analysis

Intersexual differences in resource allocation to reproduction were compared with a Mann-Whitney U test for independent samples (Statistica, 1984–2000 by StatSoft, Inc.), and the possible variation in allocation of biomass to reproduction (percentage of total biomass of inflorescences or infrutescences) as a function of plant height (see [10]) was examined by linear regression (JMP vers. 6.0) in *C. pinnatifrons*. Growth variables were analyzed using nested multivariate analyses of variance (MANOVA), one for each of the two periods and their corresponding variables, as indicated above. MANOVAs were followed by nested ANOVAs. The ANOVA model included the effect of sex and species, and plant pair nested within species as a random-effect, as well as the sex \times species interaction. This was applicable to all variables except total phenolic concentration (given that these were plants independent to the 15 pairs). In those cases in which the interaction term was significant, indicating that intersexual differences varied across species, we performed a post-hoc analysis, using the test slices comparison (JMP vers. 6.0), which analyzes each of the levels of the interaction. Given that the studentized residuals of all variables, except leaf production, were not normally distributed (after testing with a Shapiro-Wilks test (JMP vers. 6), we performed a Box Cox transformation (JMP vers. 6), which yielded normalized data. In addition to nested ANOVAs, differences among species in herbivory rates were analyzed with a Tuckey test.

Table 1. Regression models used for estimates of above-ground biomass.

Species		b_0	b_1	b_2X^2	df	F	R^2
<i>C. alternans</i>	Leaf	-11.158	0.252	$0.0006 \times (X - 91.164)^2$	1, 30	546.5***	0.94
	Stem	5.792	0.037		1, 70	2077.9***	0.96
<i>C. pinnatifrons</i>	Leaf	-2.693	0.115	$0.0019 \times (X - 40.161)^2$	1, 42	140.6***	0.87
	Stem	-0.508	0.038		1, 53	3104.5***	0.98
<i>C. ernesti-augusti</i>	Leaf	2.483	0.164	$0.0018 \times (X - 29.882)^2$	1, 39	184.18***	0.96
	Stem	-1.530	0.041		1, 47	14472.8***	0.95

Models for biomass prediction are of the form $Y = b_2X^2 + b_1X + b_0$ in leaves and $Y = b_1X + b_0$ in stems. Y is the dependent variable (dry weight in g), X is the independent variable (leaves: rachis length [cm], stem: height [cm] \times diameter [mm]), b_0 , b_1 and b_2 are constants in the equation. *** $P < 0.0001$

doi:10.1371/journal.pone.0009824.t001

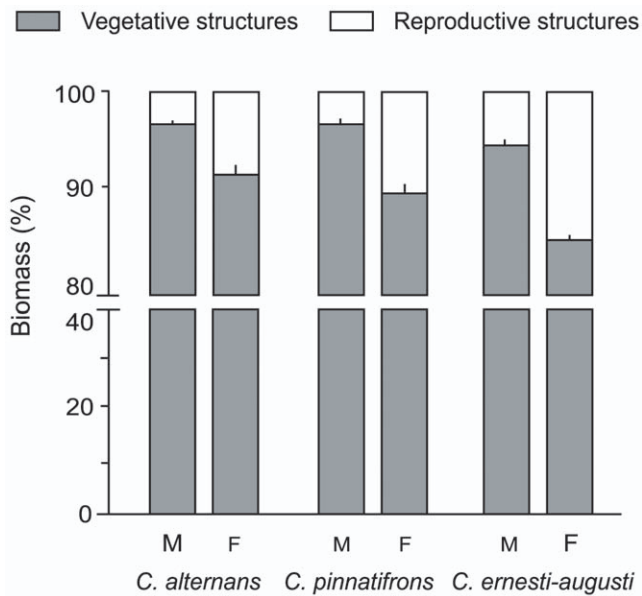


Figure 2. Biomass allocation to reproductive and vegetative structures in male (M) and female (F) plants of the three studied species. Data for *C. alternans* and *C. ernesti-augusti* were obtained from Oyama and Dirzo (1988), and Bullock (1984), respectively. Error bars denote standard error. doi:10.1371/journal.pone.0009824.g002

Results

Resource allocation to reproduction

Resource allocation to reproduction in *C. pinnatifrons* was 3.04 times higher in female plants, compared to male plants (Figure 2). This difference was highly significant ($U_{0.05(2),6.6} = 0.00$, $P = 0.0039$). This result is consistent with what is known for the other two species of study (Figure 2): in *C. alternans* resource allocation to reproduction in female plants was 2.55 higher than in male plants [10], and 2.75 for *C. ernesti-augusti* [9]. Biomass allocation to reproductive structures (i.e., the percentage of total biomass) did not change with plant height (both male and female plants: $F_{1,10} = 0.2550$, $P = 0.6257$).

Growth metrics

The MANOVA for the growth variables measured in both periods (2001–2002, 2005–2007) was highly significant ($F_{88,76} = 2.38$, $P < 0.0001$ and $F_{135,114} = 2.5$, $P < 0.0001$, respective-

ly). Male and female plants differed in growth in both years of the study ($F_{2,38} = 12.45$, $P < 0.0001$ and $F_{3,38} = 2.9$, $P = 0.047$, respectively). The species of palms also differed in growth in the two periods ($F_{4,76} = 13.77$, $P < 0.0001$ and $F_{6,76} = 23.04$, $P < 0.0001$, respectively), and the patterns between the sexes were consistent in all species (interaction sex \times species term in the period 2001–2002 [$F_{4,76} = 1.37$, $P = 0.252$], and in the period 2005–2007 [$F_{6,76} = 1.96$, $P = 0.08$]).

The subsequent ANOVAs on total height increment (THI) and leaf production rate (LPR) (2001–2002, 2005–2007) showed that males grew faster than females (Table 2, Figure 3A, B). In *C. alternans*, growth expressed in terms of THI was higher in male plants compared to female plants (Figure 3A), with a two-fold difference in stem elongation (14.47 ± 2.37 cm/yr vs. 6.95 ± 2.09 cm/yr, respectively). A similar response was found in *C. pinnatifrons*, with a 31% higher increment in male than in female plants (7.61 ± 1.96 cm/yr vs. 5.2 ± 1.02 cm/yr) and *C. ernesti-augusti*, with a 46% difference in male vs. female plants (8.69 ± 0.75 cm/yr vs. 4.64 ± 0.68 cm/yr, respectively).

In the case of LPR in 2001–2002, male plants produced significantly more leaves than female plants (Table 2, Figure 3B). In *C. alternans* LPR was 1.36-times higher in male than female plants (2.83 ± 0.17 leaves/leaf/yr vs. 2.08 ± 0.17 leaves/leaf/yr, respectively). *Chamaedorea pinnatifrons* had a slightly higher increment in male than in female plants (2.4 ± 0.2 leaves/leaf/yr vs. 2.2 ± 0.22 leaves/leaf/yr, respectively) and male plants of *C. ernesti-augusti* produced 1.48-times more leaves than female plants (3.25 ± 0.16 leaves/leaf/yr vs. 2.19 ± 0.2 leaves/leaf/yr, respectively). Given that in 2005–2007 we measured leaf production in order to estimate biomass production, we were able to calculate, again, LPR and check for consistency of results with the data from the first period. Again, the intersexual differences were consistent across species, with male plants significantly producing more leaves than female plants (Table 2). In the period 2005 to 2007 LPR in *C. alternans* was 1.25-times higher in male than in female plants (2.99 ± 0.18 leaves/leaf/yr vs. 2.37 ± 0.17 leaves/leaf/yr, respectively); in *C. pinnatifrons* it was 1.21-times higher in male than in female plants (2.86 ± 0.12 leaves/leaf/yr vs. 2.2 ± 0.1 leaves/leaf/yr, respectively) and *C. ernesti-augusti* exhibited 1.21-times more LPR in male than female plants (2.58 ± 0.17 leaves/leaf/yr vs. 2.13 ± 0.17 leaves/leaf/yr, respectively).

A comparison of RGR in the period 2005–2007 did not detect differences across species and plant sex (Table 2). However, net biomass production (BP) at the end of the period showed intersexual differences depending on the species. Male plants of *C. ernesti-augusti* produced 30% more net biomass than female

Table 2. Nested ANOVAs to assess the effects of species, sex and their interaction, on four growth variables measured in two periods.

Source of variation	2001–2002			2005–2007			
	THI	LPR	df	RGR	BP	LPR	df
	F	F		F	F	F	
Species	3.08*	17.89***	2	2.16	17.96***	10.30***	2
Sex	20.30***	5.26*	1	2.15	5.75*	4.23*	1
Pair[Species]	0.73	0.47	39	0.76	0.83	0.54	41
Species \times Sex	2.19	0.71	2	0.10	4.26*	1.65	2

Total height increment (THI) and leaf production rate (LPR) for 2001–2002; relative growth rate (RGR), net biomass production (BP) and LPR for 2005–2007. * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$.

doi:10.1371/journal.pone.0009824.t002

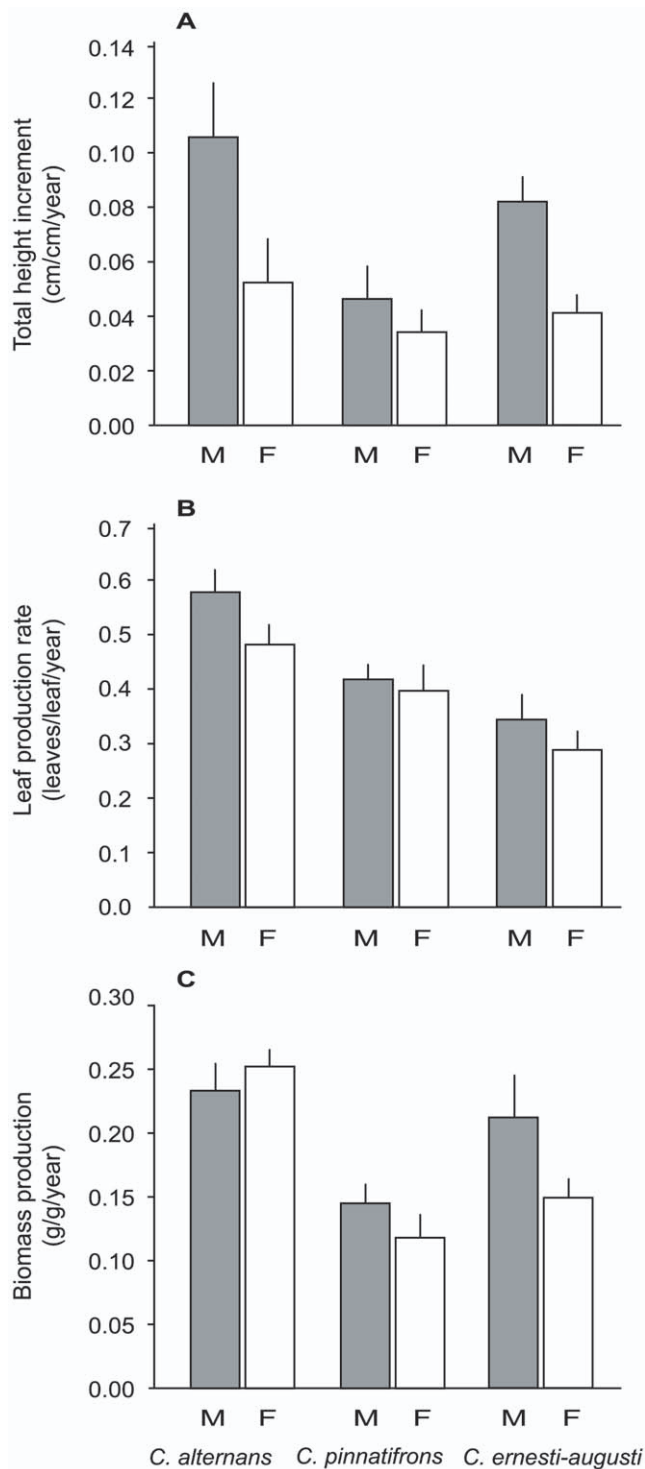


Figure 3. Comparison between male (M) and female (F) plants of four growth variables of the three studied species. A) total height increment, B) leaf production rate, C) above-ground biomass production. Error bars denote standard error.
doi:10.1371/journal.pone.0009824.g003

plants ($F_{1,41} = 6.18$, $P = 0.017$) and in *C. pinnatifrons* male plants produced 19% more biomass ($F_{1,41} = 6.85$, $P = 0.012$), while no significant differences were detected in the case of *C. alternans* ($F_{1,41} = 0.99$, $P = 0.325$) (Table 2, Figure 3C).

Defense

ANOVA detected differences between species in both leaf toughness and total phenolics (Table 3). Toughness values were higher in female plants than in male plants in all three species (a 4% difference in *C. alternans*, 9% in *C. ernesti-augusti*, and 16% in *C. pinnatifrons*) (Table 3, Figure 4A). Similarly, total phenolics concentration was consistently higher in female than in male plants, with contrasts that ranged from 18% (*C. alternans*), to 14.5% (*C. pinnatifrons*), to 7.6% (*C. ernesti-augusti*) (Figure 4B).

Herbivory

Intersexual variation in natural herbivory was also highly significant (Table 3, Figure 5) and consistent across the three species. In all three species standing damage in male plants was 2–4.7 higher in male than female plants (Figure 5A). Rates of herbivory showed the same pattern, with differences that were 1.98, 3.85, and 7.50 times higher in male than in female plants of *C. alternans*, *C. pinnatifrons* and *C. ernesti-augusti*, respectively (Figure 5B). In addition to the intersexual variation, overall standing damage showed a gradient across species in the direction *C. alternans* > *C. pinnatifrons* > *C. ernesti-augusti* ($Q = 2.44$, $\alpha = 0.05$) (Figure 5A). Herbivory rates showed the same gradient ($Q = 2.43$, $\alpha = 0.05$) (Figure 5B).

Discussion

The results of this study show an asymmetric allocation of biomass to reproduction between female and male plants, where the biomass allocated in female plants was higher than in male plants. Correlated with this, the growth observed in stem, number of leaves and biomass production was greater in male than female plants of all three species. In addition, female plants were significantly better defended (leaf toughness and phenolic compounds) than male plants, and herbivore damage was greater in male than in female plants. These results support the predictions of the consequences of intersexual differences in resource allocation on reproduction, growth and defense, and its repercussions on herbivory in dioecious plant species. To our knowledge, this is the first study that integrates the relevant elements for the Resource Allocation Principle (differential resource allocation to reproduction, growth and defense) and its consequences for herbivory, in a single system, in this case a group of long-lived, tropical sympatric species of the same genus. In addition, it is worth noting that out of 54 studies available in the literature [19], only a minor fraction (3) analyzed species from tropical forests, and only one was done involving palms. This is critical, as it is known that the proportion of dioecious species at the global scale is particularly high in the tropics [44] and that palms are a crucial structural component of tropical forests [34].

Our study is largely based on a design of replicated pairs of neighboring male and female plants followed in multi-year observations. This is relevant in that such design minimizes the effect of uncontrolled variables for the comparisons between male and female plants. Indeed, it is possible that one of the reasons that may be responsible for the inconsistency of intersexual patterns reported in the literature [19] may be the lack of control in microhabitat differences among plants. Although most of the plant variables in this study were based on our matched-pair design, some variables had to be measured from independent plants, as this required destructive sampling (biomass allocation to reproduction, allometric relationships and estimation of phenolic compounds). We posit that this might not be a significant limitation, as those plants in which destructive sampling was necessary were located in the same general area and belong to the

Table 3. Nested ANOVAs to assess the effects of species, sex and their interaction, on two defensive characteristics and two estimates of herbivory.

Source of variation	Defensive characteristics				Herbivory			
	Leaf toughness		Total phenolics		Standing damage		Herbivory rate	
	F	df	F	df	F	df	F	df
Species	42.83***	2	52.47***	2	45.47***	2	72.84***	2
Sex	6.51*	1	12.64***	1	24.78***	1	63.80***	1
Pair[Species]	0.79	39			0.58	37	1.24	39
Species × Sex	0.65	2	0.91	2	1.22	2	2.0948	2

*P<0.05, **P<0.001, *** P<0.0001.

doi:10.1371/journal.pone.0009824.t003

same populations of the matched pairs. This however is a possible caveat that needs to be taken into account in the following discussion of our results.

Intersexual differences in resource allocation to reproduction

The difference in biomass proportions allocated to reproduction between sexual morphs of our study plants (~3-times greater in female plants) falls within the range found for other dioecious species: 1.7 in *Corema conradii* [15], 2.5 in *Salix sachalinensis* [45], 3.3 in *Xanthoxylum americanum* [46] and 4.4 in *Eurya japonica* [8]. Consistent with this, intersexual contrasts in nutrient content have also been documented [14]. In *Salix glauca* the concentration of P and N in seeds is 2.5 and 1.9 times higher than that of pollen [16]. Fruit formation in *Corema conradii* demands 1.6 times more Mg and 2.1 times more Ca than male flowers production [15]. In contrast, a few studies have failed to detect differences in reproductive effort in terms of biomass [47] or number of flowers [48]. In fact, surprisingly, Cornelissen & Stiling's [19] meta-analysis failed to detect an overall intersexual difference in terms of reproductive biomass. Such inconsistency of results might be explained by the timing and type of reproductive structure that is analyzed. In some studies, for example, allocation to reproduction has been considered in terms of flowers. Although reproductive allocation in terms of biomass and nutrients during the flowering stage may be greater for male plants [11,13,14], female plants undergo a greater reproductive effort when the entire reproductive process is considered, including the flowering, fruiting and seed dispersal periods [8] and so male-female comparisons of allocation to reproduction need to take all these stages into consideration. Other reasons why differences in reproductive allocation are smaller than expected, or even absent, may be "the currency" used to estimate allocation (carbon or nutrients) and methods of estimation of reproductive allocation (biomass, respiration or photosynthesis). Environmental heterogeneity may also lead to seemingly inconsistent results. For example, Reekie and Bazzaz [49], found that variation in reproductive effort (proportion of resources diverted to reproductive organs) depends of availability of light and/or nutrients, thus emphasizing the need for controlling environmental variation to compare intersexual allocation to reproduction.

Intersexual differences in growth

Most of the expectations regarding a resource allocation tradeoff between reproduction and growth were met by the three sympatric plants of this study. Female plants of the three species of

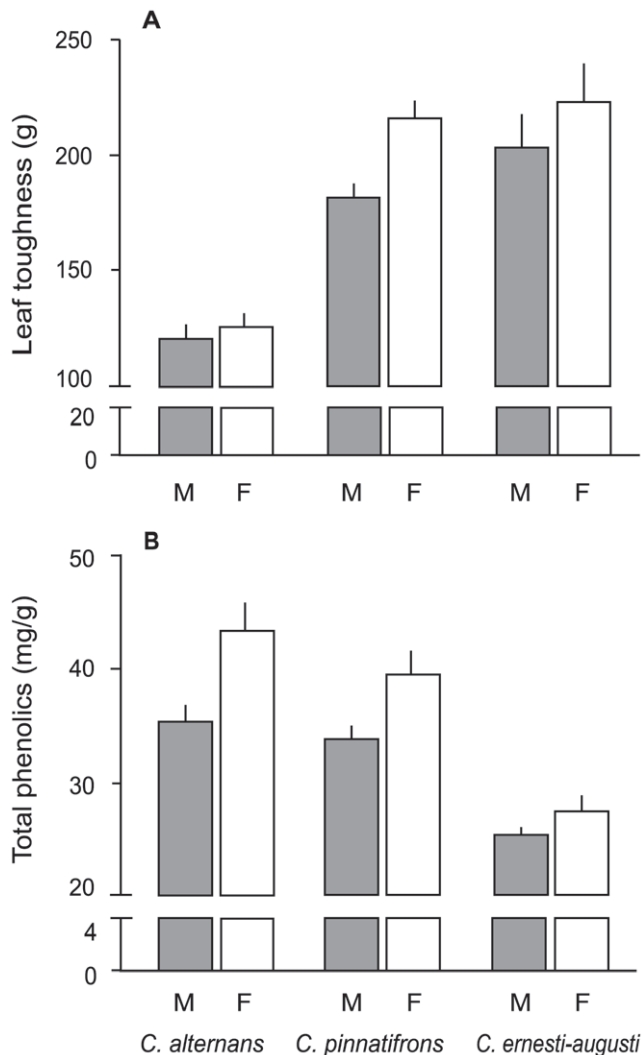


Figure 4. Comparison between male (M) and female (F) plants in two defensive characteristics of the three studied species. A) leaf toughness, B) total phenolic concentration. Error bars denote standard error.

doi:10.1371/journal.pone.0009824.g004

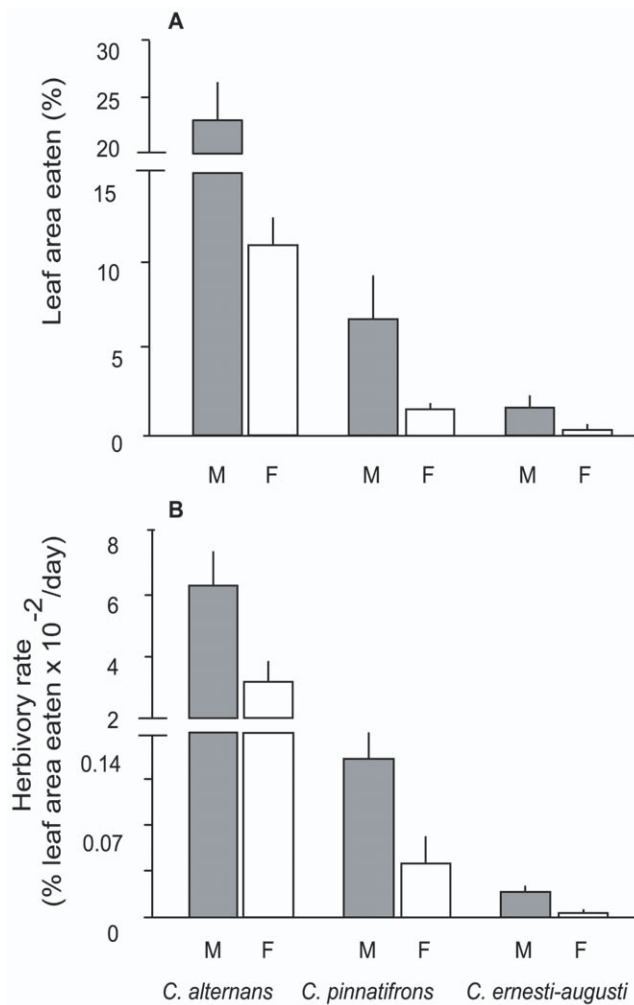


Figure 5. Comparison of two measures of herbivory between male (M) and female (F) plants of the three studied species. A) standing levels of damage measured in 2002, B) rates of herbivory measured in 2001–2002. Error bars denote standard error. doi:10.1371/journal.pone.0009824.g005

Chamaedorea exhibited a poorer performance in essentially all growth variables we measured. In general, out of twelve possible intersexual comparisons (THI, LPR, RGR and BP in all three species), eight showed significantly higher values in male than in female plants, and four were statistically non-significant. Furthermore, the intersexual differences in leaf production rates are consistent with those found in a previous study with *C. alternans* in the same study site although, surprisingly, that study did not detect significant contrasts in height increment [31].

Intersexual differences and plant-herbivore interactions

The amount of resources that a plant allocates to reproduction has been found to have significant consequences for growth and this in turn affects a host of additional variables relevant for plant performance in the field, including their interactions with herbivores. Associated to differences in growth, female plants are expected to increase the allocation to defenses for the protection of vegetative tissue (e.g., leaves), because slower growth rates make it more difficult for a plant to replace damaged tissue [50]. Male plants, in contrast, could deploy greater growth and faster leaf turnover rates, could have greater capacity to compensate for

tissue loss to herbivory, and would be under lesser selection for allocation to defenses. Accordingly, we found evidence that resource allocation to defense is greater, and growth is lower in female than in male plants. This is compatible with an argument of a growth-defense tradeoff [17]. Particularly, female plants in understory tropical forests can produce defensive compounds based on Carbon, a resource that is not so limited, in comparison to other scarcer nutrients (e.g. nitrogen) [17]. In accordance with this, we found that female plants had higher concentrations of total phenolic compounds. Likewise, leaf toughness, a physical trait known to be correlated with tannin concentration [51], and known to reduce herbivory [26,27], was also significantly higher in the foliage of female plants of all three study species. Several studies support the expectation of greater allocation to Carbon-based defenses in the leaves of female plants, as compared to male plants of dioecious species, including the trees *Acer negundo* [22], and *Salix rigida* [21].

As a result of intersexual differences in defense, herbivory levels are expected to be higher in male than female plants and, indeed, differences in herbivory have been associated to contrasts in leaf palatability as determined by the plant's secondary chemistry (see [18,22,26,52,53]). Leaves with low concentration of secondary metabolites and less toughness could explain that male plants had higher herbivory than female plants in our three study species. In their meta-analysis, Cornelissen and Stiling [19] found that the available literature supports such a trend for male-biased herbivory in dioecious plants in general.

The differences in growth rates and both physical (toughness) and chemical (phenolic compound) defenses between sexes suggest alternative anti-herbivory mechanisms (for male and female plants) to deal with herbivory: greater investment in defenses, or resistance (female plants); and compensatory growth, or tolerance (male plants). Resistance is any plant trait that reduces the preference or performance of herbivores (e.g. thorns, hairs, unpalatable secondary chemicals) [54]. Tolerance is the ability of plants to regrow and/or reproduce after herbivory. Some of the mechanisms involved in increased tolerance are high relative growth rates, increased branching or tillering, increased leaf photosynthetic rate and increased percentage of fruit set [50,54]. This alternative defense argument is compatible with our findings: male plants seem to deploy tolerance (or at least a lower degree of resistance) while female plants deploy resistance (or a lower degree of tolerance) to deal with herbivores in their natural environment.

Perspectives

In this paper we analyzed both the reproduction-growth and growth-defense tradeoffs. However, other tradeoffs are possible, for instance: current reproduction-survival, current reproduction-future reproduction, and reproduction-defense [3,55]. It is foreseeable that these additional tradeoffs may influence the tradeoffs we studied. Further work is warranted in which the reproduction-growth and growth-defense tradeoffs are analyzed in the context of other relevant tradeoffs depending on the species of study.

Although our results are based on a study of three sympatric and congeneric species, the consistency of results is striking, given that the species exhibit differences in microhabitat distribution and in the natural levels of herbivory (cf. Study species and Results sections). Furthermore, a recent phylogenetic analysis of *Chamaedorea* [33], shows that the three studied species are located in different clades, suggesting that similarities in growth, herbivory and defense among species could be the result of convergent evolution in response to similar selection pressures (i.e., herbivory)

driven by asymmetrical allocation to reproduction. This is an aspect that warrants further research.

Acknowledgments

We thank Ignacio Méndez for invaluable help with statistical analysis. Zenón Cano Santana and Eduardo Morales offered valuable guidance throughout this study. Patricia Guevara helped with chemical analysis and Armando Aguirre provided assistance with field work. Karina Boege read

previous drafts and offered suggestions to improve the manuscript. We are grateful to the Los Tuxtlas Tropical Research Station for logistical support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: VCC RD. Performed the experiments: VCC RD. Analyzed the data: VCC RD. Contributed reagents/materials/analysis tools: RD. Wrote the paper: VCC RD.

References

- Levins R (1968) Evolution in changing environments. NJ, USA: Princeton University Press.
- Stearns SC (1992) Trade-offs. The evolution of life histories: Oxford University Press. pp 72–90.
- Obeso JR (2002) The costs of reproduction in plants. *New Phytologist* 155: 321–348.
- Karlsson S, Méndez M (2005) The resource economy of plant reproduction. In: Reekie EG, Bazzaz FA, eds. Reproductive allocation in plants. United States of America: Elsevier Academic Press publications. pp 1–49.
- Obeso JR (1997) Costs of reproduction in male and female *Eurya japonica* (Theaceae) at tree and branch levels. *Journal of Ecology* 85: 159–166.
- Lloyd DG, Webb CJ (1977) Secondary sex characters in plants. *Botanical Review* 43: 177–216.
- Antos JA, Allen GA (1999) Patterns of reproductive effort in male and female shrubs of *Oemleria cerasiformis*: A 6-Year Study. *Journal of Ecology* 87: 77–84.
- Suzuki AA (2005) Reproductive investment in male and female *Eurya japonica* (Theaceae) at tree and branch levels. *American Journal of Botany* 92: 2003–2009.
- Bullock SH (1984) Biomass and nutrient allocation in a neotropical dioecious palm. *Oecologia* 63: 426–428.
- Oyama K, Dirzo R (1988) Biomass allocation in the dioecious tropical palm *Chamaedorea tepjolote* and its life history consequences. *Plant Species Biology* 3: 27–33.
- Otero-Arnaiz A, Oyama K (2001) Reproductive phenology, seed-set and pollination in *Chamaedorea alternans*, an understory dioecious palm in a rain forest in Mexico. *Journal of Tropical Ecology* 17: 745–754.
- Torimaru T, Tomaru N (2006) Relationships between flowering phenology, plant size, and female reproductive output in a dioecious shrub, *Ilex leucoclada* (Aquifoliaceae). *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 84: 1860–1869.
- Obeso JR, Retuerto R (2002) Sexual dimorphism in holly *Ilex aquifolium*: cost of reproduction, sexual selection or physiological differentiation? *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 67–77.
- Turcotte J, Houle G (2001) Reproductive costs in *Salix planifolia* ssp *planifolia* in subarctic Quebec, Canada. *Ecoscience* 8: 506–512.
- Rocheleau AF, Houle G (2001) Different cost of reproduction for the males and females of the rare dioecious shrub *Corema conradii* (Empetraceae). *American Journal of Botany* 88: 659–666.
- Dudley LS (2006) Ecological correlates of secondary sexual dimorphism in *Salix glauca* (Salicaceae). *American Journal of Botany* 93: 1775–1783.
- Herns DA, Mattson WJ (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology* 67: 283–335.
- Ågren J, Danell K, Elmqvist T, Ericson L, Hjaltn J (1999) Sexual dimorphism and biotic interactions. In: M.A. G, T.E. D, L.F. D, eds. Gender and sexual dimorphism in flowering plants Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. pp 217–246.
- Cornelissen T, Stiling P (2005) Sex-biased herbivory: a meta-analysis of the effects of gender on plant-herbivore interactions. *Oikos* 111: 488–500.
- Gross KL, Soule JD (1981) Differences in biomass allocation to reproductive and vegetative structures of male and female plants of a dioecious, perennial herb, *Silene alba* (Miller) Krause. *American Journal of Botany* 68: 801–807.
- Elmqvist T, Cates RG, Harper JK, Gardfjell H (1991) Flowering in males and females of a Utah willow, *Salix rigida* and effects on growth, tannins, phenolic glycosides and sugars. *Oikos* 61: 65–72.
- Jing SW, Coley PD (1990) Dioecy and herbivory: the effect of growth rate on plant defense in *Acer negundo*. *Oikos* 58: 369–377.
- Montesinos D, De Luis M, Verdu M, Raventos J, Garcia-Fayos P (2006) When, how and how much: Gender-specific resource-use strategies in the dioecious tree *Juniperus thurifera*. *Annals of Botany* 98: 885–889.
- Coley PD (1983) Herbivory and defensive characteristics of tree species in a lowland tropical forest. *Ecological Monographs* 53: 209–233.
- Fordyce JA, Agrawal AA (2001) The role of plant trichomes and caterpillar group size on growth and defence of the pipevine swallowtail *Battus philenor*. *Journal of Animal Ecology* 70: 997–1005.
- Fincher RM, Dyer LA, Dodson CD, Richards JL, Tobler MA, et al. (2008) Inter- and intraspecific comparisons of antiherbivore defenses in three species of rainforest understory shrubs. *Journal of Chemical Ecology* 34: 558–574.
- Sagers CL, Coley PD (1995) Benefits and costs of defense in a neotropical shrub. *Ecology* 76: 1835–1843.
- Agrawal AA (2007) Macroevolution of plant defense strategies. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 103–109.
- Delph LF (1999) Sexual dimorphism in life history. In: M.A. G, T.E. D, L.F. D, eds. Gender and sexual dimorphism in flowering plants Berlin Heidelberg: Springer-Verlag. pp 149–173.
- Krischik VA, Denno RF (1990) Patterns of growth, reproduction, defense, and herbivory in the dioecious shrub *Baccharis-halimifolia* (Compositae). *Oecologia* 83: 182–190.
- Oyama K (1990) Variation in growth and reproduction in the neotropical dioecious palm *Chamaedorea tepjolote*. *Journal of Ecology* 78: 648–663.
- Oyama K, Dirzo R (1991) Ecological aspects of the interaction between *Chamaedorea tepjolote*, a dioecious palm and *Calyptocephala marginipennis*, a herbivorous beetle, in a Mexican rain forest. *Principes* 35: 86–93.
- Thomas MM, Garwood NC, Baker WJ, Henderson SA, Russell SJ, et al. (2006) Molecular phylogeny of the palm genus *Chamaedorea*, based on the low-copy nuclear genes PRK and RPB2. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 398–415.
- Oyama K, Dirzo R, Ibarra-Manriquez G (1992) Population structure of the dominant palm species in the understory Mexican lowland rain forest. *Tropics* 2: 23–28.
- Soto M, Gama L (1997) Climas. In: E.G. S, Dirzo R, R.C. V, eds. Historia natural de Los Tuxtlas. México: Universidad Nacional Autónoma de México. pp 7–23.
- González-Soriano E, Dirzo R, Vogt R Historia natural de Los Tuxtlas. México: Universidad Nacional Autónoma de México. 647 p.
- Govaerts R, Dransfield J, Zona SF, Hodel DR, Henderson A (2006) World Checklist of Arecaceae. The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew, Published on the Internet, Royal Botanic Gardens, Kew website (2010), <<http://www.kew.org/wcsp/>>.
- Quero HJ (1994) Flora de Veracruz. Xalapa, Veracruz: Instituto de Ecología, A. C., University of California, Riverside. 118 p.
- Hunt R (1982) Concepts in plant growth analysis. Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis. London: Edward Arnold. pp 14–46.
- Ramos A, Bovi MLA, Folegatti MV, Diotto AV (2008) Leaf area and aboveground biomass estimates in peach palm using allometric relationships. *Horticultura Brasileira* 26: 138–143.
- Coley PD, Bryant JP, Chapin FS (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science* 230: 895–899.
- Feeny PP (1976) Plant apparency and chemical defense. In: L.E. G, P.H. R, eds. Coevolution of animals and plants Austin, Texas: Texas University Press. pp 3–19.
- Waterman PG, Mole S (1994) Analysis of phenolic plant metabolites. Massachusetts, USA: Blackwell Scientific Publications. pp 238 p.
- Ibarra-Manriquez G, Oyama K (1992) Ecological correlates of reproductive traits of Mexican rain forest trees. *American Journal of Botany* 79: 383–394.
- Ueno N, Kanno H, Seiwa K (2006) Sexual differences in shoot and leaf dynamics in the dioecious tree *Salix sachalinensis*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 84: 1852–1859.
- Popp JW, Reinartz JA (1988) Sexual dimorphism in biomass allocation and clonal growth of *Xanthoxylum americanum*. *American Journal of Botany* 75: 1732–1741.
- Delph LF, Lu Y, Jayne LD (1993) Patterns of resource-allocation in a dioecious *Carex* (Cyperaceae). *American Journal of Botany* 80: 607–615.
- Delph LF (1990) Sex-differential resource-allocation patterns in the subdioecious shrub *Hebe subalpina*. *Ecology* 71: 1342–1351.
- Reekie EG, Bazzaz FA (1987) Reproductive effort in plants. I. Carbon allocation to reproduction. *The American Naturalist* 129: 876–896.
- Rosenthal JP, Kotanen PM (1994) Terrestrial plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* 9: 145–148.
- Feeny P (1970) Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars. *Ecology* 51: 565–581.
- Araújo AP, Carneiro MAA, Fernandes GW (2003) Efeitos do sexo, do vigor e do tamanho da planta hospedeira sobre a distribuição de insetos indutores de galhas em *Baccharis pseudomyrsine* Teodoro (Asteraceae). *Revista Brasileira de Entomologia* 47: 483–490.
- Hjaltn J (1992) Plant sex and hare feeding preferences. *Oecologia* 89: 253–256.
- Strauss SY, Agrawal AA (1999) The ecology and evolution of plant tolerance to herbivory. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 179–185.
- Bazzaz FA (1997) Allocation of resources in plants: State of the science and critical questions. In: Bazzaz FA, Grace J, eds. Plant resource allocation: Academic Press. pp 1–37.

Capítulo 2

**Estimación del esfuerzo reproductivo
mediante asimilación de carbono en
*Chamaedorea alternans***

Estimación del esfuerzo reproductivo mediante asimilación de carbono en *Chamaedorea alternans*

RESUMEN

El esfuerzo reproductivo o la proporción de biomasa que una planta asigna a las flores, semillas y otras estructuras reproductivas, tiene consecuencias en la reproducción futura, la supervivencia y el crecimiento. El esfuerzo reproductivo puede ser estimado mediante diversas variables de asignación. La proporción de biomasa, de carbono o nutrientes que se destinan durante todo el evento reproductivo son algunas de las divisas de asignación. La biomasa es con frecuencia la variable más estudiada. En cambio, la asignación de carbono y nutrientes ha sido poco explorada. Particularmente en plantas dioicas, varios estudios evidencian una mayor asignación de recursos a la reproducción en las plantas femeninas con relación a las plantas masculinas. Este estudio explora el esfuerzo reproductivo estimado a través de dos variables de asignación, la biomasa y la asimilación de carbono.

Las estimaciones basadas en carbono fueron hechas a partir de la inversión de carbono durante la respiración y la asimilación de carbono durante la fotosíntesis. Empleamos un analizador de gases por rayos infrarrojos para determinar el intercambio de bióxido de carbono en las hojas y estructuras reproductivas de diez plantas masculinas y diez plantas femeninas de *C. alternans* durante la fase de floración, frutos inmaduros y frutos maduros.

La estimación del esfuerzo reproductivo basada en biomasa (ERB) mostró que las plantas masculinas asignan 3.3 veces más biomasa a la producción de flores. Al final de la estación reproductiva, las plantas femeninas destinan hasta 3.36 veces más biomasa para la maduración de los frutos. Estos resultados coinciden con lo que se ha reportado en la literatura. En contraste, la estimación del esfuerzo reproductivo basado en las pérdidas

estructurales de los órganos reproductivos debido a la respiración (ERR) no mostró diferencias entre plantas masculinas y femeninas. Asimismo, la estimación que considera las pérdidas debido a la respiración reproductiva menos el aporte de recursos debido a la reproducción (fotosíntesis reproductiva) (ERF) también fue estadísticamente semejante entre plantas masculinas y femeninas.

Estos resultados sugieren que la variable de asignación es un elemento importante en las estimaciones del esfuerzo reproductivo. Los resultados obtenidos a través de la biomasa y la asimilación de carbono fueron distintos. El ERB de las plantas femeninas fue superior, esto podría sugerir que la biomasa es una variable que integra varios procesos fisiológicos. Es recomendable analizar diferentes variables de asignación a la reproducción para tener un conocimiento más completo de los procesos relacionados.

INTRODUCCIÓN

La asignación de recursos ha sido ampliamente estudiada en diferentes especies de plantas (Elmqvist *et al.*, 1991; Turcotte y Houle, 2001; Obeso y Retuerto, 2002). De acuerdo con la teoría de asignación de recursos las plantas asignan recursos a tres funciones principales: reproducción, crecimiento y mantenimiento (por ejemplo: metabolismo o defensa) (Stearns, 1992). El aporte de algún recurso podría estar limitado y la asignación de este recurso limitante a una estructura o actividad puede resultar en una disminución de recursos hacia otra estructura o actividad (Levins, 1968). Por esta razón, es importante conocer la proporción de recursos que los organismos destinan a cada función.

Particularmente, la reproducción es un aspecto crucial en la historia de vida de un organismo e involucra una gran inversión de recursos como carbono, azúcares, agua,

nutrientes, entre otros. La inversión de recursos a la reproducción y la defensa tiene costos demográficos que se evidencian por la disminución en la reproducción futura (Jönsson, 2000) y la supervivencia (Obeso, 2002); y costos fisiológicos que se manifiestan en la reducción del crecimiento (Karlsson y Méndez, 2005).

Los costos de la reproducción han sido probados en algunos sistemas dioicos. Por ejemplo, la producción de botones reproductivos y brotes vegetativos se reduce en las plantas femeninas de *Salix rigida* que fructifican con relación a las que no se reproducen (Elmqvist *et al.*, 1991). El crecimiento se reduce en las ramas de plantas femeninas que producen flores (*Peumus boldus*) (Hoffman y Alliende, 1984) o que producen frutos (*Ilex aquifolium*) (Obeso y Retuerto, 2002).

No obstante, los costos reproductivos no necesariamente se observan, ya que los organismos reproductivos pueden desarrollar algunos mecanismos compensatorios al incrementar su ingreso de recursos (Tuomi *et al.*, 1983; Obeso, 2002).

Los costos de la reproducción podrían disminuir por alguna de las siguientes razones:

- 1) la asignación a la reproducción es baja (Delph *et al.*, 1993; Hemborg y Karlsson, 1998)
- 2) la planta tiene una gran cantidad de recursos almacenados
- 3) hay formación de estructuras modulares integradas fisiológicamente
- 4) hay una compensación porque la fotosíntesis se acelera durante la reproducción
- 5) hay una función fotosintética de los órganos reproductivos (Bazzaz, 1997; Horibata *et al.*, 2007)

El esfuerzo reproductivo se define frecuentemente como la proporción de biomasa que un organismo asigna a las semillas y otras estructuras reproductivas, incluyendo a las estructuras reproductivas de soporte (Reekie y Bazzaz, 1987a). Usualmente, durante la época de floración, las plantas masculinas invierten un mayor porcentaje de su biomasa total (Oyama

y Dirzo, 1988; Delph *et al.*, 1993; Obeso, 1997) y nutrientes (Rocheleau y Houle, 2001) en comparación con las plantas femeninas. Sin embargo, al término de la estación reproductiva este patrón se invierte y las plantas femeninas destinan un mayor porcentaje de su biomasa total a la maduración de los frutos de lo que las plantas masculinas destinan para la producción de flores (Oyama y Dirzo, 1988; Rocheleau y Houle, 2001; Turcotte y Houle, 2001; Ueno *et al.*, 2006). La inversión de recursos en términos de biomasa cuando finaliza la fase reproductiva es significativamente superior en las plantas femeninas.

La divisa o “moneda” de asignación es un elemento importante en las estimaciones del esfuerzo reproductivo. La biomasa ha sido con frecuencia la divisa de asignación más utilizada (Putwain y Harper, 1972; Gross y Soule, 1981; Bullock, 1984; Oyama y Dirzo, 1988; Obeso, 1997; Rocheleau y Houle, 2001). Sin embargo, el carbono y algunos nutrientes (fósforo y nitrógeno) también se han propuesto como divisas de asignación (Reekie y Bazzaz, 1987a, b).

Al carbono se le considera como una divisa apropiada de asignación (Reekie y Bazzaz, 1987a, b, c), debido a que cuando se adquiere mediante la fotosíntesis se utiliza para elaborar todos los compuestos que la planta requiere para sobrevivir. Los organismos autótrofos tienen la habilidad de utilizar la energía luminosa para transformar el bióxido de carbono (CO₂) y el agua en glucosa, molécula precursora de una gran cantidad de compuestos. La mayor parte de estos fotosintatos se destinan al mantenimiento del metabolismo y una parte menor a la formación de biomasa (Taiz y Zeiger, 2002).

Asimismo, el carbono además de ser un componente energético y estructural importante, refleja la asignación de otros recursos como el fósforo y el nitrógeno, debido a que durante la reproducción hay una gran re-asignación de N, P y K (Brenner y Bazzaz, 1985), la re-asignación de estos nutrientes permite maximizar la ganancia neta de carbono (Reekie y

Bazzaz, 1987b; Bazzaz, 1997). Por esta razón, el esfuerzo reproductivo que involucra a la respiración reproductiva (*RR*: respiración debida a las estructuras reproductivas) (Reekie y Bazzaz, 1987a), provee la mejor medida del carbono que se asigna a la reproducción (Reekie y Bazzaz, 1987a), pues este índice representa las pérdidas estructurales y atmosféricas por la producción de los órganos reproductivos.

La fotosíntesis que ocurre durante la reproducción reduce los costos de la formación y maduración de las estructuras reproductivas, como se comprobó en *Agropyron repens* (Reekie y Bazzaz, 1987a, c). La fotosíntesis se lleva a cabo en los tejidos verdes o con clorofila. Las hojas realizan la mayor parte de la fotosíntesis, y en menor proporción las estructuras reproductivas de color verde. Durante los estadios tempranos del desarrollo, los frutos son generalmente verdes y fotosintéticos (Blanke y Lenz, 1989; Lambers *et al.*, 1998), aportando parte del carbono que necesitan para la reproducción (Bazzaz, 1997). En *Adonis ramosa* (Ranunculaceae), la fotosíntesis de los frutos aporta cerca de un tercio de los recursos que estos requieren para su maduración (Horibata *et al.*, 2007). El esfuerzo reproductivo que incorpora a la fotosíntesis reproductiva (*ERR*) (Reekie y Bazzaz, 1987a, c) provee una medida del efecto de la reproducción sobre el crecimiento vegetativo cuando una insuficiencia de carbono limita el crecimiento (Reekie y Bazzaz, 1987a).

El esfuerzo reproductivo ha sido estimado mayoritariamente en términos de biomasa; sin embargo, la utilización de otras divisas de asignación tales como la asimilación de carbono (respiración y fotosíntesis) nos aportan un conocimiento integral de los patrones de asignación de recursos a la reproducción. La estimación del esfuerzo reproductivo tomando como divisa de asignación al carbono se evaluó en *Agropyron repens*, una planta hermafrodita herbácea (Reekie y Bazzaz, 1987a, b), y no se ha realizado en una especie dioica.

El objetivo de esta investigación fué contrastar la asignación de recursos a la reproducción entre plantas masculinas y femeninas en términos del esfuerzo reproductivo considerando las pérdidas estructurales (formación de flores, frutos y estructuras reproductivas de soporte) y atmosféricas debido a la formación de las estructuras reproductivas (respiración), así como el aumento en el aporte de recursos debido a la reproducción (fotosíntesis) de la especie dioica *Chamaedorea alternans* en la selva alta perennifolia de Los Tuxtlas, Veracruz.

MÉTODOS

Sitio de estudio

El estudio se realizó en la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (18° 34'–18° 36' N, 95° 04'–95 °09' W, 150 m.s.n.m.). La estación comprende una superficie total de 640 ha y está ubicada en la Sierra de Los Tuxtlas, en el estado de Veracruz, México. La Sierra de Los Tuxtlas se compone de una serie de montañas de origen volcánico. La vegetación esta clasificada como selva alta perennifolia (SAP) de acuerdo con el sistema de Miranda y Hernández-X (1963) y los árboles alcanzan hasta 35 m de altura. La vegetación dominante del sotobosque son las palmas (Oyama *et al.*, 1992), principalmente *Astrocaryum mexicanum*, y *Chamaedorea* spp. La precipitación y temperatura promedio anual son 4700 mm y 23.4°C, respectivamente (Soto y Gama, 1997). Detalles de la historia natural y ecología de la región de Los Tuxtlas se pueden consultar en González-Soriano y colaboradores (1997).

Especie de estudio

Chamaedorea alternans es una especie de palma abundante en el sotobosque, que puede alcanzar hasta 5 m de altura (Oyama *et al.*, 1992) y vive en promedio hasta 50 años. El

follaje de *C. alternans* es consumido principalmente por *Calyptocephala marginipennis*, un crisomélido de aproximadamente 6 mm de largo (Oyama, 1984). El daño que este crisomélido produce es uno de los principales factores de defoliación natural de esta especie (Oyama y Dirzo, 1991).

Selección de los organismos de estudio. Se seleccionaron 10 parejas de plantas masculina-femenina de *C. alternans* en fase reproductiva al azar. Las parejas se eligieron con una altura estadísticamente semejante (Wilcoxon: $T_{10} = 15.0$, $P = 0.2026$) en el mes de octubre de 2005, durante la etapa de floración.

Toma de datos. Las plantas se marcaron al inicio de la estación reproductiva (octubre de 2005), con pintura permanente: 1) la región más basal del tallo, 2) la última cicatriz del tallo o metámero de más reciente formación (que se encuentra en la región apical del tallo de la palma) y 3) cada una de las hojas en pie. En cada planta se registró la altura inicial del tallo, el diámetro a la altura de la base (mm), el número de hojas iniciales y la longitud de cada hoja. Asimismo se registró el número de estructuras reproductivas. En el caso de inflorescencias, se midió su longitud y su diámetro. Para las infrutescencias, se midió la longitud y diámetro del pedicelo y las raquillas, así como el número, longitud y diámetro de los frutos, con el propósito de estimar su biomasa mediante ecuaciones de regresión.

El tamaño (longitud y diámetro) de todas las estructuras vegetativas y reproductivas se registraron en cada uno de los censos de las plantas en las que se midió la asimilación de carbono, a fin de estimar la biomasa total en pie y el área para cada planta, mediante ecuaciones de regresión.

Ecuaciones de regresión. Las hojas y estructuras reproductivas en las que midió la asimilación de CO₂ no se recolectaron. El peso y el área de cada estructura se estimaron con ecuaciones de regresión lineal y de segundo grado. Estas ecuaciones se construyeron a partir

de estructuras vegetativas y reproductivas de distintos tamaños de plantas no experimentales y recolectadas en el campo. Las estructuras se obtuvieron a partir de 8 plantas adultas en las que se midieron las diferentes estructuras (Tabla 1). Los tallos fueron seccionados en fragmentos de diversos tamaños. Para estimar la biomasa y generar las ecuaciones correspondientes, se secó todo el material a 60°C en un horno durante al menos 96 horas (hasta obtener un peso seco constante. Se ajustaron modelos de regresión lineal para los tallos y estructuras reproductivas, y para las hojas se utilizó un ajuste cuadrático, (ver Cepeda-Cornejo y Dirzo, 2010), así como ecuaciones de regresión lineal para estructuras reproductivas (Tabla 1).

Para estimar las ecuaciones de área foliar, se prensaron los materiales y utilizamos el software WinDias (Ver. 2.0, Delta-T Devices) para medir área. El mejor ajuste se determinó a partir del coeficiente de determinación (R^2) y la significancia del análisis de varianza (F) (Tabla 2). Los análisis estadísticos se realizaron con un programa computacional (JMP, SAS 2007, versión 7.0, Institute Inc., Cary, North Caroline).

Censos. La asimilación de CO₂ (A) (respiración y fotosíntesis) de cada planta se midió con un analizador IRGA (CI-301 CO₂ Gas Analyzer, CID, Inc.) en tres censos: 1) los meses de octubre-noviembre de 2005, que corresponden a la etapa de floración de las plantas femeninas y masculinas, 2) junio de 2006, que corresponde a la etapa de fructificación. En esta etapa, los frutos son aún verdes o inmaduros, menores a 1 cm de longitud, y 3) septiembre de 2006, que corresponde a la etapa de maduración de los frutos. En esta etapa los frutos son de color negro y mayores a 1 cm de longitud. Las plantas masculinas y femeninas fueron medidas en el primer censo y sólo las plantas femeninas se midieron en los dos censos subsecuentes.

Categorías de las inflorescencias. Las inflorescencias masculinas y femeninas que fueron medidas en octubre y noviembre de 2005 se agruparon en cuatro categorías de maduración. La categoría 1 (C1) comprende inflorescencias en las primeras etapas, las cuales

tienen una forma casi aplanada y triangular, con una terminación en punta. La categoría 2 (C2) comprende la siguiente etapa de maduración, corresponde a estructuras con la base del pedicelo en forma cilíndrica, ya no aplanadas, y hay un mayor alargamiento de la región apical que corresponde a la zona de las raquillas de la inflorescencia. La categoría 3 (C3) corresponde a estructuras más alargadas y con mayor grado de desarrollo, previas a la antesis. La vaina que recubre la inflorescencia se hace más delgada toma un color verde más intenso y hay mayor engrosamiento de la región apical de la inflorescencia. La categoría 4 (C4) comprende estructuras reproductivas en antesis. La asimilación de CO₂ se midió en todas las categorías de desarrollo disponibles en cada una de las plantas seleccionadas.

Respiración

La respiración se midió en hojas y estructuras reproductivas. Previamente a la medición, la hoja y las estructuras reproductivas se cubrieron con un forro oscuro para impedir el paso de la luz por 30 minutos y evitar la actividad fotosintética de la hoja. Al término de este tiempo, se midió el intercambio de CO₂ de las estructuras vegetativas (hojas) o reproductivas (flores o frutos). Para la medición en hojas, se seleccionó la primera hoja en la posición de la filotaxia de la planta, que es la hoja más joven y totalmente expandida. De esta hoja, se seleccionó una pinna de la parte cercana al ápice de la hoja y se colocó dentro de la cámara herméticamente cerrada conectada al analizador de gases. Las estructuras reproductivas se introdujeron a la cámara de intercambio de gases, teniendo extremo cuidado de no romper las estructuras de sostén (pedicelo). El intercambio de CO₂ se registró durante al menos 10 minutos a partir de que las lecturas fueran estables.

Fotosíntesis

La fotosíntesis fue medida en las hojas y estructuras reproductivas (inflorescencias e infrutescencias) de las mismas plantas en las que se midió la respiración. Una lámpara de 50 watts con luz de halógeno se conectó a una fuente de corriente eléctrica para su funcionamiento en el campo. La luz de la lámpara se hizo incidir sobre la hoja o estructuras reproductivas a una distancia de 30 cm de distancia durante al menos 10 minutos antes de iniciar la medición. Se seleccionó y se midió una de las pinnas cercanas al ápice de la hoja uno en la posición de la filotaxia. Después de que la medición se estableciera se realizó la toma de datos durante al menos 10 minutos.

El área de las estructuras reproductivas en las que se midió la respiración y la fotosíntesis, se determinó mediante ecuaciones de regresión (Tabla 2). Para hojas, se recolectó la pinna en la que se determinó el intercambio de CO₂ y se midió su área foliar mediante el software WinDias versión 2.0 (Delta-T Devices).

La cámara de intercambio gaseoso fue acondicionada al medidor de gases y diseñada *ex profeso* por el centro de instrumentos de la Universidad Nacional Autónoma de México. Esta cámara de intercambio gaseoso está fabricada con acrílico de 5 mm de espesor. Tiene una forma cilíndrica, mide 28 cm de largo por 5 cm de diámetro. La cámara está dividida longitudinalmente para introducir las estructuras que serán medidas. Ella está conectada por dos mangueras al intercambiador de gases; una manguera lleva el aire del aparato hacia el interior de la cámara y la segunda conduce el aire del interior de la cámara hacia el aparato. El aire es tomado del ambiente por una tercera manguera que se introduce al aparato. El analizador registra la concentración de CO₂ del aire que ingresa a la cámara. A esta concentración se le conoce como C_o (del inglés outlet). La concentración de CO₂ del aire que circula desde la cámara hacia el analizador se denomina C_i (del inglés inlet). La estructura vegetal que es introducida a la cámara libera o absorbe CO₂ del aire y el diferencial en la

concentración $C_o - C_i$ es registrado por el analizador. El diferencial es negativo y hay respiración cuando la concentración de CO_2 que sale del analizador hacia la cámara de intercambio es menor a la concentración que regresa de la cámara al analizador, debido a que la estructura vegetal expide CO_2 . El diferencial es positivo y hay fotosíntesis cuando la concentración de CO_2 que sale del analizador hacia la cámara es mayor a la concentración de CO_2 que regresa de la cámara hacia el analizador, debido a que hay absorción de CO_2 por la estructura que esta dentro de la cámara.

El intercambio gaseoso fue registrado en cada estructura (hojas y estructuras reproductivas) durante al menos 10 minutos para respiración o fotosíntesis.

El flujo de aire en el analizador se calculó para cada una de las mediciones realizadas mediante la formula:

$W = (V / 60) \times (273.15 / T_a) \times (P / 1.013) \times (1 / 22.41) \times 10000 / A$, donde: W = Tasa de flujo por área foliar ($mol/m^2/s$), V = Tasa de flujo en volumen (litros/minuto), T_a = Temperatura del aire en °Kelvin, P = Presión atmosférica (en bares), A = Área foliar (cm^2).

Los datos de temperatura ambiental fueron proporcionados por la estación meteorológica de la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas. Los registros de temperatura fueron registrados cada 30 min todos los días.

Las lecturas del diferencial de CO_2 ($C_o - C_i$) proporcionadas por el analizador de gases y obtenidas durante 10 min por medición fueron promediadas para obtener un solo valor por cada hoja o estructura reproductiva medida. Este valor promedio fue reemplazado en la siguiente fórmula para obtener la tasa de respiración y de fotosíntesis de las hojas y estructuras reproductivas, por planta:

$P_n = W \times (C_o - C_i)$, donde: P_n = Tasa de fotosíntesis neta ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), W = Tasa de flujo por área foliar ($\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$), C_o = Concentración de CO_2 en la salida de aire del analizador hacia la cámara de intercambio, C_i = Concentración de CO_2 en la salida de aire de la cámara de intercambio hacia el analizador.

Estimación del esfuerzo reproductivo

El esfuerzo reproductivo se calculó de acuerdo al método propuesto por Reekie y Bazzaz (1987a). En este estudio el esfuerzo reproductivo calculado en función de la biomasa se denomina *ERB*, si se calcula en función de la respiración se denomina *ERR*, y si se incorpora la fotosíntesis reproductiva se denomina *ERF*.

Se realizó la integración del esfuerzo reproductivo *ERB*, *ERR* y *ERF* para toda la estación reproductiva. En plantas masculinas se consideró (con base en observaciones en campo) que el evento reproductivo se extiende desde inicios de octubre hasta la tercera semana de diciembre. En plantas femeninas se realizó la integración de todo el periodo reproductivo desde inicios de octubre de 2005 hasta fines de septiembre de 2006.

El *ERB* se obtuvo a partir de la asignación de biomasa a las estructuras vegetativas y reproductivas. Tanto en plantas masculinas y femeninas se consideró la asignación de biomasa a las estructuras reproductivas al final de la estación reproductiva. El *ERB* se estimó mediante la solución de la siguiente ecuación:

$$ERB = (BER+BES) / BTP$$

Donde: *BER* es la biomasa de las estructuras reproductivas (g), *BES* es la biomasa de las estructuras reproductivas de soporte (g) y *BTP* es la biomasa total de la planta (g) incluyendo las estructuras vegetativas y las reproductivas)

El *ERR* se obtuvo a partir de la asignación de biomasa y de la integración de la respiración total que ocurre durante todo el evento reproductivo. Dado que la respiración ocurre fundamentalmente durante la noche y es dependiente de la temperatura, se estimó la tasa de respiración nocturna de las hojas y estructuras reproductivas utilizando modelos de regresión lineal (Tabla 3). Los datos de respiración obtenidos en campo y la temperatura a la cuál fueron registrados se utilizaron para obtener estas ecuaciones.

Se realizó la estimación de la asimilación de carbono en lapsos de 30 minutos (transformando los micromoles de CO₂ a miligramos de CO₂) hasta completar toda la estación reproductiva, y se realizó la integración de todo el periodo reproductivo para calcular el *ERR* de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$ERR = (BI + BES + RR) / (BTP + RTP)$$

Donde: *BI* se refiere a la biomasa de la inflorescencia, *RR* a la respiración reproductiva (respiración de las estructuras reproductivas) y *RTP* a la respiración total de la planta.

El *ERF* se obtuvo a partir de la asignación de biomasa, la respiración reproductiva y la fotosíntesis reproductiva. En este caso, se calcularon las tasas de fotosíntesis a partir de los datos tomados en campo, no de ecuaciones de regresión. Chazdon y Fetcher (1984) mostraron que las plantas del sotobosque sobreviven con radiación solar directa por un tiempo efectivo de 60 minutos. Por esto, únicamente se consideró 60 minutos de fotosíntesis foliar efectiva por

día. La fotosíntesis foliar y de las estructuras reproductivas fué transformada de micromoles a miligramos. Posteriormente se obtuvo la integración de la fotosíntesis de todo el periodo reproductivo, en hojas y estructuras reproductivas, considerando el área total. Este valor se sustituyó en la siguiente ecuación:

$$ERF = (BI + BER + RR) - FR / (BTP + RT - FR)$$

Donde: *FR* y *RT* son la fotosíntesis reproductiva la respiración total, respectivamente.

Análisis estadísticos

Los esfuerzos reproductivos *ERB*, *ERR* y *ERF* se compararon entre las diez parejas de plantas masculinas-femeninas mediante una prueba de *t* pareada. Cuando la distribución de los datos se ajustó a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y hubo homocedasticidad entre ambos grupos, se aplicó la correspondiente prueba de *t* pareada, o en su defecto si la distribución de los datos no se ajustó a la normalidad se aplicó la correspondiente prueba de Wilcoxon. La tasa de respiración de las inflorescencias se contrastó con una ANOVA de dos vías (categoría de maduración × sexo). Para este análisis, la distribución normal de los residuales se confirmó con la prueba de Shapiro-Wilk ($W = 0.9660$, $P = 0.2069$).

Tabla 1. Modelos de regresión que relacionan la biomasa (g) con la longitud y diámetro de las estructuras vegetativas y reproductivas de *Chamaedorea alternans*. El peso de las hojas es explicado por un modelo de segundo grado de la forma: $Y = b_2 X^2 + b_1 X + b_0$, donde Y es la variable dependiente (peso seco, g) y X es la variable independiente (longitud de la hoja, cm). El peso del tallo, el peso de las inflorescencias femeninas, inflorescencias masculinas y estructuras de las infrutescencias son explicados por un modelo lineal de la forma: $Y = b_1 X + b_0$, donde Y es la variable dependiente (peso seco, g) y X es la variable independiente (tallo, inflorescencia femenina, inflorescencia masculina y la raquila de la infrutescencia $X = \text{longitud (cm)} \times \text{diámetro (mm)}$; pedicelo de la infrutescencia $X = \text{longitud (cm)}$; fruto $X = \text{longitud (mm)} \times \text{diámetro (mm)}$). b_0 , b_1 y b_2 son los coeficientes de regresión.

Estructuras	b_0	b_1	$b_2 X^2$	n	F	R^2
Vegetativas						
Hoja	-11.158	0.253	$0.0006 \times (X - 91.164)^2$	32	546.5***	0.94
Tallo	5.792	0.037		72	2077.9***	0.96
Reproductivas						
Flores femeninas	-0.0943	0.0054		13	26.77**	0.71
Flores masculinas	-0.272	0.00563		19	83.06***	0.83
Pedicelo de la infrutescencia	-0.0486	0.0361		17	26.34***	0.64
Raquila de la infrutescencia	-0.0093	0.00437		19	36.35***	0.68
Fruto (uno)	-0.0265	0.0025		36	323.39***	0.90

** $0.01 > P > 0.0001$, *** $P < 0.0001$.

Tabla 2. Modelos de regresión que relacionan el área (cm²) con la longitud y diámetro de las estructuras vegetativas y reproductivas de *C. alternans*. El área de las hojas es explicada por un modelo de segundo grado de la forma: $Y = b_2 X^2 + b_1 X + b_0$, donde X = longitud de la hoja (cm). El área de la vaina de las inflorescencias femeninas y masculinas, y de las infrutescencias (pedicelo, raquila y fruto) es explicada por un modelo lineal de la forma: $Y = b_1 X + b_0$, donde X = longitud (cm) × diámetro (mm) para las vainas de las inflorescencias masculinas y femeninas, X = longitud (cm) para el pedicelo y la raquila de la infrutescencia, y X = longitud (mm) × diámetro (mm) para el fruto. b_0 , b_1 y b_2 son los coeficientes de regresión.

Estructuras	b_0	b_1	$b_2 X^2$	n	F	R^2
Vegetativas						
Hoja	-598.156	21.547	$0.0808 \times (X - 67.0625)^2$	32	431.49***	0.97
Reproductivas						
Flores masculinas	6.496	0.085		8	30.403*	0.83
Flores femeninas	7.2136	0.0868		13	46.75***	0.81
Pedicelo de la infrutescencia	0.0253	1.0928		18	22.28**	0.58
Raquila de la infrutescencia	-0.0114	0.5839		17	119.71***	0.89
Fruto (uno)	-0.0017	0.0071		36	4824.77***	0.99

* $0.05 > P > 0.01$, ** $0.01 > P > 0.0001$, *** $P < 0.0001$.

Tabla 3. Modelos de regresión usados para estimar la respiración nocturna de *C. alternans*. Modelos lineales para la predicción de biomasa con ecuación: $Y = b_1X + b_0$, donde Y es la variable dependiente ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y X es la variable independiente (temperatura en grados Kelvin). b_0 y b_1 son los coeficientes de regresión.

Etapa fenológica y género	Estructura	b_0	b_1	N, (g.l.)	F	R^2
Floración Plantas femeninas	Hojas	26.60835	-0.09237	91, (1, 89)	4.177*	0.05
	Inflorescencias Categorías 1 y 2	82.81312	-0.29045	144 (1, 142)	4.065*	0.03
	Inflorescencias Categorías 3 y 4	247.04922	-0.85021	159 (1, 157)	6.814**	0.04
Floración Plantas masculinas	Hojas	20.44046	-0.07176	87 (1, 85)	4.31*	0.05
	Inflorescencias Categorías 1 y 2	96.04077	-0.33962	131 (1, 129)	4.348*	0.03
	Inflorescencias Categorías 3 y 4	202.56313	-0.72083	132 (1, 130)	14.757**	0.10
Fructificación, frutos inmaduros	Hoja	9.60116	-0.0355	69 (1, 67)	4.299*	0.06
	Infrutescencia	19.58286	-0.07216	78 (1,76)	3.954*	0.05
Fructificación, frutos maduros	Hoja	46.0625	-0.15628	117 (1,115)	11.889**	0.09
	Infrutescencia	91.7665	-0.31051	90 (1,88)	4.794*	0.05

* $0.05 > P > 0.01$, ** $0.01 > P > 0.0001$, *** $P < 0.0001$.

RESULTADOS

Las Tablas 1, 2 y 3 muestran las ecuaciones obtenidas para predecir la biomasa, el área y para estimar la respiración nocturna en ambos sexos.

El esfuerzo reproductivo en términos de biomasa (*ERB*), o la proporción de biomasa en peso seco que las plantas destinan a la reproducción durante la etapa de floración, fue significativamente mayor en las plantas masculinas con respecto a las plantas femeninas ($T = 5.0$, $P = 0.0381$); en promedio, las plantas masculinas asignaron 3.3 veces más biomasa a la producción de flores (Tabla 4, Figura 1).

La comparación del *ERB* entre plantas masculinas y femeninas al final de la estación reproductiva (plantas masculinas en floración y femeninas en fructificación) mostró que las plantas femeninas destinaron una mayor cantidad de recursos a la reproducción ($t = 6.8928$, $P < 0.0001$; Tabla 4). En promedio, las plantas femeninas destinaron hasta 3.36 veces más biomasa para la maduración de los frutos en relación con la producción de flores en las plantas masculinas (Figura 1). Las plantas femeninas aumentaron su índice del *ERB*, de 0.95 en la etapa de floración a 11.72 en la fase de fructificación, es decir 12.34 veces.

Los esfuerzos reproductivos calculados en función de la respiración (*ERR*) e incorporando la fotosíntesis reproductiva (*ERF*) se calcularon para cada sexo integrando todo el periodo de estudio. El periodo reproductivo comprendió: en plantas masculinas abarcó 2.6 meses (octubre, noviembre y 20 días de diciembre), y en plantas femeninas 12 meses. Este intervalo de tiempo está basado en observaciones en campo.

El *ERR* se estimó a través de la respiración reproductiva y vegetativa, y nos indica el porcentaje de la asignación que corresponde a la respiración reproductiva a partir de la respiración total de la planta, tomando en consideración a la biomasa. La comparación del

ERR, fue indistinto entre plantas masculinas y femeninas ($t_9 = 0.7736$, $P = 0.4614$; Figura 2).

El *ERF*, estimado por la adición de la respiración reproductiva y sustrayendo el aporte de recursos debido a la reproducción (*FR*), no mostró diferencias significativas entre plantas masculinas y femeninas ($t_9 = 0.6296$, $P = 0.5446$; Figura 2).

El *ERR* en las plantas masculinas fué de 7.41, y se redujo a 7.31 al incorporar la fotosíntesis debida a los órganos reproductivos (*ERF*), es decir hubo una reducción de 1.86%. En contraste, el *ERR* de las plantas femeninas fué de 6.7, y se redujo a 6.0 al sustraer el aporte de carbono debido a la fotosíntesis de las inflorescencias, es decir la reducción fué de 9.8%. Esta reducción puede apreciarse al comparar el *ERR* y *ERF* en la figura 2.

La tasa de consumo de carbono durante la respiración de las inflorescencias (en microgramos de $\text{CO}_2 \text{ m}^{-2}$) varía con el estado de maduración y con el sexo ($F_{7,37} = 6.5058$, $P < 0.0001$). Hay un efecto significativo del sexo, las inflorescencias de las plantas masculinas mantuvieron una tasa de respiración de carbono más elevada ($F_{1,37} = 13.4859$, $P = 0.0008$) y esto fué consistente en las cuatro categorías. Asimismo, el consumo de carbono en las inflorescencias varió con el grado de desarrollo de éstas ($F_{3,37} = 8.7198$, $P = 0.0002$). La respiración fue más elevada en las inflorescencias con mayor grado de maduración (Figura 3). La comparación de medias (Tukey: $Q = 2.70$, $P < 0.05$), indicaron que las primeras dos categorías de desarrollo (C1 y C2) consumieron una menor cantidad de carbono, con relación a las dos categorías siguientes (C3 y C4; Figura 3). La interacción categoría \times sexo fue marginalmente significativa ($F_{3,37} = 2.79$, $P = 0.054$) y la correspondiente prueba de Tukey señaló que las vainas de las plantas masculinas de las categorías 3 y 4 tienen la mayor tasa de respiración ($Q = 3.22$, $P < 0.05$).

Los valores promedio de las tasas de respiración y fotosíntesis para hojas y estructuras reproductivas se muestran en la Tabla 5. La fotosíntesis de las estructuras reproductivas masculinas fue significativa sólo en las categorías 1 y 2 o con un bajo grado de desarrollo, mientras que con un mayor grado de maduración (categorías 3 y 4) fue prácticamente nula.

La longitud y el área foliar presentaron diferencias intersexuales: las plantas femeninas presentaron hojas de mayor longitud ($t = 5.24$, $P = 0.0005$) y consecuentemente una mayor área foliar ($T = 3.0$, $P = 0.013$).

La tasa de respiración foliar presentó valores entre 0.24 y 1.44 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en las plantas masculinas y entre 0.18 y 1.56 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en las plantas femeninas. La comparación intersexual no fué significativa ($t = 0.81$, $P = 0.437$). La tasa de fotosíntesis foliar oscila entre 0.42 y 0.87 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en las plantas masculinas y entre 0.28 y 1.64 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en las plantas femeninas. Las diferencias entre sexos tampoco fueron significativas ($T = 22.0$, $P = 0.328$).

Tabla 4. Índices del esfuerzo reproductivo, o la proporción de recursos que la planta destina al final de la estación reproductiva en función de la biomasa (*ERB*), la respiración reproductiva (*ERR*), y la respiración reproductiva menos la fotosíntesis reproductiva (*ERF*).

Esfuerzo reproductivo	Etapa fenológica	Plantas masculinas ($\bar{x} \pm \text{E.E.}$)	Plantas femeninas ($\bar{x} \pm \text{E.E.}$)	<i>t</i>	<i>P</i>
<i>ERB</i>	Floración	3.48 ± 1.14	0.95 ± 0.26	5.00*	0.022
<i>ERB</i>	Periodo completo	3.48 ± 1.14	11.72 ± 1.13	6.893	< 0.0001
<i>ERR</i>	Periodo completo	7.41 ± 2.26	6.65 ± 0.75	0.774	0.461
<i>ERF</i>	Periodo completo	7.31 ± 2.24	6.00 ± 0.89	0.63	0.545

* El valor corresponde al estadístico *T* de la prueba no paramétrica de Wilcoxon.

Tabla 5. Tasas de respiración ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y fotosíntesis ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) de hojas y estructuras reproductivas en las tres etapas fenológicas de muestreo: floración, frutos inmaduros y frutos maduros.

Etapa fenológica	Estructura	Respiración		Fotosíntesis	
		Plantas masculinas ($\bar{x} \pm \text{E.E.}$)	Plantas femeninas ($\bar{x} \pm \text{E.E.}$)	Plantas masculinas ($\bar{x} \pm \text{E.E.}$)	Plantas femeninas ($\bar{x} \pm \text{E.E.}$)
Floración (oct-nov 05)					
	Hojas	0.77 \pm 0.14	0.89 \pm 0.12	0.68 \pm 0.10	0.61 \pm 0.14
	Inflorescencias Categorías 1 y 2	5.80 \pm 0.71	4.47 \pm 0.75	1.89 \pm 0.22	2.57 \pm 0.5
	Inflorescencias Categorías 3 y 4	12.64 \pm 1.0	6.63 \pm 1.0	0.0 \pm 0.0	2.25 \pm 0.12
Frutos inmaduros					
	Hojas	-	0.88 \pm 0.09	-	0.50 \pm 0.04
	Frutos verdes	-	1.93 \pm 0.12	-	0.0
Frutos maduros					
	Hojas	-	1.18 \pm 0.12	-	0.97 \pm 0.06
	Frutos maduros	-	1.52 \pm 0.31	-	0.0

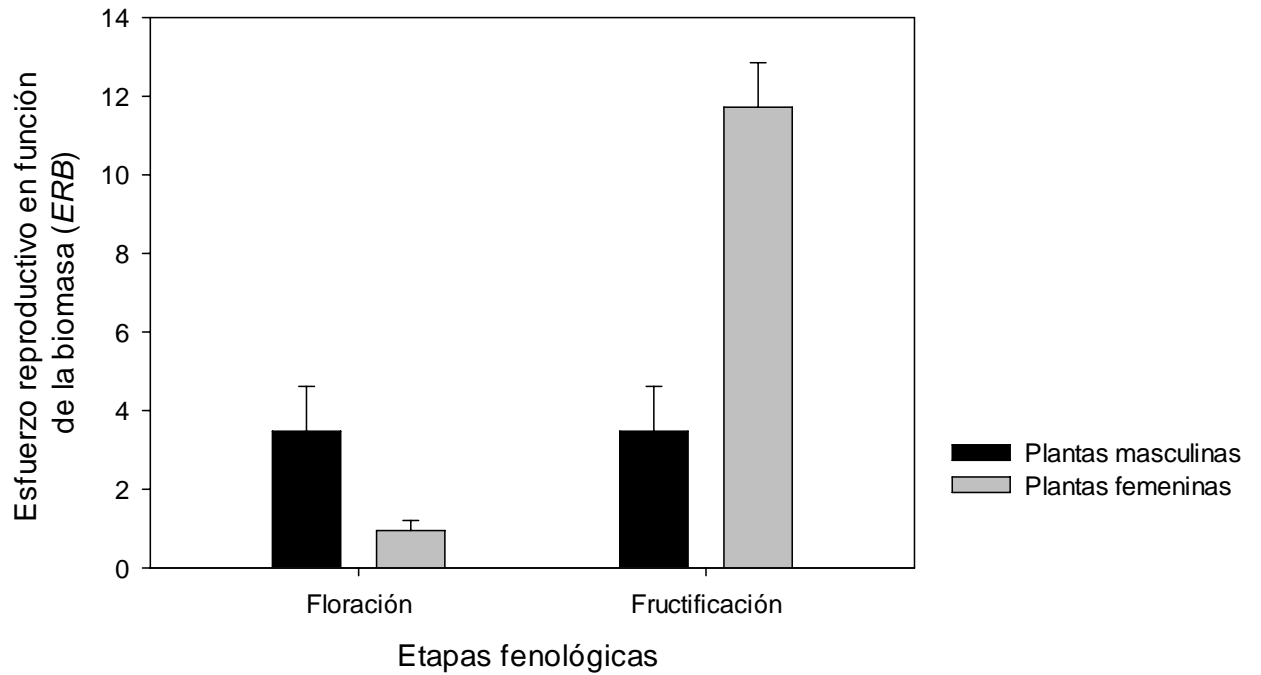


Figura 1. Esfuerzo reproductivo en términos de la biomasa (*ERB*) durante las etapas fenológicas de floración y fructificación en plantas masculinas y femeninas de la palma *Chamaedorea alternans*. Las barras de error representan el error estándar.

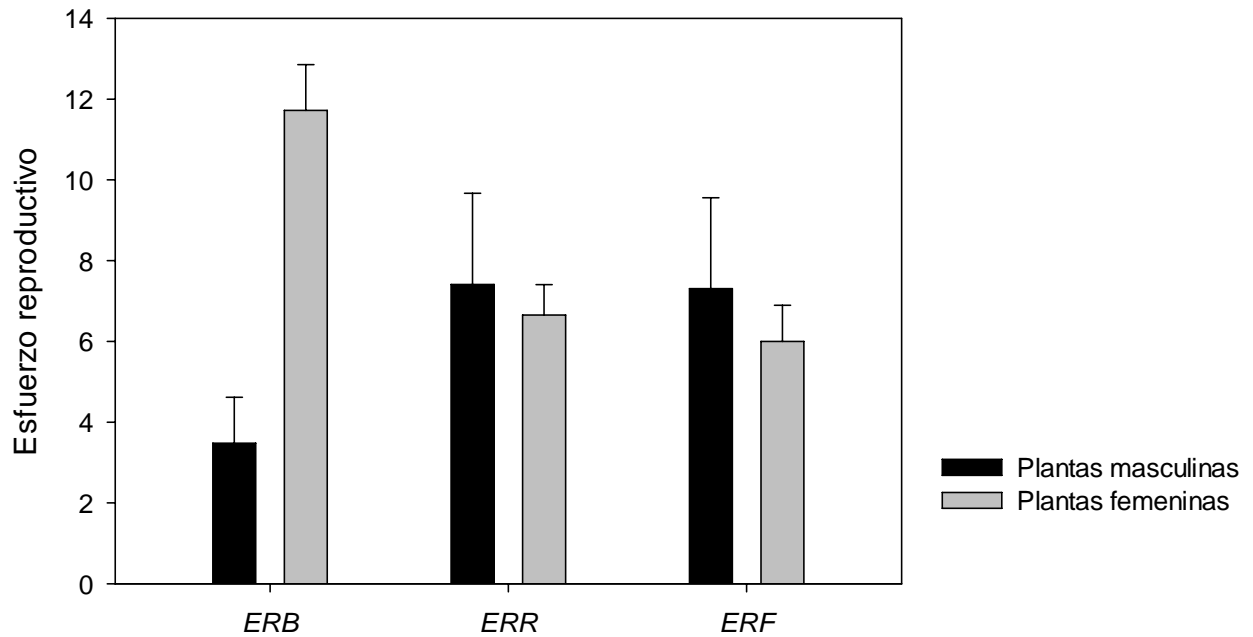


Figura 2. Estimación del esfuerzo reproductivo, o la proporción de recursos que la planta destina al final de la reproducción en función de la biomasa (*ERB*), en función de la respiración reproductiva (*ERR*) e incorporando la fotosíntesis reproductiva (*ERF*) en *C. alternans*. El índice comprende la etapa fenológica de floración para las plantas masculinas y la fase fenológica de floración y fructificación para las plantas femeninas. Las barras de error representan el error estándar.

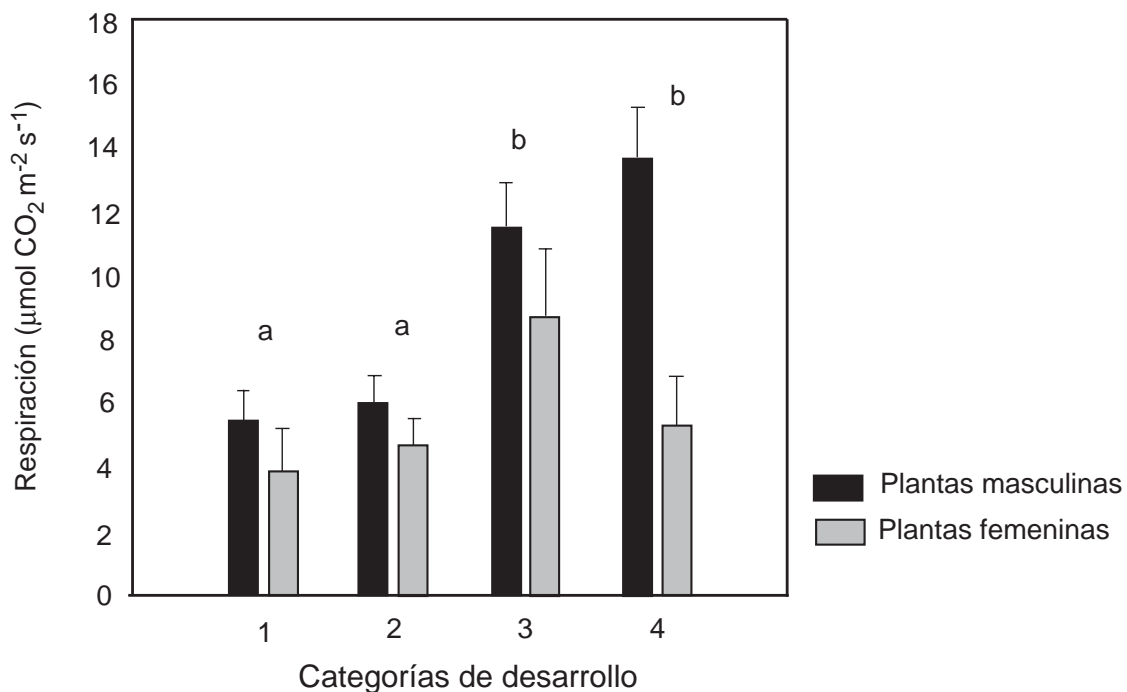


Figura 3. Tasa de respiración de las inflorescencias masculinas y femeninas de *C. alternans*, en cuatro estadios de desarrollo, donde la categoría 1 representa la primera etapa de desarrollo (vainas aplanadas), la categoría 2 es una etapa con más desarrollo (vainas circulares de color verde pálido), la categoría 3 es una etapa previa a la antesis (vainas circulares, más alargadas y de color verde intenso) y la categoría 4 representa la etapa de antesis. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre etapas de desarrollo (Tukey: $Q = 2.7$, $P < 0.05$). Las barras de error representan el error estándar.

DISCUSIÓN

La proporción de recursos que las plantas destinan a la reproducción varía de acuerdo con la etapa fenológica, con el sexo y con la divisa de asignación. En términos de biomasa, las plantas masculinas de *C. alternans* destinan más biomasa a la producción de flores con relación a las plantas femeninas; sin embargo, al final de la estación reproductiva el patrón se invierte, y las plantas femeninas destinan un porcentaje más elevado a la producción de frutos y semillas con respecto a la producción de flores en las plantas masculinas. No obstante, el esfuerzo reproductivo obtenido en términos del incremento en el esfuerzo reproductivo causado por la respiración de las estructuras reproductivas (*ERR*) y el esfuerzo reproductivo en términos del aporte debido a la fotosíntesis reproductiva (*ERF*), no presentan diferencias estadísticas entre plantas masculinas y femeninas.

La biomasa ha sido con frecuencia la divisa de asignación más utilizada, durante las etapas de floración y de fructificación (Pop y Reinhartz 1988). Frecuentemente, y de acuerdo con la literatura, las plantas masculinas destinan entre 1 y 2.5 veces más biomasa, de lo que asignan las plantas femeninas, a la producción de inflorescencias (Popp y Reinartz, 1988; Delph, 1990; Antos y Allen, 1994; Obeso, 1997; Rocheleau y Houle, 2001; Nicotra, 1999). En este estudio las plantas masculinas de *C. alternans* destinaron hasta 3.3 veces más biomasa, de lo que asignaron las plantas femeninas a la producción de inflorescencias. Este resultado es consistente con lo reportado en la literatura. Oyama y Dirzo (1988) encontraron que las plantas masculinas de *Chamaedorea alternans* (anteriormente confundida con *Chamaedorea tepejilote*) destinaron hasta 1.9 veces más biomasa, de lo destinado por las plantas femeninas en esta etapa fenológica.

La biomasa de las flores masculinas y femeninas también ha sido contrastada. La biomasa total de una flor masculina de *Oemleria cerasiformis* es en promedio mayor a la de

una flor femenina. El hipanto (tejido basal de la flor en la que se asientan los diversos verticilos de una flor) de las flores masculinas tiene mayor peso con respecto al de las flores femeninas. Aunque, la biomasa del pistilo en anthesis es considerablemente mayor a la de los estambres (Antos y Allen, 1994).

Los costos de la formación de estructuras reproductivas han sido cuantificados en términos de nutrientes. Los costos de la producción de polen son elevados. El polen contiene altos niveles de nutrientes: K, Ca, Mg, Fe y Zn (Stanciu *et al.*, 2011), particularmente contiene altas concentraciones de nitrógeno (N) y fósforo (P) (Hemborg, 1998; Harris y Pannell, 2008). Los requerimientos de nutrientes en la reproducción se han estudiado en las herbáceas perennes y anuales. La reducción de nutrientes en el suelo provocó la disminución en el número de granos de polen de *Silene latifolia* una planta perenne de vida corta (Herlihy y Delph 2009). En otro ejemplo, la producción de las inflorescencias masculinas de *Mercurialis annua*, una planta dioica herbácea anual, requiere de una alta concentración de nitrógeno. El contenido de nitrógeno se reduce significativamente durante la reproducción en los tejidos vegetativos de las plantas masculinas. Asimismo, el crecimiento se reduce significativamente durante la fase reproductiva en las plantas masculinas, y no resulta afectado en las plantas femeninas. Estos resultados sugieren que las plantas masculinas de especies dioicas herbáceas anuales o perennes incurren en un alto costo reproductivo (Harris y Pannell, 2008; Herlihy y Delph, 2009). Los nutrientes empleados en la reproducción son re-asignados desde otras estructuras de la planta. Durante la reproducción, la planta anual *Abutilon theophrasti* re-asigna el 60% de su nitrógeno, 78% de su fósforo y 14% del potasio de sus tallos (Benner y Bazzaz, 1985). Probablemente en las palmas de este estudio, la producción de inflorescencias masculinas es costosa y requiere una alta concentración de nutrientes que probablemente son re-asignados a partir de los tejidos vegetativos. Sin

embargo, diversos estudios han mostrado que al final de la estación reproductiva las plantas femeninas invierten una mayor proporción de biomasa y nutrientes para la formación de frutos y semillas.

En este estudio las plantas femeninas destinaron hasta 3.36 veces más biomasa a la producción de frutos de lo que destinaron las plantas masculinas para producir sus inflorescencias. Es decir, el *ERB* fue significativamente más elevado en las plantas femeninas. Asimismo, en otras especies de plantas dioicas, como *Xanthoxylum americanum* (Popp y Reinartz, 1988), *Myristica insipida* (Armstrong y Irvine, 1989), *Hebe subalpina* (Delph, 1990), *Nyssa sylvatica* (Cipollini y Stiles, 1991), *Oemleria cerasiformis* (Antos y Allen, 1994), *Ilex aquifolium* (Obeso, 1997), *Siparuna grandiflora* (Nicotra, 1999), *Corema conradii* (Rocheleau y Houle, 2001), *Salix planifolia* (Turcotte y Houle, 2001) y *Salix sachalinensis* (Ueno *et al.*, 2006), la inversión de recursos que se destina a todo el evento reproductivo es significativamente más elevada en las plantas femeninas. Este porcentaje de asignación en las plantas femeninas alcanza un rango desde 1.7 hasta 10.8 veces más que la asignación de las plantas masculinas. Esta cifra probablemente se incremente si son consideradas las flores femeninas. En términos de nutrientes las plantas femeninas también asignan más recursos. Las plantas femeninas de *Salix glauca* destinan dos veces más nitrógeno y fósforo para la maduración de semillas que lo que destinan las plantas masculinas para la producción de polen (Dudley, 2006).

Aunque, medir la asignación en términos de la biomasa ha sido el método más empleado, medir el esfuerzo reproductivo en términos de la respiración y la fotosíntesis revela una visión más detallada de los procesos fisiológicos relacionados con la distribución de los fotosintatos (Reekie y Bazzaz, 1987a, b, c). La fotosíntesis es ciertamente responsable de la mayoría de la ganancia en biomasa de la planta. Sin embargo, la mitad de todos los

fotosintatos producidos en un día son respirados en el mismo periodo. Por ejemplo, la respiración de las raíces consume entre el 10 y el 50% del carbono total asimilado por día debido a la fotosíntesis (Van der Werf *et al.*, 1994).

La tasa de crecimiento es un elemento importante a considerar en el gasto energético causado por la respiración. Particularmente en las plantas de lento crecimiento, el porcentaje de carbono consumido por la respiración se incrementa y consecuentemente el porcentaje de carbono invertido al crecimiento se reduce (Lambers *et al.*, 1998).

La tasa de crecimiento ha sido evaluada en *Chamaedorea alternans* a través de la tasa de producción foliar, el incremento en altura, la tasa relativa de crecimiento (*RGR*, por sus siglas en inglés: relative growth rate) y la producción neta de biomasa. Las plantas masculinas de *C. alternans* producen significativamente un mayor número de hojas y muestran un mayor incremento en altura. Sin embargo, la tasa relativa de crecimiento y la producción neta de biomasa no muestran diferencias intersexuales (Cepeda-Cornejo y Dirzo, 2010). La razón es que aunque las plantas masculinas producen un mayor número de hojas, estas son más cortas que las hojas de las plantas femeninas. Es posible que si ambos sexos producen una cantidad semejante de biomasa en el tiempo (revisar Cepeda-Cornejo y Dirzo, 2010), el costo respiratorio sea también semejante entre los sexos, y de esta forma es posible explicar que el esfuerzo reproductivo evaluado en términos de la respiración haya sido estadísticamente indistinguible entre plantas masculinas y femeninas.

El área foliar es un aspecto importante para la captación de bióxido de carbono y realización de la fotosíntesis. Las plantas femeninas de *C. alternans* poseen hojas no sólo con más biomasa, también de una mayor área foliar con relación a las plantas masculinas. Esta diferencia, podría reducir el costo de la reproducción para las plantas femeninas de esta especie. Asimismo, la producción de las flores y maduración de los frutos requiere de

aproximadamente un año. Es el evento reproductivo de mayor longitud en contraste con *C. pinnatifrons* (~ 7 meses) y *C. ernesti-augusti* (~ 5 meses). Es posible que las plantas femeninas presenten hojas con mayor área foliar a fin de sostener la enorme demanda de fotosintatos. Asimismo, la fotosíntesis total (de toda la corona foliar), fue 1.83 veces mayor en las plantas femeninas, no obstante, que las diferencias no fueron significativas.

La fotosíntesis en estructuras reproductivas fue detectada en las inflorescencias femeninas de las categorías 1 a 4 y en frutos inmaduros (al inicio de su formación). En plantas masculinas únicamente las primeras dos categorías de las inflorescencias realizaron actividad fotosintética. Se sabe que la actividad fotosintética que realizan los frutos verdes brinda una proporción sustancial de su requerimiento energético (Blanke y Lenz, 1989; Bazzaz, 1997; Lambers *et al.*, 1998). En este estudio se detectó, a través de la estimación del *ERR* y *ERF*, que la fotosíntesis reproductiva disminuye el costo debido a la respiración en un 1.86% en las plantas masculinas y hasta un 9.77% en las plantas femeninas. De este modo, es muy posible que la actividad fotosintética que se detectó en las estructuras reproductivas reduzca el costo de la reproducción como se ha documentado (Reekie y Bazzaz, 1987a, b).

La glucosa es la molécula precursora de una gran cantidad de compuestos que la planta requiere como 1) lípidos, 2) ligninas, 3) fenoles solubles (taninos y flavonoides, 4) compuestos orgánicos que contienen nitrógeno tales como proteínas y ADN, 5) carbohidratos totales estructurales (p. eg. celulosa), 6) carbohidratos no estructurales (p. eg. almidón y azúcares) y 7) ácidos orgánicos. Sin embargo, los costos de construcción de cada uno de estos compuestos varían. Generalmente los lípidos y las proteínas, son muy costosos en términos del ATP que se requiere para su biosíntesis. En estos términos, los costos de construcción o bien los gramos de glucosa que se invierten en cada gramo de tejido (g/g) dependen de los compuestos que los conforman. El costo de construcción de las hojas (en

varias especies y ambientes) es de 1.56, de los tallos de 1.44, de las raíces 1.34 y de las semillas y frutos de 1.65. Es decir, el costo de construcción más elevado se presenta en las semillas. Particularmente, las semillas de algunas palmas (p. ej. *Elaeis guineensis*, la palma de aceite) se constituyen fundamentalmente de lípidos y galactomananos (Alang *et al.*, 1988). Esto implica un costo de construcción elevado. Es decir, el costo de la reproducción de las infrutescencias de *C. alternans* podría ser elevado por la demanda de una gran cantidad de compuestos con un alto costo de construcción. Estos recursos sólo pueden obtenerse por la vía de la asimilación de carbono durante la fotosíntesis.

En este estudio se evaluó el *ER* con base en el carbono gastado durante la respiración (*ERR*) y el carbono que es asimilado durante la fotosíntesis (*ERF*) en plantas masculinas y femeninas de *C. alternans*. La comparación del esfuerzo reproductivo tomando como divisa de asignación al carbono sólo había sido evaluada en un sistema hermafrodita (*Agropyron repens*) y no se había realizado en un sistema dioico. No obstante, es recomendable evaluar el *ER* en otras especies dioicas particularmente *C. pinatifrons* y *C. ernesti-augusti* que muestran algunas características importantes, como son un periodo reproductivo de menor duración y una mayor producción de biomasa en las plantas masculinas, a diferencia de *C. alternans*. Sería interesante contrastar los patrones de asignación entre estas tres especies bajo estas consideraciones.

Los resultados demuestran que la estimación del esfuerzo reproductivo varía de acuerdo con la divisa de asignación. La estimación del esfuerzo reproductivo tomando como divisa al carbono es de gran importancia, ya que la asignación de carbono a la reproducción podría resultar en una disminución del crecimiento vegetativo. Asimismo, evaluar la fotosíntesis reproductiva es importante ya que ésta, puede reducir el costo de la reproducción.

Por otra parte, la asignación de carbono puede reflejar la asignación de otros nutrientes como el fósforo y el nitrógeno (Reekie y Bazzaz, 1987b).

Asimismo, la estimación del esfuerzo reproductivo empleando diferentes variables (biomasa, carbono, nutrientes) nos proporciona una visión más completa del gasto asociado al evento reproductivo. La acumulación de biomasa es el resultado de diversos procesos metabólicos, no sólo representa las ganancias y pérdidas de carbono, sino también de otros elementos como el fósforo o el nitrógeno y podría explicar el aumento del *ERB* en las plantas femeninas. La asignación de otros nutrientes no está considerada en la estimación basada en carbono, y su integración podría explicar las diferencias entre las estimaciones basadas en biomasa con las estimaciones realizadas en carbono.

LITERATURA CITADA

- Alang, Z.C., Moir, G.F.J., y Jones, L.H. (1988) Composition, degradation and utilization of endosperm during germination in the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Annals of botany*, 61(2), 261-268.
- Antos, J.A., y Allen, G.A. (1994) Biomass allocation among reproductive structures in the dioecious shrub *Oemleria cerasiformis* a functional interpretation. *Journal of Ecology*, 82(1), 21-29.
- Armstrong, J.E., y Irvine, A.K. (1989) Flowering, sex ratios, pollen-ovule ratios, fruit set, and reproductive effort of a dioecious tree, *Myristica insipida* (Myristicaceae) in two different rain forest communities. *American Journal of Botany*, 76, 74-85.
- Bazzaz, F.A. (1997) Allocation of resources in plants: State of the science and critical questions. En *Plant resource allocation* (F.A. Bazzaz, y J. Grace, eds): Academic Press, pp. 1-37.
- Benner, B.L., y Bazzaz, F.A. (1985) Response of the annual *Abutilon theophrasti* medic. (Malvaceae) to timing of nutrient availability. *American Journal of Botany*, 72(2), 320-323.
- Blanke, M.M., y Lenz, F. (1989) Fruit photosynthesis a review. *Plant Cell Environmental*, 12, 31-46.
- Brenner, B.L., y Bazzaz, F.A. (1985) Response to the annual *Abutilon theophrasti* medic. (Malvaceae) to timing of nutrient availability. *American Journal of Botany*(72), 320-323.

- Bullock, S.H. (1984) Biomass and nutrient allocation in a neotropical dioecious palm. *Oecologia*, 63(3), 426-428.
- Cepeda-Cornejo, V., y Dirzo, R. (2010) Sex-related differences in reproductive allocation, growth, defense and herbivory in three dioecious neotropical palms. *PLoS ONE*, 5(3), e9824.
- Cipollini, M.L., y Stiles, E.W. (1991) Costs of reproduction in *Nyssa sylvatica*: sexual dimorphism in reproductive frequency and nutrient flux. *Oecologia*, 86, 585-593.
- Chazdon, R.L., y Fetcher, N. (1984) Photosynthetic light environments in a lowland tropical rain forest in Costa Rica. *Journal of ecology*, 72, 553-564.
- Delph, L.F. (1990) Sex differential resource allocation patterns in the subdioecious shrub *Hebe subalpina*. *Ecology*, 71, 1342-1351.
- Delph, L.F., Lu, Y., y Jayne, L.D. (1993) Patterns of resource-allocation in a dioecious *Carex* (Cyperaceae). *American Journal of Botany*, 80(6), 607-615.
- Dudley, L.S. (2006) Ecological correlates of secondary sexual dimorphism in *Salix glauca* (Salicaceae). *American Journal of Botany*, 93(12), 1775-1783.
- Elmqvist, T., Cates, R.G., Harper, J.K., y Gardfjell, H. (1991) Flowering in males and females of a Utah willow, *Salix-rigida* and effects on growth, tannins, phenolic glycosides and sugars. *Oikos*, 61(1), 65-72.
- González-Soriano, E., Dirzo, R., y Vogt, R. (1997) Historia natural de Los Tuxtlas. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 647 pp.
- Gross, K.L., y Soule, J.D. (1981) Differences in biomass allocation to reproductive and vegetative structures of male and female plants of a dioecious, perennial herb, *Silene alba* (Miller) Krause. *American Journal of Botany*, 68(6), 801-807.
- Harris, M.S., y Pannell, J.R. (2008) Roots, shoots and reproduction: sexual dimorphism in size and costs of reproductive allocation in an annual herb. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 275(1651), 2595-2602.
- Hemborg, A.M. (1998) Seasonal dynamics in reproduction of first year females and males in *Silene dioica*. *International Journal of Plant Sciences*, 159(6), 958-967.
- Hemborg, Å.M., y Karlsson, P.S. (1998) Somatic costs of reproduction in eight subarctic plant species. *Oikos*, 82, 149-157.
- Herlihy, C.R., y Delph, L.F. (2009) Selection lines of *Silene latifolia* (caryophyllaceae) differ in how stress affects pollen production. *International Journal of Plant Sciences*, 170(9), 1103-1108.
- Hoffman, A.J., y Alliende, M.C. (1984) Interactions in the patterns of vegetative growth and reproduction in woody dioecious plants. *Oecologia*, 61, 109-114.
- Horibata, S., Hasegawa, S.F., y Kudo, G. (2007) Cost of reproduction in a spring ephemeral species, *Adonis ramosa* (Ranunculaceae): Carbon budget for seed production. *Annals of Botany*, 100(3), 565-571.
- Jönsson, K.I. (2000) Life history consequences of fixed costs of reproduction. *Ecoscience*, 7(423-427).
- Karlsson, S., y Méndez, M. (2005) The resource economy of plant reproduction. En *Reproductive allocation in plants* (E.G. Reekie, y F.A. Bazzaz, eds), Nueva York: Elsevier Academic Press publications, pp. 1-49.
- Lambers, H., Chapin III, F.S., y Pons, T.L. (1998) Respiration. En *Plant physiological ecology*, New York, E.U.A.: Springer-Verlag, pp. 96-139.
- Levins, R. (1968) Evolution in changing environments. New Jersey, E.U.A.: Princeton University Press, 120 pp.

- Miranda, F., y Hernández-X, E. (1963) Los tipos de vegetación de México y su clasificación. Boletín de la Sociedad Botánica de México, 28, 29-178.
- Nicotra, A.B. (1999) Reproductive allocation and the long-term costs of reproduction in *Siparuna grandiflora*, a tropical dioecious shrub. Journal of ecology, 87, 138-149.
- Obeso, J.R. (1997) Costs of reproduction in *Ilex aquifolium*: Effects at tree, branch and leaf levels. Journal of Ecology, 85(2), 159-166.
- Obeso, J.R. (2002) The costs of reproduction in plants. New Phytologist, 155(3), 321-348.
- Obeso, J.R., y Retuerto, R. (2002) Sexual dimorphism in holly *Ilex aquifolium*: cost of reproduction, sexual selection or physiological differentiation? Revista Chilena de Historia Natural, 75, 67-77.
- Oyama, K. (1984) Biología comparativa entre individuos masculinos y femeninos de *Chamaedorea tepejilote* Liebm. (Palmae). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias, México, D.F.
- Oyama, K., y Dirzo, R. (1988) Biomass allocation in the dioecious tropical palm *Chamaedorea tepejilote* and its life history consequences. Plant Species Biology, 3, 27-33.
- Oyama, K., y Dirzo, R. (1991) Ecological aspects of the interaction between *Chamaedorea tepejilote*, a dioecious palm and *Calyptocephala marginipennis*, a herbivorous beetle, in a Mexican rain forest. Principes, 35(2), 86-93.
- Oyama, K., Dirzo, R., y Ibarra-Manriquez, G. (1992) Population structure of the dominant palm species in the understory Mexican lowland rain forest. Tropics, 2, 23-28.
- Popp, J.W., y Reinartz, J.A. (1988) Sexual dimorphism in biomass allocation and clonal growth of *Xanthoxylum americanum*. American Journal of Botany, 75, 1732-1741.
- Putwain, P.D., y Harper, J.L. (1972) Studies in the dynamics of plant populations. V. Mechanisms governing the sex ratio in *Rumex acetosa* and *R. acetosella*. Journal of Ecology, 60, 113-129.
- Reekie, E.G., y Bazzaz, F.A. (1987a) Reproductive effort in plants. 1. Carbon allocation to reproduction. The American Naturalist, 129(6), 876-896.
- Reekie, E.G., y Bazzaz, F.A. (1987b) Reproductive effort in plants. 2. Does carbon reflect the allocation of other resources? The American Naturalist, 129(6), 897-906.
- Reekie, E.G., y Bazzaz, F.A. (1987c) Reproductive effort in plants. 3. Effect of of reproduction on vegetative activity. The American Naturalist, 129(6), 907-919.
- Rocheleau, A.F., y Houle, G. (2001) Different cost of reproduction for the males and females of the rare dioecious shrub *Corema conradii* (Empetraceae). American Journal of Botany, 88(4), 659-666.
- Soto, M., y Gama, L. (1997) Climas. En Historia natural de Los Tuxtlas (S. E.G., R. Dirzo, y V. R.C., eds), México: Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 7-23.
- Stanciu, O.G., Marghitas, L.A., Dezmiorean, D., y Campos, M.G. (2011) A comparison between the mineral content of flower and honeybee collected pollen of selected plant origin (*Helianthus annuus* L. and *Salix* sp.). Romanian Biotechnological Letters, 16(4), 6291-6296.
- Stearns, S.C. (1992) The evolution of life histories. Nueva York: Oxford University Press, 249 pp.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2002) Plant Physiology. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc., Publishers, 690 pp.

- Tuomi, J., Hakala, T., y Haukioja, E. (1983) Alternative concepts of reproductive effort, cost of reproduction, and selection in life-history evolution. *American Zoologist*, 23, 25–34.
- Turcotte, J., y Houle, G. (2001) Reproductive costs in *Salix planifolia* ssp *planifolia* in subarctic Quebec, Canada. *Ecoscience*, 8(4), 506-512.
- Ueno, N., Kanno, H., y Seiwa, K. (2006) Sexual differences in shoot and leaf dynamics in the dioecious tree *Salix sachalinensis*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 84(12), 1852-1859.
- Van der Werf, A., Poorter, H., y Lambers, H. (1994) Respiration as dependent on a species' inherent growth rate and on the nitrogen supply to the plant. En *A whole-plant perspective of carbon-nitrogen interactions* (J. Roy, y E. Garnier, eds): SPB Academic Publishing, The Hague, pp. 61-77.

Capítulo 3

**Efectos de la defoliación experimental en el
crecimiento y formación de estructuras
reproductivas en tres especies de
*Chamaedorea***

Efectos de la defoliación experimental en el crecimiento y formación de estructuras reproductivas masculinas y femeninas de tres especies de *Chamaedorea*

La herbivoría afecta el éxito reproductivo de las plantas al disminuir su crecimiento y afectar el desarrollo de las estructuras reproductivas. En este estudio exploramos las consecuencias de la pérdida foliar en la formación de estructuras reproductivas y el crecimiento de plantas masculinas y femeninas de tres especies dioicas de *Chamaedorea*. El estudio abarcó un periodo de dos años y comprende aspectos detallados de la reproducción que no se habían sido considerados en otros estudios de defoliación en el género: tamaño de las florescencias, frutos cuajados y crecimiento en biomasa. Tres tratamientos de defoliación fueron aplicados: defoliación al 0%, defoliación al 25% defoliación al 50%. El desempeño de las plantas fue medido durante dos años. Se encontró que la defoliación repercute negativamente en la formación de estructuras reproductivas y en la producción de biomasa.

La longitud de las inflorescencias y la longitud de la biomasa varían entre el primer y segundo año de estudio, en plantas sin defoliación la longitud y la biomasa disminuyeron con relación a las plantas con defoliación. En el primer año de estudio, las plantas sin defoliación produjeron inflorescencias significativamente más largas con respecto a las plantas defoliadas. El peso total y el peso de la panícula de las inflorescencias masculinas se redujo en las plantas con 25 y 50% de defoliación en *C. alternans*. En las plantas femeninas, el porcentaje de frutos cuajados (no. frutos totales / no. de frutos) se reduce significativamente en las plantas con defoliación al 25%. La producción de biomasa se redujo en el primer año en las plantas femeninas con 50% de defoliación, y en global para las plantas femeninas de *C. pinnatifrons* con 25 y 50% de defoliación.

Los resultados de este estudio ponen en evidencia los efectos negativos que sobre las plantas tiene la herbivoría en el crecimiento, éxito reproductivo y consecuentemente en la adecuación. Los resultados sugieren que la herbivoría puede tener consecuencias negativas para la adecuación de las plantas femeninas. No obstante, se desconocen los efectos negativos de la pérdida foliar en la germinación, establecimiento y sobrevivencia en estas plantas.

INTRODUCCIÓN

La herbivoría es una interacción antagónica, en la que plantas y herbívoros están en un conflicto continuo. La herbivoría implica por definición el consumo de cualquier tejido o fluido vegetal por algún animal; constituye una de las interacciones bióticas más importantes al afectar la sobrevivencia, fecundidad y crecimiento de las plantas (Marquis, 1992). De la herbivoría, la depredación de semillas y plántulas, es una de las mayores fuerzas que controlan la distribución (Louda, 1982a) abundancia y establecimiento de las especies (Louda, 1982b).

Las plantas están constantemente bajo la presión de selección que ejercen los herbívoros y los polinizadores. Se ha sugerido que la evaluación de algunos atributos defensivos de las plantas son resultado de dicha presión, por ejemplo los tricomas, las espinas y los compuestos secundarios (Marquis, 1992). La presión que ejercen los herbívoros puede inclusive controlar la distribución de ciertos genotipos. Un ejemplo claro de esto es la distribución del trébol blanco *Trifolium repens* y de sus herbívoros, los caracoles y las babosas, pues en áreas con altas densidades de moluscos, los morfos de trébol que producen compuestos cianogénicos están sobre-representados en comparación con áreas con bajas densidades de dichos herbívoros (Dirzo y Harper, 1982).

Los efectos de la herbivoría sobre las plantas son con frecuencia negativos. La pérdida de tejido foliar causa una disminución de la supervivencia, el crecimiento y la reproducción (Marquis, 1984; Mendoza *et al.*, 1987; Domínguez y Dirzo, 1994; Koptur *et al.*, 1996). La defoliación experimental de especies como *Piper arieianum* (Marquis, 1984) y *Astrocaryum mexicanum* (Mendoza *et al.*, 1987) han puesto en evidencia estos efectos negativos. La defoliación al 25 y 100% de *Erythroxylum havanense* reduce la producción de semillas. Una defoliación del 100% causa una disminución del incremento en área basal, aumenta el tiempo de maduración de los frutos y disminuye el número de flores (Domínguez y Dirzo, 1994). El daño causado por la herbivoría reduce el atractivo de las flores a los polinizadores (Strauss *et al.*, 1996). El número de granos de polen, la longitud y ancho de los pétalos, se reducen en las plantas de *Rhaphanus raphanistrum* que han sido dañadas (Strauss *et al.*, 1996; Lehtilä y Strauss, 1999). Es por esto que se ha concluido que el daño foliar tiene un impacto en la adecuación de las plantas.

Los efectos de la defoliación experimental también se han estudiado en plantas dioicas. La defoliación en *Silene dioica* reduce el número de flores e incrementa la mortalidad de las plantas masculinas. En tanto que las plantas femeninas reducen el número de flores, el número y el tamaño de las semillas, en comparación con las plantas control (Elmqvist y Gardfjell, 1988). Asimismo, la remoción del 80% de los brotes vegetativos en el árbol *Salix sachalinensis*, ocasiona la reducción en el crecimiento en diámetro de los brotes de un año de edad. Además, la reducción es mayor en las plantas femeninas que en plantas masculinas (Ueno *et al.*, 2006). No obstante, en *Carex picta* la defoliación de los brotes vegetativos reduce el crecimiento de las plantas masculinas y las plantas femeninas no ven afectado su crecimiento (Delph *et al.*, 1993). Particularmente en *C. alternans* (anteriormente confundida con *C. tepejilote*). Las plantas masculinas con 25, 50 y 100% de defoliación producen significativamente una mayor cantidad

de hojas y de inflorescencias. Las plantas femeninas con entre 25 y 100% de defoliación producen también un mayor número de hojas, aunque el número de inflorescencias no cambia. La producción de frutos se eleva con la defoliación entre 25 y 50% al primer año, aunque no varía al siguiente año (Oyama y Mendoza, 1990).

Con frecuencia las plantas femeninas invierten un mayor porcentaje de sus recursos a la reproducción, en comparación con las plantas masculinas (Bullock, 1984; Oyama y Dirzo, 1988; Popp y Reinartz, 1988; Obeso, 1997; Rocheleau y Houle, 2001; Turcotte y Houle, 2001; Obeso y Retuerto, 2002; Dudley, 2006; Ueno *et al.*, 2006; Cepeda-Cornejo y Dirzo, 2010). También se ha comprobado en algunas especies dioicas que una mayor asignación a la maduración de frutos y semillas va acompañada de una menor asignación de recursos al crecimiento (Popp y Reinartz, 1988; Jing y Coley, 1990; Elmqvist *et al.*, 1991; Obeso, 1997; Rocheleau y Houle, 2001; Obeso y Retuerto, 2002). Eso supone una diferencia en la capacidad de regenerar el tejido foliar entre plantas masculinas y femeninas. La reducción en el área foliar podría afectar en mayor grado el desempeño de las plantas femeninas. Particularmente en este estudio trabajamos con tres especies de palmas de *Chamaedorea*. Las plantas masculinas de estas tres especies poseen una mayor tasa de producción foliar en comparación con las plantas femeninas (Cepeda-Cornejo y Dirzo, 2010), esto supone una mayor capacidad de regenerar el tejido perdido, por lo tanto es esperable que existan contrastes notables dependiendo del sexo y del porcentaje de área pérdida. La pérdida de tejido foliar podría causar la disminución no solo en el número de estructuras reproductivas, sino del peso y longitud de las inflorescencias, tamaño de las flores e incluso del número de frutos cuajados (no. de frutos/no. de flores), así como la disminución en el crecimiento. Además, los efectos negativos de la defoliación podrían manifestarse en subsecuentes temporadas reproductivas. Asimismo, existen diferencias interespecíficas importantes en la tasa de producción de biomasa en las especies de estudio, y

consecuentemente podría darse un gradiente en la respuesta a la defoliación a este nivel. El objetivo de este estudio fue evaluar el desempeño de plantas masculinas y femeninas de tres especies dioicas y simpátricas de *Chamaedorea* en respuesta a la pérdida de tejido foliar.

MÉTODOS

Sitio y especies de estudio

El sitio de estudio se ubicó en los alrededores de la estación de Biología Tropical Los Tuxtlas del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (18°34'–18°36' N, 95°04'–95°09' W, 150 m.s.n.m.). La estación comprende una superficie total de 640 hectáreas y está ubicada en la Sierra de Los Tuxtlas, en el estado de Veracruz, México. La vegetación esta clasificada como selva alta perennifolia (SAP) de acuerdo con el sistema de Miranda y Hernández-X (1963). Las tres especies de estudio son palmas del género *Chamaedorea* (Arecaceae) que son notables en la región por su abundancia e importancia biológica: *C. alternans*, *C. ernesti-augusti* y *C. pinnatifrons*. Detalles de la historia natural de la zona y las especies en González-Soriano y colaboradores (1997).

Selección de los organismos de estudio

Las plantas fueron elegidas al azar a lo largo de un extenso recorrido. Seleccionamos entre 40 y 54 plantas reproductivas por sexo y por especie (145 plantas femeninas y 120 plantas masculinas). Durante el estudio algunas plantas se perdieron por caída de troncos o muerte natural. Al inicio del estudio cada una de las plantas fue marcada con pintura indeleble en las hojas, la región basal y apical del tallo. La condición inicial del tallo y hojas de cada planta fue registrada. Medimos al inicio y en cada censo el diámetro de la región basal y apical del tallo con un vernier digital (Miyutoyo CD-6°C, Japón). El número de las hojas en pie y la longitud de cada una de ellas también fueron registrados.

El marcaje inicial fue realizado en noviembre de 2004. El primer censo de crecimiento y remarcado de hojas nuevas se realizó después de 14 meses (enero de 2006) y el segundo y último censo se realizó al siguiente año (enero de 2007), es decir a los 26 meses del marcaje inicial.

Tratamientos

Tres tratamientos de defoliación fueron aplicados. Las plantas que recibieron cada uno de los tratamientos fueron seleccionadas al azar. Cada uno de los tratamientos se aplicó a 10-15 plantas por sexo por especie. El tratamiento 1 consistió en 0% de defoliación, el tratamiento 2 consistió en 25% de defoliación y el tratamiento 3 en 50% de defoliación del área foliar total en pie. La extracción del área foliar se realizó con tijeras. En las especies con lámina dividida se retiró el área correspondiente en cada una de las pinnas. En la especie con lámina entera se retiró el área equivalente en el lado derecho e izquierdo de cada hoja. El raquis central de la lámina no fue cortado, aunque si se cortaron las venas longitudinales. Estos niveles de defoliación ya han sido previamente probados en una de las tres especies de estudio (Oyama y Mendoza, 1990). Con la finalidad de mantener el nivel de defoliación en cada planta y evitar el consumo foliar por sus herbívoros naturales, se aplicó una solución de agua con insecticida. Utilizamos dos insecticidas: el dimetoato (Gardena raíz y follaje, Happy Flower Mexicana, S.A. de C.V., México) a razón de 1 ml en 1 L de agua y el diazinon 25% (AGROformuladora Delta S.A. de C.V., México) a una concentración de 5 ml por litro. El dimetoato es un insecticida de contacto para plagas masticadoras en la zona del follaje y raíces, en tanto que el diazinon es un insecticida fosforado que tiene un efecto prolongado durante 6 a 8 semanas. El follaje se humedecía completamente con la solución de agua-insecticida una vez al mes y se aplicó a todas las plantas de los tres tratamientos. La defoliación fue realizada dos veces, la primera

durante el marcaje inicial (noviembre de 2004) y la segunda poco después de un año de iniciado el experimento (enero de 2006).

Estructuras reproductivas

Las inflorescencias masculinas fueron colectadas en el pico de la reproducción. Así, las flores masculinas de *C. ernesti augusti* se colectaron entre febrero y marzo, las flores masculinas de *C. pinnatifrons* durante mayo y junio y las flores masculinas de *C. alternans* durante octubre a diciembre. El estudio incluyó dos periodos reproductivos para cada especie.

Las inflorescencias fueron embolsadas en papel y secadas en un horno a 60°C durante 24 horas. El peso total de la inflorescencia (incluyendo el pedicelo o estructura de sostén) y el peso de la panícula fueron registrados para cada inflorescencia colectada, empleando una balanza digital (Ohaus, Scout II 200g × 0.01g, E.U.A.). La panícula contiene a todas las flores sin considerar el eje o pedicelo, y debido a que en algunos casos no era posible colectar completamente este eje, se obtuvo el peso de la panícula. Se midió la longitud total de la inflorescencia (incluyendo el pedicelo), la longitud de las raquillas (superior, intermedia e inferior) y el diámetro (Miyutoyo CD-6°C, Japón) de tres flores por inflorescencia. La raquilla es cada una de las subunidades que conforman la panícula de la inflorescencia y sobre la cual están insertadas las flores.

El número total de flores femeninas se cuantificó durante la fase de anthesis para cada una de las inflorescencias producidas en todas las plantas seleccionadas. Al final de la estación reproductiva y cuando los frutos estaban maduros, el número total de frutos formados fue cuantificado en cada una de las inflorescencias de todas las plantas femeninas seleccionadas. Se calculó el número de frutos cuajados por inflorescencia y por planta (mediante el promedio de todas las infrutescencias). El cuajado es la fertilización de la flor, tras la cual se da paso a la formación del fruto, se conoce comúnmente como fruit-set. Donde el número de frutos cuajados

(FC) = número total de frutos / número total de flores. El número de FC fue obtenido sólo para la primera estación reproductiva del experimento.

Crecimiento

Los datos de la altura y diámetro del tallo, así como número y longitud de las hojas correspondientes a cada censo, fueron empleados para estimar el crecimiento de las plantas. De acuerdo con el análisis de crecimiento de Hunt (1982), se calculó:

a) la tasa de incremento en altura del tallo (IAP) = $(\ln AP_{\text{final}} - \ln AP_{\text{inicial}}) / t$, donde AP = altura parcial del tallo en cm y t = tiempo en años.

El incremento en altura del tallo en este capítulo, se calculó a partir de la formación de nuevos metámeros en la zona apical del tallo y ocurre por la aposición de tejido en dicha zona.

b) la tasa de producción foliar (TPF) = hojas producidas / (hojas iniciales/t), donde t = tiempo en años.

c) producción de biomasa total (PB) = biomasa producida en tallo y hojas / (biomasa inicial/t).

La biomasa de las hojas y tallos fue estimada por ecuaciones de regresión. Las ecuaciones fueron desarrolladas en plantas de diferentes tamaños de las tres especies y colectadas en los alrededores de la Estación (Cepeda-Cornejo y Dirzo, 2010).

Análisis estadísticos

La variación entre el primer intervalo (noviembre de 2004 a enero de 2005, se menciona como 2005) con el siguiente (enero de 2006 a enero de 2007, se menciona como 2006) en el peso de la inflorescencia total, el peso de la panícula, la longitud de la inflorescencia total, la longitud de la raquila, el diámetro de la flor, la tasa de incremento en altura del tallo, la tasa de producción foliar y la producción de biomasa total fue contrastada por un análisis de varianza de medidas repetidas. El modelo incluyó el efecto de la especie, el sexo y el tratamiento, así como sus interacciones: especie \times sexo, especie \times tratamiento, sexo \times tratamiento y especie \times sexo \times

tratamiento. Previamente se verificó la normalidad de los residuales por la prueba de W Shapiro-Wilk. Los residuales se obtuvieron al calcular un ANOVA por separado de los tiempos uno (2005) y dos (2006). Se analizaron los efectos dentro de sujetos y entre sujetos. Los efectos dentro de sujetos (dentro de plantas) indican el cambio en el tiempo de cada planta en cada una de las variables. Los efectos entre sujetos (entre plantas) suman el efecto de los dos años. Los efectos del análisis de medidas repetidas que resultaron significativos fueron analizados con pruebas de contrastes post-hoc. La significancia de las comparaciones fue corregida por el criterio de Bonferroni.

La proporción de frutos cuajados fue analizada por un análisis de varianza de dos factores (tratamiento \times especie) en las tres especies de estudio y los tres tratamientos.

Adicionalmente, los datos del año 2005 de la longitud de la inflorescencia y de la producción de biomasa fueron analizados con un análisis de varianza de dos (especie \times tratamiento) y tres factores (especie \times sexo \times tratamiento), respectivamente.

La normalidad de los residuales fue verificada para todos los análisis por la prueba de W Shapiro-Wilk. Sin embargo, cuando los residuales no estaban normalmente distribuidos, una transformación Box Cox fue aplicada a los datos (JMP vers 7.0, SAS Institute Inc. 2007).

RESULTADOS

Estructuras reproductivas

El análisis de varianza de medidas repetidas (efectos dentro de sujetos) detectó un efecto significativo del tiempo en el peso total, peso de la panícula y longitud de la raquila. Las variables, peso total de la inflorescencia, peso de la panícula, longitud total y diámetro de las flores presentaron un efecto significativo de la interacción tiempo \times especie. Únicamente la longitud total de la inflorescencia tuvo un efecto significativo de la interacción tiempo \times tratamiento, así como tiempo \times especie \times tratamiento. La comparación entre sujetos indicó efectos de la especie y de la interacción especie \times tratamiento (Tabla 1).

La comparación en el tiempo (al interior de cada planta o dentro de sujetos) indicó que el peso de las inflorescencias producidas en 2005 fue significativamente mayor en un 8.7%, con respecto a las inflorescencias producidas en 2006 (Tabla 1, Figura 1). La comparación entre plantas (también llamada entre sujetos) indica que las plantas de *C. alternans* con 25 y 50% de defoliación produjeron inflorescencias significativamente de menor peso con respecto a las plantas sin defoliación (Tabla 2).

El peso de la panícula en todas las inflorescencias producidas en 2005 fue significativamente mayor, en un 20.6%, al peso de las panículas producidas en el 2006 (efecto dentro de sujetos) (Tabla 1, Figura 2). Las panículas de la especie *C. alternans* con 50 y 25% de defoliación tuvieron significativamente menor peso con respecto a las plantas sin defoliación (efecto entre sujetos) (Tabla 2, Figura 2).

La longitud total de la inflorescencia no mostró cambios en el tiempo, aunque si hubo efectos de la interacción tiempo \times tratamiento (dentro de sujetos) (Tabla 1). El contraste post-hoc indicó que la longitud de las inflorescencias de las plantas sin defoliación disminuyó significativamente con relación a la longitud de las inflorescencias de plantas con 25% de

defoliación (Tabla 2, Figura 3). La longitud de las inflorescencias de las plantas sin defoliación disminuyó en promedio un 13%, de 38.1 cm en 2005 a 33.1 cm en 2006 y la longitud en las plantas con 25% de defoliación aumentó un 7.3% de 32.8 cm en 2005 a 35.4% en 2006. El efecto del tratamiento sobre la longitud de la inflorescencia fue significativo sólo en la especie *C. pinnatifrons*. La longitud de las inflorescencias de las plantas sin defoliación disminuyó significativamente con respecto a la longitud en plantas con 25 y 50% de defoliación (Tabla 2). La longitud de las inflorescencias de las plantas sin defoliación disminuyó un 34%, de 41.3 cm en 2005 a 27.2 cm en 2006. En tanto, la longitud se incrementó un 17.6% en plantas con 25% de defoliación y 7.1% en plantas con 50% de defoliación. No obstante, la comparación mediante un análisis de ANOVA de dos factores (especie \times tratamiento) de los datos correspondientes de la longitud en el año 2005, señaló un efecto significativo del tratamiento ($F = 5.76$, $P = 0.050$). La longitud de las inflorescencias en plantas sin defoliación fué significativamente mayor a la de las plantas con 25 y 50% de defoliación (14.6 y 18.6%, respectivamente).

La longitud de las raquillas producidas en el primer año (2005) fué significativamente menor (en un 0.9%) a la longitud del segundo año (2006) (Tabla 2, Figura 4). El diámetro de las flores únicamente mostró variación interespecífica (Tabla 1, Figura 5).

El análisis de la producción de frutos con un ANOVA de dos factores señaló un efecto significativo de la especie ($F = 12.14$, $P < 0.0001$) y de los tratamientos ($F = 3.33$, $P = 0.0429$). Las comparación de Tukey indica que el número de frutos amarrados resultó ser más elevado en *C. ernesti-augusti*, y no hay diferencias significativas entre *C. alternans* y *C. pinnatifrons*. Asimismo, la cifra promedio de frutos cuajados para las plantas sin defoliación de las tres especies fue de 0.375 y para el tratamiento de defoliación al 25% fue de 0.25. Esto es, las plantas femeninas sin defoliación produjeron significativamente más frutos cuajados, 1.48 veces, que el tratamiento con 25% de defoliación (Figura 6).

Crecimiento

Al analizar los datos con un ANOVA de medidas repetidas se encontró para el incremento en altura del tallo, la tasa de producción foliar y la producción de biomasa total, un efecto significativo del tiempo y solo la biomasa total mostró un efecto marginalmente significativo de la interacción tiempo \times tratamiento ($P = 0.051$) y significativo para las interacciones tiempo \times especie ($P = 0.0019$) y tiempo \times sexo \times tratamiento ($P = 0.0132$) (efectos dentro de sujetos) (Tabla 3). La comparación entre sujetos señala un efecto significativo de la especie, del sexo y de la interacción especie \times sexo \times tratamiento (Tabla 3).

La altura obtenida por todas las plantas en el año 2005 fue de 0.082 cm/cm/año y disminuyó significativamente a 0.071 cm/cm/año en el año 2006, lo que representa una disminución del 13.2% (efectos dentro de sujetos) (Figura 7).

La tasa de producción foliar obtenida en el año 2005 aumentó significativamente un 0.8% con relación al año 2006. La tasa de producción foliar fue de 0.49 hojas/hoja/año en el 2005 y aumentó a 0.50 hojas/hoja/año en el 2006 (Figura 8) (efectos dentro de sujetos). La producción foliar a los dos años mostró un efecto significativo de la especie y el sexo (Tabla 3) (efectos entre sujetos). Las tasas de producción foliar entre especies varían en el siguiente orden: *C. alternans* > *C. pinnatifrons* > *C. ernesti-augusti*. Las plantas masculinas de las tres especies produjeron una mayor cantidad de hojas, 1.08 veces más que todas las plantas femeninas.

La producción de biomasa alcanzó 0.25 g/g/año en 2005 y descendió significativamente a 0.18 g/g/año durante el año 2006, esto representa una disminución del 28.3% (Figura 9).

Uno de los contrastes post-hoc para la interacción tiempo \times tratamiento fue significativo, las plantas sin defoliación mostraron una reducción significativamente mayor en la producción de biomasa con respecto a las plantas con 50% de defoliación (Tabla 4). La biomasa que fue

producida en 2005 en plantas sin defoliación fue de 0.26 g/g/año y disminuyó a 0.17 g/g/año en el año 2006 (disminución del 35.2%). Asimismo, las plantas con 50% de defoliación produjeron 0.23 g/g/año en 2005 y sólo 0.18 g/g/año (disminución del 20.8%).

El análisis de contrastes post-hoc para la interacción tiempo \times sexo \times tratamiento para la producción de biomasa fue significativo para cinco comparaciones (Tabla 4). Las plantas femeninas con 50% de defoliación tuvieron una menor reducción del 6% en la producción de biomasa y este porcentaje es significativamente menor con respecto a las plantas femeninas sin defoliación (reducción del 37.3%), plantas masculinas sin defoliación (reducción del 33.1%), plantas masculinas con 25% de defoliación (reducción del 28.7%) y plantas masculinas con 50% de defoliación (reducción del 30.6%). Asimismo las plantas sin defoliación muestran mayor disminución de la producción de biomasa con respecto a los dos grupos de plantas femeninas con defoliación (25 y 50%) (efectos dentro de sujetos, Tabla 4). Es interesante comparar las diferencias en la biomasa producida por sexo y tratamiento para el año 2005. La biomasa producida por las plantas femeninas con 50% de defoliación es 25-30% menor con respecto al resto de las plantas.

El ANOVA factorial (especie \times sexo \times tratamiento) realizado únicamente para los datos del 2005, mostró un efecto significativo de la interacción sexo \times tratamiento ($F = 3.32$, $P = 0.0386$). La comparación de Tukey indicó que en efecto, las plantas femeninas con 50% de defoliación produjeron menos biomasa con respecto a las plantas femeninas sin defoliación, masculinas con 25% y masculinas con 50% de defoliación. Estas diferencias no se manifestaron en el año 2006.

La comparación entre sujetos también detectó variación interespecífica en el siguiente gradiente: *C. alternans* > *C. ernesti-augusti* > *C. pinnatifrons* (Tabla 4). Asimismo, la producción de biomasa de todas las plantas masculinas fue 1.12 veces más elevada a la de las

plantas femeninas. Los contrastes post-hoc sobre la triple interacción especie \times sexo \times tratamiento reveló que las plantas femeninas de *C. pinnatifrons* con 25% de defoliación produjeron significativamente menos biomasa con respecto a las plantas femeninas sin defoliación. Igualmente, los dos tratamientos de defoliación en las plantas femeninas de esta misma especie, produjeron menos biomasa que las plantas femeninas sin defoliación (Tabla 4, Figura 9).

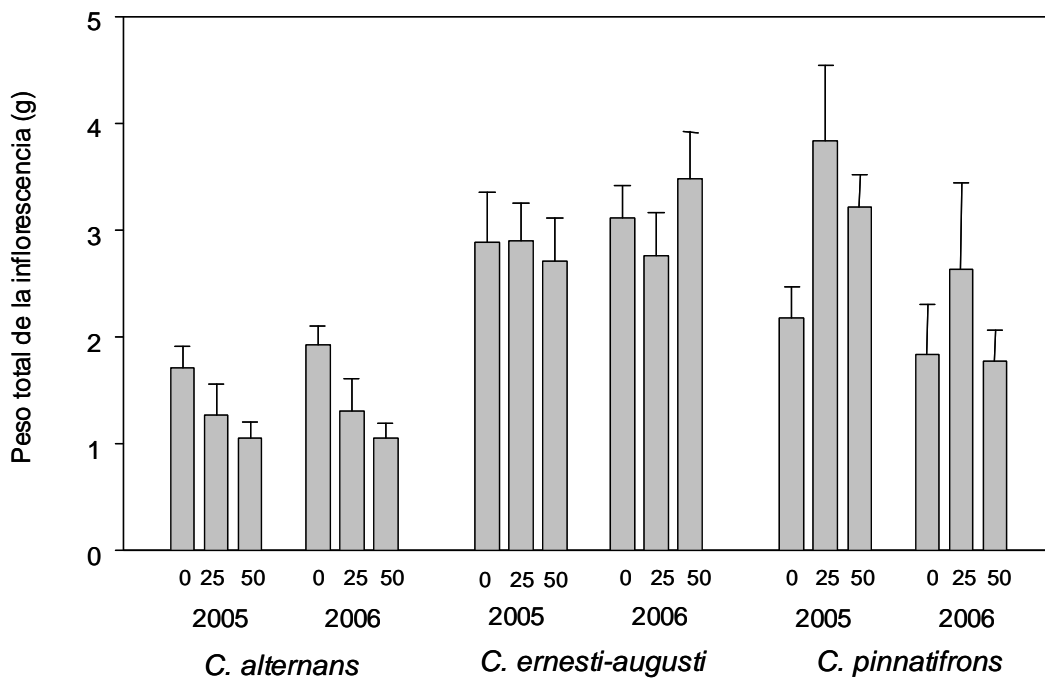


Figura 1. Peso total de las inflorescencias masculinas producidas por las tres especies de estudio, aplicando tres tratamientos: 0%, 25% y 50% de defoliación. Las líneas de las barras indican el error estándar.

Tabla 1. Análisis de varianza de medidas repetidas del peso total, peso de la panícula, longitud total de las inflorescencias, longitud promedio de las raquillas y diámetro de las flores masculinas de *C. alternans*, *C. ernesti-augusti* y *C. pinnatifrons*.

Fuente de variación	Peso total		Peso de la panícula		Longitud total		Longitud de la raquilla		Diámetro	
	<i>F</i>	df	<i>F</i>	df	<i>F</i>	df	<i>F</i>	df	<i>F</i>	df
Dentro de sujetos										
Tiempo	32.63***	1, 46	46.79***	1, 46	0.18	1, 45	52.97***	1, 65	1.93	1, 44
Tiempo × Especie	19.61***	2, 46	22.62***	2, 46	0.21	2, 45	20.29***	2, 65	3.31*	2, 44
Tiempo × Tratamiento	0.62	2, 46	0.79	2, 46	4.09*	2, 45	1.17	3, 65	0.24	2, 44
Tiempo × Especie × Tratamiento	0.69	4, 46	0.70	4, 46	3.14*	4, 45	1.84	6, 65	0.77	4, 44
Entre sujetos										
Especie	37.09***	2, 46	52.17***	2, 46	141.67***	2, 45	50.6***	2, 65	110.15***	2, 44
Tratamiento	0.24	2, 46	0.09	2, 46	0.84	2, 45	0.07	3, 65	2.52	2, 44
Especie × Tratamiento	2.59*	4, 46	2.93*	4, 46	1.33	4, 45	2.21†	6, 65	1.38	4, 44

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$. † Marginalmente significativo ($P = 0.0533$).

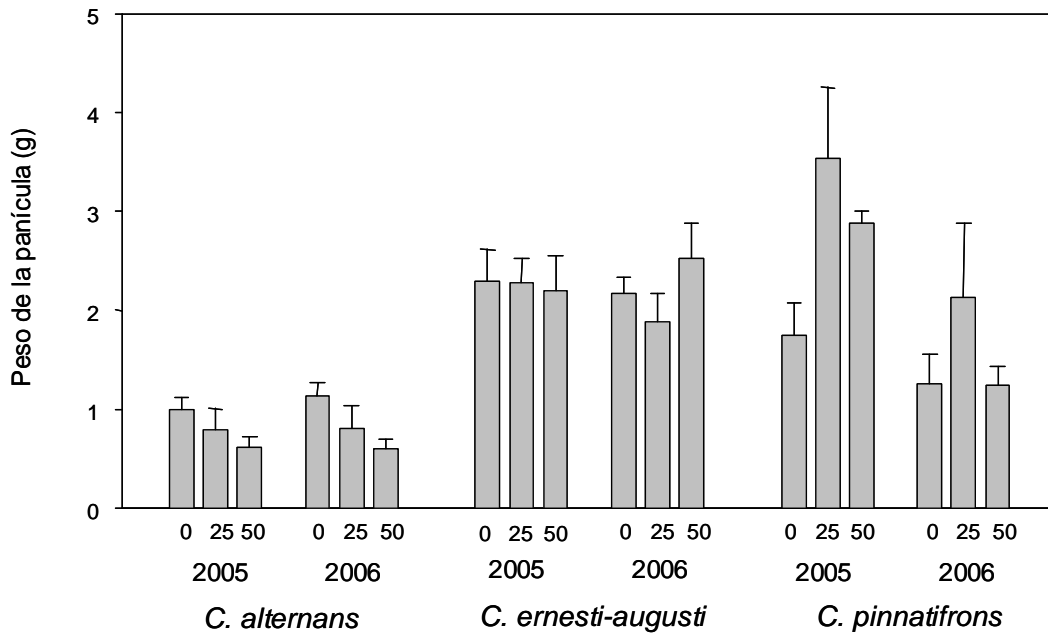


Figura 2. Peso total de la panícula de las inflorescencias masculinas en las tres especies de estudio, aplicando tres tratamientos: 0%, 25% y 50% de defoliación. Las líneas de las barras indican el error estándar.

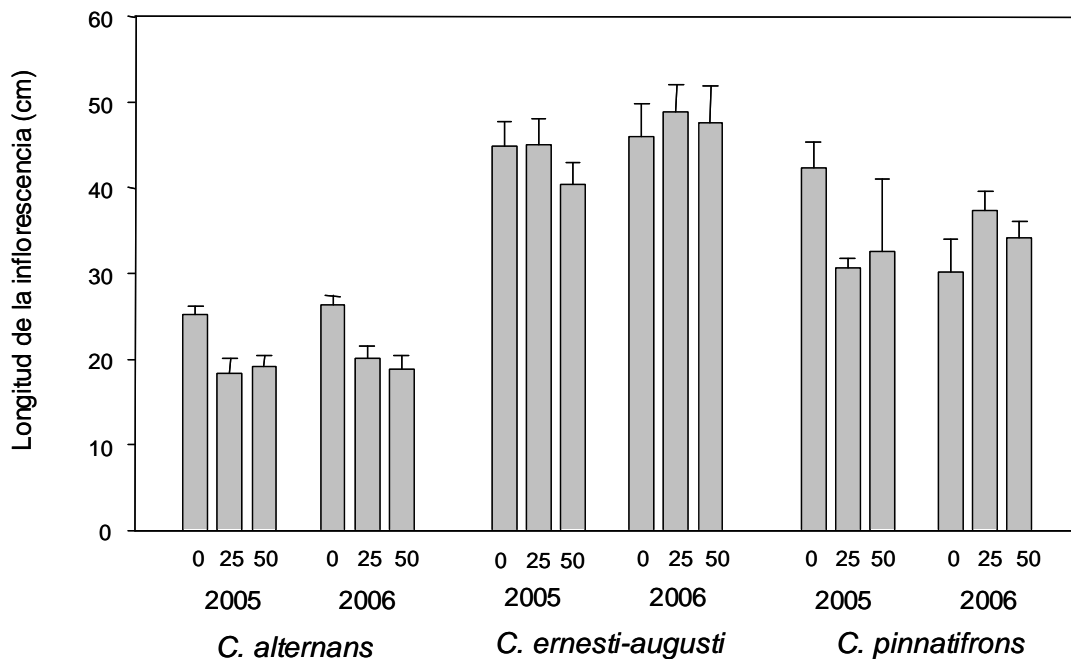


Figura 3. Longitud de las inflorescencias masculinas en las tres especies de estudio, aplicando tres tratamientos: 0%, 25% y 50% de defoliación. Las líneas de las barras indican el error estándar.

Tabla 2. Tabla de contrastes post-hoc que resultaron significativas entre los tres tratamientos de defoliación para las estructuras reproductivas masculinas.

Variable	Contraste	Comparación	F	g.l.
Dentro de sujetos				
Peso total de la inflorescencia	Tiempo × especie	<i>C. alternans</i> vs. <i>C. pinnatifrons</i>	30.04***	1, 46
		<i>C. ernesti-augusti</i> vs. <i>C. pinnatifrons</i>	16.06**	1, 46
Peso de la panícula	Tiempo × especie	<i>C. alternans</i> vs. <i>C.ernesti-augusti</i>	12.1**	1, 46
		<i>C. alternans</i> vs. <i>C. pinnatifrons</i>	14.16***	1, 46
		<i>C. ernesti-augusti</i> vs. <i>C. pinnatifrons</i>	14.25**	1, 46
Longitud total de la inflorescencia	Tiempo × tratamiento	Defoliación 0% vs. defoliación 25%	7.55*	1, 45
	Tiempo × especie × tratamiento	<i>C. pinnatifrons</i> 0% vs. <i>C. pinnatifrons</i> 25%	14.53**	1, 45
		<i>C. pinnatifrons</i> 0% vs. <i>C. pinnatifrons</i> 50%	5.94*	1, 45
Longitud de la raquila	Tiempo × especie	<i>C. alternans</i> vs. <i>C.ernesti-augusti</i>	9.72*	1, 65
		<i>C. alternans</i> vs. <i>C. pinnatifrons</i>	40.12***	1, 65
		<i>C. ernesti-augusti</i> vs. <i>C. pinnatifrons</i>	13.22**	1, 65
Diámetro	Tiempo × especie	<i>C. ernesti-augusti</i> vs. <i>C. pinnatifrons</i>	6.60*	1, 44
Entre sujetos				
Peso total de la inflorescencia	Especie × tratamiento	<i>C. alternans</i> 50% vs. <i>C. alternans</i> 0%	6.38*	1, 46
		<i>C. alternans</i> 25% y 50% vs. <i>C. alternans</i> 0%	7.78*	1, 46
Peso de la panícula	Especie × tratamiento	<i>C. alternans</i> 50% vs. <i>C. alternans</i> 0%	6.15*	1, 46
		<i>C. alternans</i> 25% y 50% vs. <i>C. alternans</i> 0%	6.29*	1, 46

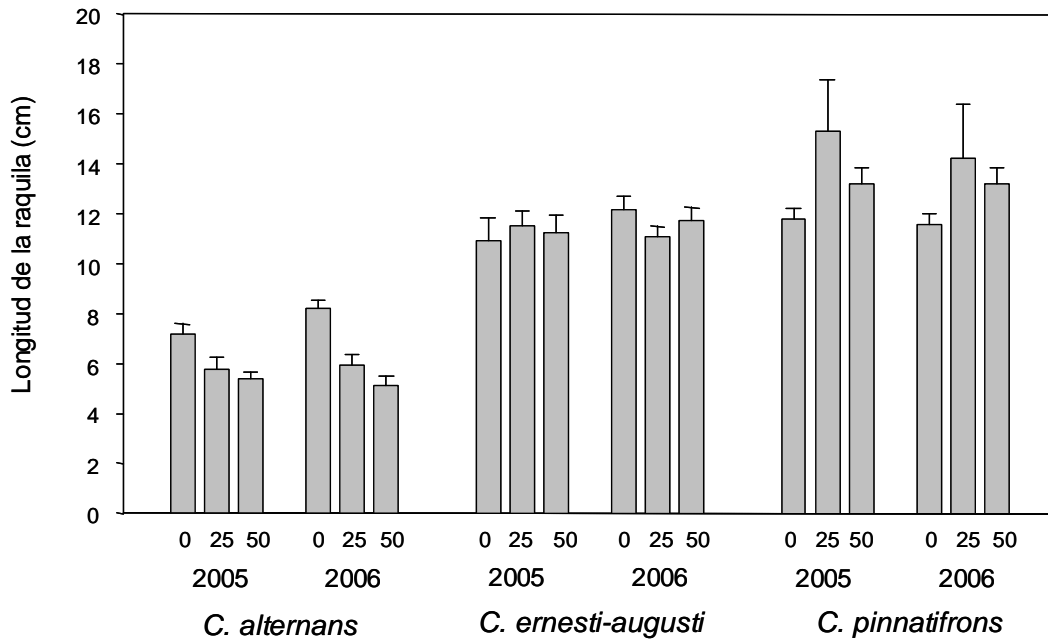


Figura 4. Longitud promedio de las raquillas de las inflorescencias masculinas en las tres especies de estudio. Se aplicaron tres tratamientos: 0%, 25% y 50% de defoliación. Las líneas de las barras indican el error estándar.

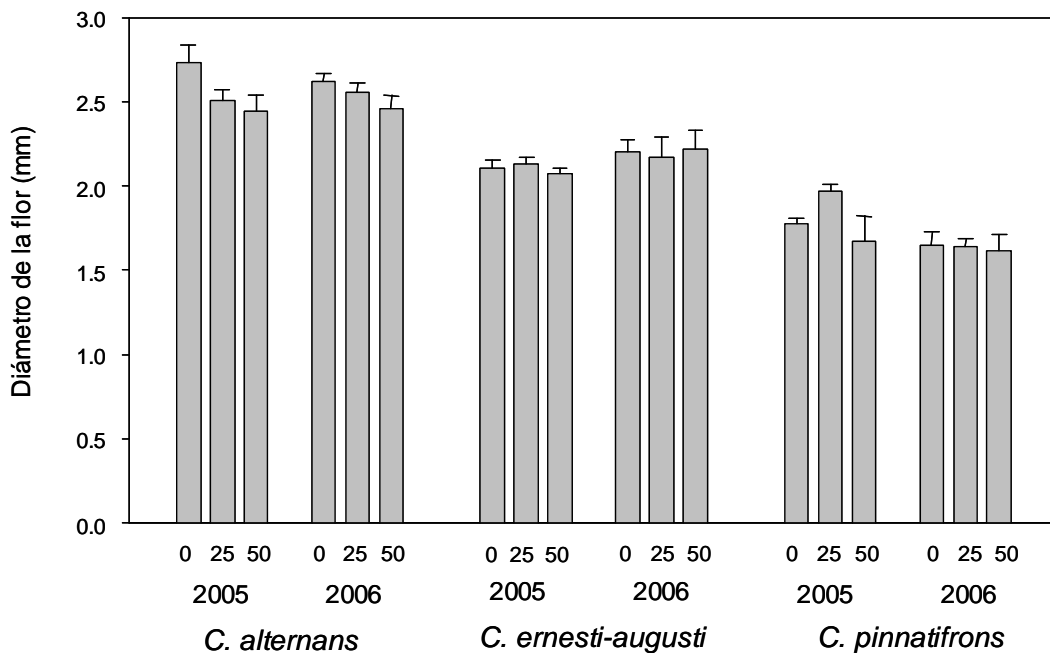


Figura 5. Diámetro de las flores masculinas de las tres especies de estudio, en plantas con aplicación de tres tratamientos: 0%, 25% y 50% de defoliación. Las líneas de las barras indican el error estándar.

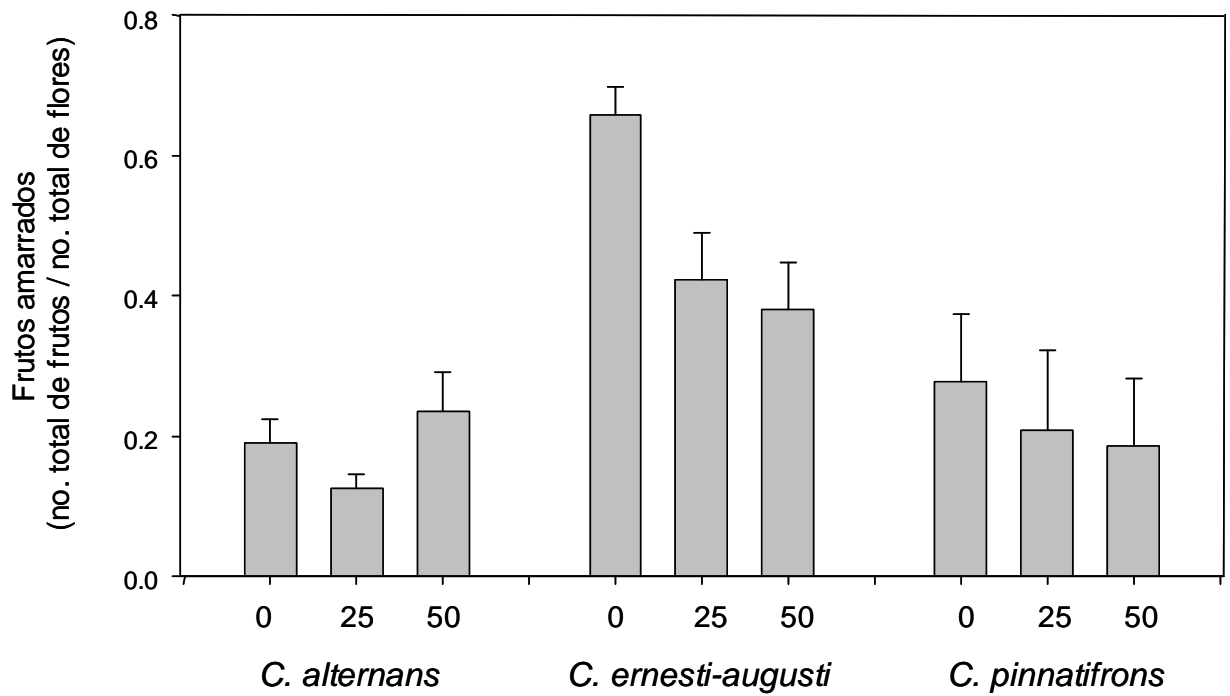


Figura 6. Proporción de flores que formaron frutos (frutos amarrados) en tres especies de *Chamaedorea* y aplicando tres tratamientos: 0%, 25% y 50% de defoliación. Las líneas de las barras indican el error estándar.

Tabla 3. Análisis de varianza de medidas repetidas de la tasa de incremento en altura del tallo, tasa de producción foliar y producción de biomasa de las plantas masculinas y femeninas de *C. alternans*, *C. ernesti-augusti* y *C. pinnatifrons*, con tratamientos de defoliación.

	Altura tallo		Producción foliar		Biomasa total	
Dentro de sujetos	<i>F</i>	df	<i>F</i>	df	<i>F</i>	df
Tiempo	89.72***	1, 164	9.09*	1, 162	35.06***	1, 164
Tiempo × especie	1.10	2, 164	1.46	2, 162	6.50*	2, 164
Tiempo × sexo	0.25	1, 164	0.016	1, 162	3.61	1, 164
Tiempo × especie × sexo	2.1	2, 164	0.29	2, 162	2.12	2, 164
Tiempo × tratamiento	1.27	2, 164	0.26	2, 162	3.03†	2, 164
Tiempo × especie × tratamiento	0.29	4, 164	1.25	4, 162	0.76	4, 164
Tiempo × sexo × tratamiento	1.69	2, 164	1.83	2, 162	4.44*	2, 164
Tiempo × especie × sexo × tratamiento	1.04	4, 164	0.62	4, 162	0.92	4, 164
Entre sujetos						
Especie	12.24***	2, 164	77.36***	2, 162	98.44***	2, 164
Sexo	2.41	1, 164	5.80*	1, 162	6.76*	1, 164
Especie × sexo	1.48	2, 164	2.10	2, 162	2.91	2, 164
Tratamiento	0.55	2, 164	0.30	2, 162	0.85	2, 164
Especie × tratamiento	0.50	4, 164	0.32	4, 162	0.42	4, 164
Sexo × tratamiento	2.19	2, 164	0.40	2, 162	1.64	2, 164
Especie × sexo × tratamiento	1.99	4, 164	0.17	4, 162	2.53*	4, 164

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, $P < 0.0001$. † Diferencia marginalmente significativa ($P = 0.051$).

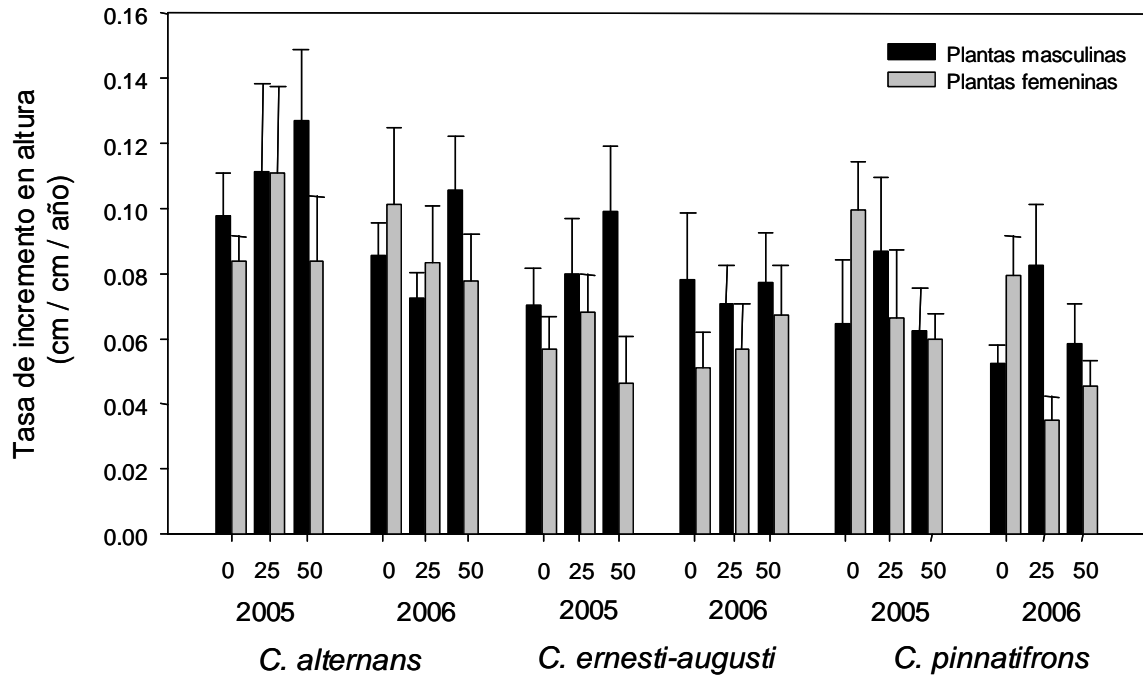


Figura 7. Tasa de incremento en altura del tallo en los años 2005 y 2006, en plantas masculinas y femeninas de tres especies de *Chamaedorea*, aplicando tres tratamientos: 0%, 25% y 50% de defoliación. Las líneas de las barras indican el error estándar.

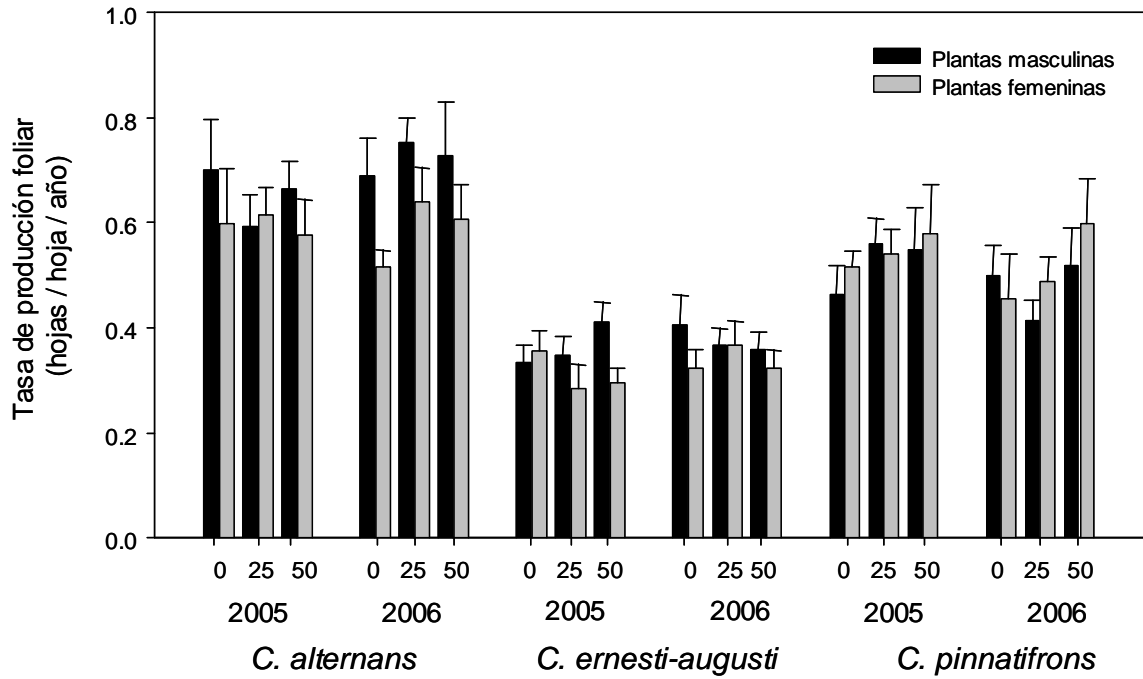


Figura 8. Tasa de producción de hojas durante los años 2005 y 2006, en plantas masculinas y femeninas de tres especies de *Chamaedorea*, aplicando tres tratamientos: 0%, 25% y 50% de defoliación. Las líneas de las barras indican el error estándar.

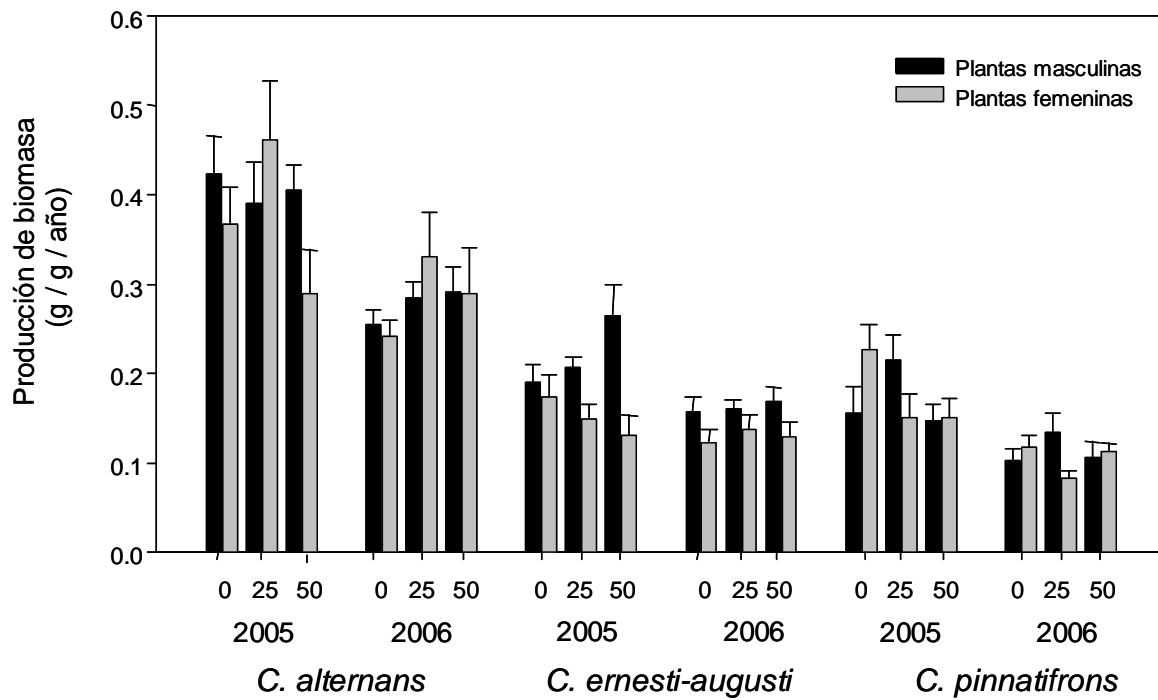


Figura 9. Tasa de producción de biomasa en el año 2005 y 2006, en plantas masculinas y femeninas de tres especies de *Chamaedorea*, aplicando tres tratamientos: 0%, 25% y 50% de defoliación. Las líneas de las barras indican el error estándar.

Tabla 5. Tabla de contrastes o comparaciones a priori que resultaron significativas entre los tres tratamientos de defoliación para la producción de biomasa.

Variable	Contraste	Comparación	F	g.l.
Dentro de sujetos				
Producción de biomasa	Tiempo × especie	<i>C. alternans</i> vs. <i>C. ernesti-augusti</i>	13**	1, 164
		<i>C. alternans</i> vs. <i>C. pinnatifrons</i>	4.08*	1, 164
	Tiempo × tratamiento	Defoliación 0% vs. defoliación 50%	5.75*	1, 164
	Tiempo × sexo × tratamiento	Femenina 0% vs. femenina 50%	14.82**	1, 164
		Femenina 50% vs. masculina 50%	11.56**	1, 164
		Femenina 50% vs. masculina 25%	10.95*	1, 164
		Femenina 50% vs. masculina 0%	8.81*	1, 164
		Femenina 25% y Femenina 50% vs. Femenina 0%	8.68*	1, 164
		Femenina 25% y Femenina 50% vs. masculina 25% masculina 50%	8.83*	1, 164
Entre sujetos				
Producción de biomasa	Especie	<i>C. alternans</i> vs. <i>C. ernesti-augusti</i>	113.7***	1, 164
		<i>C. alternans</i> vs. <i>C. pinnatifrons</i>	181.16***	1, 164
		<i>C. pinnatifrons</i> vs. <i>C. ernesti-augusti</i>	6.55*	1, 164
Producción de biomasa	Especie × sexo × tratamiento	<i>C. pinnatifrons</i> femenina 0% vs. <i>C. pinnatifrons</i> femenina 25%	5.29*	1, 164
		<i>C. pinnatifrons</i> femenina 0% vs. <i>C. pinnatifrons</i> femenina 25 y 50%	5.30*	1, 164

DISCUSIÓN

La defoliación repercutió negativamente en la formación de estructuras reproductivas y crecimiento de las plantas. El peso y la longitud de las inflorescencias masculinas disminuyeron en plantas con 25 y 50% de defoliación. La proporción de frutos cuajados disminuyó con 25% de defoliación. La producción de biomasa se redujo en el primer año en las plantas femeninas con 50% de defoliación, y en global para las plantas femeninas de *C. pinnatifrons* con 25 y 50% de defoliación.

Los estudios de defoliación que se han realizado en diversos sistemas muestran que la disminución del área foliar afecta negativamente la producción de estructuras reproductivas. Lo anterior ha sido demostrado en *Vicia sativa* (Koptur *et al.*, 1996), *Piper arieianum* (Marquis, 1984), *Rhaphanus raphanistrum* (Strauss *et al.*, 1996; Lehtilä y Strauss, 1999) y *Erythroxylum havanense* (Domínguez y Dirzo, 1994), entre otras. Asimismo, se ha encontrado que la defoliación causa la reducción del tamaño y número de las flores (Elmqvist y Gardfjell, 1988; Strauss *et al.*, 1996; Lehtilä y Strauss, 1999), disminuye el número de frutos (Mendoza *et al.*, 1987; Marquis, 1992) y se incrementa el tiempo de maduración de los frutos (Domínguez y Dirzo, 1994). En este estudio se encontró que el daño foliar reduce el peso y la longitud de la inflorescencia masculina. En plantas femeninas la pérdida de área foliar al 25% reduce la proporción de frutos cuajados. Estos resultados coinciden con lo ya reportado por los trabajos arriba mencionados. No obstante, un estudio de defoliación se realizó previamente en *C. alternans* (Oyama y Mendoza, 1990). Los autores contaron el número de inflorescencias que forman infrutescencias, y encontraron que las plantas con defoliación reducen el número de inflorescencias que forman infrutescencias en comparación con las plantas control. Aunque los autores no consideraron el número de frutos cuajados, el resultado que obtuvieron es

semejante o equivalente a una disminución del número de frutos cuajados y coincide con lo que aquí se reporta. Oyama y Mendoza (1990) también cuantificaron la producción de frutos y encontraron un aumento del número de frutos en el primer año de defoliación, no obstante que no se conoce el número inicial de flores. A diferencia del estudio realizado por Oyama y Mendoza, en este estudio se midió el número de frutos cuajados, que nos podría reflejar en mayor medida los efectos negativos de la pérdida foliar, por ejemplo, el aborto de los frutos.

La longitud de las inflorescencias producidas en el año 2005 fué significativamente mayor en las plantas sin defoliación. No obstante, el análisis en el tiempo indica que la longitud de las inflorescencias en las plantas sin defoliación se redujo entre el año 2005 al año 2006, con respecto a las plantas que tuvieron daño foliar. Este resultado podría sugerir que las plantas con defoliación tuvieron un mejor desempeño en el tiempo. Sin embargo, las diferencias entre tratamientos del año 2005, posiblemente explican estas diferencias en el tiempo. Asimismo, las plantas femeninas con 50% de defoliación tuvieron una reducción significativa en su crecimiento en el año 2005 con respecto a los otros tratamientos. Esta diferencia se reflejó en las comparaciones en el tiempo, las plantas femeninas con 50% de defoliación mostraron una menor disminución de la producción de biomasa en el tiempo con respecto a los otros tratamientos.

Es interesante resaltar la disminución en la longitud, peso de las inflorescencias y crecimiento vegetativo hacia el segundo año de estudio en todos los tratamientos, es posible que el efecto prolongado del insecticida tuviera un efecto negativo no solo en la producción de estructuras reproductivas, también en el crecimiento vegetativo. No obstante, los resultados a nivel general señalan un efecto negativo de la herbivoría en la producción de

estructuras reproductivas tanto femeninas como masculinas. El crecimiento vegetativo fué afectado principalmente en las plantas femeninas.

Los estudios que han comparado el desempeño de plantas masculinas y femeninas en condiciones experimentales de defoliación han mostrado que existe variación entre los sexos. En *Silene dioica*, las plantas femeninas tuvieron una mejor capacidad de regenerar el tejido dañado, aunque en ambos sexos se reduce el número de ramets (Elmqvist y Gardfjell, 1988). La defoliación de los retoños de la especie *Carex picta* causa que sólo las plantas masculinas reduzcan su crecimiento. *Carex picta* es una planta particularmente distinta a otras plantas dioicas, las plantas femeninas invierten pocos recursos a la reproducción y los autores del estudio argumentan que posiblemente esta sea la razón por la que la defoliación afecta sólo a las plantas masculinas. En cambio, en la especie *Salix sachalinensis* la remoción de las yemas vegetativas causó la reducción en el diámetro de los brotes. La reducción fué mayor en las plantas femeninas que masculinas (Ueno *et al.*, 2006). A diferencia de lo que sucede en la especie *Carex picta*, las plantas femeninas de *Salix sachalinensis* invierten una mayor cantidad de recursos a la reproducción con respecto a las plantas masculinas.

La asignación de recursos a la reproducción en las plantas femeninas de las tres especies de este estudio es significativamente mayor que en las plantas masculinas. Consecuentemente, la cantidad de recursos que las plantas femeninas tienen para crecer esta limitada por la inversión hacia la producción y maduración de los frutos. Posiblemente, estos conflictos de asignación de recursos causaron la disminución de la producción de biomasa en las plantas femeninas con defoliación.

La asignación de recursos al crecimiento en las plantas masculinas aparentemente no resultó afectada, pues tanto en condiciones naturales (Cepeda-Cornejo y Dirzo, 2010)

como en los tratamientos de defoliación, estas plantas mantuvieron una tasa de producción foliar elevada con respecto a las plantas femeninas.

La producción de biomasa es un aspecto que tampoco había sido estudiado por Oyama y Mendoza. En el presente estudio no detectamos un cambio en altura o producción en el número de hojas, sin embargo, si detectamos un efecto de la defoliación en la producción de biomasa, por lo tanto esta podría ser una variable importante. Las plantas femeninas de la especie con menor tasa de producción de biomasa, *C. pinnatifrons*, tuvieron una disminución significativa en la producción de biomasa bajo condiciones de defoliación.

Los datos de este estudio muestran una disminución del crecimiento en plantas femeninas con 50% de defoliación. Este resultado no fue consistente con lo que se ha reportado para *C. tepejilote* (*C. alternans*) por Oyama y Mendoza (1990). Sin embargo, los efectos negativos de la herbivoría sobre el crecimiento han sido documentados en otros estudios. En la palma *Astrocarium mexicanum* la defoliación experimental reduce el número de hojas (Mendoza *et al.*, 1987). En *Erythroxylum havanense* hay reducción del área basal (Domínguez y Dirzo, 1994) y en *Piper arieianum* la altura de la planta disminuye (Marquis, 1984).

El crecimiento compensatorio ha sido revisado en *Chamaedorea elegans*. El análisis de crecimiento revela que las plantas defoliadas asignan considerablemente más biomasa a la producción de lámina foliar que las plantas control, y esta asignación la realizan a expensas de la asignación a otros órganos, particularmente a estructuras reproductivas (Anten *et al.*, 2003). Particularmente, en este estudio posiblemente la reducción el tamaño de las estructuras reproductivas en las plantas masculinas y la disminución del número de

frutos cuajados en las plantas femeninas sea una consecuencia de la re-asignación de recursos hacia el crecimiento a expensas de la reproducción.

Los resultados obtenidos sugieren que la defensa del tejido foliar podría ser un aspecto fundamental en el éxito reproductivo de las plantas femeninas. La tasa de crecimiento y la regeneración de las plantas femeninas es comparativamente baja con respecto a las plantas masculinas, y los datos muestran que la pérdida de tejido foliar resulta en una disminución en la producción de frutos y con ello podía verse disminuida la adecuación. De esta forma, podemos explicar que la estrategia de las plantas femeninas es de asignar una mayor cantidad de recursos a la elaboración de compuestos secundarios con respecto a las plantas masculinas. Por el contrario, la estrategia de las plantas masculinas es producir un mayor número de hojas (Cepeda-Cornejo y Dirzo, 2010). Ambas estrategias podrían contribuir al éxito reproductivo de estas especies. También se puede concluir que el gasto reproductivo está determinando muchos aspectos de la estrategia de historia de vida de los dos sexos.

LITERATURA CITADA

- Anten, N.P.R., Martínez-Ramos, M., y Ackerly, D.D. (2003) Defoliation and growth in an understory palm: quantifying the contributions of compensatory responses. *Ecology*, 84(11), 2905-2918.
- Bullock, S.H. (1984) Biomass and nutrient allocation in a Neotropical dioecious palm. *Oecologia*, 63(3), 426-428.
- Cepeda-Cornejo, V., y Dirzo, R. (2010) Sex-related differences in reproductive allocation, growth, defense and herbivory in three dioecious neotropical palms. *PLoS ONE*, 5(3), e9824.
- Delph, L.F., Lu, Y., y Jayne, L.D. (1993) Patterns of resource-allocation in a dioecious *Carex* (Cyperaceae). *American Journal of Botany*, 80(6), 607-615.
- Dirzo, R., y Harper, J.L. (1982) Experimental studies on slug-plant interactions. III. Differences in the acceptability of individual plants of *Trifolium repens* to slugs and snails. *Journal of Ecology*, 70, 101-118.
- Domínguez, C.A., y Dirzo, R. (1994) Effects of defoliation on *Erythroxylum havanense*, a tropical proleptic species. *Ecology*, 75(7), 1896-1902.
- Dudley, L.S. (2006) Ecological correlates of secondary sexual dimorphism in *Salix glauca* (Salicaceae). *American Journal of Botany*, 93(12), 1775-1783.
- Elmqvist, T., Cates, R.G., Harper, J.K., y Gardfjell, H. (1991) Flowering in males and females of a Utah willow, *Salix-rigida* and effects on growth, tannins, phenolic glycosides and sugars. *Oikos*, 61(1), 65-72.
- Elmqvist, T., y Gardfjell, H. (1988) Differences in response to defoliation between males and females of *Silene dioica*. *Oecologia*, 77, 225-230.
- González-Soriano, E., Dirzo, R., y Vogt, R. (1997) Historia natural de Los Tuxtlas. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 647 pp.
- Hunt, R. (1982) Concepts in plant growth analysis. *Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis*. London: Edward Arnold, 14-46 pp.
- Jing, S.W., y Coley, P.D. (1990) Dioecy and herbivory: the effect of growth rate on plant defense in *Acer-negundo*. *Oikos*, 58(3), 369-377.
- Koptur, S., Smith, C.L., y Lawton, J.H. (1996) Effects of artificial defoliation on reproductive allocation in the common vetch, *Vicia sativa* (Fabaceae: Papilionoideae). *American Journal of Botany*, 83(7), 886-889.
- Lehtilä, K., y Strauss, S.Y. (1999) Effects of foliar herbivory on males and female reproductive traits of wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Ecology*, 80(1), 116-124.
- Louda, S.M. (1982a) Distribution ecology: variation in plant recruitment over a gradient in relation to insect seed predation. *Ecological Monographs*, 52(1), 25-41.
- Louda, S.M. (1982b) Limitation of the recruitment of the shrub *Haplopappus squarrosus* (Asteraceae) by flower- and seed-feeding insects. *Journal of Ecology*, 70, 43-53.
- Marquis, R.J. (1984) Leaf herbivores decrease fitness of a tropical plant. *Science*, 226, 537-539.
- Marquis, R.J. (1992) Selective impact of herbivores. En *Plant resistance to herbivores and pathogens. Ecology, evolution, and genetics*, Chicago, U.S.A: The University of Chicago Press, pp. 301-325.

- Mendoza, A., Piñero, D., y Sarukhán, J. (1987) Effects of experimental defoliation on growth, reproduction and survival of *Astrocaryum mexicanum*. *Journal of Ecology*, 75, 545-554.
- Miranda, F., y Hernández-X, E. (1963) Los tipos de vegetación de México y su clasificación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 28, 29-178.
- Obeso, J.R. (1997) Costs of reproduction in *Ilex aquifolium*: Effects at tree, branch and leaf levels. *Journal of Ecology*, 85(2), 159-166.
- Obeso, J.R., y Retuerto, R. (2002) Sexual dimorphism in holly *Ilex aquifolium*: cost of reproduction, sexual selection or physiological differentiation? *Revista Chilena de Historia Natural*, 75, 67-77.
- Oyama, K., y Dirzo, R. (1988) Biomass allocation in the dioecious tropical palm *Chamaedorea tepejilote* and its life history consequences. *Plant Species Biology*, 3, 27-33.
- Oyama, K., y Mendoza, A. (1990) Effects of defoliation on growth, reproduction, and survival of a neotropical dioecious palm, *Chamaedorea tepejilote*. *Biotropica*, 22(2), 119-123.
- Popp, J.W., y Reinartz, J.A. (1988) Sexual dimorphism in biomass allocation and clonal growth of *Xanthoxylum americanum*. *American Journal of Botany*, 75(11), 1732-1741.
- Rocheleau, A.F., y Houle, G. (2001) Different cost of reproduction for the males and females of the rare dioecious shrub *Corema conradii* (Empetraceae). *American Journal of Botany*, 88(4), 659-666.
- Strauss, S.Y., Conner, J.K., y Rush, S.L. (1996) Foliar herbivory affects floral characters and plant attractiveness to pollinators: implications for male and female plant fitness. *The American Naturalist*, 147(6), 1098-1107.
- Turcotte, J., y Houle, G. (2001) Reproductive costs in *Salix planifolia* ssp *planifolia* in Subarctic Quebec, Canada. *Ecoscience*, 8(4), 506-512.
- Ueno, N., Kanno, H., y Seiwa, K. (2006) Sexual differences in shoot and leaf dynamics in the dioecious tree *Salix sachalinensis*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 84(12), 1852-1859.

Capítulo 4

**Crecimiento, defensa y herbivoría en
plantas pre-reproductivas de tres especies
simpátricas dioicas del género
*Chamaedorea***

Crecimiento, defensa y herbivoría en plantas pre-reproductivas de tres especies simpátricas dioicas del género *Chamaedorea*

La asignación de recursos al crecimiento y la defensa; así como la herbivoría de las plantas pre-reproductivas ha sido poco explorada. La carencia de un método para identificar el género en especies perennes en estadio anterior a la reproducción ha dificultado este tipo de estudios. En este trabajo analizamos la distribución de frecuencias del crecimiento, defensa y herbivoría de una muestra de 100 plantas en estado pre-reproductivo de tres especies dioicas y simpátricas del género *Chamaedorea*. Los datos muestran una distribución unimodal del incremento en altura, incremento en biomasa, concentración de compuestos secundarios y herbivoría puntual de las tres especies estudiadas. La tasa de herbivoría en *C. alternans* se comportó de forma multimodal. Los resultados sugieren que los conflictos de asignación al crecimiento y defensa, así como sus implicaciones en la herbivoría, que se manifiestan en las plantas adultas, muy posiblemente no ocurren en plantas que aún no inician la reproducción.

INTRODUCCIÓN

Las especies de plantas dioicas se caracterizan por tener individuos que únicamente producen flores estaminadas o masculinas en unas plantas, y flores pistiladas o femeninas en otras. Las plantas femeninas asignan energía para la producción de flores y maduración de los frutos, e invierten proporcionalmente una mayor cantidad de recursos en términos de biomasa y nutrientes a la reproducción (Bullock, 1984; Oyama y Dirzo, 1988; Popp y Reinartz, 1988; Rocheleau y Houle, 2001; Turcotte y Houle, 2001; Obeso y Retuerto, 2002;

Ueno *et al.*, 2006). La separación de las estructuras reproductivas masculinas y femeninas en plantas independientes tiene costos y consecuencias en los patrones de asignación de recursos a la reproducción (Lloyd y Webb, 1977), mantenimiento y crecimiento (capítulos 1 y 2).

Los costos de la reproducción han sido medidos en términos de una reducción del crecimiento, supervivencia y reproducción futura (Obeso y Retuerto, 2002). Es esperable que las plantas femeninas de especies dioicas incurran en un mayor costo en la reproducción y reduzcan su crecimiento, con relación a las plantas masculinas. Algunas especies dioicas han mostrado evidencias de este conflicto: las plantas femeninas tienen un menor crecimiento en comparación con las plantas masculinas (Boecklen *et al.*, 1990; Jing y Coley, 1990; Krischik y Denno, 1990; Obeso, 1997; Palomino, 2002; Montesinos *et al.*, 2006).

Además del conflicto reproducción-crecimiento, otro más podría presentarse: la reducción en el crecimiento está acompañada por una reducción en la tasa de producción foliar y es esperable que para evitar la pérdida de tejido foliar, las hojas de las plantas femeninas estén mejor defendidas contra los herbívoros, particularmente por compuestos basados en carbono (Jing y Coley, 1990). Las plantas femeninas tienen una tasa de producción foliar más baja. Esto, particularmente, ha sido comprobado en tres especies simpátricas del género *Chamaedorea* (Oyama, 1990; Cepeda-Cornejo y Dirzo, 2010). Específicamente, las plantas femeninas de las tres especies de palmas del género *Chamaedorea* tienen una tasa de producción foliar más baja que la que presentan las plantas masculinas. Además, la concentración de compuestos secundarios (fenoles totales) es mayor en las plantas femeninas que en plantas masculinas y como consecuencia, la tasa

de acumulación de daño por herbivoría es más alta en las plantas masculinas (Cepeda-Cornejo y Dirzo, 2010).

Los conflictos de asignación de recursos en plantas dioicas hasta ahora han sido ampliamente documentados en organismos adultos reproductivos. Sin embargo, han sido poco explorados en plantas juveniles o que, siendo adultas, no han comenzado la reproducción. Es concebible que los conflictos de asignación de recursos comiencen después del momento en que inicia la reproducción, o bien que estos conflictos se manifiesten antes de iniciarse la reproducción. Esta dicotomía podría resolverse bajo el siguiente raciocinio. La tasa de crecimiento, las concentraciones de metabolitos secundarios y consecuentemente la herbivoría podrían diferir entre sexos en este estadio. Las diferencias podrían ser en la misma dirección que ocurren en las plantas adultas o bien en un sentido distinto. La inversión de recursos a la reproducción es con frecuencia mayor en las plantas femeninas con respecto a las plantas masculinas, y existe la posibilidad de que las plantas femeninas capturen recursos y crezcan a una tasa superior a la de las plantas masculinas en la etapa anterior a la reproducción. De esta forma, al llegar el momento de la reproducción, las plantas femeninas podrían tener suficientes recursos almacenados para destinar a la formación de frutos y semillas. En tal caso, la tasa de crecimiento podría diferir entre plantas masculinas y femeninas en la etapa pre-reproductiva. La estrategia de historia de vida podría cambiar con la ontogenia, o bien, podría mantenerse constante durante toda la vida de estas plantas. Por esta razón resulta interesante explorar el patrón de crecimiento, defensa y herbivoría en la etapa anterior a la reproducción. La unimodalidad en la distribución de las variables asociadas al crecimiento, defensa y herbivoría podría indicar que los conflictos de asignación inician después de la reproducción, en tanto que un

comportamiento bimodal o multimodal podría sugerir que los conflictos inician antes de la primera reproducción.

Las plantas masculinas y femeninas en estadio juvenil son morfológicamente iguales y no es fácil o factible identificar el género. Algunos estudios en plantas dioicas que incluyen a la plantas pre-reproductivas, son estudios sobre la estructura poblacional y edad (García y Antor, 1995), o bien contrastan los patrones de asignación al crecimiento entre plantas juveniles y pre-reproductivas con relación a las plantas adultas (Ataroff y Schwarzkopf, 1992; Ataroff y Schwarzkopf, 1994; Onate y Munne-Bosch, 2009). En ambos casos no hay un conocimiento del género de las plantas pre-reproductivas.

Los dos estudios reportados en la literatura que comparan los patrones de asignación al crecimiento o defensa en plantas dioicas en estado pre-reproductivo se ha realizado con esquejes o podando las yemas reproductivas (Ahman, 1997; Nicotra, 1999). Nicotra (1999), comparó los patrones de asignación al crecimiento en fase pre-reproductiva, entre plantas masculinas y femeninas de *Siparuna grandiflora*. Las plantas pre-reproductivas masculinas y femeninas fueron obtenidas de esquejes o cortes de plantas adultas masculinas y femeninas, respectivamente. Las plantas femeninas pre-reproductivas produjeron tallos más altos y un mayor número de hojas que las plantas masculinas, bajo las mismas condiciones lumínicas. Además, las plantas masculinas producen hojas con mayor área foliar y aunque las hembras producen más hojas, no hay diferencias intersexuales en el área foliar total. Sin embargo, en plantas adultas no hubo diferencias en el crecimiento del tallo o la producción de hojas. En *Salix viminalis*, Ahman (1997) estimó la defensa de las plantas y comparó las tasas de ataque por hongos entre plantas masculinas y femeninas no-reproductivas. Las plantas no-reproductivas fueron obtenidas al retirar las yemas reproductivas (identificando el género por las estructuras florales). El ataque por hongos (*Melampsora*) fue más severo

en plantas femeninas que en masculinas cuando las plantas están en un estado no-reproductivo, y no hubo diferencias entre géneros en estado adulto. El incremento en biomasa no muestra diferencias entre sexos en plantas no-reproductivas. Prácticamente no hay estudios que aborden la asignación de recursos en plantas de corta edad que no han iniciado la formación de estructuras reproductivas. Ello plantea la problemática de contar con un método para conocer el género de las plantas que no han iniciado la reproducción. Hasta ahora, la identificación del género en plantas dioicas depende de la producción de estructuras reproductivas o bien de la utilización de algún método diseñado para ello, como la detección de cromosomas sexuales (Ciupercescu *et al.*, 1990; Navajas-Pérez *et al.*, 2005), la utilización de marcadores moleculares (Khadka *et al.*, 2002; Jamsari *et al.*, 2004; Eppley *et al.*, 2009), diferencias en el contenido de ADN (Costich *et al.*, 1991) o diferencias en la actividad enzimática (Meagher, 1988).

Los conflictos de asignación de las plantas juveniles o pre-reproductivas son prácticamente imposibles de explorar sin un método que nos permita conocer el género de estas plantas antes de que comience la reproducción. Una alternativa que aquí se propone, es realizar un análisis de la distribución de frecuencias de las variables en cuestión, en una muestra grande de plantas de la misma población para detectar la posible existencia de clases modales indicativas de variación intersexual. La predicción es que las diferencias en crecimiento, defensa y herbivoría se manifiestan a partir del inicio de la reproducción y estas diferencias intersexuales no se manifiestan en plantas juveniles o pre-reproductivas. No obstante, es factible que las diferencias intersexuales se manifiesten desde los primeros estadios en la dirección de las plantas adultas y que la reproducción no sea el factor que determine los patrones de asignación de recursos al crecimiento y la defensa. La distribución de frecuencias se representa frecuentemente en la forma de un histograma y se

utiliza para describir el comportamiento de un conjunto de datos. Su elaboración requiere del cálculo de la amplitud de banda o ancho de intervalo. La amplitud de banda determina el número de intervalos. Al utilizar pocos intervalos se eliminan detalles de la distribución mientras que numerosas clases resultan en estimaciones ruidosas (Salgado-Ugarte *et al.*, 2005).

La elección de la amplitud de banda es un aspecto relevante para analizar un conjunto de datos. La regla más famosa para determinar el número de intervalos para la estimación de densidad del histograma fue propuesta por Sturges (Sturges, 1926). La formulación de Sturges se ha vuelto una guía y a menudo es utilizada como valor pre-establecido en programas estadísticos, aún cuando en varios casos no es apropiada: esta regla no es aplicable a datos con distribución asimétrica, no Gaussiana o multimodal (Scott, 1992; Salgado-Ugarte, 2002).

Recientemente, los investigadores han desarrollado técnicas no paramétricas para el análisis de la distribución de los datos, como la estimación de la “densidad”. Entre otros, está el método de Silverman (Silverman, 1981). Este método combina la estimación de densidad por kernel (EDK) con un procedimiento de prueba jerárquico o muestreo repetitivo (bootstrap), siendo ambos métodos no paramétricos. Los estimadores de densidad por kernel (EDKs) resuelven el problema de discontinuidad de los histogramas, causado por las esquinas cuadradas de las barras que los conforman, produciendo figuras redondeadas en lugar de rectángulos (Salgado-Ugarte, 2002). Los análisis de datos biológico-pesqueros han empleado los EDKs con éxito, pues son de gran utilidad en el estudio de tallas de peces para estudiar su crecimiento. En estos casos, una cohorte puede estar definida por un componente o moda (Salgado-Ugarte *et al.*, 2005).

El comportamiento de las variables relacionadas al crecimiento, defensa y herbivoría de plantas pre-reproductivas no ha sido explorado de manera conjunta en el mismo sistema. La pregunta de este estudio es: ¿hay diferencias relacionadas al género en las tasas de crecimiento, asignación a metabolitos secundarios y herbivoría en plantas que no han iniciado la reproducción? Respondimos a esta pregunta determinando la multimodalidad, por la prueba de Silverman, del crecimiento, metabolitos secundarios y herbivoría en plantas pre-reproductivas de tres especies simpátricas del género *Chamaedorea*.

MÉTODOS

Especies y sitio de estudio

Tres especies de palmas dioicas y simpátricas del género *Chamaedorea*: *C. alternans*, *C. ernesti-augusti* y *C. pinnatifrons* fueron seleccionadas. Las tres especies presentan un gradiente de herbivoría en el sentido *C. alternans* > *C. pinnatifrons* > *C. ernesti-augusti* (Cepeda-Cornejo y Dirzo, 2010). *C. alternans* y *C. pinnatifrons* son especies consumidas por crisomélidos en fase larvaria y adulta (obs. pers.). El crecimiento, defensa y herbivoría ha sido previamente investigado en plantas adultas de *C. alternans* (Oyama, 1990; Oyama y Dirzo, 1991; Cepeda-Cornejo y Dirzo, 2010).

El estudio fue realizado en la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (18°34'–18°36' N, 95°04'–95°09' W, 150 m s.n.m.), que comprende una superficie total de 640 ha y está ubicada en la Sierra de Los Tuxtlas, en el estado de Veracruz, México. La precipitación y temperatura promedio anual son 4700 mm y 23.4°C, respectivamente (Soto y Gama, 1997) y la vegetación dominante es la selva alta perennifolia (González-Soriano *et al.*, 1997).

Selección de los organismos de estudio

Las plantas se seleccionaron en los alrededores de la Estación y al azar, fueron 100 plantas por especie en etapa juvenil y pre-reproductiva, ya establecidas. De acuerdo con Ataroff y Schwarzkopf (1992) las plantas de *Chamaedorea bartlingiana* son separadas en a) juveniles: desde la emergencia de la plántula, con una sola lámina bífida hasta la aparición de las hojas pinnadas con más de tres folíolos, b) pre-reproductivas: desde la aparición de la primera hoja pinnada hasta el desarrollo de la primera yema reproductiva, y c) adultas: desde el momento en que la yema axilar se desarrolla en yema reproductiva. Las plantas de *C. bartlingiana* permanecen siete años como juveniles y seis años en la etapa de pre-reproductivos. Las plantas seleccionadas en este estudio ya no eran plántulas, sino que tenían al menos de dos a tres hojas, y en *C. alternans* y *C. pinnatifrons* las hojas ya tenían, en su gran mayoría, divisiones en la lámina. En *C. ernesti-augusti* la lámina no se divide nunca por lo que no se puede diferenciar entre estadio juvenil y pre-reproductivo. Sin embargo, ninguna de las plantas había iniciado la primera reproducción por lo que el género de ellas era desconocido. Las plantas de cada especie se seleccionaron a lo largo de un transecto de aproximadamente 1 km de longitud y 20 m de ancho.

Marcaje de las plantas

Inicialmente, se marcó en cada una de las plantas, con pintura de esmalte, el metámero (cada uno de los segmentos que conforman el tallo) ubicado en la región más basal del tallo. El diámetro basal de la planta fue medido en este metámero. El metámero apical de más reciente formación, también fue marcado con pintura. Asimismo, se marcó el pecíolo de todas las hojas en pie. Las hojas nuevas fueron marcadas cada seis meses con un color diferente.

Crecimiento

Al inicio del estudio se registró: 1) el diámetro a la altura de la base sobre el metámero más basal, 2) el diámetro del tallo en la región apical, 3) la altura total del tallo (distancia comprendida entre la región más basal y la zona de separación de la yema foliar con la hoja de mas reciente formación, o en su defecto cuando la yema no está presente, es decir, la zona de separación entre la hoja de más reciente formación y la siguiente en la posición de la filotaxia; ésta incluye la zona de producción foliar), 4) la altura parcial del tallo (la distancia comprendida entre el metámero más basal y hasta el metámero de más reciente formación), y 5) el número y la longitud de cada una de las hojas.

Después de un año y un mes, se registró nuevamente cada una de estas cinco variables. A partir de estos datos y de acuerdo con el análisis de crecimiento de Hunt (1982), se calculó:

- a) la tasa de incremento en altura parcial del tallo (*IAP*) como: $IAP = (\ln AP_{final} - \ln AP_{inicial}) / t$, donde *AP* = altura parcial del tallo en cm y *t* = tiempo en años. b) la tasa de incremento en altura total del tallo (*IAT*) como: $IAT = (\ln A_{final} - \ln A_{inicial}) / t$, donde *A* = altura total del tallo en cm. c) la tasa de crecimiento relativa en biomasa del tallo (*CRT*) como: $(\ln BT_{final} - \ln BT_{inicial}) / t$, donde *BT* = biomasa del tallo en gramos (solo metámeros).
- d) la tasa de producción foliar (*TPF*) como: $TPF = \text{hojas producidas} / (\text{hojas iniciales} / t)$.
- e) producción de biomasa total (*PB*) como: $PB = \text{biomasa producida en tallo y hojas} / (\text{biomasa inicial} / t)$.

El incremento en altura parcial del tallo en este estudio, resulta debido a la formación de nuevos metámeros en la zona apical del tallo y ocurre por la aposición de

tejido en dicha zona. El incremento en altura total del tallo por su parte, incluye además del crecimiento de los metámeros, la zona de producción foliar.

Estimación de la biomasa por ecuaciones de regresión. La biomasa de las hojas y tallos fue estimada por ecuaciones de regresión. Se colectaron entre seis y ocho plantas pre-reproductivas por especie, separé las hojas y el tallo. La longitud y diámetro del tallo, así como la longitud de las hojas, fueron medidos en el material fresco. Posteriormente, las estructuras fueron secadas a 60°C hasta peso constante y pesamos cada una de las estructuras. A partir del peso seco y las mediciones de longitud y diámetro, obtuvimos ecuaciones de regresión (Tabla 1) para estimar la biomasa en peso seco de las plantas marcadas en campo.

Defensa (metabolitos secundarios)

La concentración de fenoles totales en el tejido foliar de trescientas plantas (100 por especie) fue determinada. Un fragmento de tejido foliar fue colectado a partir de la hoja extendida de más reciente formación. Cortar las hojas podría causar efectos negativos en el crecimiento de las plantas, por esta razón, las plantas que se seleccionaron para esta prueba fueron adicionales a las plantas previamente elegidas para estimar el crecimiento. El tejido foliar fue transportado en nitrógeno líquido hasta el laboratorio donde fue leofilizado a 4°C durante 20 h, para extraer el agua de los tejidos. El secado al vacío evita la oxidación de los fenoles que pudiera ocurrir con el secado a temperatura ambiente y en presencia de oxígeno (Gartlan *et al.*, 1980). Una fracción de tejido (0.5 g) fue macerado en nitrógeno líquido en un mortero. La extracción de los compuestos fenólicos fue hecha en 80% metanol-agua por 24 h a 4°C. El método modificado por Price-Butler, modificado por Graham fue empleado para evaluar la concentración de fenoles totales (Waterman y Mole, 1994). La reacción del

azul de Prusia fue medida a 700 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Varian Inc, Modelo Cary 50 Bio). La curva patrón fue obtenida a partir de ácido tánico.

Herbivoría

La herbivoría fue estimada mediante la magnitud instantánea de daño (censo puntual) y por la tasa de herbivoría.

Censo puntual. El daño instantáneo fue estimado en 100 plantas juveniles de cada una de las tres especies. Las plantas fueron seleccionadas al azar en septiembre de 2004 y son independientes, es decir adicionales, a las plantas juveniles elegidas para estimar el crecimiento. Estas plantas corresponden a las plantas empleadas para medir los metabolitos secundarios. Se registró la altura y número de hojas de cada planta. Colectamos al azar cuatro pinas de la segunda (*C. alternans*) y tercera hoja (*C. ernesti* y *C. pinnatifrons*) en la filotaxia de la planta. Las pinas fueron prensadas y secadas en una estufa a 60°C durante 48 h. Obtuvimos la imagen digital de cada pina y determinamos el área foliar dañada en porcentaje con el software WinDias ver. 2.0 (Delta-T Devices). La herbivoría foliar (*H*) se define como el porcentaje de área foliar dañada, y se calcula como: $H = (AFP - AFR / AFP) \times 100$, donde *AFP* = área foliar potencial o no dañada, y *AFR* = área foliar remanente.

Tasa de herbivoría. La tasa de herbivoría fue determinada en las plantas juveniles seleccionadas para medir el crecimiento. Seleccionamos cuatro pinas sin daño o con el menor daño posible de la primera hoja en la posición de la filotaxia. En *C. ernesti-augusti* fue necesario seleccionar las hojas uno y dos de la filotaxia. Delimitamos un área inicial en forma cuadrada o rectangular (de entre 2-10 cm × 2-10 cm, dependiendo del tamaño de la pinna), mediante cuatro puntos de tinta indeleble (uno en cada vértice) situados en el anverso de la hoja. El daño inicial fue estimado en septiembre de 2004 situando una retícula

transparente y punteada, con puntos equidistantes cada 2 mm. Para evitar extraer tejido foliar de la planta, tomé fotografías digitales (Canon PowerShot S500, 5.0 megapíxeles), después de 211 días (abril de 2005) y siempre anexando un escala en cm. En el laboratorio, estas imágenes fueron analizadas empleando el software WinDias versión 2.0 (Delta-T Devices) para estimar la tasa de herbivoría en porcentaje de área foliar por día.

Análisis estadísticos

Estimamos la densidad por kernel Gaussiano (EDK) del conjunto de datos correspondiente a cada una de las variables de crecimiento (incremento en altura parcial y total, tasa de crecimiento de biomasa relativa en tallo, producción de biomasa total y tasa de producción foliar), defensa (metabolitos secundarios) y herbivoría (censo puntual y tasa de herbivoría). La detección del número de modas se realizó con la prueba para multimodalidad no-paramétrica propuesta por Silverman (Silverman, 1981), y consistió en: 1) identificación de las bandas críticas compatibles con la hipótesis de un número de modas dado, 2) obtención de muestras “bootstrap” suavizadas para cada amplitud crítica de banda (último valor compatible con cierto número de modas), 3) estimación de las densidades correspondientes para cada muestra bootstrap y 4) cálculo de la probabilidad estadística (valor de P) para el número de modas como la fracción resultante de contar las estimaciones que muestran más modas que el número indicado por la banda crítica usada para dividir las entre el número total de repeticiones (muestras bootstrap) (Salgado-Ugarte *et al.*, 1997). Todos los análisis se realizaron con el software Stata (StataCorp vers. 9.1, Texas, EE.UU.). La prueba se considera significativa cuando el valor de probabilidad es mayor o igual a 0.4. Las figuras presentadas en los Resultados muestran la estimación de la densidad por kernel convertida a frecuencia.

La tasa de herbivoría de *C. pinnatifrons* presentó algunos datos que se encuentran fuera de los límites establecidos, llamados casos extraordinarios. Esto es, las observaciones más allá de 1.5 veces la dispersión del cuarto superior e inferior se consideran como casos extraordinarios moderados; aquellas situadas más allá de 3 veces la dispersión del cuarto superior e inferior son casos extraordinarios acentuados (Salgado-Ugarte, 2011). Fue necesario eliminar estos casos, debido a que después de ocho modas el valor de probabilidad de la prueba de Silverman no alcanzó el 0.4. No obstante, en el gráfico se muestran todos los datos. De forma similar, la distribución de los datos de herbivoría puntual de *C. ernesti-augusti*, presentaron un caso extraordinario, la prueba se realizó con todos los datos y sin el dato extraordinario.

Los datos de la tasa de producción foliar no pudieron analizarse por la prueba de multimodalidad de Silverman, pues son datos muy discretizados, básicamente el número de modas (8) fue igual al número de cifras que se repetían en la muestra (8).

En aquellos casos en que la prueba de multimodalidad reveló la presencia de más de una moda se aplicó el método de Battacharya (Salgado-Ugarte *et al.*, 1994; Salgado-Ugarte *et al.*, 2005) para conocer el tamaño de cada componente. El método de Battacharya está diseñado para estimar componentes Gaussianos bien separados en distribuciones mezcladas (Salgado-Ugarte *et al.*, 2005).

RESULTADOS

Crecimiento

La prueba de multimodalidad de Silverman resultó en una distribución unimodal de la tasa de incremento en altura parcial del tallo (*IAP*) en *C. ernesti-augusti* y *C. pinnatifrons*

(Figura 1, Tabla 2). La prueba fue significativa para una distribución con dos modas en *C. alternans*; sin embargo, el procedimiento de Battacharya muestra que un gran porcentaje (97%) de los datos se ubican en el primer componente o moda y el restante 3% corresponde a la segunda moda (3 de 100 plantas). Un análisis exploratorio de los datos revela la presencia de tres datos extraordinarios (datos que están a más de 1.5 veces la desviación del cuarto superior). Con la eliminación de estos valores se obtiene una distribución unimodal significativa. Los valores promedio se muestran en la Tabla 4.

La tasa de incremento en altura total (*IAT*) del tallo mostró una distribución de la densidad por kernel significativamente unimodal en *C. alternans* y *C. pinnatifrons*. En *C. ernesti-augusti* la distribución fue trimodal. El método de Bhattacharya (Salgado-Ugarte et al. 1994) para caracterizar los componentes Gaussianos, indica que el tamaño del componente 1 (la moda situada a la izquierda en la Figura 2, Tabla 2) corresponde al 16% de los datos (15 de 93 plantas), el componente de mayor densidad contiene al 84% de los datos (77 de 93) y el último componente, situado al extremo derecho, contiene al 1% de los datos (1 de 93).

La tasa de crecimiento relativa en biomasa del tallo (*TCRT*) mostró tener una distribución de la densidad unimodal sólo en *C. pinnatifrons*. En cambio, la distribución fue bimodal en *C. alternans* y *C. ernesti-augusti* (Figura 3, Tabla 2). El método de Bhattacharya muestra que la moda con menor densidad contiene a 9% de las plantas (9 de 100) en *C. alternans*, y 16.1% de las plantas (15 de 93) en *C. ernesti-augusti*.

La producción de biomasa total (*PB*) que corresponde a la biomasa producida en tallo y el total de las hojas producidas en el intervalo de tiempo que comprendió el estudio, mostró una distribución unimodal en las tres especies (Figura 4, Tabla 2).

Metabolitos secundarios

El estimador de densidad por kernel de la concentración de fenoles totales en las tres especies de estudio resultó en una distribución unimodal (Figura 5, Tabla 3).

Herbivoría

La estimación de la densidad del porcentaje de área foliar consumida, medida en un censo puntual (tasa instantánea) tiene una distribución unimodal en *C. alternans* y *C. pinnatifrons* (Figura 6, Tabla 3). El grueso de los datos de *C. ernesti-augusti* mostró una distribución de cinco modas. El gráfico muestra que un gran porcentaje de los datos corresponde a un componente. Un dato extraordinario tenía más de 1.5 veces la dispersión del cuarto superior (dato extraordinario), la prueba de Silverman se ejecutó nuevamente sin este único dato con lo que la distribución resultante fue unimodal.

La tasa de herbivoría refleja mayor variación en la distribución de los datos. La prueba de multimodalidad de Silverman revela la existencia de cuatro modas en la distribución de densidad de la acumulación de daño de *C. alternans*. La prueba de Battacharya indica que uno de los componentes contiene a la mayoría de los datos (Figura 7, Tabla 3).

Tabla 1. Modelos de regresión empleados para predecir la biomasa (gramos de peso seco) de las estructuras vegetativas. El peso de las hojas es explicado por un modelo de segundo grado de la forma: $Y = b_2 X^2 + b_1 X + b_0$, donde Y es la variable dependiente (peso seco en gramos) y X es la variable independiente (longitud de la hoja (cm)). El peso del tallo es explicado por un modelo lineal de la forma: $Y = b_1 X + b_0$, donde Y es la variable dependiente (peso seco en gramos) y X es la variable independiente (longitud (cm) × diámetro (mm)); b_0 , b_1 y b_2 son constantes en la ecuación. * $0.05 > P > 0.01$, *** $P < 0.0001$.

Especie	Estructura	b_0	b_1	$b_2 X^2$	g.l.	F	R^2
<i>C. alternans</i>	Hoja	-8.83846	0.20977	$0.00162 \times (X-75.8842)^2$	2, 35	592.2***	0.97
	Tallo (fragmentos grandes)	-0.33425	0.0482		1, 80	9503.9***	0.99
	Tallo (fragmentos chicos)	-0.03336	0.02847		1, 58	830.3***	0.93
<i>C. ernesti-augusti</i>	Hoja	-2.48394	0.16400	$0.00176 \times (X-29.8829)^2$	2, 38	184.2***	0.91
	Tallo (fragmentos grandes)	-0.3260	0.04202		1,51	1052.4***	0.95
	Tallo (fragmentos chicos)	-0.01784	0.01966		1, 10	9.66*	0.49
<i>C. pinnatifrons</i>	Hoja	-3.73923	0.13802	$0.00227 \times (X-46.2459)^2$	2, 34	87.4***	0.84
	Tallo (fragmentos grandes)	-0.60003	0.04187		1, 83	7751.8***	0.99
	Tallo (fragmentos chicos)	-0.02279	0.02531		1, 38	196.2***	0.84

Tabla 2. Amplitudes de banda crítica utilizados en los estimadores de densidad kernel de cuatro variables asociadas al crecimiento, en tres especies de *Chamaedorea*. Se indica el nivel de significancia obtenido en cada prueba (*P*). *IAP*: Tasa de incremento en altura parcial del tallo, *IAT*: Tasa de incremento en altura total del tallo, *CRT*: tasa de crecimiento relativa en biomasa del tallo y *PB* producción de biomasa total (tallo y hojas).

Especie	Variable	Ancho de banda crítica	Número de modas	<i>P</i>
<i>C. alternans</i>	IAP	0.0641	2	0.72
	IAT	0.0115	1	0.65
	CRT	0.081	2	0.40
	PB	0.028	1	0.89
<i>C. ernesti-augusti</i>	IAP	0.1119	1	0.74
	IAT	0.0134	3	0.47
	CRT	0.1437	2	0.59
	PB	0.0555	1	0.86
<i>C. pinnatifrons</i>	IAP	0.1161	1	0.72
	IAT	0.02	1	0.93
	CRT	0.1437	1	0.74
	PB	0.0236	1	0.60

Tabla 3. Amplitudes de banda crítica utilizados en los estimadores de densidad kernel de los datos de fenoles totales, herbivoría puntual y tasa de herbivoría en tres especies de *Chamaedorea*. Se indica el nivel de significancia obtenido en cada prueba (*P*).

Especie	Variable	Ancho de banda crítica	Número de modas	<i>P</i>
<i>C. alternans</i>	Fenoles totales	5.017	1	0.63
	Herbivoría puntual	5.92	1	0.83
	Tasa de herbivoría	1.242	4	0.46
<i>C. ernesti-augusti</i>	Fenoles totales	5.58	1	0.52
	Herbivoría puntual	4.471	1	0.51
<i>C. pinnatifrons</i>	Fenoles totales	4.495	1	0.86
	Herbivoría puntual	4.011	1	0.75
	Tasa de herbivoría	0.1321	1	0.65

Tabla 4. Valores promedio de todo el conjunto de datos de las variables que se estimaron para medir crecimiento, defensa (producción de fenoles totales) y herbivoría. Las unidades corresponden a las de las figuras. *IAP*: Tasa de incremento en altura parcial del tallo, *IAT*: Tasa de incremento en altura total del tallo, *CRT*: tasa de crecimiento relativa en biomasa del tallo y *PB* producción de biomasa total (tallos y hojas).

		Crecimiento ($\bar{x} \pm E.E.$)	Fenoles totales ($\bar{x} \pm E.E.$)	Herbivoría puntual ($\bar{x} \pm E.E.$)	Tasa de herbivoría ($\bar{x} \pm E.E.$)
<i>C. alternans</i>	IAP	0.30 ± 0.025	68 ± 1.68	29.59 ± 2.05	0.025 ± 0.003
	IAT	0.048 ± 0.003			
	CRT	0.29 ± 0.03			
	PB	0.18 ± 0.01			
<i>C. ernesti-augusti</i>	IAP	0.39 ± 0.04	44.43 ± 1.18	6.71 ± 1.12	
	IAT	0.08 ± 0.006			
	CRT	1.03 ± 0.06			
	PB	0.36 ± 0.02			
<i>C. pinnatifrons</i>	IAP	0.5 ± 0.05	58.79 ± 1.75	9.31 ± 1.14	0.0026 ± 0.0007
	IAT	0.08 ± 0.006			
	CRT	0.49 ± 0.05			
	PB	0.18 ± 0.008			

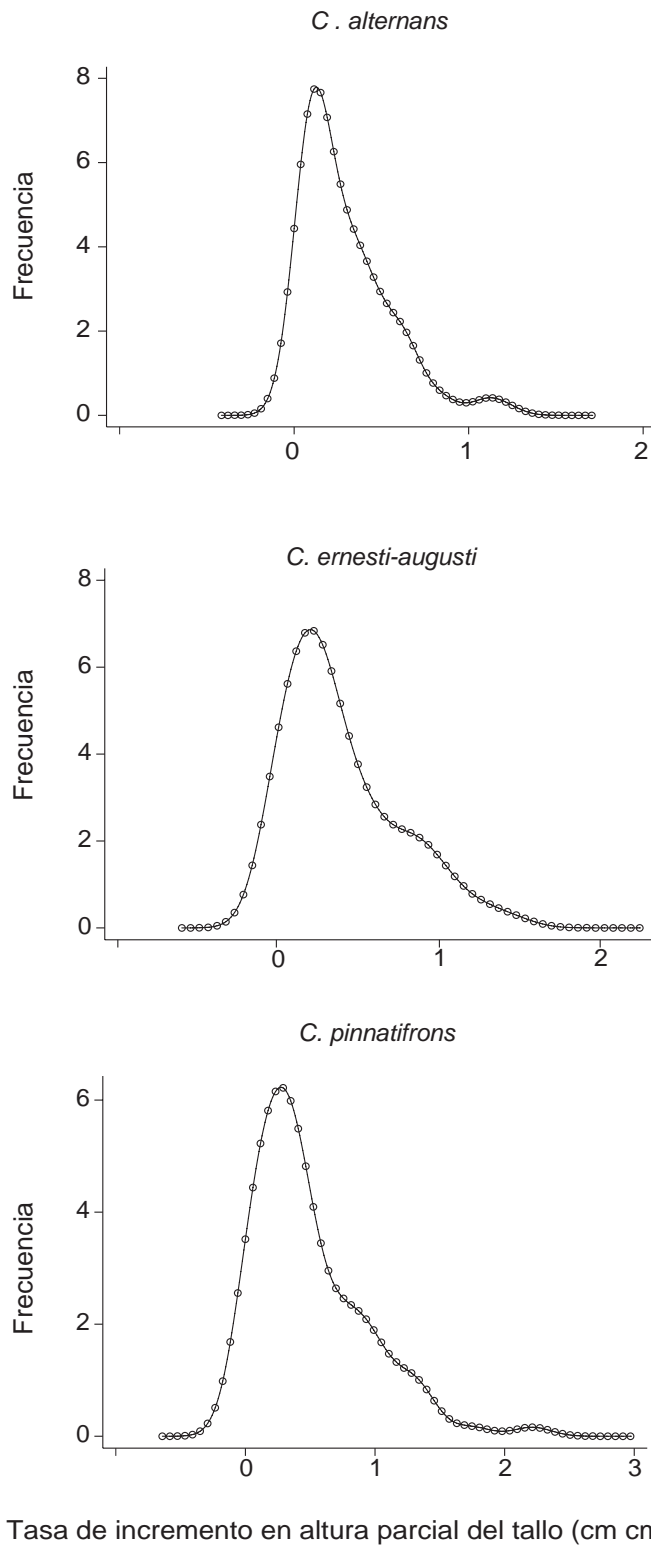


Figura 1. Estimación de densidad por kernel Gaussiano con la amplitud de banda indicada por la prueba de Silverman, para los datos de tasa de incremento en altura parcial del tallo de tres especies del género *Chamaedorea*. La frecuencia está suavizada.

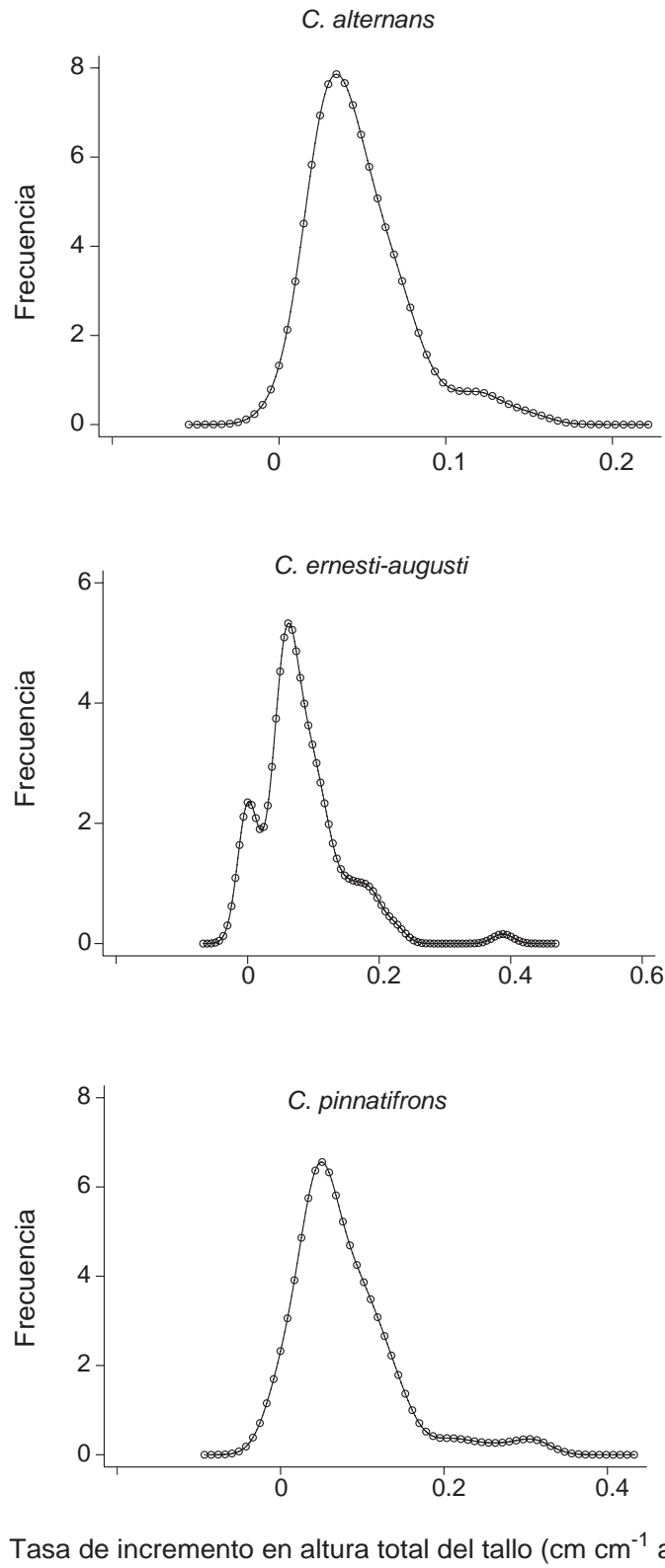


Figura 2. Estimación de densidad por kernel Gaussiano con la amplitud de banda indicada por la prueba de Silverman, para los datos de tasa de incremento en altura total del tallo de tres especies del género *Chamaedorea*. La frecuencia está suavizada.

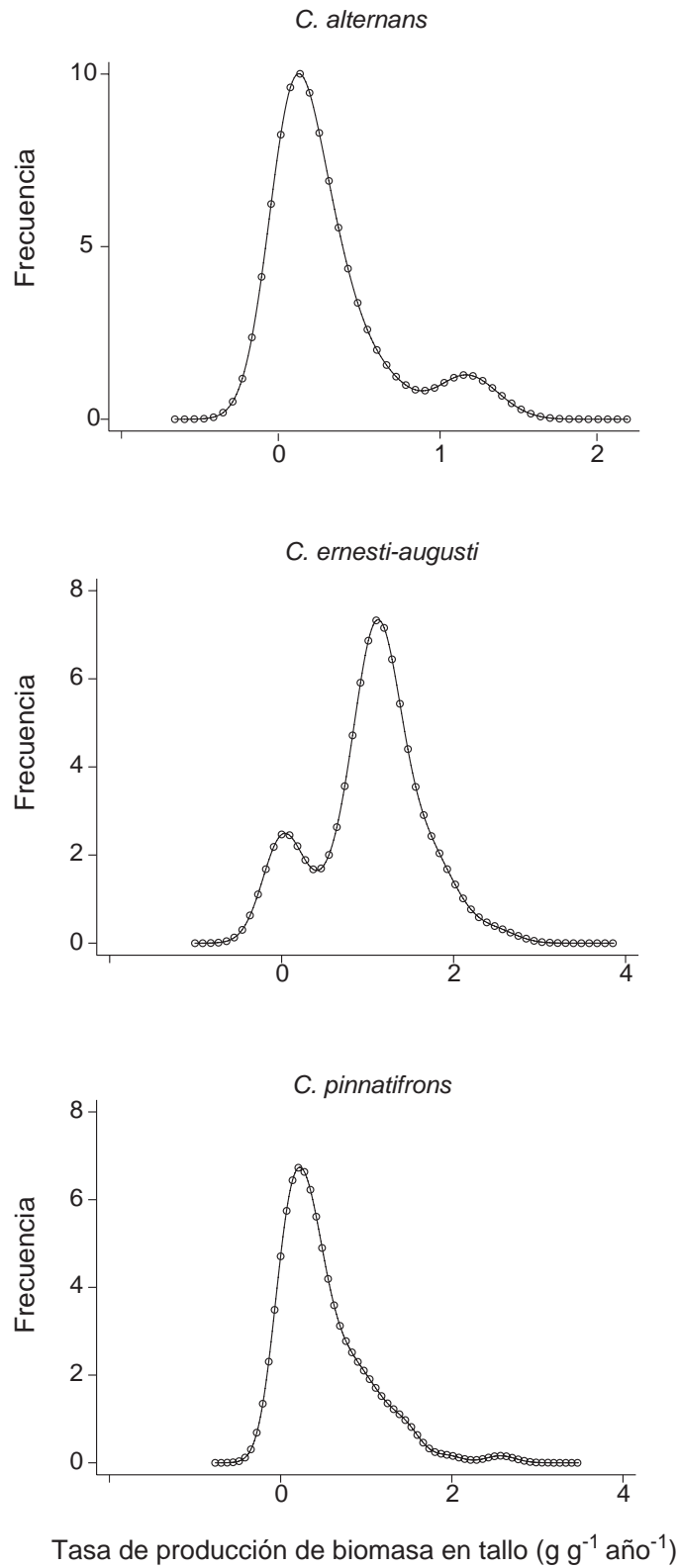


Figura 3. Estimación de densidad por kernel Gaussiano con la amplitud de banda indicada por la prueba de Silverman, para los datos de tasa de producción de biomasa en tallo de tres especies del género *Chamaedorea*. La frecuencia está suavizada.

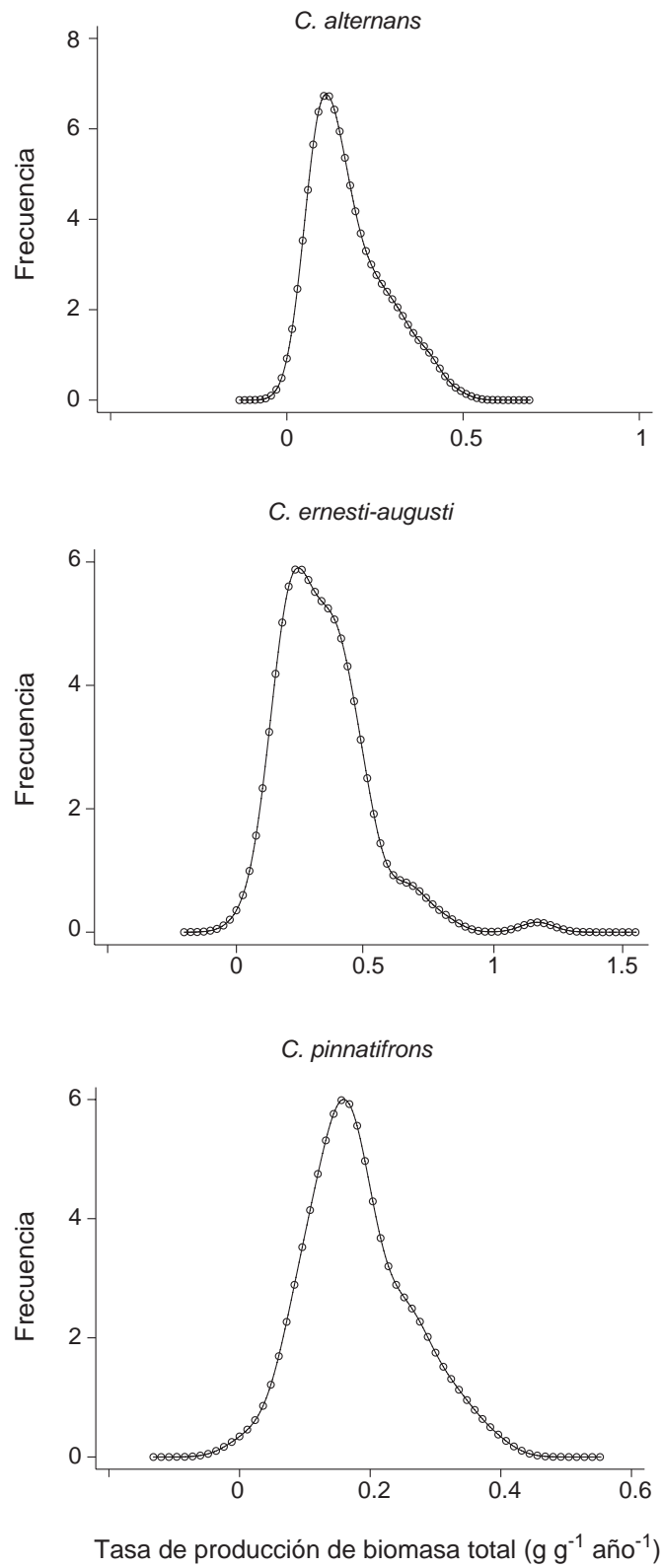


Figura 4. Estimación de densidad por kernel Gaussiano con la amplitud de banda indicada por la prueba de Silverman, para los datos de tasa de producción de biomasa total (tallo y hojas) de tres especies del género *Chamaedorea*. La frecuencia está suavizada.

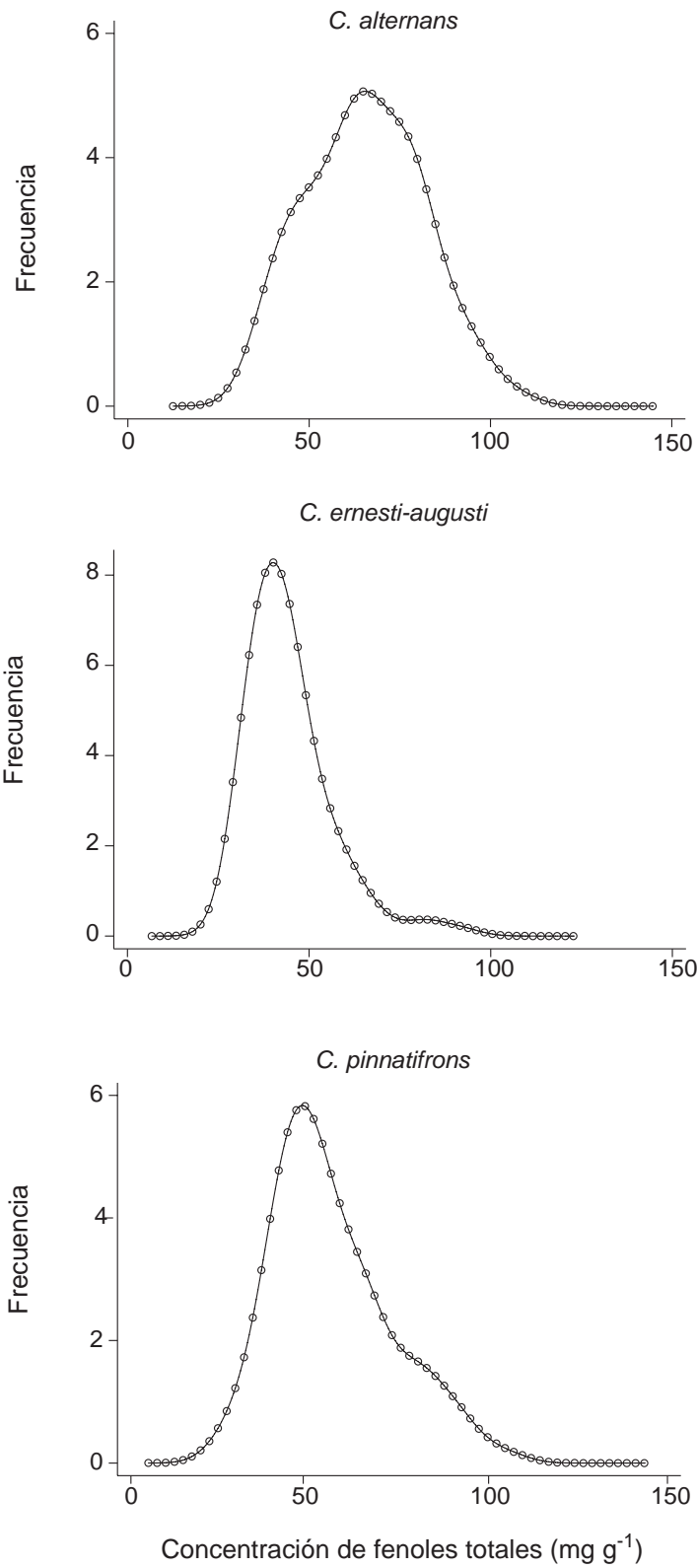


Figura 5. Estimación de densidad por kernel Gaussiano con la amplitud de banda indicada por la prueba de Silverman, para los datos de concentración de fenoles totales de tres especies del género *Chamaedorea*. La frecuencia está suavizada.

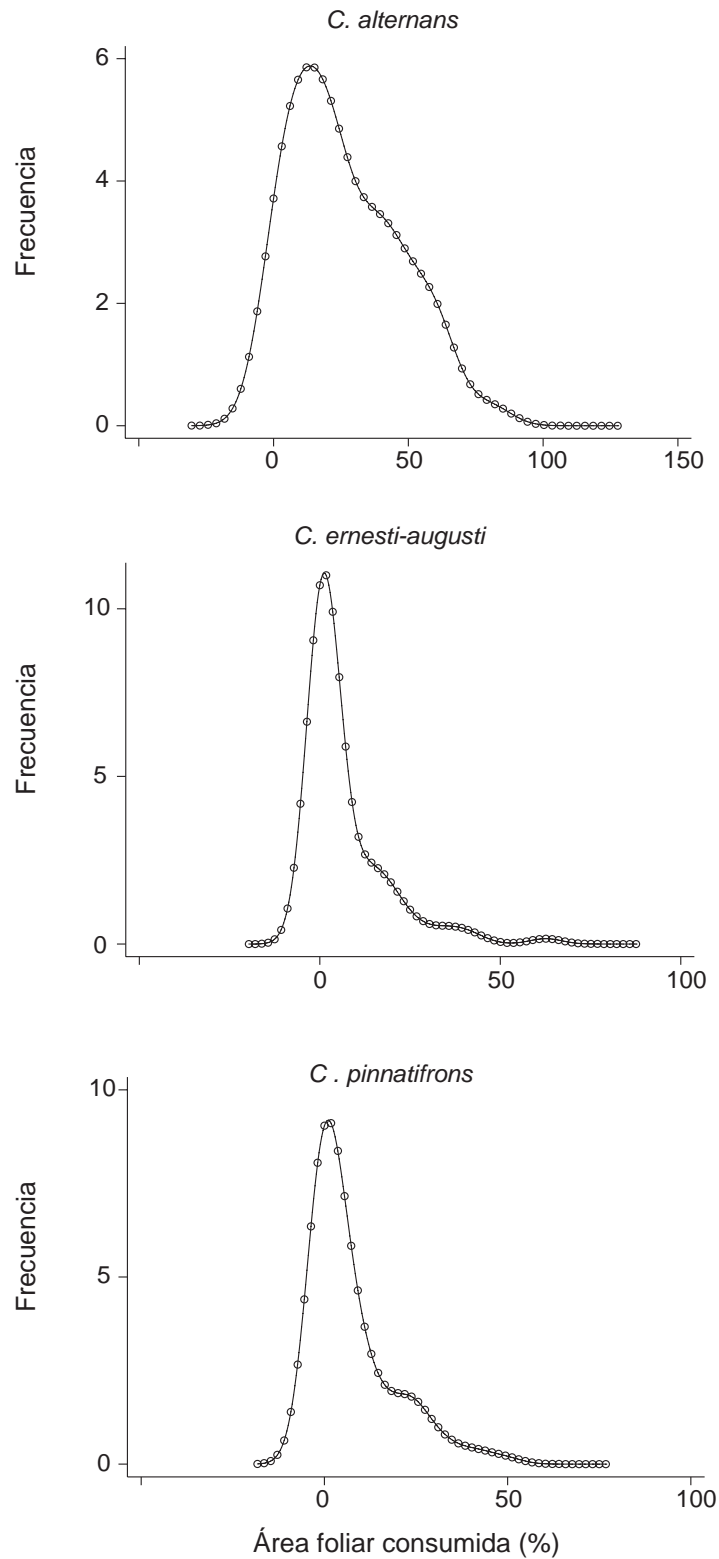


Figura 6. Estimación de densidad por kernel Gaussiano con la amplitud de banda indicada por la prueba de Silverman, para los datos de área foliar consumida en porcentaje en un censo puntual para las tres especies de estudio. La frecuencia está suavizada.

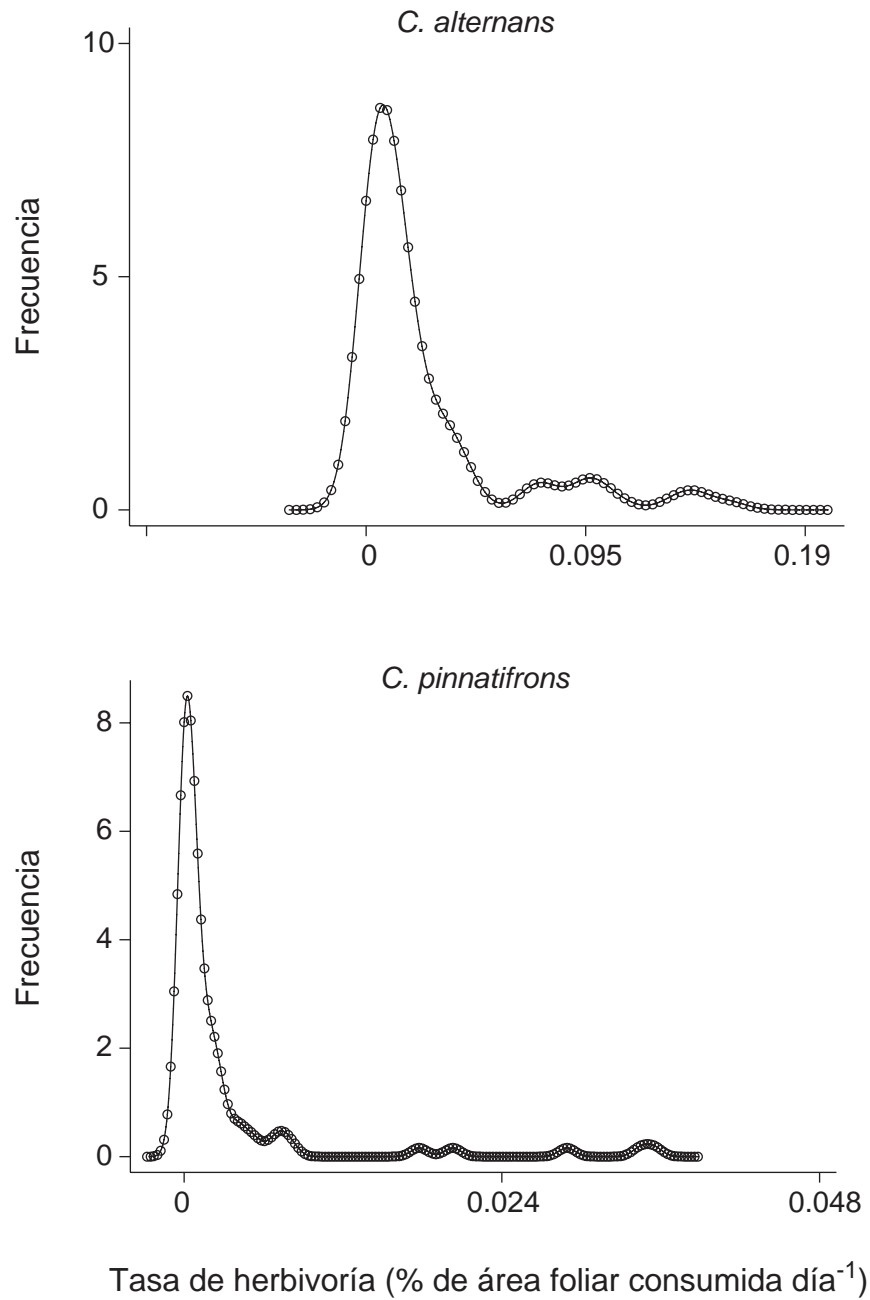


Figura 7. Estimación de densidad por kernel Gaussiano con la amplitud de banda indicada por la prueba de Silverman, para los datos de tasa de herbivoría en porcentaje de área foliar consumida por día, para las tres especies de estudio. La frecuencia está suavizada.

DISCUSIÓN

La prueba de multimodalidad de Silverman aplicada a los datos de tasa de incremento en altura parcial (*IAP*), tasa de incremento en altura total (*IAT*) y tasa de crecimiento relativa en biomasa del tallo (*CRT*) y producción de biomasa, resultó ser significativa para una moda en la mayoría de las comparaciones (8 de 12). En las comparaciones con dos y tres modas, los componentes con menor densidad, presentan un porcentaje menor a 17 individuos.

Las proporciones sexuales *Chamaedorea bartlingiana* son equivalentes a 1:1 (51% plantas femeninas, 49% plantas masculinas) (Ataroff y Schwarzkopf, 1994). Asimismo las razones sexuales de *C. alternans* en campo no difieren significativamente de uno (Oyama, 1990), y las razones sexuales de *C. pinnatifrons* y *C. ernesti-augusti* también se acercan a 1:1 (R. Dirzo com. pers. y V. Cepeda obs. pers.). De acuerdo con esto, es factible pensar que la proporción de plantas en estadio juvenil y pre-reproductivo es también de 1:1. Aunque no se descarta la posibilidad de que exista mortalidad diferencial que empate las frecuencias. Sin embargo, si asumimos que las proporciones son 1:1, y si existe la bimodalidad en las tasas de crecimiento y estas diferencias se presentan a semejanza de lo que ocurre en plantas adultas, es decir, las plantas femeninas presentan una menor tasa de crecimiento con respecto a las plantas masculinas, entonces se esperaría una distribución de la densidad del 50% de los datos en cada uno de los dos componentes. Esto no ocurrió.

Asimismo, las cuatro estimaciones de crecimiento en *C. pinnatifrons* mostraron una distribución unimodal de la densidad. Un total de 12 estimaciones fueron realizadas entre las tres especies, ocho de las cuales fueron unimodales. La producción de biomasa total (de tallo y hojas) fue unimodal en las tres especies de estudio. Estos resultados sugieren que la

tendencia es que hay un crecimiento unimodal en el estadio juvenil o pre-reproductivo de estas tres especies. Asimismo la concentración de fenoles totales y la tasa instantánea de herbivoría fue también unimodal en las tres especies.

Las comparaciones entre plantas adultas de las tres especies de estudio indican que la tasa de incremento en altura del tallo y la tasa de producción foliar de las plantas masculinas es mayor con relación a las plantas femeninas. La producción de biomasa total fue también significativamente mayor en plantas masculinas de *C. ernesti-augusti* y *C. pinnatifrons*, no obstante que en *C. alternans* no hubo diferencias intersexuales (Cepeda-Cornejo y Dirzo, 2010). Metodológicamente no fue posible analizar la tasa de producción foliar. Sin embargo, el resto de las variables relacionadas con el crecimiento, sugieren que no hay diferencias intersexuales en el crecimiento de las plantas juveniles y pre-reproductivas de las tres especies de *Chamaedorea*. Muy posiblemente, si las plantas pre-reproductivas no invierten recursos a la reproducción tampoco hay diferencias intersexuales en el crecimiento y la producción de metabolitos secundarios.

Los estudios en plantas pre-reproductivos son escasos, no obstante el estudio de Nicotra (1999) reporta diferencias en el crecimiento entre plantas masculinas y femeninas en estado no-reproductivo a pesar de que en las plantas adultas no hay diferencias intersexuales. El autor sugiere que la capacidad de las plantas femeninas pre-reproductivas para crecer más rápido les permite compensar el gasto de la reproducción cuando son plantas adultas. En este estudio se detectaron dos o más componentes en algunas de las comparaciones (4 de 12, Tabla 2) asociadas a crecimiento y una posibilidad es que en los casos en que se presentaron dos componentes las plantas femeninas se ubiquen en el componente mayor. Un seguimiento en el tiempo de las plantas nos podría dar esta

información. Adicionalmente la variación ambiental puede ser responsable del aumento o disminución en la tasa de crecimiento de algunos organismos de la población.

La tasa instantánea de herbivoría fue unimodal en las tres especies. La tasa de herbivoría fue también unimodal en *C. pinnatifrons*; sin embargo, resultaron cuatro componentes en *C. alternans*, uno de ellos conformado por la mayoría de los datos (85.9% de los datos). Posiblemente los otros tres componentes (14.1% de los datos) son explicados por variación ambiental o genética. Karban (1992) afirma que el genotipo de las plantas es tan importante para las poblaciones de herbívoros como cualquier otro factor ambiental. Ahman (1997) detecta diferencias intersexuales en el ataque por hongos en plantas no-reproductivas. Nuevamente, un seguimiento de las plantas seleccionadas podría aportar más información.

En suma, los resultados encontrados sugieren que los conflictos de asignación al crecimiento y la defensa se manifiestan en las plantas adultas, a partir del inicio de la reproducción. Sin embargo, el estudio de los patrones de asignación en plantas pre-reproductivas está limitado por la identificación del género y es aconsejable continuar al búsqueda de metodologías prácticas para este fin. El empleo de metodologías como el análisis de densidad por Kernel (EDK) nos ofrece la posibilidad de explorar estos conflictos en plantas pre-reproductivas.

LITERATURA CITADA

- Ahman, I. (1997) Growth, herbivory and disease in relation to gender in *Salix viminalis* L. *Oecologia*, 111(1), 61-68.
- Ataroff, M., y Schwarzkopf, T. (1992) Leaf production, reproductive patterns, field germination and seedling survival in *Chamaedorea-bartlingiana*, a dioecious understory palm. *Oecologia*, 92(2), 250-256.

- Ataroff, M., y Schwarzkopf, T. (1994) Vegetative growth in *Chamaedorea bartlingiana*. *Principes*, 38(1), 24-32.
- Boecklen, W.J., Price, P.W., y Mopper, S. (1990) Sex and drugs and herbivores-sex-biased herbivory in arroyo willow (*Salix-lasiolepis*). *Ecology*, 71(2), 581-588.
- Bullock, S.H. (1984) Biomass and nutrient allocation in a neotropical dioecious palm. *Oecologia*, 63(3), 426-428.
- Cepeda-Cornejo, V., y Dirzo, R. (2010) Sex-related differences in reproductive allocation, growth, defense and herbivory in three dioecious neotropical palms. *Plos One*, 5(3), 9.
- Ciupercescu, D.D., Veuskens, J., Mouras, A., Ye, D., y Brinquet, M. (1990) Kariotiping *Melandrium album*, a dioecious plant with heteromorphic sex chromosomes. *Genome*, 33, 556-562.
- Costich, D.E., Meagher, T.R., y Yurkow, E.J. (1991) A rapid means of sex identification in *Silene latifolia* by use of flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9, 359-370.
- Eppley, S.M., O'Quinn, R., y Brown, A.L. (2009) New sequence-tagged site molecular markers for identification of sex in *Distichlis spicata*. *Molecular Ecology Resources*, 9(5), 1373-1374.
- García, M.B., y Antor, R.J. (1995) Age and size structure in populations of a long-lived dioecious geophyte - *Borderea pyrenaica* (Dioscoreaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 156(2), 236-243.
- Gartlan, J.S., Mackey, D.B., Waterman, P.G., Mbi, C.N., y Struhsaker, T.T. (1980) A comparative study of the phytochemistry of two African rain forest. *Biochemical Systematics and Ecology*, 8, 401-422.
- González-Soriano, E., Dirzo, R., y Vogt, R. (Eds.) (1997) *Historia natural de Los Tuxtlas. México: Universidad Nacional Autónoma de México*, 647 pp.
- Hunt, R. (1982) Concepts in plant growth analysis. En *Plant growth curves: the functional approach to plant growth analysis*, London: Edward Arnold, pp. 14-46.
- Jamsari, A., Nitz, I., Reamon-Büttner, S.M., y Jung, C. (2004) BAC-derived diagnostic markers for sex determination in asparagus. *Theoretical Applied Genetics*, 108, 1140-1146.
- Jing, S.W., y Coley, P.D. (1990) Dioecy and herbivory: the effect of growth rate on plant defense in *Acer-negundo*. *Oikos*, 58(3), 369-377.
- Karban, R. (1992) Plant variation: Its effects on populations of herbivorous insects. En *Plant resistance to herbivores and pathogens. Ecology, evolution, and genetics*, Chicago: The University of Chicago Press, pp. 195-215.
- Khadka, D.K., Nejidat, A., Tal, M., y Golan-Goldhirsh, A. (2002) DNA markers for sex: molecular evidence for gender dimorphism in dioecious *Mercurialis annua* L. *Molecular Breeding*, 9, 251-257.
- Krischik, V.A., y Denno, R.F. (1990) Patterns of growth, reproduction, defense, and herbivory in the dioecious shrub *Baccharis-halimifolia* (Compositae). *Oecologia*, 83(2), 182-190.
- Lloyd, D.G., y Webb, C.J. (1977) Secondary sex characters in plants. *Botanical Review*, 43(2), 177-216.
- Meagher, T.R. (1988) Sex determination in plants. En *Plant reproductive ecology* (J.L. Doust, y L.L. Doust, eds), New York: Oxford University Press, Inc., pp. 125-138.

- Montesinos, D., De Luis, M., Verdu, M., Raventos, J., y Garcia-Fayos, P. (2006) When, how and how much: Gender-specific resource-use strategies in the dioecious tree *Juniperus thurifera*. *Annals of Botany*, 98(4), 885-889.
- Navajas-Pérez, R., de la Herrán, R., González, G.L., Jamilena, M., Lozano, R., Rejón, C.R., Rejón, M.R., y Garrido-Ramos, M.A. (2005) The evolution of reproductive systems and sex-determining mechanisms within *Rumex* (Polygonaceae) inferred from nuclear and chloroplastidial sequence data. *Molecular Biology and Evolution*, 22(9), 1929-1939.
- Nicotra, A.B. (1999) Sexually dimorphic growth in the dioecious tropical shrub, *Siparuna grandiflora*. *Functional Ecology*, 13(3), 322-331.
- Obeso, J.R. (1997) Costs of reproduction in *Ilex aquifolium*: Effects at tree, branch and leaf levels. *Journal of Ecology*, 85(2), 159-166.
- Obeso, J.R., y Retuerto, R. (2002) Sexual dimorphism in holly *Ilex aquifolium*: cost of reproduction, sexual selection or physiological differentiation? *Revista Chilena de Historia Natural*, 75, 67-77.
- Onate, M., y Munne-Bosch, S. (2009) Influence of plant maturity, shoot reproduction and sex on vegetative growth in the dioecious plant *Urtica dioica*. *Annals of Botany*, 104(5), 945-956.
- Oyama, K. (1990) Variation in growth and reproduction in the neotropical dioecious palm *Chamaedorea tepejilote*. *Journal of Ecology*, 78(3), 648-663.
- Oyama, K., y Dirzo, R. (1988) Biomass allocation in the dioecious tropical palm *Chamaedorea tepejilote* and its life history consequences. *Plant Species Biology*, 3, 27-33.
- Oyama, K., y Dirzo, R. (1991) Ecological aspects of the interaction between *Chamaedorea tepejilote*, a dioecious palm and *Calyptocephala marginipennis*, a herbivorous beetle, in a Mexican rain forest. *Principes*, 35(2), 86-93.
- Palomino, M. (2002) Variación intersexual en la asignación de recursos y herbivoría en *Cecropia obtusifolia* en la selva de Los Tuxtlas. Tesis. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Popp, J.W., y Reinartz, J.A. (1988) Sexual dimorphism in biomass allocation and clonal growth of *Xanthoxylum americanum*. *American Journal of Botany*, 75(11), 1732-1741.
- Rocheleau, A.F., y Houle, G. (2001) Different cost of reproduction for the males and females of the rare dioecious shrub *Corema conradii* (Empetraceae). *American Journal of Botany*, 88(4), 659-666.
- Salgado-Ugarte, I.H. (2002) Suavización no paramétrica para análisis de datos. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, 139 pp.
- Salgado-Ugarte, I.H. (2011) Métodos exploratorios y confirmatorios para análisis de datos, un enfoque biométrico. México: DGAPA y FES Zaragoza, UNAM, 300 pp.
- Salgado-Ugarte, I.H., Gómez-Márquez, J.L., y Peña Mendoza, B. (2005) Métodos actualizados para análisis de datos biológico-pesqueros. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, 240 pp.
- Salgado-Ugarte, I.H., Shimizu, M., y Taniuchi, T. (1994) Semigraphical determination of Gaussian components in mixed distributions. *Stata Technical Bulletin*, 18, 15-27.
- Salgado-Ugarte, I.H., Shimizu, M., y Taniuchi, T. (1997) Nonparametric assessment of multimodality of univariate data. *Stata Technical Bulletin*, 38, 27-35.

- Scott, D.W. (1992) Multivariate density estimation: theory, practice, and visualization. Nueva York: John Wiley & Sons, 317 pp.
- Silverman, B.W. (1981) Using kernel density estimates to investigate multimodality. *Journal of the Royal Statistical Society, B*, 43, 97-99.
- Soto, M., y Gama, L. (1997) Climas. En *Historia natural de Los Tuxtlas* (E.G. Soriano, R. Dirzo, y R.C. Vogt, eds), México: Universidad Nacional Autónoma de México, pp. 7-23.
- Sturges, H.A. (1926) The choice of a class interval. *Journal of American Statistical Association*, 21, 65-66.
- Turcotte, J., y Houle, G. (2001) Reproductive costs in *Salix planifolia* ssp *planifolia* in subarctic Quebec, Canada. *Ecoscience*, 8(4), 506-512.
- Ueno, N., Kanno, H., y Seiwa, K. (2006) Sexual differences in shoot and leaf dynamics in the dioecious tree *Salix sachalinensis*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 84(12), 1852-1859.
- Waterman, P.G., y Mole, S. (1994) Analysis of phenolic plant metabolites. Massachusetts: Blackwell Scientific Publications, 238 pp.

Capítulo 5

**Intersexual comparison of DNA content by
flow cytometry, and chromosome number
in four dioecious *Chamaedorea* palms from
Mexico**

Artículo para envío a International Journal of Plant Sciences

**Intersexual comparison of DNA content by flow cytometry, and chromosome number
in four dioecious *Chamaedorea* palms from Mexico**

Verónica Cepeda-Cornejo, Guadalupe Palomino, Ignacio Méndez & Rodolfo Dirzo

SUMMARY

Flow cytometric analysis of DNA content was performed using nuclei isolated from young leaves of male and female plants of four sympatric *Chamaedorea* species. Nuclear DNA content distribution showed that more than 90 % of leaf nuclei were in the G₀/G₁ phase of the cell cycle. Nuclei with DNA content higher than 4C were not detected, indicating the absence of endopolyploidy. All four species were diploids. *C. tepejilote* and *C. alternans* with $2n = 2x = 32$; $x = 16$, displayed a 52% variation in 2C DNA content, which ranged from 5.95 pg in *C. tepejilote* to 12.34 pg in *C. alternans*. *C. pinnatifrons* and *C. ernesti-augusti*, with $2n = 2x = 26$; $x = 13$ had 19%, had a range in 2C DNA content from 6.67 pg in *C. pinnatifrons* to 8.26 pg in *C. ernesti-augusti*. DNA content did not vary significantly between male and female plants.

INTRODUCTION

Dioecious plants have staminate flowers produced on male plants and pistillate flowers on female ones. Gender identification in dioecious plants is typically done upon evidence of reproductive structures. The lack of primary sexual characters, and the long time it takes for many species to reach reproductive maturity, renders intersexual comparative studies (e.g., sex-related variation in herbivory and defense) (Cepeda-Cornejo and Dirzo, 2010); difficult or even impossible when attempting such comparisons in plants at the pre-reproductive stage, or when the plants are out of their reproductive season. This difficulty is

particularly evident in the case of palms, which represent an important component of the flora of tropical ecosystems (Henderson, 1995) and take a long time to reach sexual maturity. *Chamaedorea* is a genus of neotropical palms that comprises 107 species (Govaerts *et al.*, 2006), all of them dioecious. For example, in *C. alternans* and *C. pinnatifrons* age at first reproduction occurs not before 6 years under greenhouse conditions (V. Cepeda-Cornejo, unpub. data). Given this situation, methods that allow gender identification at the pre-reproductive stage or in the non-reproductive period, should facilitate studies on the biology of dioecious palms. Some possibilities to assess gender identification include: 1) sex-related differences in karyotype (i.e., presence of sexual chromosomes) (Ciupercescu *et al.*, 1990; Navajas-Pérez *et al.*, 2005), 2) differences in nuclear DNA content between male and female plants (Costich *et al.*, 1991), 3) molecular markers (Khadka *et al.*, 2002; Jamsari *et al.*, 2004) and 4) intersexual differences in enzymatic activity (e.g., peroxidase activity) (Meagher, 1988). Among these, nuclear DNA's C-value, defined as the DNA content in the unreplicated haploid or gametic nucleus of an organism (Bennett *et al.*, 2000), and genome size (or DNA content) are being widely used and applied in a variety of fields (e.g., cell and molecular biology, ecology, evolution, phytogeography, systematics, and conservation (Bennett and Leitch, 1995; Bennett *et al.*, 2000; Bennett and Leitch, 2005). In addition, flow cytometry has been used to compare nuclear DNA content in both male and female plants of *Silene latifolia* (*Melandrium album*) (Costich *et al.*, 1991). In this species, a frequency-distribution histogram of nuclear DNA content allows to distinguish different peaks of DNA content for male and female plants. Such distinction of DNA peaks in this species is due to the presence of a pair of strongly heteromorphic sex chromosomes (small X and large Y) (Ciupercescu *et al.*, 1990; Costich *et*

al., 1991; Dolezel and Göhde, 1995). Similarly, plants of *Silene latifolia* have 3.9% more DNA than female plants (Meagher and Costich, 1994).

Sexual chromosomes have been found only in some dioecious species (Charlesworth, 2002) of the orders Caryophyllales: *Silene dioica* (Ciupercescu *et al.*, 1990), *Rumex* sp. (Navajas-Pérez *et al.*, 2005) and *Phoenix dactylifera* (Siljak-Yakovlev *et al.*, 1996). Among the order Arecales, to which palms belong, the dioecious *Phoenix dactylifera* has been proven to have sex chromosomes of the XX/YY type. Sex chromosomes in this palm were detected using a staining method in which Chromomycin A3 differentially stains heterochromatin from male and female cells. The nuclei of female meristem root cells show two identical spots, while the two spots on male nuclei have different sizes. In a male cell, one spot in one chromosome is about double the volume of the other one (Siljak-Yakovlev *et al.*, 1996).

DNA content has been reported in the database of the Royal Kew Botanical Gardens (2006) in only six species of *Chamaedorea*: *C. oblongata*, *C. woodsoniana*, *C. klotzschiana*, *C. pinnatifrons*, *C. sp.* and *C. tenella* and yet in no case has the content been reported separately for male and female plants. Chromosome number has been given for 22 species of *Chamaedorea* (Uhl and Dransfield, 1987; Röser *et al.*, 1997), including *C. alternans* $n = 16$: (Read, 1966; Uhl and Dransfield, 1987), *C. ernesti-augüsti* (Read, 1963; Uhl and Dransfield, 1987; Röser, 1994), and *C. pinnatifrons* $n = 13$ (Röser *et al.*, 1997), while in *C. tepejilote* two chromosome numbers have been reported $n = 13$ and $n = 16$ (Uhl and Dransfield, 1987).

Palms in the genus *Chamaedorea* are of considerable economic (Hodel, 1992; Current, 2002) and ecological (Oyama and Dirzo, 1991; Cepeda-Cornejo and Dirzo, 2010; Sanchez-Ramos *et al.*, 2010) importance. In this study we aim at not only contributing to the

knowledge of both DNA content and chromosome number in palms, but at exploring the possibility of identifying the sex of individual plants, as a basis for ecological studies directed to assess the ecological consequences of dioecy in palms (Cepeda-Cornejo and Dirzo, 2010). The specific objective of this study is to analyze DNA content in male and female plants in four sympatric, dioecious species of *Chamaedorea* using the method of flow cytometry. Flow cytometry has been used to compare nuclear DNA content in both male and female plants of dioecious species. Also we analyze chromosome number of this four species.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Four species of *Chamaedorea* were selected for this study: *C. tepejilote* Liebm., *Chamaedorea pinnatifrons* (Jacq.) Oerst., *C. ernesti-augusti* H. Wendl. and *Chamaedorea alternans* H. Wendl.

All voucher specimens were deposited at the National Herbarium of Mexico (MEXU): *C. alternans* female plant VCC-1 1307170 MEXU!, *C. alternans* male plant VCC-2 1307161 MEXU!, *C. ernesti-augusti* female plant VCC-7 1307164 MEXU!, *C. ernesti-augusti* male plant VCC-8 1307165 MEXU!, *C. pinnatifrons* female plant VCC-5 1307166 MEXU!, *C. pinnatifrons* male plant VCC-6 1307158 MEXU!, *C. tepejilote* female plant VCC-3 1307172 MEXU!, *C. tepejilote* male plant VCC-4 1307167 MEXU!

Seeds and leaves of each species were collected from plants naturally growing at the Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, a field station of the Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) (18°34'–18°36'N, 95°04'–95°09' W), in the state of Veracruz, Mexico. The predominant vegetation of this area is tropical rain

forest, with emergent trees reaching over 30 m in height, and an understory dominated by palms, mainly *Astrocaryum mexicanum*, and six species of *Chamaedorea*, along with several understory trees (particularly in the Rubiaceae), and the juvenile plants of many trees and some herbaceous species. Details of the natural history of this forest are given in González-Soriano and collaborators (1997).

Mitotic chromosome counts

For the observation of chromosome number ($2n$) of the study species, mitotic cells at metaphase from six to eight plants of each species were analyzed. Seeds of four *Chamaedorea* species were germinated and cultivated in medium growth Metro-Mix® 200 (Sun Gro Horticulture) to 25°C. Plants were grown in a growth chamber (Conviron G30) under a 12 h light/12 h dark photoperiod. Elongating meristems of secondary roots between 1 to 1.5 cm were collected from seedlings of *Chamaedorea* species and placed in a solution of 8-hydroxyquinoline 0.002 M for 5 hr at 18°C in darkness. Root tips of *C. ernesti-augusti* and *C. tepejilote* were placed in a saturated solution of 1-Bromonaphthalene for 24 h at 4°C in darkness. Later, the root tips were fixed in fresh Farmer solution 3:1 (V/V) ethanol-glacial acetic acid at least 24 h. Root tips of *C. ernesti-augusti*, *C. pinnatifrons* and *C. tepejilote* were hydrolyzed in 1N HCl at 60°C for 15 min and were stained in Feulgen reagent for 30 min (Palomino and Hermilo, 1992). Slides were prepared using the squash technique, and the cells with clearly defined chromosomes were frozen with dry ice (Conger and Fairchild, 1953). Root tips of *C. alternans* were prepared by the splash method (Tapia-Pastrana and Mercado-Ruaro, 2001). Slides were frozen and mounted in Canada balsam. Ten to 16 of the cells in mitotic metaphase of each species were analyzed in an optical Carl Zeiss microscope. The cells for each species were photographed with Technical Pan Film using a Zeiss photomicroscope II and a digital camera (AxioCam ICc 1, Zeiss), using software

AxioVision Release 4.7 (05-2008). A negative film or digital photographs was used to count the chromosomes.

Estimation of nuclear DNA content

Four to seven adult plants from each sex for each species were selected in the field. The most young leave completely developed (in position one in the phyllotaxis) was collected, transported at 4°C until laboratory and kept refrigerated until its analysis. In all cases three replicates for each individual plant were analyzed. *Zea mays* L. cv. CE-777, 2C DNA = 5.433 (Dolezel et al., 1998a; Dolezel et al., 2007) was used for estimation of genome size in *C. pinnatifrons* and *C. ernesti-augusti*. *Pisum sativum* L. cv. Ctirad, 2C DNA = 9.09 pg (Dolezel et al., 1998a; Dolezel et al., 2007) was used for estimation of genome size in *C. alternans* and *C. tepejilote*. Suspensions of intact nuclei were prepared according to Otto (1990) and Palomino *et al.* (1999) with some modifications, as described by Doležel and Göhde (1995). Briefly, 15-30 mg of palm leaf tissue and 10-20 mg of corresponding internal standard plant (*Zea mays* or *Pisum sativum*) were simultaneously chopped with a razor blade in a Petri dish containing 1 ml of 0.1 M citric acid and 0.5% Tween 20. Chopped material was filtered through a 50-µm nylon mesh and incubated for 10 min at room temperature. The nuclei in the filtrate were then pelleted by centrifugation (90 g × 3 min), suspended in 1 ml of the citric acid/Tween 20 solution and incubated for 10 min at room temperature. Subsequent to this, 2 ml of 0.4 M Na₂HPO₄ was added and suspension was supplemented with 125 µl of propidium iodide and RNase to a final concentration of 50 µg/ml and analyzed by flow cytometry as follows.

The flow cytometric estimation of nuclear DNA content was performed using Partec CA II flow cytometer (Partec GmbH Münster, Germany). Nuclei isolated from chicken red

blood cells were used to align the flow cytometer, checking its linearity by comparing peak position of single nuclei and nuclei clumps (doubles, triplets, et.) (Galbraith *et al.*, 1998). At least 10,000 nuclei were analyzed in each sample. Peak means, areas and coefficients of variation were calculated using DPAC software (Partec). Coefficients of variation were less than 5% assuring accurate measurements (Dolezel, 1997). Nuclear genome size was then calculated according to the formula:

$$\text{Palm species 2C nuclear DNA content (pg)} = \frac{\text{Palm species G}_0/\text{G}_1 \text{ peak mean}}{\text{Internal standard G}_0/\text{G}_1 \text{ peak mean}} \times \text{2C DNA content internal standard (pg)}$$

where G_0/G_1 correspond to the phase of the cell cycle with non-duplicated chromosomes and 1 picogram (pg) = 978 megabase pairs (Dolezel *et al.*, 2007).

Statistical analysis

DNA content. Differences in 2C DNA content in pg (1 pg = 978 megabase pairs; Dolezel *et al.*, 2007) of male and female plants of the four species of *Chamaedorea* were analyzed with a complete nested unbalanced analysis of variance (ANOVA). In this analysis individual plant was nested within sex \times species factors. Individuals were considered as random factor (Zar, 1996; Kuehl, 2003). The first level of analysis corresponded to the species, the second level to male or female of plants, the third level to individuals within species and the fourth corresponded to repetitions within individual plant [4 species \times 2 sexes \times 4 - 7 individuals (replicates) \times 3 repetitions]. Additionally, restricted maximum likelihood estimation (REML) was applied to data analysis. The normality of residuals was assessed using the Shapiro-Wilk test ($W = 0.9708$, $P = 0.1127$) and variance homogeneity was assessed with Bartlett test ($F = 0.1092$, $P = 0.7410$). When a significant effect was detected, a Tukey test

was applied. All statistical analyses were performed using SAS version 7.0 software (2007 SAS, Institute Inc., Cary, North Carolina).

RESULTS

Chromosome number. We observed two different chromosome numbers among the four study species. In *C. pinnatifrons* and *C. ernesti-augusti* the diploid chromosome number was $2n = 2x = 26$, $x = 13$. In *C. tepejilote* and *C. alternans* the corresponding number was $2n = 2x = 32$, $x = 16$ (Figure 1).

We detected the presence of a heteromorphic pair in *C. alternans*, as shown in figure 1, panel D (see asterisk). In total, there are 15 large chromosomes. Although such heteromorphic pair is clearly different from the rest, it is not possible to ascertain whether this represents a sexual pair.

Nuclear DNA content. Nuclear 2C DNA or genome size varied significantly among species ($P < 0.0001$, Tables 1 and 2), and shows a gradient in the direction: *C. tepejilote* (5.95 pg) < *C. pinnatifrons* (6.67 pg) < *C. ernesti-augustii* (8.26 pg) < *C. alternans* (12.34 pg) (Table 1, Figures 2 and 3). The picogram DNA amount was 52% higher in *C. alternans* as compared to *C. tepejilote* ($P = 0.0008$), indicating a 2.07 greater DNA content. *C. ernesti-augusti* has a 19% higher DNA content compared to *C. pinnatifrons*, equivalent to a 1.24 difference ($P < 0.0001$). The range of genome size among the species was $2C = 5.95$ pg (2909 Mpb) in *C. tepejilote*, to $2C = 12.34$ pg (6036 Mpb) in *C. alternans* (Table 1).

DNA content, as determined by mean peak frequency (Figure 2) showed that male and female plants do not differ significantly in the amount of DNA ($P = 0.1740$) (Table 2). The interaction species \times sex was not significant either ($P = 0.2997$).

Table 1. Nuclear DNA content and genome size in male and female plants of four species of *Chamaedorea*. Same letters indicate no statistical difference using $\alpha = 0.05$, with ANOVA $P < 0.0001$. 1 picogram (pg) = 978 megabase pairs (Mbp) (Dolezel *et al.*, 2007).

Species	2n	Number of plants (male, female)	2C nuclear DNA content (pg) ($\bar{x} \pm$ S.E.)			Tukey's grouping	1C _x Genome size (Mbp)
			Male	Female	Species		
<i>C. ernesti-augusti</i>	26	4, 5	8.260 \pm 0.10	8.259 \pm 0.04	8.259 \pm 0.05	c	4039
<i>C. pinnatifrons</i>	26	5, 4	6.695 \pm 0.07	6.630 \pm 0.06	6.666 \pm 0.05	b	3260
<i>C. alternans</i>	32	6, 7	12.184 \pm 0.09	12.478 \pm 0.17	12.343 \pm .011	d	6036
<i>C. tepejilote</i>	32	4, 5	5.840 \pm 0.06	6.034 \pm 0.05	5.948 \pm 0.05	a	2909

Table 2. Results of analysis of variance for nuclear DNA content in *C. ernesti-augusti*, *C. pinnatifrons*, *C. alternans* and *C. tepejilote*.

<i>Source</i>	<i>d.f.</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Species	3, 32	102.87	1693.99	<.0001
Sex	1, 32	0.039	1.93	0.1740
Species × Sex	3, 32	0.077	1.27	0.2997

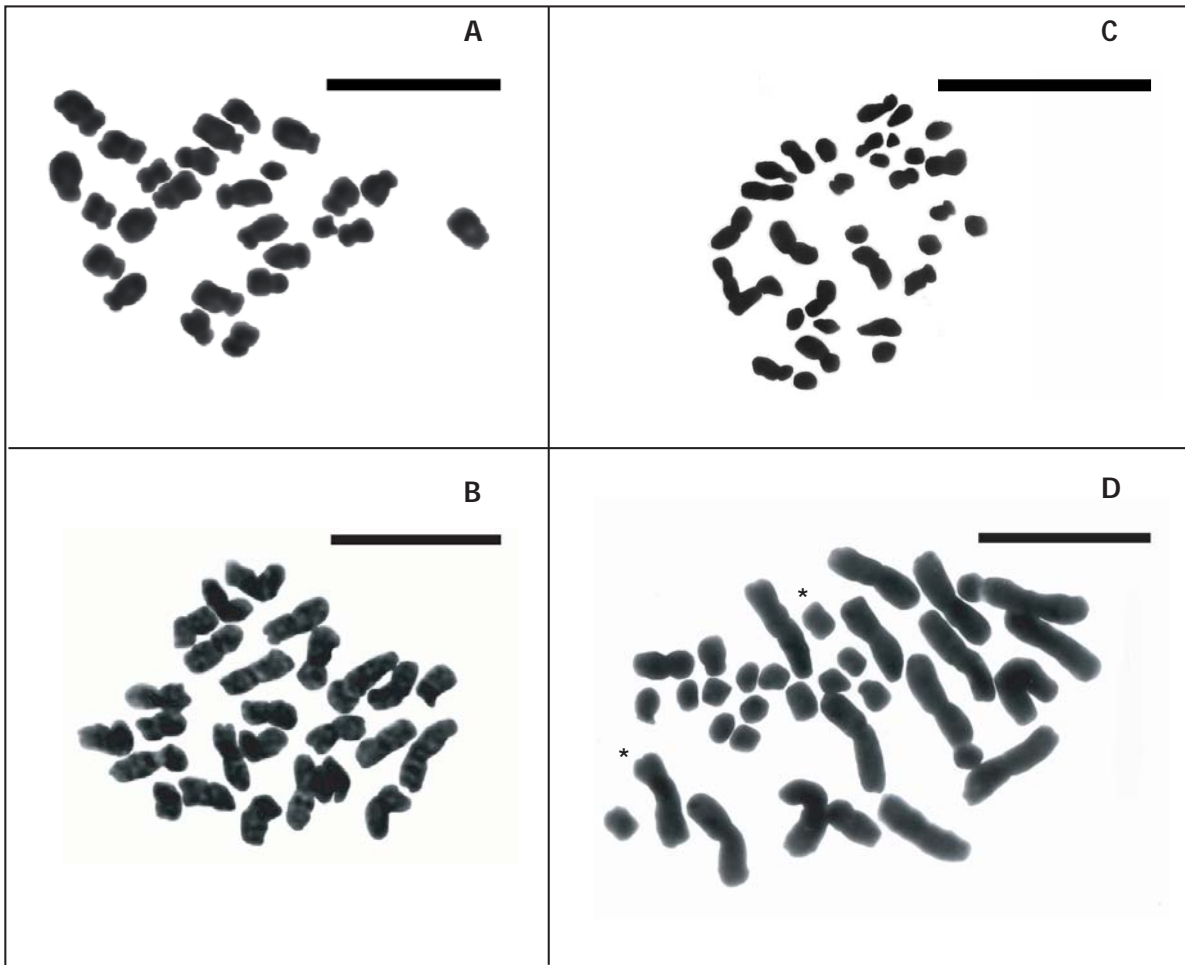


Figure 1. Somatic chromosomes of A) *C. ernesti-augusti* $2n = 2x = 26$, B) *C. pinnatifrons* $2n = 2x = 26$, C) *C. tepejilote* $2n = 2x = 32$, and D) *C. alternans* $2n = 2x = 32$. The bar on each panel represents the scale of the photo (=10 μm .) *Heteromorphic homologous pair.

Figure 2

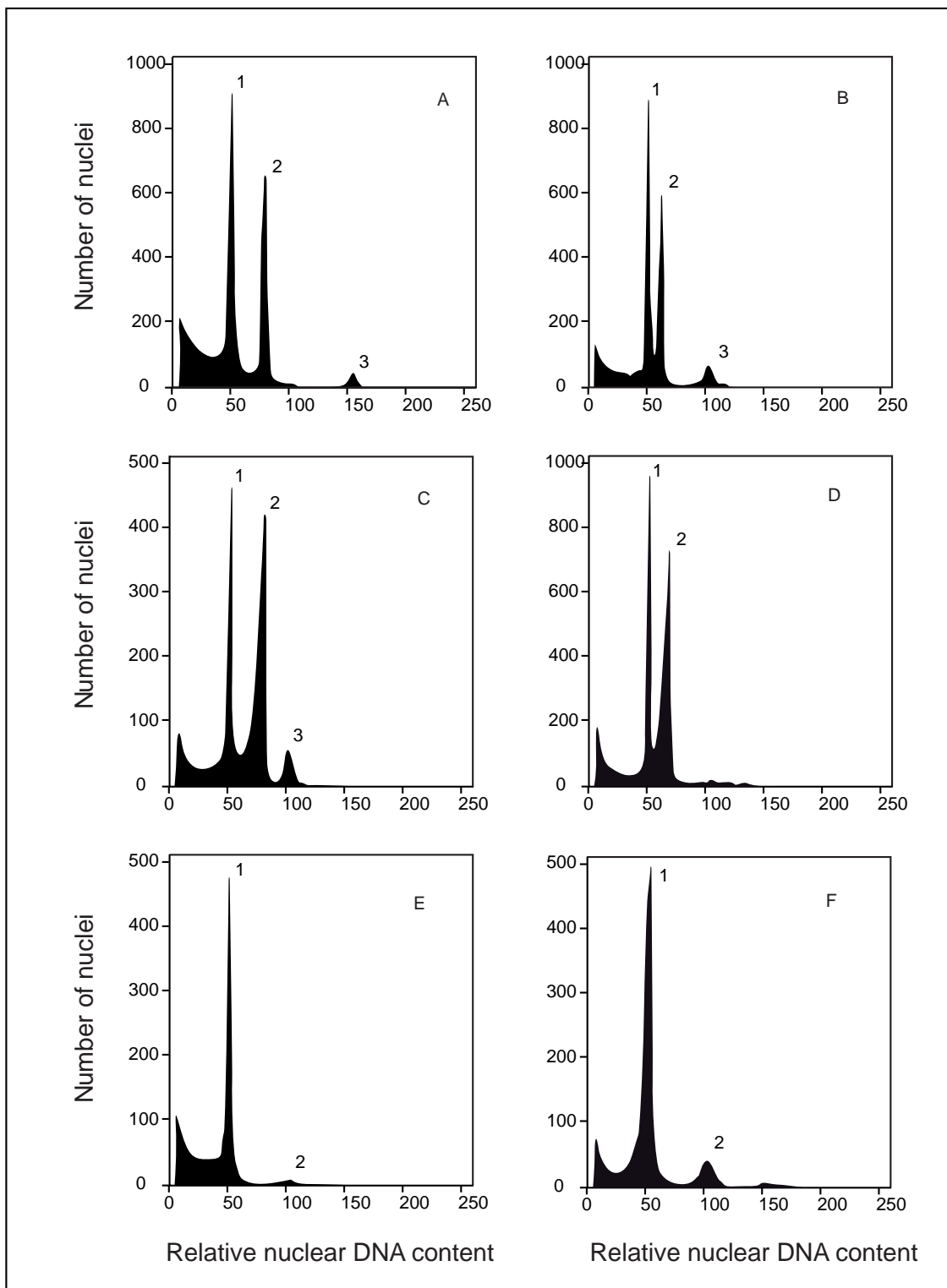


Figure 2. Histograms of fluorescence intensity using flow cytometry analysis of isolated nuclei of *Chamaedorea* spp. and internal standard plant. A) Male plant of *C. tepejilote*, with peak 1 representing G₁-G₀ nuclei of palm; peaks 2 and 3 represent G₁-G₀ and G₂ nuclei of *Pisum sativum*. B) Male plant of *C. pinnatifrons*, with peaks 1 and 3 representing G₁-G₀ and G₂ nuclei of *Zea mays*; peak 2 representing G₁-G₀ nuclei of palm. C) Female plant of *C. ernesti-augustii*, with peaks 1 and 3 representing G₁-G₀ and G₂ nuclei of *Zea mays*, peak 2 represent G₁-G₀ nuclei of palm. D) Female plant of *C. alternans*, with peak 1 representing G₁-G₀ nuclei of *P. sativum*, peak 2 representing G₁ nuclei of palm. E) Peaks 1 and 2 representing G₁-G₀ and G₂ nuclei of both male and female plants of *C. pinnatifrons*. F) Peaks 1 and 2 representing G₁-G₀ and G₂ nuclei of both male and female plants of *C. alternans*.

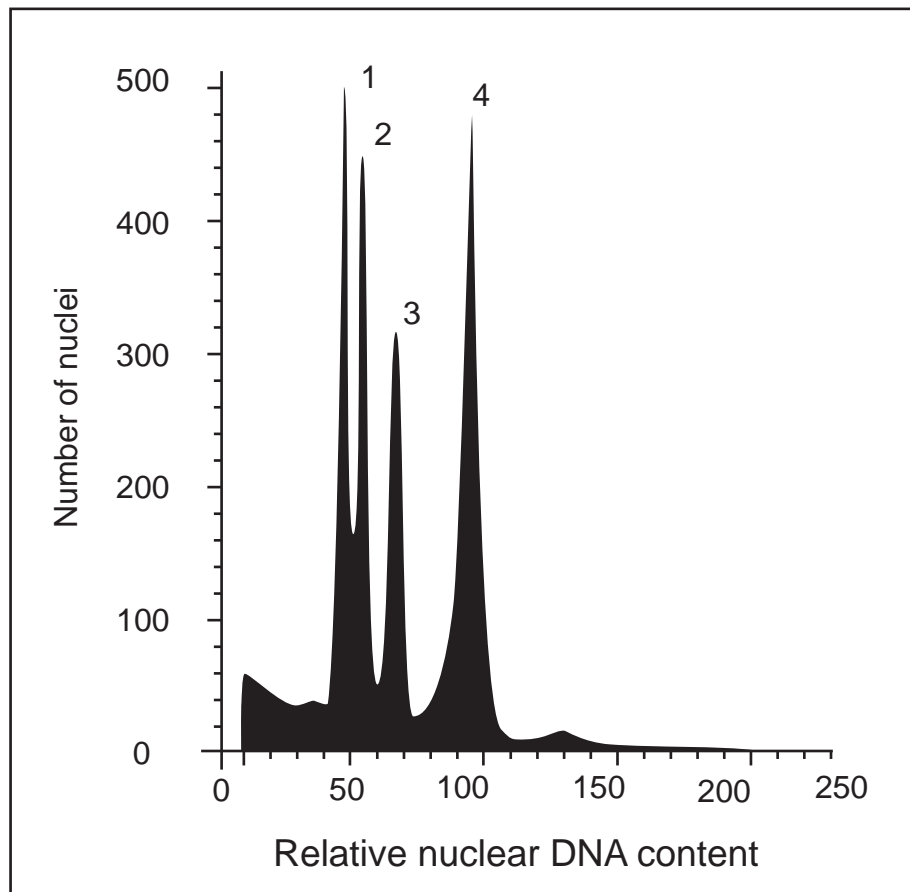


Figure 3. Histograms of fluorescence intensity using flow cytometric analysis of nuclei isolated from leaf tissue of four *Chamaedorea* species without internal standard plant. Peak 1 representing G₁-G₀ nuclei of *C. tepejilote*, peak 2 representing G₁-G₀ nuclei of *C. pinnatifrons*, peak 3 representing G₁-G₀ nuclei of *C. ernesti-augusti* and peak 4 representing G₁-G₀ nuclei of *C. alternans*.

DISCUSSION

We found two distinct chromosome numbers (26, and 32) in the studied *Chamaedorea* species. Similarly, DNA content differed among species but we did not detect inersexual differences.

The chromosome numers we found coincide with those reported previously (Uhl and Dransfield, 1987). Although two chromosome numbers have been reported for *C. tepejilote* ($n=13$ and $n=16$), in this study we only found one, $n = 16$. The Arecaceae family is known to be polybasic, that is, it includes genera and species with chromosome numbers that range from $x = 13$ to 18. The chromosome numbers we found in this study fall within this range. Some researchers consider that $n = 18$ is probaly the ancestral number in palms (Moore and Uhl, 1973; Uhl and Dransfield, 1987).

Frequently, the same chromosme number is reported for a set of species belonging to the same genus, as is the case of $x=30$ (or multiples of this in the case of polyploids) are characteristic of the Agavaceae (Palomino *et al.*, 2008). However, different numbers have also been reported for species belonging to the same genus. For instance, in *Crotalaria* (Fabaceae) chromosme numbers of $2n = 16$, 14 and 32 (with basic numbers $x = 7$ and $x = 8$) have been reported (Palomino and Vázquez, 1991). Likewise, in particular case of the Arecaceae several genera are reported with distinct chromosome numbers, including, for example, *Ravenea*, with $2n = 30$ and $2n = 32$ (Röser *et al.*, 1997), *Calamus* with $2n = 26$ and 28, and *Raphia* with $2n= 28$ and 32 (Uhl and Dransfield, 1987). In the case of *Chamaedorea* chromosome numbers $2n = 26$ have been reported in 19 species and $2n = 32$ in five species (Uhl and Dransfield, 1987). Therefore, *Chamaedorea* can be considered to be a dibasic genus, with $x = 13$ y 16.

More detailed studies are needed to ascertain the mechanism by which two chromosome numbers originated in *Chamaedorea*. Changes in chromosome number originated by reduction or increase in chromosome number (dysploidy), can arise via aneuploidy due to Robertsonian fusion, centric fission or various types of tandem fusion (Guerra, 2008). Reduction of chromosome numbers may be due to repeated reciprocal translocations of unequal chromosome segments from metacentrics to the long arms of subtelocentrics and telocentrics, combined with the subsequent loss of remaining centric fragments (Röser, 1995). Although chromosome number typically occurs by polyploidy, this is rare in Arecaceae, with the sole exception of *Voanioala gerardii*, with a remarkable minimum of 596 chromosomes (Johnson *et al.*, 1989).

Here we report the C value for four species of *Chamaedorea*, of which only that of *C. pinnatifrons* was known. The C value reported by Röser *et al.* (1997) *C. pinnatifrons* ($2C = 8.9$ pg) does not coincide with the one reported here ($2n = 6.66$ pg). It is conceivable that, given the active, recent taxonomic revisions of *Chamaedorea*, the taxon analyzed by Röser is a different one from the one we studied. Röser *et al.* (1997) used microdensitometry with Feulgen for their DNA quantification, however such a method is equally effective to flow cytometry (Dolezel *et al.*, 1998b).

The range of variation of DNA content in the studied species was from 5.95 pg in *C. tepejilote*, to 12.34 pg in *C. alternans*. the $2C$ DNA value had been reported only for six species of *Chamaedorea*, out of the 107 species studied by Govaerts *et al.* (2006), and the range they reported was 8.16 a 10.10 pg. Thus their range is broadened with the data we report here.

Regarding intersexual differences, these were not evident in the group of taxa we studied. The difference in DNA content in *C. alternans* was 0.294 pg (2.36%) greater in

female plants, although such a difference could be due exclusively to the heteromorphic pair. Nevertheless, the difference was not statistically significant and not distinguishable by cytometry. Similarly, intersexual difference in *C. tepejilote* was 0.194 pg (3.32%) greater in female plants. In contrast, in *Silene latifolia* the observed intersexual difference is of similar magnitude and statistically significant but the value is greater in male plants (Costich *et al.*, 1991).

Intersexual differences tend to be evident when sexual chromosomes of large size are present. However, such large chromosomes were not evident in the four species of *Chamaedorea* studied here (Cepeda-Cornejo *et al.*, in prep.).

Dolezel and Göhde (1995) found a distinct separation of DNA spikes from a male and a female plant of *Silene latifolia* when these were analyzed simultaneously. Such intersexual difference and the DNA spike separation of the male and female plants can probably be explained by the presence of heteromorphic chromosomes. Given that in this study we were not able to obtain karyotypes of male and female plants we cannot define whether there are sex chromosomes in this set of species. The chromosome set of *C. alternans* presents a heteromorphic pair (Cepeda-Cornejo *et al.*, in prep.), yet we are unable to discern if this corresponds to a heteromorphic sex pair. The presence of sex chromosomes must be determined via the assessment of meiotic configurations in both sexes (Meagher, 1988). Similarly, the presence of heteromorphic pairs has been noted in species that are not dioecious (Palomino and Hermilo, 1992). It is worth noting that although the sexual identity of the plants used for the chromosome count is not known, in no case did we detect a pair with a markedly greater size among the chromosome set, as has been the case of case of species that have a sexual pair such as *Melandrium album*, (Ciupercescu *et al.*, 1990). Nevertheless, this does not necessarily negate the possibility that a sexual pair may exist in

the taxa we studied and it would be of interest to explore in greater detail the karyotypes of male and female plants using other techniques (for instance, selective staining of repeated sequences of DNA in chromosomes using Chromomycin A3). Sexual determination in plants does not occur only via sex chromosomes. In *Chamaedorea* the mechanism of sex determination has not been elucidated. Furthermore, sexual determination in dioecious species is also known to be influenced by environmental factors (Meagher, 1988).

On the other hand, the interspecific differences in DNA quantity were very evident among the studied taxa. *C. tepejilote* presented the lowest DNA content while *C. alternans* the highest. Interspecific variation seems to be related to a number of phenotypic characteristics at the nuclear, cell tissue and organ levels (Bennett, 1987; Bennett *et al.*, 2000). The observed variation in the C value seems to be correlated with the volume or length of chromosomes, the minimum duration of the mitotic cell cycle, the duration of meiosis, and minimum generation time (Bennett and Leitch, 1995). Among the studied species, *C. tepejilote* presents short chromosomes and the lowest C value. In contrast, *C. alternans* presents the longest chromosomes (Cepeda-Cornejo *et al.*, in prep.), and the highest DNA content. The observed differences in the amount of DNA could be related to growth rate of the species. *C. alternans*, *C. pinnatifrons* and *C. ernesti-augusti* show significant contrasts in several growth metrics, including total height increment, leaf production rate and net biomass production (Cepeda-Cornejo and Dirzo, 2010). In addition, Bennett *et al.* (2000) suggest that C value frequently decreases over time. It is possible that *C. tepejilote* might have had changes in its karyotype and that such chromosomal rearrangements led to a reduction in its genome.

It is useful to note the differences in DNA content and chromosome length between *C. alternans* and *C. tepejilote* (Figure 1). Although both species have the same chromosome

number ($2n = 32$), *C. alternans* has 2.07 times greater DNA content (pg) and 2.06 times a greater genome size (μm) than *C. tepejilote* (Cepeda-Cornejo *et al.*, in prep.). Indeed, both species are morphologically similar (although with contrasting phenologies) and had been classified as a single taxon until 1987. Subsequently, Quero (1984) finally established that it is in fact a group of two species. Nevertheless, the definition of these species has been controversial. Bacon y Donovan (2006) analyzed the genotype of 44 samples of *C. alternans* and *C. tepejilote*, using AFLP markers. Their UPGMA clustered in a clade the samples of *C. alternans* while those of *C. tepejilote* were grouped in a different clade. These results are consistent with those we report here.

ACKNOWLEDGMENTS

The National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT), the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, and the Instituto de Ecología, UNAM provided financial support for graduate studies to V.C.C. Field work to V.C.C. was supported by a CONACYT grant. Laboratorio de Citogenética, Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM, provided financial support and technical assistance. We thank Miriam Laad Otero for invaluable help for technical assistance in DNA quantification. F. Javier Martínez Ramón helped with technical assistance in separation and identification of chromosomes. Ingrid Brunner Caligaris helped with the observation in optical microscope. Francisco Vergara-Silva offered suggestions to improve the manuscript. Zenón Cano Santana and Eduardo Morales Guillaumin offered valuable guidance throughout this study. We are grateful to Los Tuxtlas Tropical Research Station for logistical support.

LITERATURE CITED

- Bacon CD, CB Donovan 2006 Taxonomy and Conservation: A Case Study from *Chamaedorea alternans*. *Annals of Botany* 98: 755-763.
- Bennett MD 1987 Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New phytologist* 106 (Suppl.): 177-200.
- Bennett MD, P Bhandol, IJ Leitch 2000 Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses - 807 new estimates. *Annals of Botany* 86: 859-909.
- Bennett MD, IJ Leitch 1995 Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals of Botany* 76: 113-176.
- Bennett MD, IJ Leitch 2005 Plant genome size research: a field in focus. *Annals of Botany* 95: 1-6.
- Cepeda-Cornejo V, R Dirzo 2010 Sex-related differences in reproductive allocation, growth, defense and herbivory in three dioecious neotropical palms. *PLoS ONE* 5: e9824.
- Cepeda-Cornejo V, R Dirzo, I Méndez, G Palomino in prep. Interspecific variation in karyotype of four *Chamaedorea* species In prep.
- Ciupercescu DD, J Veuskens, A Mouras, D Ye, M Brinquet 1990 Kariotiping *Melandrium album*, a dioecious plant with heteromorphic sex chromosomes. *Genome* 33: 556-562.
- Conger DD, LM Fairchild 1953 A quick freeze method for making smear slides permanent. *Stain technology* 28: 281-283.
- Costich DE, TR Meagher, EJ Yurkow 1991 A rapid means of sex identification in *Silene latifolia* by use of flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 359-370.
- Current D. 2002. In search of a sustainable palm market in America. The Commission for Environmental Cooperation of North America. Available from http://www.cec.org/pubs_docs/documents/index.cfm?varlan=englishandID=1028, (accessed October 2005).
- Charlesworth D 2002 Plant sex determination and sex chromosomes. *Heredity* 88: 94-101.
- Dolezel J 1997 Applications of flow cytometry for the study of plant genomes. *Journal of Applied Genetics* 38: 285-302.
- Dolezel J, W Göhde 1995 Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow-cytometry. *Cytometry* 19: 103-106.
- Dolezel J, J Greilhuber, S Lucretti, A Meister, MA Lysak, L Nardi, R Obermayer 1998a Plant genome size estimation by flow cytometry: inter-laboratory comparison. *Annals of Botany, Supplement, A* 82: 17-26.
- Dolezel J, J Greilhuber, S Lucretti, A Meister, MA Lysák, L Nardi, R Obermayer 1998b Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Annals of botany* 82: 17-26.
- Dolezel J, J Greilhuber, J Suda 2007 Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols* 2: 2233-2244.
- Galbraith DW, GM Lambert, J Macas, J Doležel 1998 Analysis of nuclear DNA content and ploidy in higher plants. *in*: JP Robinson, Z Darzynkiewicz, PN Dean, LG Dessler, A Orfao, PS Rabinovitch, CC Stewart, HJ Tanke, LL Wheelless eds. *Currents protocols in cytometry*. John Wiley and Sons, Inc., Nueva York.
- González-Soriano E, R Dirzo, R Vogt 1997 *Historia Natural de Los Tuxtlas*. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 647 pp.

- Govaerts R, J Dransfield, SF Zona, DR Hodel, A Henderson. 2006. World Checklist of Arecaceae. The board of trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://www.kew.org/wcsp/>.
- Guerra M 2008 Chromosome numbers in plant cytotaxonomy: concepts and implications. *Cytogenet and genome research* 120: 339-350.
- Henderson A 1995 *The palms of the amazon*. Oxford University Press, New York. 362 pp.
- Hodel DR 1992 *Chamaedorea* palms. The species and their cultivation. The International Palm Society, Allen Press, Lawrence, Kansas.
- Jamsari A, I Nitz, SM Reamon-Büttner, C Jung 2004 BAC-derived diagnostic markers for sex determination in asparagus. *Theoretical Applied Genetics* 108: 1140-1146.
- Johnson MAT, AY Kenton, MD Bennett, PE Brandham 1989 *Voaniola gerardii* has the highest known chromosome number in the monocotyledons. *Genome* 32: 328-333.
- Khadka DK, A Nejidat, M Tal, A Golan-Goldhirsh 2002 DNA markers for sex: molecular evidence for gender dimorphism in dioecious *Mercurialis annua* L. *Molecular Breeding* 9: 251-257.
- Kuehl RO 2003 *Diseño de experimentos. Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación*. Thomson Learning, México.
- Meagher TR 1988 Sex determination in plants. *in*: JL Doust, LL Doust eds. *Plant reproductive ecology*. Oxford University Press, Inc., New York.
- Meagher TR, DE Costich 1994 Sexual dimorphism in nuclear DNA content and floral morphology in populations of *Silene latifolia* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* 81: 1198-1204.
- Moore HE, Jr., NW Uhl 1973 Palms and the Origin and Evolution of Monocotyledons. *The Quarterly Review of Biology* 48: 414-436.
- Navajas-Pérez R, R de la Herrán, GL González, M Jamilena, R Lozano, CR Rejón, MR Rejón, MA Garrido-Ramos 2005 The evolution of reproductive systems and sex-determining mechanisms within *Rumex* (Polygonaceae) inferred from nuclear and chloroplastidial sequence data. *Molecular Biology and Evolution* 22: 1929-1939.
- Otto F 1990 DAPI staining of fixed cells for high resolution flow cytometry in nuclear DNA. *in*: HA Crissman, Z Darzynkiewics eds. *Methods in cell biology*. Vol. 33. Academic Press, New York.
- Oyama K, R Dirzo 1991 Ecological aspects of the interaction between *Chamaedorea tepejilote*, a dioecious palm and *Calyptocephala marginipennis*, a herbivorous beetle, in a Mexican rain forest. *Principes* 35: 86-93.
- Palomino G, J Doležel, R Cid, I Brunner, I Méndez, A Rubluo 1999 Nuclear genome stability of *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae) regenerants induced by auxins in long-term in vitro culture. *Plant Science* 141: 191-200.
- Palomino G, Q Hermilo 1992 Karyotype analysis of three species of *Sabal*, L. (Palmae: Coryphoideae). *Cytologia* 57: 485-489.
- Palomino G, J Martínez, I Méndez 2008 Karyotype studies in cultivars of *Agave tequilana* Weber. *Caryologia* 61: 144-153.
- Palomino G, R Vázquez 1991 Cytogenetic studies in mexican population of species of *Crotalaria* L. (Leguminosae-Papilionoideae). *Cytologia* 56: 343-351.
- Read RW 1963 Palm chromosomes. *Principes* 7: 85-88.
- Read RW 1966 New chromosome counts in the Palmae. *Principes* 10: 55-61.
- Röser M 1994 Pathways of karyological differentiation in palms (Arecaceae). *Plant Systematics and Evolution* 189: 83-122.

- Röser M 1995 Trends in the karyo-evolution of palms. *in*: PE Brandham, MD Bennett eds. Kew Chromosome Conference IV. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Röser M, MAT Johnson, L Hanson 1997 Nuclear DNA amounts in palms (Arecaceae). *Botanica Acta* 110: 79-89.
- Sanchez-Ramos G, P Reyes-Castillo, A Mora Olivo, J Guadalupe Martinez-Avalos 2010 Study of herbivory on the radicalis palm (*Chamaedorea radicalis*) Mart., in the Sierra Madre Oriental of Tamaulipas, Mexico. *Acta Zoologica Mexicana Nueva Serie* 26: 153-172.
- Siljak-Yakovlev S, S Benmalek, M Cerbah, T Coba de la Peña, N Bounaga, SC Brown, A Sarr 1996 Chromosomal sex determination and heterochromatin structure in date palm. *Sexual Plant Reproduction* 9: 127-132.
- Tapia-Pastrana F, P Mercado-Ruaro 2001 A combination of the "Squash" and "Splash" techniques to obtain the karyotype and assess meiotic behavior of *Prosopis laevigata* L. (Fabaceae: Mimosoideae). *Cytologia* 66: 11-17.
- Uhl NW, J Dransfield 1987 *Genera palmarum*. Allen Press, Lawrence, Kansas. 610 pp.
- Zar JH 1996 *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey.

DISCUSIÓN GENERAL

El dimorfismo sexual en plantas dioicas y adultas ha sido ampliamente estudiado (Lloyd y Webb, 1977; Obeso, 2002; Obeso y Retuerto, 2002). En este estudio, los resultados sugieren que dimorfismo que existe en los patrones de asignación a la reproducción entre las plantas masculinas y femeninas de las especies de estudio, generan diferencias muy marcadas en los patrones de asignación de recursos al crecimiento y la defensa.

Las plantas masculinas y femeninas de las especies de estudio adoptan distintas estrategias de vida. Por una parte, las plantas masculinas invierten una menor cantidad de biomasa a la reproducción y esto les permite tener una tasa de crecimiento más acelerada. A diferencia de las plantas femeninas que destinan más recursos a la reproducción, lo que limita su tasa de crecimiento. Ante la limitación de recursos disponibles para crecer, las plantas femeninas destinan una mayor cantidad de recursos para proteger su follaje en relación a lo que destinan las plantas masculinas. Consecuentemente, las hojas con una alta concentración de compuestos secundarios resultaron mejor defendidas y fueron menos consumidas por los herbívoros. Es decir, las plantas masculinas emplean una estrategia de vida muy diferente a la estrategia de vida utilizada por las plantas femeninas.

Se han propuesto varias teorías para explicar los patrones de defensa y herbivoría en la naturaleza, incluyendo la hipótesis de la apariencia (Feeny, 1976), de la disponibilidad de recursos (Coley *et al.*, 1985), la hipótesis del vigor (Price, 1991), la hipótesis del balance Carbono-Nutrientes (Bryant *et al.*, 1983) y la hipótesis de la diferenciación-crecimiento (Herms y Mattson, 1992).

Recientemente la hipótesis de la disponibilidad de los recursos fue puesta a prueba en un meta-análisis de 50 estudios que examinan el crecimiento, la defensa y la herbivoría.

Los resultados confirmaron la antigua teoría, las especies adaptadas a ambientes pobres en recursos crecen más lentamente, invierten más en defensas constitutivas (metabolitos secundarios de alto peso molecular) y presentan una menor herbivoría que las especies que crecen en ambientes con abundancia de recursos (Endara y Coley, 2011). En este estudio solamente hicimos comparaciones entre sexos de una misma especie. Sin embargo, son evidentes las diferencias intersexuales en crecimiento, defensa y herbivoría en la dirección interespecífica que Coley y colaboradores (1985) proponen. Los patrones de defensa intersexual con una teoría que fue desarrollada para especies de forma de vida contrastante son consistentes con los de mi sistema de estudio.

Los resultados en plantas pre-reproductivas sugieren que los conflictos de asignación de recursos podían manifestarse después de que ha comenzado la reproducción. Aparentemente, no hay un comportamiento marcadamente bimodal en el grueso de los datos, que nos sugiera que hay dos conjuntos de individuos con distintas tasas de crecimiento a semejanza de lo que ocurre en las plantas adultas. Esto sugiere que las plantas pre-reproductivas femeninas crecen a la misma tasa de crecimiento que las plantas masculinas. Igualmente, las plantas femeninas producen cantidades semejantes de metabolitos secundarios a los que producen las plantas masculinas.

Los metabolitos secundarios han sido de gran relevancia, algunos de estos compuestos pudieron presentarse en las primeras angiospermas y les proporcionaron cierta protección contra los fitófagos (Ehrlich y Raven, 1964). Algunos autores afirman que la defensa vía compuestos secundarios constituye una forma de protección efectiva contra los herbívoros (Bennett y Wallsgrave, 1994). Sin embargo, algunos estudios recientes han cuestionado este supuesto al no encontrar una asociación entre las concentraciones de metabolitos secundarios y la susceptibilidad a la herbivoría (Carmona *et al.*, 2011). No

obstante, la producción de metabolitos es costosa y sólo se justifica una inversión en defensas de alto costo, si los herbívoros constituyen un desafío ecológico importante que conduzca a un cociente costo/beneficio positivo (Feeny, 1976). Se ha calculado, que el costo de construcción (cantidad de moléculas, o gramos de glucosa requeridas para construir 1 g de compuesto de estructura dada) para la formación de fenoles solubles es de 2.6 g de glucosa por g de compuesto elaborado. Este es el costo de construcción más elevado después de los lípidos, que es 3.03 g de glucosa (Lambers y Rytcher, 1989). En plantas pre-reproductivas, la reproducción no ha comenzado y posiblemente no existe aún un riesgo ecológico importante para las plantas femeninas que promueva el aumento en la producción de metabolitos secundarios.

La identificación del género de las plantas pre-reproductivas no fue posible por la cuantificación de ADN. No se descarta la presencia de cromosomas sexuales. No obstante es aconsejable el empleo de otras metodologías como el uso de marcadores moleculares. En este estudio empleamos el patrón de distribución de una muestra grande de plantas como una alternativa para el estudio de los patrones de asignación en plantas pre-reproductivas.

“En efecto, la “interfase” planta-herbívoro puede ser la mayor zona de interacción responsable para generar la diversidad orgánica terrestre”, afirmaron Ehrlich y Raven (1964). En este estudio, se obtuvo que la pérdida de área foliar puede afectar a corto plazo el crecimiento de las plantas femeninas y la formación de estructuras reproductivas en ambos sexos. Asimismo, obtuvimos que existe dimorfismo, las plantas femeninas invierten más recursos en la reproducción sexual y la defensa y las plantas masculinas invierten más energía en el crecimiento vegetativo. Este patrón de asignación posiblemente permite un uso más eficiente de los recursos en plantas con sexos separados y cuya asignación a la reproducción representa un alto costo energético. Muy posiblemente, la presencia de dos

estrategias de crecimiento y defensa, sea la mejor forma de optimizar la adecuación (Harper, 1979; Stearns, 1992).

LITERATURA CITADA

- Bennett, R.N., y Wallsgrave, R.M. (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist*, 127, 617-633.
- Bryant, J.P., Chapin III, F.S., y Klein, D.R. (1983) Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos*, 40, 357-368.
- Carmona, D., Lajeunesse, M.J., y Johnson, M.T.J. (2011) Plant traits that predict resistance to herbivores. *Functional Ecology*, 25, 358-367.
- Coley, P.D., Bryant, J.P., y Chapin, F.S. (1985) Resource availability and plant antiherbivore defense. *Science*, 230(4728), 895-899.
- Ehrlich, P.R., y Raven, P.H. (1964) Butterflies and plants: a study in coevolution. En *Foundations of ecology classic papers with commentaries* (L.A. Real, y J.H. Brown, eds), Chicago: The University of Chicago Press, pp. 362-384.
- Endara, M.-J., y Coley, P.D. (2011) The resource availability hypothesis revisited: a meta-analysis. *Functional Ecology*, 25, 389-398.
- Feeny, P.P. (1976) Plant apparency and chemical defense. En *Coevolution of animals and plants* (L.E. Gilbert, y P.H. Raven, eds), Austin, Texas: Texas University Press., pp. 3-19.
- Harper, J.L. (1979) *Population biology of plants*. E.U.A.: Academic Press, pp.
- Herms, D.A., y Mattson, W.J. (1992) The dilemma of plants: to grow or defend. *The Quarterly Review of Biology*, 67(3), 283-335.
- Lambers, H., y Rytcher, A. (1989) The biochemical background of variation in respiration rate: Respiratory pathways and chemical composition. En *Causes and consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants* (H. Lambers, M.L. Cambridge, H. Koning, y T.L. Pons, eds): SPB Academic Publishing: The Hague, pp. 199-225.
- Lloyd, D.G., y Webb, C.J. (1977) Secondary sex characters in plants. *Botanical Review*, 43(2), 177-216.
- Obeso, J.R. (2002) The costs of reproduction in plants. *New Phytologist*, 155(3), 321-348.
- Obeso, J.R., y Retuerto, R. (2002) Sexual dimorphism in holly *Ilex aquifolium*: cost of reproduction, sexual selection or physiological differentiation? *Revista Chilena de Historia Natural*, 75, 67-77.
- Price, P.W. (1991) The plant vigor hypothesis and herbivore attack. *Oikos*, 62, 244-251.
- Stearns, S.C. (1992) *The evolution of life histories*. Oxford: Oxford University, pp.



Lámina 1. A) *Chamaedorea alternans*, B) *Chamaedorea pinnatifrons*, C) *Chamaedorea ernesti-augusti*. D) Plantas femenina (D) y masculina (E) de *Chamaedorea alternans*. F) Larva de coleóptero (*Calypthocephala marginipennis*) y daño foliar causado por esta larva (G). H) *Calypthocephala marginipennis* en estadio adulto.



Lámina 2. A) Medición del diámetro a la altura de la base en *C. alternans*. B) Registro de la longitud foliar en *Chamaedorea ernesti-augusti*. C) Iluminación de la lámina foliar en las mediciones de bióxido de carbono. D) Medición de la tasa de respiración en las estructuras reproductivas de *C. alternans* empleando un analizador de gases por rayos infrarrojos.