

Fuentes de variación en el tamaño de la semilla de la herbácea perenne *Helleborus foetidus* L. (Ranunculaceae)

por

José L. Garrido¹, Pedro J. Rey² & Carlos M. Herrera³

¹Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Jaén, 23071 Jaén, España. jlgasa@usc.es
(autor correspondencia)

²Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Universidad de Jaén, 23071 Jaén, España. prey@ujaen.es

³Estación Biológica de Doñana, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 41080 Sevilla, España. herrera@ebd.csic.es

Resumen

El tamaño de la semilla ha sido uno de los rasgos vegetales más estudiados por su posición ecológica pivotante entre los procesos de dispersión y los procesos de emergencia, supervivencia y establecimiento de especies. Frecuentemente, la mayor parte de la variación en este rasgo se localiza dentro de la planta y supera a la variación entre plantas y entre poblaciones, y se ha propuesto que la adjudicación de recursos de la planta y el tipo de polinización son las principales fuentes de tal variación. Este trabajo explora la variación en la masa de la semilla de *Helleborus foetidus* y evalúa la importancia relativa de las posibles causas de tal variación. En dos poblaciones de la especie muestreamos exhaustivamente el peso de la semilla, descomponiendo su variación en los sucesivos niveles de población, planta, flor, carpelo y variación dentro de carpelo. Nuestros resultados confirman que la mayor parte de la variación reside dentro de la propia planta. Entre los posibles factores susceptibles de generar variación a este nivel nuestro estudio sugiere que son los relacionados con cuestiones de adjudicación de recursos los que influyen mayoritariamente. En particular, los resultados apuntan hacia un papel relevante de la función floral post-antesis en la adjudicación de recursos a las semillas. A falta de investigación experimental al respecto, sugerimos que dicha función puede basarse en la capacidad fotosintética que tiene el periantio de la flor de *Helleborus foetidus*. Por otra parte, algunas variables relacionadas con el esfuerzo reproductivo de la planta contribuyen a explicar una parte importante de la variación entre plantas en peso medio de semillas. En particular, parte de la variación a este nivel se debe a un compromiso entre producción y tamaño de la semilla y, probablemente, a costes asociados con el tipo de polinización.

Palabras clave: actividad fotosintética floral, análisis de vías, costes reproductivos, diseños anidados, fuentes de variación, función floral post-antesis, *Helleborus foetidus*, tamaño de semilla, variación dentro de planta.

Abstract

Seed size is one of the plant traits more thoroughly studied in plant sciences due to its pivoting ecological position between dispersal processes and emergence, survival and establishment of plant species. Frequently, most seed size variation is located within plant, exceeding variation between plants and between populations. Resource allocation and type of pollination are some of the main causes of within-plant variation in seed mass. This work explores seed mass variation in *Helleborus foetidus* trying to assess the relative importance of its possible causes. We thoroughly sampled seed size in two hellebore populations by partitioning its variance in the hierarchic levels of population, plant, flower, carpel, and within carpel. Our results show that the most important source of variance is the within-plant variation. Among the factors most likely responsible for variability at this level, our study suggests that resource allocation exerted the strongest influence. In particular, some evidence points towards a relevant role of the post-anthesis flower functionality on the resource allocation to seeds. Although needing further experimental research, we suggest that such functionality is due to the photosynthetic ability of the perianths of *Helleborus foetidus* flowers. Some variables related to the reproductive effort accounted for the between-plant variation in mean seed mass. Particularly, a trade-off between seed mass and seed production and the costs related to the pollination type are also contribute to the variation of seed size at this level.

Keywords: *Helleborus foetidus*, nested designs, path analysis, photosynthetic floral ability, post-anthesis floral function, reproductive costs, seed size, sources of variation, within-plant variation.

Introducción

El tamaño de la semilla es considerado como uno de los rasgos vegetales de mayor relevancia ecológica y, consecuentemente, ha sido uno de los más profundamente estudiados. Su importancia radica en ser un rasgo que ocupa una posición pivotante en la ecología de las plantas, al estar asociado tanto con la capacidad de las especies de dispersarse y establecerse (Willson, 1983; Westoby & al., 1992, 1996; Leishman & al., 2000) como con características de la planta como la probabilidad de emergencia, establecimiento y supervivencia, la forma de crecimiento y la altura (Jurado & al., 1991; Leishman & Westoby, 1994; Leishman & al., 1995; Alexander & al., 2001).

Aunque a menudo es considerado como uno de los parámetros reproductivos más constantes de las plantas (Fenner, 1985; Susko & Lovett-Doust, 2000), la realidad es que existe una importante variación asociada al tamaño de la semilla (Wolf & al., 1986; Michaels & al., 1988; Leishman & al., 2000). Esta variación se ha puesto de manifiesto entre poblaciones, entre años y entre individuos, pero la más substancial es la detectada dentro de plantas individuales (Thompson, 1984; Michaels & al., 1988; Stöckling & Favre, 1994; Vaughton & Ramsey, 1997, 1998).

La variación en el tamaño de las semillas de una misma planta establece un importante marco de estudio por diversas razones. Según predice la teoría, las plantas deben proveer a todas las semillas de la misma cantidad de recursos y tender a producir semillas de un único tamaño óptimo, por lo que, ante fluctuaciones en la disponibilidad de recursos, las plantas optarían por modificar el número de semillas antes que su peso (Smith & Fretwell, 1974; McGinley & al., 1987; Haig & Westoby, 1988). Además, la notable variación existente en el tamaño de la semilla se muestra inconsistente con la evidencia empírica de una fuerte selección direccional hacia semillas de tamaños grandes (Mazer, 1987; McGinley & al., 1987; Winn, 1988). La ventaja de esta selección residiría en que semillas más grandes dan a las plántulas más ventajas de cara a la germinación, establecimiento y supervivencia (Herre & al., 1994; Leishman & Westoby, 1994; Jakobsson & Eriksson, 2000; Susko & Lovett-Doust, 2000; Paz & Martínez-Ramos, 2003; Alcántara & Rey, 2003, entre otros). Habida cuenta de la importancia que para la eficacia biológica de las plantas tiene el tamaño de la semilla, es importante conocer cuáles son los mecanismos y factores responsables de su variación.

Por un lado, la variación en el tamaño de la semilla dentro de planta puede tener un carácter adaptativo. Entre las razones para ello están las respuestas que dicha variación ofrece ante ambientes variables (Harper

& al., 1970; Janzen, 1977, 1978, 1982; Leishman & al., 2000; Hereford & Mirouchi, 2005) y ante el compromiso en las presiones selectivas que ejercen, por un lado, los dispersantes y, por otro, el ambiente de germinación y desarrollo de las plántulas (Alcántara & Rey, 2003; Gómez, 2004). La ausencia de una fuerte selección o su variabilidad temporal, estarían también directamente implicadas en el mantenimiento de la variabilidad en el tamaño de la semilla (Pitelka & al., 1983; Thompson, 1984). En este orden de cosas, Gritz (1995) cataloga de Estrategia Evolutivamente Estable a todos los mecanismos que contribuyen a mantener esta variabilidad, mecanismos que podrían actuar tanto antes de que se establezca un tamaño óptimo definitivo, como después.

Por otra parte, la variabilidad genética entre plantas constituye también un factor de gran relevancia en la variación en el tamaño de la semilla. La variación genética entre individuos está directamente implicada en la evolución de este carácter y en muchas ocasiones subyace al resto de factores implicados (Stanton, 1984; Temme, 1986; Wolfe, 1995). Además, la varianza en el tamaño de la semilla puede ser el resultado de cuestiones relacionadas con la adjudicación de recursos que la planta hace a cada una de sus estructuras jerárquicas (Gutterman, 1992; Méndez, 1997; Vaughton & Ramsey, 1997, 1998), que puede redundar en la incapacidad por parte de la planta madre de proveer a todas sus semillas de igual cantidad de recursos. Esta incapacidad puede ser debida a restricciones físicas o fisiológicas asociadas a la posición de los frutos en la planta (Schaal, 1980; Waller, 1982; Gutterman, 1992; Méndez, 1997), o de las semillas dentro de los frutos; y también puede deberse a cambios temporales en el entorno físico o fisiológico de la planta (Cook, 1975; Cavers & Steel, 1984). Por último, el tipo de polinización (Richards, 1986; Jordano, 1993) y los costes asociados a ésta (Sakai & Sakai, 1996) también han sido propuestos entre los factores que afectan a la variabilidad en tamaño de la semilla, de forma que normalmente es de esperar que la xenogamia produzca semillas de mayor tamaño que las producidas por autogamia (Manasse & Stanton, 1991; Wolfe, 1995).

Tal y como se ha reflejado, el origen de la variabilidad en el tamaño de la semilla depende de diversos factores que, aunque lejos de ser mutuamente excluyentes, sí que pueden predominar unos sobre otros. A lo largo de este trabajo se tratará de cuantificar la magnitud de la variación en el tamaño de las semillas de *Hebeborus foetidus* y de valorar la importancia relativa de los procesos ecológicos y evolutivos responsables de generar esta variabilidad. Para ello se efectúa una partición de la varianza según los sucesivos niveles jerár-

quicos de carpelo, fruto, planta y población. La variabilidad en el peso de las semillas de una misma planta, niveles carpelo y fruto, suele estar relacionada con patrones de adjudicación de recursos de la planta y, además, con el tipo de polinización y los costes asociados a ésta (ver referencias citadas con anterioridad). La variación entre plantas dentro de una misma población indica normalmente diferencias genéticas (Temme, 1986; Stanton, 1984; pero véase Wolfe, 1995) y/o microambientales entre las plantas de una misma localidad (Vaughton & Ramsey, 1998, pero véase Halpern, 2005). Por último, la variación entre distintas localidades puede revelar diferencias ambientales, diferencias en el servicio de los polinizadores y en los niveles de autopolinización espontánea, además de poder estar relacionada con una posible diferenciación genética del tamaño de la semilla entre localidades (Thompson, 1984; Winn, 1991; Obeso, 1993; Stöckling & Favre, 1994; Vaughton & Ramsey, 1997, 1998).

Material y métodos

Especie y área de estudio

Helleborus foetidus L. (Ranunculaceae), heléboro en adelante, es una planta herbácea rizomatosa perenne ampliamente distribuida por Europa occidental (Werner & Ebel, 1994). En la Península Ibérica la especie aparece principalmente en el sotobosque de bosques caducifolios y mixtos y en hábitat abiertos de matorral disperso. Cada planta adulta se compone de uno o varios vástagos que desarrollan una inflorescencia terminal al cabo de 3-5 años. La especie florece en invierno (de enero a marzo), madura sus frutos de marzo a junio y los carpelos liberan las semillas en junio-julio. El periantio de la flor persiste después de la antesis, permaneciendo de color verde. Dicho color se pierde cuando el fruto (también verde) madura, tornándose entonces amarilla. Las flores son apocárpicas, con 1-5 carpelos (normalmente 2-3), y cada carpelo contiene 10-15 semillas con elaiosoma, un apéndice fundamentalmente lipídico que es atractivo para las hormigas (ver Herrera & al., 2001, 2002 para más detalles sobre la especie).

El estudio se llevó a cabo en tres localidades de la provincia de Jaén. Dos de las localidades, concretamente el "Puerto de La Mata" (37°44'N 3°28'W, 1650 m) y "La Pasaila" (37°43'N 3°30'W, 1440 m), están enclavadas en Sierra Mágina, mientras que la tercera localidad, el "Collado de Góntar" (38°16'N 2°32'W, 1550 m), se halla en la Sierra de Segura. La vegetación dominante en Puerto de la Mata y en Collado de Góntar es un matorral parcheado abierto mediterráneo de media-alta montaña, con predominancia de especies arbustivas como *Berberis hispanica*, *Rosa*

canina y *Crataegus monogyna*. La Pasaila se enclava en un bosque mixto de *Quercus ilex* ssp. *ballota* y *Quercus faginea*. Las localidades serán denominadas "Mágina Abierto", "Segura" y "Mágina Bosque", respectivamente, de aquí en adelante.

Patrón general de variación natural en el peso de la semilla

Tanto en Mágina Abierto como en Segura se escogieron 30 plantas y tomamos 5 frutos (con dos o más carpelos cada uno) de cada una de ellas. De cada carpelo se pesó la mitad, elegida al azar, de sus semillas cuajadas. Las diásporas fueron recolectadas de carpelos en el estadio final de maduración y posteriormente contadas y clasificadas según los sucesivos niveles jerárquicos de carpelo, fruto, planta y población. El número total de semillas pesadas fue de 4425 correspondientes a 60 plantas procedentes de dos poblaciones distintas. Después se secaron en estufa a 60 °C hasta peso constante, para obtener el peso seco de la diáspora completa. Seguidamente, se les eliminó el elaiosoma para obtener el peso de la semilla (PSEM), que será nuestra estima del tamaño de la semilla.

Esfuerzo reproductivo y peso medio de las semillas por planta

Para explorar esta relación se usaron plantas de las poblaciones de Mágina Abierto (20 plantas) y Mágina Bosque (14 plantas). A cada planta se le estimó la producción total de semillas (PROD) como el producto del número de frutos por planta, el número medio de carpelos por fruto y el número de semillas producidas por carpelo. El número de flores por planta se contó al inicio de la fase reproductiva para evitar pérdidas por determinados factores, como la herbivoría floral. Además de la producción total, se estimaron otros parámetros del esfuerzo reproductivo de la planta, como el número medio de óvulos por carpelo (NOVC), la proporción de carpelos que finalmente maduraron y produjeron semillas con respecto a los carpelos que inicialmente tenía la flor (Carpel Set, en adelante) y la proporción de semillas cuajadas respecto a los óvulos producidos por carpelo (Seed Set, en adelante).

Análisis de datos

La exploración del patrón natural de variación del tamaño de la semilla se llevó a cabo ajustando un Modelo Lineal Mixto a los datos observacionales mediante el módulo MIXED de SAS (SAS Institute, 1996), módulo que nos permite trabajar simultáneamente con factores aleatorios y fijos. El procedimiento empleado para el ajuste del modelo fue el de Restricted

Maximum Likelihood (REML). Se usó concretamente éste para evitar los problemas que se derivan de la naturaleza no balanceada de los diseños jerárquicos en la partición de la varianza (Searle & al., 1992; Underwood, 1997; Quinn & Keough, 2002). La varianza total del peso de las semillas fue descompuesta mediante un diseño anidado en el que se consideraron los efectos jerárquicos de localidad, planta (localidad), fruto (planta), carpelo (fruto) y dentro de carpelo.

La influencia del número de semillas por carpelo, por fruto y por planta sobre el tamaño de las semillas se exploró mediante análisis de covarianza. En dichos análisis se comprobó previamente la existencia de homogeneidad de pendientes en la relación entre la covariable y cada uno de los niveles del factor categórico correspondiente. La existencia de dicha homogeneidad condiciona el tipo de análisis de covarianza que hay que realizar. En caso de no existir se procedería con un modelo clásico de ANCOVA y en caso contrario con un modelo de pendientes separadas (ver Tabla 2).

La relación entre las distintas variables usadas para describir el esfuerzo reproductivo de la planta y el peso de la semilla fue analizada mediante un Modelo de Ecuación Estructural (SEM) y análisis de vías ("Path

analysis"). La hipótesis expresada en el modelo es comprobada mediante un test de bondad de ajuste que compara la matriz de covarianza observada con la esperada si el modelo fuera correcto. Si el resultado del test de bondad de ajuste no es estadísticamente significativo ($P > 0.05$), el modelo es indistinguible del patrón observado y describe adecuadamente la relación entre las variables. El análisis se realizó con el módulo SEPATH de STATISTICA (Statsoft, Inc., 2001), usando Maximum Likelihood como función de discrepancia. Puesto que el número de casos (plantas) considerados fue relativamente bajo ($n = 34$), los coeficientes de vías y su significación estadística fueron obtenidos mediante estimas bootstrap (*bias-corrected percentile limits*, Manly 1998) tras 1000 iteraciones.

Resultados

Patrón de variación natural en el tamaño de la semilla

Considerando el conjunto de semillas individuales, el peso de la semilla varió entre 5,10 y 18,13 mg, mientras que el peso medio de la semilla por planta varió entre 5,17 y 12,81 mg (consideradas todas las plantas independientemente de la población de pertenencia). La distribución de tamaños de semilla individuales estuvo ligeramente sesgada hacia valores menores de los esperados ($N = 4154$, $G_1 = 0,225 \pm 0,036$, $t = 6,11$, $P < 0,05$), indicando que hay menos semillas de tamaños grandes que las esperadas según la distribución normal (Fig. 1). La distribución también mostró un coeficiente de curtosis significativo ($N = 60$, $G_2 = 1,555 \pm 0,073$, $t = 21,12$, $P < 0,05$), lo que nos muestra que hay más semillas agrupadas en torno a la media que las esperadas por la distribución normal.

Tabla 1. ANOVA anidado del peso de la semilla. Se muestra el porcentaje de varianza asociada a cada una de estas fuentes. El término residual explica la variación dentro de carpelo.

Factores aleatorios	Wald-Z	P	% varianza
Localidad	0,67	0,2526	19,0
Planta (localidad)	4,39	<0,0001	29,0
Fruto (planta localidad)	9,56	<0,0001	27,6
Carpelo (fruto planta localidad)	4,66	<0,0001	2,1
Residual (dentro de carpelo)	43,37	<0,0001	22,3

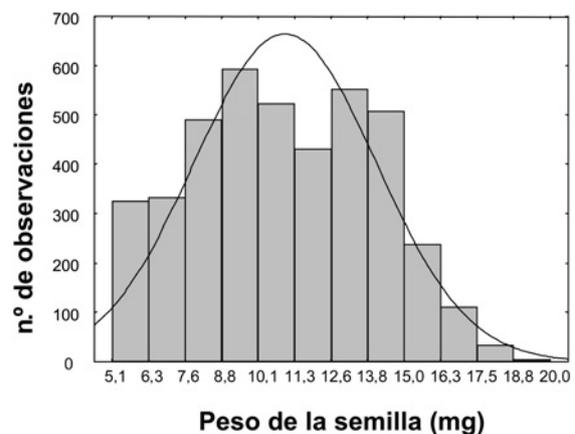
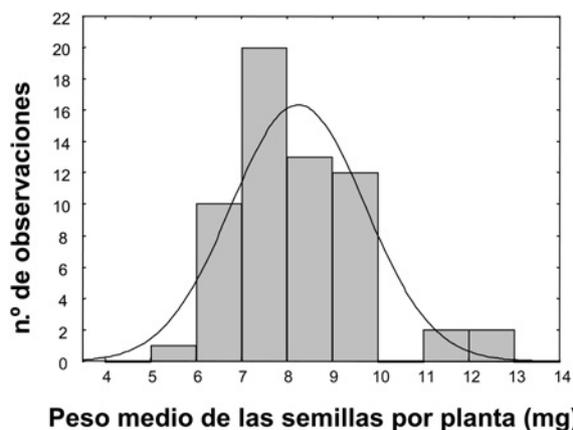


Fig. 1. Distribución de frecuencias del peso de las semillas. Se muestra la distribución para el total de semillas y para el peso medio de las semillas por planta.

El patrón de variación natural mostrado por las semillas de heléboro, reflejado en la Tabla 1, muestra como dentro de una misma población la variación entre plantas explica de modo significativo un gran porcentaje de la varianza total (29%), mientras que la varianza debida a diferencias entre poblaciones es sensiblemente menor (19%) y no resultó significativamente distinta de cero. La mayor parte de la variación ocurre, sin embargo, dentro de plantas (52%) y es explicada de modo significativo por las diferencias entre frutos de la misma planta (27,6%), por las diferencias entre carpelos del mismo fruto (2,1%) y por las diferencias dentro de carpelos (22,3%).

Variación dentro de planta

Dentro de planta se pueden concebir al menos tres niveles distintos de variación del peso de las semillas: frutos distintos de una planta, carpelos distintos de un mismo fruto y dentro de carpelo. Un primer factor que podría influir sobre tal variación es la adjudicación diferencial de recursos en cada uno de esos tres niveles, adjudicación que es el resultado del producto de número de semillas por el peso de las semillas. Por tanto se puede explorar si tal adjudicación genera la variación observada mediante el examen de la influencia que el número de semillas tiene sobre el peso de éstas a distintos niveles jerárquicos de la planta (Tabla 2). En resumen, los análisis realizados para estudiar la influencia del número de semillas sobre el peso de la semilla en niveles encajados dentro de la planta concluyeron que a nivel de fruto (columna B en la Tabla 2), el número de semillas (NSF) no incidió sobre su peso, mientras que, a nivel de carpelo (columna A),

el número de semillas sí afectó al peso medio de las semillas, aunque su efecto no fue igual para todos los frutos de una misma planta [efecto de interacción significativo: NSC*Fruto (planta)]. El análisis a nivel de planta (columna C) sugiere también un efecto marginal ($P = 0,05$) del número de semillas producido por la planta (NSP) sobre el peso medio de las semillas por planta, que es analizado con más detenimiento a continuación.

Esfuerzo reproductivo y peso de la semilla

El modelo que relaciona distintas variables del esfuerzo reproductivo con el peso medio de las semillas (Fig. 2), propone que tres variables del esfuerzo reproductivo, producción de semillas (PROD), Seed Set (SSET) y Carpel Set (CSET), inciden directamente sobre el peso medio de las semillas (PSEM), mientras que el número de óvulos por carpelo (NOVC) lo haría indirectamente a través de su incidencia en el

Tabla 3. Efectos directos (ED) y totales (ET) sobre las variables dependientes en el SEM. Los efectos significativos se resaltan en negrita. r^2 indica el tanto por uno de varianza explicada para cada variable dependiente. Acrónimos de las variables referidos a la Figura 2.

V. Independientes	Variables dependientes				
	SSET	PROD		PSEM	
	ED	ED	ET	ED	ET
NOVC	-0,30	-	-0,14	-	0,08
SSET	-	0,49	0,49	-0,11	-0,28
CSET	-	-0,09	-0,09	0,42	0,45
PROD	-	-	-	-0,35	-0,35
r^2	0,11	0,30		0,45	

Tabla 2. ANCOVAs para explorar, a distintos niveles jerárquicos dentro de planta, el efecto del número de semillas sobre el peso de las semillas. Nótese que los efectos que es posible explorar con cada variable dependiente son distintos, así como distinto es el significado de los residuos. NSC = número de semillas por carpelo, NSF = número de semillas por fruto, NSP = número de semillas por planta. Nótese también que (A) es un modelo de heterogeneidad de pendientes, mientras que (B) y (C) son modelos con homogeneidad de pendientes, puesto que, en estos dos últimos casos, análisis previos mostraron que no existía interacción del número de semillas y el peso de la semilla al nivel considerado (ver Métodos, sección de Análisis de datos). Las celdas vacías de la tabla, marcadas con guiones, corresponden a efectos no aplicables en el análisis de la columna correspondiente (A, B o C).

	Variable dependiente					
	(A) Peso medio de semilla por carpelo		(B) Peso medio de semilla por fruto		(C) Peso medio de semilla por planta	
Factores aleatorios	Wald-Z	P	Wald-Z	P	Wald-Z	P
Localidad	0,67	0,2522	0,67	0,2520	0,64	0,2601
Planta (localidad)	4,06	<0,0001	3,97	<0,0001	-	-
Fruto (planta)	3,44	0,0003	-	-	-	-
NSC * Fruto (planta)	2,40	0,0082	-	-	-	-
Residuos	12,28	<0,0001	10,79	<0,0001	5,34	<0,0001
Covariable						
NSC	0,65	0,4215	-	-	-	-
NSF	-	-	0,59	0,4425	-	-
NSP	-	-	-	-	3,93	0,0524

Seed Set. Además, la producción de semillas estaría afectada directamente por el Seed Set y Carpel Set y, por tanto, ambos tienen también una influencia indirecta sobre el peso de la semilla. El test de bondad de ajuste ($\chi^2 = 3,09$, $df = 3$, $P = 0,37$) indica que el modelo describe adecuadamente las relaciones entre las variables y, por tanto, corrobora la hipótesis subyacente de cómo el peso de la semilla es afectado por distintas variables del esfuerzo reproductivo.

El modelo explicó el 45% de la varianza en el peso medio de las semillas, que resultó directa y negativamente afectado por la producción total de semillas de la planta y positivamente por el Carpel Set. Además, el Seed Set afectó positivamente a la producción y, por tanto, indirecta y negativamente al peso de la semilla. El efecto total sobre el peso de la semilla del Carpel Set fue mayor que el de la producción de semillas y el del Seed Set (Tabla 3). Finalmente, el número de óvulos por carpelo afectó negativamente al Seed Set y, a través de la ruta indirecta anteriormente comentada, tuvo un efecto positivo significativo sobre el peso de la semilla.

Discusión

Patrón natural de variación

El rango de variación del peso de las semillas de heléboro fue considerablemente amplio. El peso de las

semillas más pesadas fue casi 4 veces el de las más pequeñas, mientras que el peso medio de las semillas por planta fue más de dos veces mayor para las plantas con semillas más grandes que para aquellas con semillas más pequeñas. La consideración de más poblaciones y áreas geográficas amplía aún más el rango de variación del peso medio de las semillas (Garrido & al., 2002). Por tanto, se puede concluir que existe una gran variación del tamaño de la semilla en esta especie, lo que puede tener importantes implicaciones ecológicas y evolutivas. Nuestros resultados muestran que la variación más substancial en el peso de las semillas de heléboro se debe a las diferencias dentro de planta, que en conjunto explican el 52% de la varianza total. Diversos estudios han mostrado variaciones en peso de la semilla debidas a diferencias entre poblaciones, entre años y entre plantas, pero las más substanciales suelen ser las detectadas dentro de planta (Thompson, 1984; Wolf & al., 1986; Michaels & al., 1988; Obeso, 1993; Stöckling & Favre, 1994; Vaughton & Ramsey, 1997, 1998; Susko & Lovett-Doust, 2000). Esto indica que los procesos que influyen la variabilidad en el tamaño de la semilla operan fundamentalmente dentro de planta.

La variación entre plantas dentro de una misma población fue también claramente significativa y explicó una parte importante de variación en el peso de la semilla. Este tipo de diferencias son habitualmente indi-

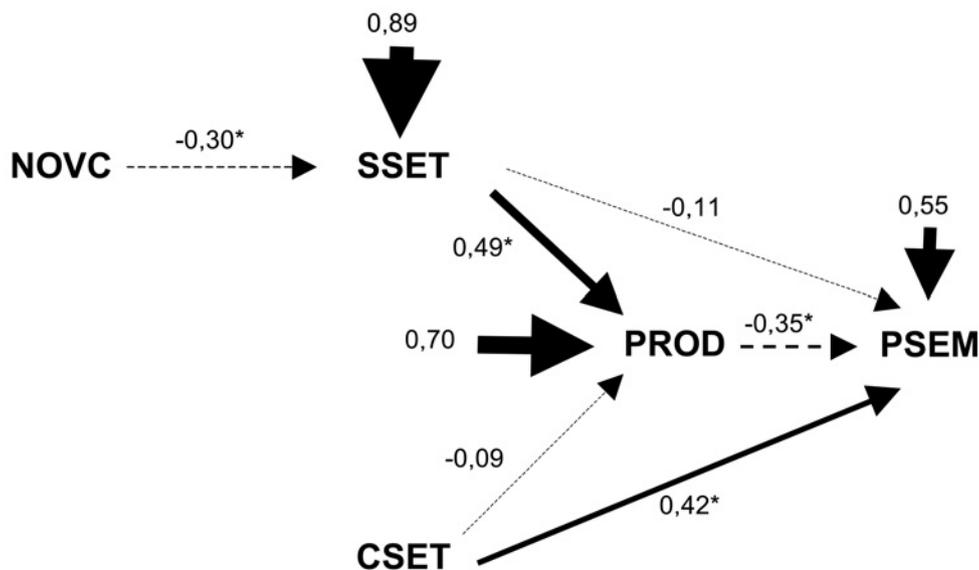


Fig. 2. Modelo de ecuación estructural explorando la relación entre el número medio de óvulos por carpelo (NOVC), Seed Set medio (SSET), Carpel Set medio (CSET), producción total por planta (PROD) y peso medio de la semilla (PSEM), basado en valores correspondientes a $N = 34$ plantas individuales. Los coeficientes de vías que resultaron significativamente distintos de cero tras estimas bootstrap se muestran con un asterisco. Tests previos de homogeneidad de pendientes (datos no mostrados) indicaron que la pendiente de la relación de cada variable con el peso de la semilla (variable dependiente) no difería entre localidades, por lo que para dar mayor robustez al análisis se agruparon las plantas de ambas poblaciones. Las flechas con trazo continuo muestran efectos positivos, y las de trazo discontinuo, efectos negativos. El grosor de cada flecha es proporcional al valor del coeficiente de vía.

cativas de diferencias genéticas (Temme, 1986; Stanton, 1984; pero ver Wolfe, 1995) y/o microambientales entre las plantas de una misma localidad (Vaughton & Ramsey, 1998, pero ver Halpern, 2005).

Variación en el peso de la semilla dentro de planta

La bibliografía disponible (ver referencias en Introducción) sugiere dos causas principales para la variación del peso de la semilla dentro de planta. Por un lado, un problema de adjudicación de recursos a distintos niveles encajados de la planta, y por otro, el tipo de polinización y sus costes. Para valorar la importancia de estas causas es útil la exploración de la varianza que existe dentro de cada uno de los niveles encajados dentro de planta. Nuestros resultados muestran que el peso de la semilla dentro de planta varió entre frutos, entre carpelos del mismo fruto y dentro de carpelo.

Variación entre flores/frutos: La variación entre frutos de la misma planta fue la mayor fuente de variación en el peso de la semilla (27,6% de la variación). Tanto factores relacionados con la adjudicación de recursos como el tipo de polinización que sufra cada flor pueden contribuir a esta variación. En lo que se refiere a la adjudicación de recursos, puede resultar particularmente interesante la existencia de un cierto grado de autonomía de la flor/fruto para generar recursos propios con que proveer a sus semillas. Si el fruto tuviera un cierto grado de autonomía en la adjudicación de recursos a las semillas que produce, podría interferir con el patrón de adjudicación de recursos impuesto por la planta. De hecho, si la planta controlara totalmente el reparto de recursos entre sus flores/frutos (y asumiendo una adjudicación equitativa de recursos a distintos frutos), el número de semillas producidas por un fruto afectaría a, o estaría relacionado con, el peso medio de éstas. Dicho de otra manera, la existencia de tal relación podría interpretarse también como una prueba de la inexistencia de un fuerte control a nivel floral del reparto de recursos entre sus semillas. En nuestro caso, no se dio tal relación, de modo que las diferencias en el peso de las semillas encontradas entre frutos no se deben al número de semillas que éstas producen. Este resultado sugiere, por tanto, un cierto grado de interferencia por parte de la flor/fruto en el patrón de adjudicación de recursos que ejerce la planta, actuando cada flor/fruto con un cierto grado de autonomía en la adjudicación de recursos hacia sus semillas.

Existe, además, otra importante prueba empírica que apoya esta presunta "autonomía floral". Las flores del género *Helleborus* tienen capacidad fotosintética (poseen un parénquima fotosintético activo) de-

bida a que los sépalos y carpelos tienen clorofila, por lo que son capaces de producir recursos de forma autónoma a la captación foliar de la planta. Concretamente, diversos experimentos realizados con *H. foetidus* han mostrado que, cuando se reduce experimentalmente el número de sépalos, el peso medio de las semillas se reduce proporcionalmente a la reducción en superficie de los sépalos (Herrera, 2005), lo que confiere, por tanto, funcionalidad a la persistencia post-antesis del perianto floral. En *Helleborus niger* se ha detectado cómo los leucoplastos presentes durante la antesis (los sépalos de esa especie son blancos durante la antesis) se van transformando en cloroplastos después de la polinización, lo que favorece el aporte de recursos en la iniciación de los frutos. En esta especie la actividad fotosintética de los sépalos llega a ser aproximadamente la mitad de la que efectúan las hojas presentes al mismo tiempo (Salopek Sondi & al., 2000). Incluso a nivel del nectario se ha encontrado parénquima fotosintéticamente activo, tanto en *Helleborus foetidus* como en *Helleborus bocconei* (Vesprini & al., 1999). Otros estudios con especies no pertenecientes al género *Helleborus* han mostrado también importantes contribuciones al esfuerzo reproductivo por parte de recursos fotosintéticos generados por las flores y los frutos en desarrollo (Bazzaz & al., 1979; Cipollini & Levey, 1991; Palliotti & Cartechini, 2001; véanse además las revisiones en Blanke & Lenz, 1989, y Aschan & Pfanz, 2003).

Otros factores que inducirían distintas distribuciones de recursos entre flores serían efectos físico-fisiológicos asociados a la posición de las flores en la planta. La posición puede generar diferencias de tamaño de semillas entre flores. Estas diferencias pueden darse en diversos sentidos según la especie presente dominancia basal, como generalmente ocurre con las herbáceas, o dominancia apical, como es común en leñosas (Díaz & al., 2004 y referencias allí dadas). También están descritos casos en los que existe una relativa independencia en la asignación de recursos según la posición (Marquis, 1988). Según la dominancia apical de las herbáceas, las flores más distantes de la fuente de fotosintatos y nutrientes estarían en desventaja competitiva frente a las basales, de modo que flores a las que llegaran menos recursos serían capaces de producir semillas de menor tamaño (Schaal, 1980; Waller, 1982; Gutterman, 1992; Méndez, 1997; Vaughton & Ramsey, 1997, 1998). Estos factores de posición de flores no fueron abordados en nuestro trabajo, pero dado el grado de autonomía floral en la adjudicación de recursos no parecen tener una importancia significativa de cara a explicar la variación en el peso de las semillas encontrada entre flores.

Dejando al margen los factores relacionados con la adjudicación de recursos, el tipo de polinización también puede determinar diferencias en el tamaño de la semilla entre flores, ya que semillas generadas por autogamia son frecuentemente más pequeñas que las generadas por xenogamia (Manasse & Stanton, 1991; Wolfe, 1995). Resultados obtenidos a partir de cruces dialelos (C.M. Herrera, datos no publicados) y “half-sibling” (J.M. Alcántara y P.J. Rey, datos no publicados) sugieren que quién sea la fuente de polen no es particularmente relevante para el tamaño de la semilla de esta especie, aunque la polinización cruzada incrementa ligera, pero significativamente, el peso de la semilla (Garrido, 2003; C.M. Herrera, datos no publicados). La influencia menor del tipo de polinización sobre el peso de la semilla sería congruente con el hecho de que el heléboro sea una especie autocompatible y con altos niveles de autopolinización autónoma (Herrera & al., 2001, 2002) que redundan en semillas aparentemente viables. Merced a ello la planta puede asegurarse un mínimo éxito reproductivo independientemente de si el servicio de los polinizadores es de mayor o menor calidad y cantidad. En definitiva, sugerimos que el tipo de polinización podría tener una importancia menor para explicar las diferencias en el tamaño de la semilla dentro de planta.

Variación entre carpelos de una misma flor: La variación en este nivel fue escasa en términos relativos (2,1%), lo que sugiere que no hay un control a nivel de carpelo sobre el peso de la semilla. El número de semillas en el carpelo afectó significativamente al peso de la semilla, aunque esto varió entre flores de la misma planta, lo que apunta más bien a un control a nivel de flor sobre la adjudicación de recursos a cada carpelo; un control basado en el número de semillas que contenga o en el número de carpelos por flor. De hecho, resultados preliminares apuntan a que el tamaño de la semilla es menor conforme aumenta el número de carpelos por flor (C.M. Herrera, datos no publicados). De modo similar a lo expuesto para las variaciones entre flores, los factores de posición del carpelo, no explorados en nuestro estudio, influyen frecuentemente sobre el tamaño de la semilla (Vaughton & Ramsey, 1997, 1998). No obstante, la disposición en un mismo verticilo de los carpelos en la flor de heléboro, que favorece el acceso equitativo de los carpelos a los recursos, no hace muy probable un efecto marcado de posición a este nivel.

Variación dentro de carpelo: La variación entre las semillas de un carpelo contribuyó también en gran medida a la varianza total (22,3%). La naturaleza de nuestros datos no permite aclarar la causa de esta variación. Sin embargo, las variaciones dentro de carpe-

lo han sido asociadas frecuentemente a la posición de las semillas dentro del carpelo y a restricciones espaciales de las semillas derivadas del empaquetamiento de éstas en el carpelo (Siemens & Johnson, 1995; Méndez, 1997; Vaughton & Ramsey, 1997, 1998).

Resumiendo, la gran variación en tamaño de semilla dentro de planta parece estar relacionada con una notable autonomía floral en la producción y adjudicación de recursos, que se refleja en la gran variación en el peso de la semilla encontrada entre flores e incluso dentro de carpelo. Subsidiariamente, el número de carpelos por flor y la posición y grado de empaquetamiento de las semillas dentro del carpelo deben inducir también una notable variación en las semillas.

Variación en el peso de la semilla entre plantas

Este tipo de variación es habitualmente indicadora de la existencia de diferencias genéticas (Temme, 1986; Stanton, 1984) y/o microambientales entre las plantas de una misma localidad (Venable, 1992; Mehlman, 1993; Obeso, 1993; Lamont & al., 1993; pero véase Wolfe, 1995). Además, el esfuerzo reproductivo que cada planta efectúe puede tener también una gran influencia sobre el tamaño de la semilla (Vaughton & Ramsey, 1997, 1998; Eriksson & Jakobsson, 1999), aunque de nuevo el esfuerzo reproductivo es función de las características genéticas y/o del microambiente de la planta. Todo este conjunto de factores pueden verse enmascarados por un efecto fenotípico del tamaño de la planta habida cuenta de que, al menos a nivel interespecífico, se ha encontrado una relación clara entre el tamaño de la planta y el tamaño de sus semillas (Jakobsson & Eriksson, 2000; Sakai & Harada, 2001).

En nuestro caso las diferencias entre plantas explicaron un 29% de la variación total hallada en el peso de la semilla. Al menos dos variables indicadoras del esfuerzo reproductivo de la planta, la producción total de semillas y el Carpel Set, se relacionaron directamente con el peso medio de las semillas, aunque su relación fue de signo opuesto. Manteniendo constante el Carpel Set, las plantas que generaron un mayor número de semillas produjeron semillas de menor tamaño, lo que sugiere una limitación en la cantidad de recursos que pudieron asignar a cada semilla o, lo que es lo mismo, que cada planta dispone de una cantidad de recursos limitada para invertir en su progenie, lo que se manifiesta en un compromiso entre el número y el peso individual de las semillas (Crawley, 1997 y referencias allí dadas). Este “trade-off” es resuelto de forma diferente por cada planta, por lo que no hay un único tamaño óptimo de semilla. Por otro lado, manteniendo constante la producción, plantas con mayor

proporción de carpelos cuajados tuvieron semillas más pesadas. La influencia de la variación en carpelos cuajados por flor sobre la variación en el peso medio de la semilla es aún mayor que la descrita para la producción de semillas. Una posible explicación del efecto positivo de los carpelos cuajados es que, en realidad, estén expresando un efecto del tipo de polinización. Ya se ha demostrado con esta especie que un mayor servicio de polinizadores se relaciona con un mayor cuajado de carpelos por planta (Herrera & al., 2001, 2002) y probablemente con mayor incidencia de xenogamia. La polinización cruzada en la especie se relaciona, a su vez, con un mayor peso medio de las semillas con respecto a cruce autógamo (Garrido, 2003; C.M. Herrera, datos no publicados). Esto, unido a la considerable variación entre plantas en el servicio que les prestan los polinizadores (Herrera & al., 2001, 2002), podría explicar que mayor cuajado se relacione con mayor peso medio de semilla. Probablemente, plantas con mayor proporción de carpelos cuajados fueron más visitadas por polinizadores (Herrera & al., 2002), lo que incrementaría la proporción de semillas procedentes de polinización cruzada, que serían de mayor tamaño. Por el contrario, podría sugerirse que plantas con poco cuajado fueron poco visitadas por polinizadores, por lo que una mayor proporción de las semillas procederían de auto-polinización autónoma y serían de menor tamaño.

Otro resultado interesante es que el número de óvulos por carpelo influyó negativamente sobre el Seed Set (si bien la varianza explicada en Seed Set fue bastante baja), lo que apunta hacia una limitación por polen en el cuajado de semillas, o a la posibilidad de efectos deletéreos sobre el cuajado de semillas producidas por elevadas tasas de autogamia (Baker, 1955; Lloyd, 1980, 1992; Motten, 1982; Piper & al., 1986; Jarne & Charlesworth, 1993; Schoen & al., 1996), dados unos niveles generales elevados de autopolinización espontánea (Herrera & al., 2001, 2002).

Las variables del esfuerzo reproductivo consideradas fueron capaces de explicar sólo un 45% de la varianza existente entre plantas en el peso medio de la semilla. Por tanto, todavía una parte importante de la variabilidad entre plantas en tamaño de semilla pudo deberse a factores genéticos o micro-ambientales distintos a la polinización.

Variación entre localidades

Aunque, como ya se ha comentado, las variaciones más substanciales en el peso de la semilla suelen ser debidas a diferencias dentro de planta o entre plantas, algunos estudios han mostrado diferencias importantes debidas a variación entre poblaciones (Thompson,

1984; Winn, 1991; Obeso, 1993; Stöckling & Favre, 1994; Vaughton & Ramsey, 1997, 1998).

En este trabajo se ha prestado escasa atención a la variación entre localidades en tamaño de las semillas. Así, sólo se ha trabajado con dos localidades para las que se disponía de información para distintos niveles jerárquicos de variación encajados dentro de planta. Usando sólo esas dos localidades, la varianza explicada por la localidad (aún sumando un 19% de la varianza total) no resulta significativamente diferente de cero. No obstante, contamos con la evidencia de que, cuando se amplía considerablemente el número de poblaciones y el rango geográfico considerado, esa varianza se torna significativamente diferente de cero (Garrido & al., 2002), contribuyendo a explicar una parte importante de la variación total en el tamaño de la semilla y estableciendo diferencias en peso medio de semillas entre localidades. Además de las diferencias ambientales y de posible diferenciación genética del tamaño de la semilla entre localidades, las diferencias regionales en niveles de autopolinización espontánea y/o servicio de polinizadores podrían contribuir a explicar la variación entre regiones en peso de las semillas. Todos estos aspectos permanecen inexplorados en esta especie y requieren de ulterior investigación.

Agradecimientos

Los autores agradecen su colaboración a M.C. Anguita, J. Garrido y A.M. Guilleray por su inestimable ayuda en las labores de campo, recolección y pesado de las semillas. Agradecemos también a las respectivas juntas rectoras del Parque Natural de Cazorla, Segura y Las Villas y del Parque Natural de Sierra Mágina, las facilidades de trabajo que nos brindaron. Este estudio estuvo apoyado por el proyecto PB96-0856 de la Dirección General de Enseñanza Superior e Investigación del Ministerio de Educación y Cultura.

Referencias bibliográficas

- Alcántara, J.M. & Rey, P.J. 2003. Conflicting selection pressures on seed size: evolutionary ecology of fruit size in a bird-dispersed tree, *Olea europaea*. *Journal of Evolutionary Biology* 16: 1168-1176.
- Alexander, H.M., Cummings, C.L., Kahn, L. & Snow, A.A. 2001. Seed size variation and predation of seeds produced by wild and crop-wild sunflowers. *American Journal of Botany* 88: 623-627.
- Aschan, G. & Pfan, H. 2003. Non-foliar photosynthesis – a strategy of additional carbon acquisition. *Flora* 198: 81-97.
- Baker, J.D. 1955. Self compatibility and establishment after “long-distance” dispersal. *Evolution* 9: 347-348.
- Bazzaz, F.A. 1979. The physiological ecology of plant succession. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10: 351-371.
- Blanke, M.M. & Lenz, F. 1989. Fruit photosynthesis. *Plant Cell and Environment*. 12: 31-46.

- Cavers, P.B. & Steel, M.G. 1984. Patterns of change in seed weight over time on individual plants. *American Naturalist* 124: 324-335.
- Cipollini, M.L. & Levey, D.J. 1991. Why some fruits are green when they are ripe - carbon balance in fleshy fruits. *Oecologia* 88: 371-377.
- Cook, R.E. 1975. The photoinductive control of seed weight in *Chenopodium rubrum* L. *American Journal of Botany* 62: 427-431.
- Crawley, M.J. 1997. *Plant Ecology*. Blackwell Science. Oxford.
- Díaz, M., Pulido, F.J. & Moller, A.P. 2004. Herbivore effects on developmental instability and fecundity of Holm oaks. *Oecologia* 139 (2): 224-234.
- Eriksson, O. & Jakobsson, A. 1999. Recruitment trade-offs and the evolution of dispersal mechanisms in plants. *Evolutionary Ecology* 13: 411-423.
- Fenner, M. 1985. *Seed ecology*. Chapman and Hall. London.
- Garrido, J.L. 2003. *Semillas y plántulas de Helleborus foetidus (Ranunculaceae): variación geográfica, ecología y evolución*. Tesis doctoral. Universidad de Jaén.
- Garrido, J.L., Rey, P.J., Cerdá, X. & Herrera, C.M. 2002. Geographical variation in diaspore traits of an ant dispersed plant (*Helleborus foetidus*): are ant community composition and diaspore traits correlated? *Journal of Ecology* 90: 446-455.
- Geritz, S.A.H. 1995. Evolutionarily stable seed polymorphism and small-scale spatial variation in seedling density. *American Naturalist* 146: 685-707.
- Gómez, J.M. 2004. Bigger is not always better: conflicting selective pressures on seed size in *Quercus ilex*. *Evolution* 58: 71-80.
- Guterman, Y. 1992. Maternal effects on seeds during development. In: M. Fenner (ed.), *Seeds: the ecology of regeneration in natural plant communities*. 27-60 CAB International. Wallingford.
- Haig, D. & Westoby, M. 1988. Inclusive fitness, seed resources, and maternal care. In: J. Lovett-Doust & L. Lovett-Doust (eds.), *Plant Reproductive Ecology: Patterns and strategies*: 60-79. Oxford University Press. Oxford.
- Halpern, S.L. 2005. Sources and consequences of seed size variation in *Lupinus perennis* (Fabaceae): Adaptive and non-adaptive hypotheses. *American Journal of Botany* 92: 205-213.
- Harper, J.L., Lovell, P.H. & Moore, K.G. 1970. The shapes and sizes of seeds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1: 327-356.
- Hereford, J. & Moriuchi, K.S. 2005. Variation among populations of *Diodia teres* (Rubiaceae) in environmental maternal effects. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 124-131.
- Herrera, C.M. 2005. Post-anthesis functionality of the floral perianth. 1. Contribution of persistent sepals to seed development in *Helleborus foetidus*. *American Journal of Botany* 92: 1486-1491.
- Herrera, C.M., Jordano, P., López-Soria, L. & Amat, J.A.. 1994. Recruitment of a mast-fruited, bird-dispersed tree: bridging frugivore activity and seedling establishment. *Ecological Monographs* 64: 315-344.
- Herrera, C.M., Sánchez-Lafuente, A.M, Medrano, M., Guitián, J., Cerdá, X. & Rey, P.J. 2001. Geographical variation in autonomous self-pollination levels unrelated to pollinator service in *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany* 88: 1025-1032.
- Herrera, C.M., Cerdá, X., García, M.B., Guitián, J., Medrano, M., Rey, P.J. & Sánchez-Lafuente, A.M. 2002. Floral Integration, Phenotypic Covariance Structure and Pollinator Variation in Bumblebee-Pollinated *Helleborus foetidus*. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 108-121.
- Jakobsson, A. & Eriksson, O. 2000. A comparative study of seed number, seed size, seedling size and recruitment in grassland plants. *Oikos* 88: 494-502.
- Janzen, D.H. 1977. What are dandelions and aphids? *American Naturalist* 111: 586-589.
- Janzen, D.H. 1978. Seeding patterns of tropical trees. In: P.B. Tomlinson & M.H. Zimmermann (eds.), *Tropical Trees as Living Systems*: 83-128. Cambridge University Press. Cambridge.
- Janzen, D.H. 1982. Removal of seeds from horse dung by tropical rodents: influence of habitat and amount of dung. *Ecology* 63: 1887-1900.
- Jarne, P. & Charlesworth, D. 1993. The evolution of the selfing rate in functional hermaphrodite plants and animals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 441-466.
- Jordano, P. 1993. Pollination biology of *Prunus mahaleb* L.: deferred consequences of gender variation for fecundity and seed size. *Biological Journal of the Linnean Society* 50: 65-84.
- Jurado, E., Westoby, M. & Nelson, D. 1991. Diaspore weight, dispersal, growth form and perenniality of central Australian plants. *Journal of Ecology* 79: 811-830.
- Lamont, B.B., Witkowski, E.T.F. & Enright, N.J. 1993. Postfire litter microsites - safe for seeds, unsafe for seedlings. *Ecology* 74: 501-512.
- Leishman, M.R., Masters, G.J., Clarke, I. P & Brown, V.K. 2000. Seed bank dynamics: the role of fungal pathogens and climate change. *Functional Ecology* 14: 293-299.
- Leishman, M.R. & Westoby, M. 1994. Hypotheses on seed size: tests using the semiarid flora of western New South Wales, Australia. *American Naturalist*. 143: 890-906.
- Leishman, M.R., Westoby, M. & Jurado, E. 1995. Correlates of seed size variation- a comparison among 5 temperate floras. *Journal of Ecology* 83: 517-529.
- Lloyd, D.G. 1980. Demographic factors and mating patterns in angiosperms. In: O.T. Solbrig (ed.), *Demography and evolution in plant populations*: 67-88. Blackwell. Oxford.
- Lloyd, D.G. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences* 153: 370-380.
- Manasse, R.S. & Stanton, M.L. 1991. The influence of the mating system on seed size variation in *Crinum erubescens* (Amaryllidaceae). *Evolution* 45: 883-890.
- Manly, B.F.J. 1998. *Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology*. Chapman & Hall. London.
- Marquis, R.J. 1988. Intra-crown variation in leaf herbivory and seed production in Striped Maple, *Acer pensylvanicum* L. (Aceraceae). *Oecologia* 77: 51-55.
- Mazer, S.J. 1987. The quantitative genetics of life history and fitness components in *Raphanus raphanistrum* L. (Brassicaceae): Ecological and evolutionary consequences of seed-weight variation. *American Naturalist* 130: 153-175.
- Mcginley, M.A., Temme, D.H. & Geber, M.A. 1987. Parental investment in offspring in variable environments: theoretical and empirical considerations. *American Naturalist* 130: 370-398.
- Mehlman, D.W. 1993. Seed size and seed packaging variation in *Baptisia lanceolata* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 80: 735-742.
- Méndez, M. 1997. Sources of variation in seed mass in *Arum italicum*. *International Journal of Plant Science* 158: 298-305.
- Michaels, H.J., Brenner, B., Hartgerink, A.P., Lee, T.D., Rice, S., Willson, M.F. & Bertin, R.I. 1988. Seed size variation: magnitude, distribution, and ecological correlates. *Evolutionary Ecology* 2: 157-166.

- Motten, A.F. 1982. Autogamy and competition for pollinators in *Hepatica americana* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany* 69: 1296-1305.
- Obeso, J.R. 1993. Does defoliation affect reproductive output in herbaceous perennials and woody plants in different ways? *Functional Ecology* 7: 150-155.
- Palliotti, A. & Cartechini, A. 2001. Developmental changes in gas exchange activity in flowers, berries, and tendrils of field-grown Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* 52: 317-323.
- Paz, H. & Martínez-Ramos, M. 2003. Seed mass and seedling performance within eight species of Psychotria (Rubiaceae). *Ecology* 84: 439-450.
- Piper, J.G., Charlesworth, B. & Charlesworth, D. 1986. Breeding system evolution in *Primula vulgaris* and the role of reproductive assurance. *Heredity* 56: 207-217.
- Pitelka, L.F., Thayer, M.E. & Hansen, S.B. 1983. Variation in achene weight in *Aster acuminatus*. *Canadian Journal of Botany* 61: 1415-1420.
- Quinn, G.P. & Keough, M.J. 2002. *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Richards, A.J. 1986. *Plant breeding systems*. George Allen & Unwin. London.
- Sakai, S. & Harada, Y. 2001. Why do large mothers produced large offspring? Theory and test. *American Naturalist* 157: 349-359.
- Sakai, S. & Sakai, A. 1996. Why is there variation in mean seed size among plants within single populations? Test of the fertilization efficiency hypothesis. *American Journal of Botany* 83: 1454-1457.
- Salopek Sondi, B., Kovac, M., Ljubesic, N. & Magnus, V. 2000. Fruit initiation in *Helleborus niger* L. triggers chloroplast formation and photosynthesis in the perianth. *Journal of Plant Physiology* 157: 357-364.
- SAS Institute. 1999. SAS/STAT Software. *SAS Institute*. Cary, NC.
- Schaal, B.A. 1980. Reproductive capacity and seed size in *Lupinus texensis*. *American Journal of Botany* 67: 703-709.
- Schoen, D.J., Morgan, M.T. & Bataillon, T. 1996. How does self-pollination evolve? Inferences from floral ecology and molecular genetic variation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 351: 1281-1290.
- Searle, S.R., Casella, G. & McCulloch, C.E. 1992. *Variance components*. Wiley, New York.
- Siemens, D.H. & Johnson, C.D. 1995. Number of Seeds Per Pod in 3 Species of Perennial Legumes - a Compromise Between Ecological and Physiological Constraints. *American Midland Naturalist* 133: 197-205.
- Smith, C.C. & Fretwell, S.D. 1974. The optimal balance between size and number of offspring. *American Naturalist* 108: 499-506.
- Stanton, M.L. 1984. Development and genetic sources of seed weight variation in *Raphanus raphanistrum* L. (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 71: 1090-1098.
- Statsoft, Inc. 2001. STATISTICA (data analysis software system). StatSoft, Inc.
- Stöcklin, J. & Favre, P. 1994. Effects of plant size and morphological constraints on variation in reproductive components in two related species of *Epilobium*. *Journal Ecology* 82: 735-746.
- Susko, D.J. & Lovett-Doust, L. 2000. Patterns of seed mass variation and their effects on seedling traits in *Alliaria petiolata* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 87: 56-66.
- Temme, D.H. 1986. Seed size variability: a consequence of variable genetic quality among offspring? *Evolution* 40: 414-417.
- Thompson, J.N. 1984. Variation among individual seed masses in *Lomatium gravi* (Umbelliferae) under controlled conditions: magnitude and partitioning of the variance. *Ecology* 65: 626-631.
- Underwood, A.J. 1997. *Experiments in ecology: Their logical design and interpretation using analysis of variance*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Vaughton, G. & Ramsey, M. 1997. Seed mass variation in the shrub *Banksia spinulosa* (Proteaceae): resource constraints and pollen source effects. *International Journal of Plant Sciences* 158: 424-431.
- Vaughton, G. & Ramsey, M. 1998. Sources and consequences of seed mass variation in *Banksia marginata* (Proteaceae). *Journal of Ecology* 86: 563-573.
- Venable, D.L. 1992. Size-number trade-offs and the variation of seed size with plant resource status. *American Naturalist* 140: 287-304.
- Vesprini, J.L., Nepi, M. & Pacini, E. 1999. Nectary structure, nectar secretion patterns and nectar composition in two *Helleborus* species. *Plant Biology* 1: 560-568.
- Waller, D.M. 1982. Factors influencing seed weight in *Impatiens capensis* (Balsaminaceae). *American Journal of Botany* 69: 1470-1475.
- Werner, K. & Ebel, F. 1994. Life-history of the genus *Helleborus* L. (Ranunculaceae). *Flora* 189: 97-130.
- Westoby, M., Jurado, E. & Leishman, M. 1992. Comparative evolutionary ecology of seed size. *Trends in Ecology and Evolution* 7: 368-372.
- Westoby, M., Leishman, M. & Lord, J. 1996. Comparative ecology of seed size and dispersal. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 351: 1309-1318.
- Willson, M.F. 1983. *Plant reproductive ecology*. Wiley, New York.
- Winn, A.A. 1988. Ecological and evolutionary consequences of seed size in *Prunella vulgaris*. *Ecology* 68: 1537-1544.
- Winn, A.A. 1991. Proximate and ultimate sources of within-individual variation in seed mass in *Prunella vulgaris* (Lamiaceae). *American Journal of Botany* 78: 838-844.
- Wolf, L.L., Hainsworth, F.R., Mercier, T. & Benjamin, R. 1986. Seed size variation and pollinator uncertainty in *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae). *Journal of Ecology* 74: 361-371.
- Wolfe, L.M. 1995. The genetics and ecology of seed size variation in a biennial plant, *Hydrophyllum appendiculatum* (Hydrophyllaceae). *Oecologia* 101: 343-352.

Editor asociado: J.R. Obeso
 Recibido: 19-V-2005
 Aceptado: 24-X-2005