



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

**Influencia de la distancia estigma-antera y de la
reciprocidad de órganos sexuales en el depósito de
polen legítimo y fecundidad en la planta distílica
Bouvardia ternifolia (Cav.) Schltdl. (Rubiaceae)**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

ROSA ELENA TORRES ESTRADA

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS FERNANDO ROSAS PACHECO

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO. 2016

There is grandeur in this view of life, with its several powers, having been originally breathed into a few forms or into one; and that, whilst this planet has gone cycling on according to the fixed law of gravity, from so simple a beginning endless forms most beautiful and most wonderful have been, and are being evolved.

Charles Darwin (1859).

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	5
JUSTIFICACIÓN	8
OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES	9
HIPÓTESIS	10
MÉTODO	10
<i>Sitio de estudio</i>	10
<i>Especie de estudio</i>	11
<i>Estimación de la reciprocidad (intermorfo) en la posición antera-estigma y distancia (intramorfo) estigma-antera (DEA)</i>	12
<i>Caracterización y estimación de polen legítimo depositado en estigmas</i>	14
<i>Estimación de la fecundidad</i>	15
RESULTADOS	15
<i>Reciprocidad estigma-antera y DEA</i>	15
<i>Tamaño de polen pin y thrum</i>	17
<i>Depósito de polen legítimo</i>	17
<i>Evaluación de la fecundidad</i>	18
DISCUSIÓN	20
<i>Variación de los órganos sexuales, reciprocidad intermorfo y DEA</i>	20
<i>Variación en el depósito de polen inter e intrapoblacional</i>	22
<i>Variación en la fecundidad y su relación con la DEA y el depósito de polen legítimo</i>	24
<i>Implicaciones de los resultados en el funcionamiento y mantenimiento de la distilia</i>	27
CONCLUSIÓN	28
BIBLIOGRAFÍA	29

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Esquematización de la transferencia de polen pin y thrum.....	4
2. Área de estudio, ubicada en los municipios A) Tlanalapa y B) Huasca de Ocampo, Hidalgo, México.....	11
3. Especie de estudio <i>Bouvardia ternifolia</i> familia Rubiaceae, A) arbusto, B) morfos pin y thrum C) frutos maduros	12
4. Medidas de órganos sexuales de flores de <i>Bouvardia ternifolia</i>	13
5. Micrografías de estigmas pin y thrum	15
6. Reciprocidad entre estigma-antera y DEA en plantas de Tlanalapa (A) y Huasca (B).....	18
7. Porcentaje de polen legítimo depositado en estigmas de plantas pin y thrum de Tlanalapa (A) y Huasca (B).....	21
8. Fecundidad expresada con base en la producción de frutos en plantas de Tlanalapa (A) y Huasca (B).....	23

ÍNDICE DE CUADROS

1. Talla del polen pin y thrum para Tlanalapa y Huasca.....	19
---	----

RESUMEN

La distilia es un sistema reproductivo que se caracteriza por la presencia de dos morfos florales que difieren recíprocamente en la posición de las anteras y estigmas dentro de la flor. Las plantas con flores de estilo largo y estambres cortos se denominan pin y las de estilo corto y estambres largos thrum. En las poblaciones los morfos florales cotidianamente ocurren en frecuencia 1:1 y el sistema en conjunto se asocia con la promoción del entrecruzamiento. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de la variación en la distancia entre anteras y estigmas (intrafloral) y de su grado de reciprocidad (intermorfo) sobre el depósito de polen legítimo y la fecundidad. Para tal fin se examinaron dos poblaciones de la planta distílica *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae), que han sido monitoreadas en el estado de Hidalgo. Con base en un muestreo aleatorio se seleccionaron 27 y 28 plantas pin y thrum en Tlanalapa y 12 y 18 plantas pin y thrum en Huasca. De cada planta se colectaron 3 flores para medir el largo y ancho de la corola, el largo de estambres y estilos y la distancia entre estigmas y anteras. Todas las flores se conservaron para elaborar preparaciones semipermanentes de; a) las anteras para caracterizar la talla de los granos de polen de cada morfo, y b) de los estigmas para estimar la proporción de polen legítimo depositado. Para estimar la fecundidad se realizó un conteo del número de frutos por planta al final de la temporada reproductiva. Los resultados muestran un alto grado de reciprocidad de los órganos sexuales entre morfos florales en ambas poblaciones, sin embargo la distancia estigma-antenas es significativamente menor en las plantas de Huasca, marcadamente en las flores thrum. Acorde a lo reportado en la literatura el polen thrum es más grande que el pin. Esta diferencia permitió cuantificar el polen legítimo depositado en los estigmas. El análisis mostro que el depósito de polen legítimo es significativamente mayor en las plantas de Tlanalapa (97%) que en las de Huasca, donde además difiere entre morfos (pin 69% y thrum 37%). Además, las plantas de Tlanalapa producen significativamente más frutos que las plantas de Huasca. En conclusión los resultados indican que el mantenimiento de la reciprocidad de los órganos sexuales entre morfos florales no garantiza el intercambio y depósito de polen legítimo, ya que la disminución de la distancia estigma-antena se correlaciona con un incremento de polen ilegítimo depositado en los estigmas y con una menor fecundidad.

INTRODUCCIÓN

Aproximadamente 90% de las 250000 especies de angiospermas tienen flores hermafroditas (Ainsworth, 2000), condición en la que los órganos sexuales masculinos (estambres) y femeninos (pistilos) se encuentran en la misma flor. En esta circunstancia y en ausencia de un sistema de autoincompatibilidad pueden ocurrir: 1) autopolinización, que resulta en la pérdida de oportunidades de apareamientos con otros individuos y potencialmente en depresión por endogamia e 2) interferencia física entre la recepción y remoción de polen (Lloyd & Webb, 1992). Se ha señalado que la solución al potencial conflicto entre los beneficios de la eficiente dispersión del polen y los costos asociados a la interferencia reproductiva y la autofecundación, es una de las principales fuerzas detrás de la evolución del posicionamiento diferencial y de la segregación de los órganos sexuales en las plantas con flores (Darwin, 1877; Lloyd & Yates, 1982). Una respuesta evolutiva a este tipo de conflicto es el desarrollo de estrategias para promover el entrecruzamiento, donde se incluyen la segregación espacial (hercogamia) y/o temporal (dicogamia) de los órganos/funciones sexuales (Barrett, 2002).

Un ejemplo clásico de la evolución de estrategias reproductivas que favorecen el entrecruzamiento es el polimorfismo floral que caracteriza a la heterostilia que se presenta en poblaciones constituidas por dos (distilia) o tres (tristilia) morfos que difieren recíprocamente en la longitud de estilos y estambres de sus flores (Barrett, 1992). Mientras que la tristilia es poco frecuente y ocurre únicamente en 6 familias (Barrett, 1993), la distilia es la forma más común de la heterostilia (Ree, 1997), y ha evolucionado independientemente en 25 familias de angiospermas (Barrett *et al.*, 2008).

La distilia se caracteriza por la presencia de dos morfos florales (pin y thrum) que generalmente ocurren en una proporción de 1:1 en las poblaciones. En el morfo pin las flores tienen estilo largo y estambres cortos y en el morfo thrum estambres largos y estilo corto (Darwin, 1877). Además de esta reciprocidad en la posición de anteras y estigmas, el dimorfismo floral puede incluir diferencias en el tamaño de la corola, número y tamaño de granos de polen y en la morfología del estigma y de las

papilas estigmáticas (Ganders, 1979; Dulberger, 1992; Weller, 2009). Asimismo, las plantas distílicas presentan un sistema genético de autoincompatibilidad esporofítico heteromórfico que impide tanto la autofecundación como la reproducción entre plantas del mismo morfo (Ganders, 1979; Barrett, 2002). Por lo tanto, en especies distílicas la fecundación y la producción de frutos solo ocurre cuando las plantas son polinizadas con polen procedente del morfo opuesto, lo cual se conoce como polinización legítima, mientras que la polinización que ocurre entre flores del mismo morfo se denomina ilegítima (Darwin, 1877).

La primera interpretación funcional de la distilia fue dada por Darwin (1877). Su explicación plantea que la posición recíproca de estigmas y anteras en especies distílicas es un mecanismo que promueve la eficiencia en el flujo de polen entre morfos (*disassortative mating*, que hace referencia a apareamientos clasificados, y en el caso de la distilia ocurren con polen pin en estigmas thrum y polen thrum en estigmas pin), y el entrecruzamiento mediado por polinizadores. A partir de esta primera interpretación estudios posteriores señalan que las funciones de la hercogamia y del sistema de autoincompatibilidad como mecanismos que promueven la polinización legítima, son redundantes y que por tanto se requiere una explicación más completa.

Una interpretación más elaborada en la que se reconocen las diferentes funciones que tienen el sistema fisiológico de autoincompatibilidad y el componente morfológico propone que: a) por un lado el sistema de autoincompatibilidad evita que las plantas se autofecunden y por lo tanto se restringen los efectos de la depresión por endogamia contribuyendo a la función femenina (Ganders, 1979; Barrett, 2002) y b) por otro lado la separación espacial de anteras y estigmas favorece la eficiente transferencia de polen, reduciendo además la probabilidad de depósito de polen propio en los estigmas, lo cual beneficia a la función masculina (Barrett, 2002).

Desde el punto de vista morfológico se espera que una mayor reciprocidad entre morfos acompañada de la separación espacial entre anteras y estigmas, este relacionada con una alta eficiencia en la transferencia de polen, es decir, un flujo

simétrico de polen en calidad y cantidad entre morfos (Lloyd & Webb, 1992; Barrett, 2002), (Figura 1). De esta manera la variación en la posición de anteras y estigmas entre morfos puede afectar el eficiente flujo de polen y la fecundidad de las plantas.

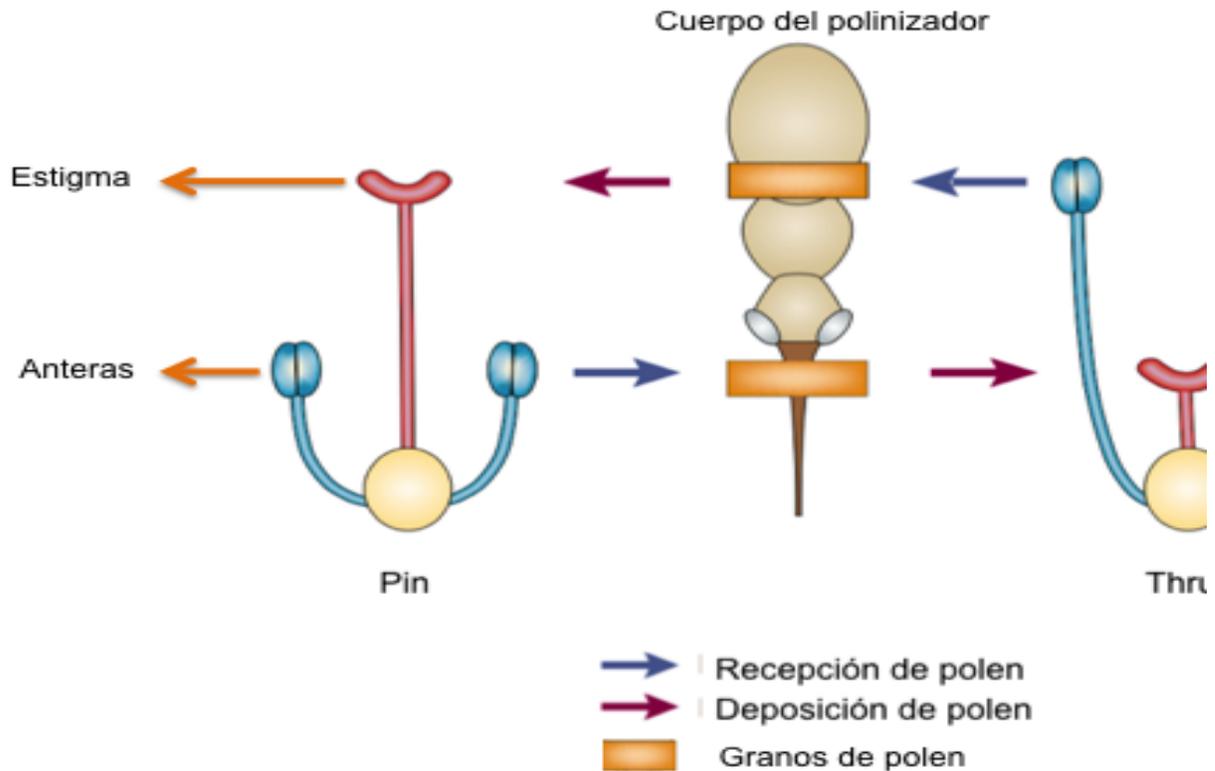


Figura 1. Flujo de polen entre morfos florales, de anteras pin a estigma thru y anteras thru a estigma pin. Además se ilustra el depósito de polen pin y thru en diferentes partes del cuerpo del polinizador (tomado y modificado de Barrett, 2002).

ANTECEDENTES

El dimorfismo floral que caracteriza a la distilia es un escenario revelador para realizar estudios que contribuyen a comprender desde su significado adaptativo, hasta sus implicaciones funcionales y ecológicas. En general se sabe que la distilia se puede mantener en las poblaciones siempre que la proporción de morfos florales, la polinización y la fecundidad, así como la posición de los órganos florales sean simétricas y se conserve el sistema de autoincompatibilidad (SI). Por el contrario, la permanencia y el funcionamiento de este sistema reproductivo pueden estar en riesgo si existen asimetrías o alteraciones de estos caracteres. Lo cual puede derivar en la pérdida del dimorfismo y su transición a la homostilia, o bien en la especialización reproductiva y la segregación de las funciones sexuales (dioecia).

Debido a la reciprocidad reproductiva entre morfos florales, la donación/recepción de polen y la fecundidad dependen en primera instancia de que la proporción de morfos sea 1:1 (Brys *et al.*, 2008), de que la distribución y la distancia entre plantas del morfo opuesto sean homogéneas (Björkman, 1994; Pailler, 2002; Brys *et al.*, 2008), de que el despliegue y la arquitectura floral sean uniformes (Rossi, 2005; García-Robledo, 2008) y de que el servicio de polinización y el flujo de polen sean simétricos entre morfos (Ganders, 1979; Ornelas, 2004). Si la frecuencia de morfos florales en la población se desvía de 1:1 existe el potencial de autofecundación diferencial debida a la relajación del SI (Barrett, 1988; Ferrero, 2014). Al respecto se ha mostrado que diferencias en el éxito reproductivo de morfos florales y procesos estocásticos pueden desviar la proporción de morfos en las poblaciones (Brys *et al.*, 2008), incrementando la asimetría reproductiva y disminuyendo la tasa de entrecruza y la diversidad genética en las poblaciones (Meeus *et al.*, 2012).

Por su parte el papel de los polinizadores es crucial para garantizar el éxito reproductivo de plantas distílicas, ya que son los encargados de transportar el polen entre las flores de ambos morfos (Pérez-Barrales & Arroyo, 2010; Ferrero, 2011). En general la eficiencia de la polinización depende de la forma en que el cuerpo del polinizador tiene contacto con las anteras y estigmas de las flores (Ganders, 1979;

Stone & Thomson, 1994). La correspondencia entre las estructuras florales y el cuerpo del polinizador define no solo la magnitud de la interferencia sino la eficacia en la remoción y depósito recíproco de polen. Algunos ejemplos de estudios sobre el tema muestran que en especies del género *Pentanisia* el polen pin y thrum se deposita de forma diferencial en el cuerpo de los polinizadores (mariposas) haciendo eficiente el depósito de polen (Massinga, 2005). En *Palicourea padifolia* y *Bouvardia ternifolia* se ha mostrado que la transferencia de polen depende de la correspondencia morfológica entre el polinizador y la arquitectura, dimensión y variación de las flores (Faivre & McDade, 2001; Ornelas, 2004). En especies de *Primula* y *Psychotria* se ha mostrado que la deficiencia en el servicio de la polinización puede disminuir la deposición de polen legítimo y resultar en asimetrías en la producción de frutos entre los morfos florales (Nishihiro, 2000; Rossi, 2005; Valois-Cuesta, 2009).

A un nivel más fino, los órganos sexuales de las flores (anteras y estilos) de las plantas distílicas pueden mostrar variación morfológica, y diversos estudios han explorado las consecuencias funcionales, reproductivas, y evolutivas de dicha variación en sistemas distílicos. A este nivel se han explorado dos componentes de dicha variación: el grado de reciprocidad (intermorfo) entre los órganos sexuales y la distancia que separa anteras de estigmas (intramorfo). En relación al grado de reciprocidad, estudios con diferentes especies (*Oxalis alpina*, *Sebaea grandis*, *Primula halleri*, *Psychotria nervosa*, *Pentanisia prunelloides*, *P. angustifolia* y *Palicourea padifolia*) reportan y concuerdan en que este componente juega un papel muy importante promoviendo el flujo de polen legítimo/compatible (Ree, 1997; Massinga, 2005; Wolfe, 2009; Hernández-Ramírez, 2012; Baena-Díaz, 2012; De Vos, 2012). El consenso general es que cuanto mayor es el grado de reciprocidad entre los órganos de los morfos florales, mayor es la eficiencia en la transferencia de polen compatible. Con respecto a la variación en la separación espacial de los órganos florales, se ha mostrado que esta relacionada con genes modificadores que influyen en la posición relativa de anteras y estigmas enmascarando la condición heterostílica. En esta condición el fenotipo de las flores se aproxima o deriva en

homostilia (Mather & de Winton, 1941; Thompson, 2000). La evidencia empírica con especies como *Gaertnera vaginata* (Pailler, 2002) y *Jasminum fruticans* (Thompson, 2000) indica que la disminución en la separación de anteras y estigmas esta ligada firmemente al incremento en el depósito de polen propio (ilegítimo). Las consecuencias reproductivas están vinculadas principalmente con el descuento y la limitación por polen, y con deficiencias en la producción de frutos y semillas. Además se ha documentado que la reducción de la distancia estigma-antera puede ser asimétrica entre morfos florales. En *Psychotria poeppigiana* los órganos de flores thrum están relativamente menos separados que en las flores pin, ocasionando diferencias en la eficiencia de polinización pero no en la fecundidad de los morfos florales (Valois-Cuesta, 2009).

Las implicaciones de la variación o desviación de los componentes y atributos que caracterizan a la distilia se resumen a dos efectos sustanciales que diluyen la funcionalidad del sistema. Por un lado el deterioro del dimorfismo morfológico acompañado de la relajación del SI, puede dar lugar a la recombinación de los atributos de la distilia y conducir a la pérdida del dimorfismo floral (transición a la homostilia) (Mather & de Winton, 1941; Charlesworth & Charlesworth, 1979; Thompson, 2000; Carlson, 2008). Por otro lado, la variación en los atributos de la distilia acompañada del mantenimiento del SI, y por tanto de la reciprocidad reproductiva entre los morfos florales, puede derivar en la especialización reproductiva de los morfos florales (funcionalmente unisexuales) y en la evolución de sistemas dioicos (Ornduff, 1966; Lloyd, 1979; Beach & Bawa, 1980).

Es evidente que el dimorfismo floral que caracteriza a la distilia ha sido y es un tema de interés para los biólogos. El estudio de los diferentes componentes de este sistema reproductivo ha generado información relevante sobre su significado funcional y de los factores que ejercen influencia en su mantenimiento o pérdida. Sin embargo, aún hay mucho que explorar y en este trabajo se analiza el grado de reciprocidad de los órganos sexuales entre los morfos florales y la variación intra-morfo en la separación de estigma-anteras, con la finalidad de explorar las

consecuencias reproductivas de dicha variación utilizando como modelo plantas que presentan variación morfológica versus plantas que tienen el sistema bien representado.

JUSTIFICACIÓN

El origen de la diversidad de los sistemas reproductivos en plantas pueden estar relacionados con limitaciones o restricciones fisiológicas y ecológicas a las que están sujetas. Considerando que las plantas son organismos sésiles y que para llevar a cabo la reproducción cruzada necesitan de la intervención de polinizadores y la disponibilidad de parejas compatibles, el hermafroditismo puede ser una condición ideal, pues en ausencia de polinizadores o parejas compatibles tienen la capacidad de autofecundarse. Sin embargo no es una condición ideal, puesto que pueden estar sujetas a los efectos de la depresión por endogamia. Es por esto que las plantas han desarrollado una serie de estrategias para promover la fecundación cruzada, ya sea separando espacial (hercogamia) o temporalmente (dicogamia) las funciones sexuales. La distilia es un sistema reproductivo en el que los órganos sexuales están separados espacialmente, y su funcionamiento depende del mantenimiento de la reciprocidad y distancia estigma-antera entre los órganos sexuales. Por lo tanto evaluar el efecto de la variación en la posición recíproca y separación espacial entre estigmas y anteras en el depósito de polen legítimo y la fecundidad, nos permiten visualizar posibles escenarios en los que derivará el sistema reproductivo y posiblemente el mantenimiento de las poblaciones de plantas distílicas.

OBJETIVO GENERAL

Estimar la eficiencia de la transferencia de polen legítimo en relación a la distancia intra-floral estigma-antera y al grado de correspondencia de los órganos sexuales entre morfos utilizando como modelo de estudio dos poblaciones de *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae), donde se ha observado variación en los atributos florales.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Caracterizar la variación en la posición relativa de anteras y estigmas para evaluar el grado de reciprocidad entre los morfos florales, y determinar la distancia estigma-antera.
2. Caracterizar la talla y los atributos generales de los granos de polen pin y thrum para su identificación y cuantificación en muestras florales (estigmas).
3. Estimar y analizar la proporción de polen legítimo depositado en los estigmas en poblaciones con diferente grado de correspondencia morfológica.
4. Evaluar la fecundidad de las plantas de ambas poblaciones en relación con el depósito de polen legítimo registrado.

HIPÓTESIS

Los órganos sexuales de los morfos florales de plantas distílicas están arreglados recíprocamente de manera que se favorece la transferencia de polen entre morfos, mientras que el nivel de hercogamia intramorfo evita la interferencia entre los órganos sexuales y la autopolinización. El mantenimiento de estos atributos promueve la deposición de polen legítimo, por el contrario, la variación de los órganos florales puede incrementar el depósito de polen propio y por consiguiente disminuir la fecundidad de las plantas.

MÉTODO

Sitio de estudio

Se estudiaron dos poblaciones silvestres de *Bouvardia ternifolia*, ubicadas en los Municipios de Tlanalapa y Huasca de Ocampo, en el estado de Hidalgo, México. Con base en observaciones detalladas de las plantas de ambas poblaciones, se detectó variación en el tamaño de las flores así como en la posición de anteras y estigmas.

Tlanalapa se ubica geográficamente entre los paralelos 19°48' 59" N y 98° 36' 08.37" O, a una altitud de 2,460 metros sobre el nivel del mar. El clima es templado-frío, registra una temperatura media anual de 14.1°C., con una precipitación anual de 490 milímetros por año. La vegetación esta compuesta por pastizales inducidos, nopaleras y bosques de encino.

Huasca de Ocampo se encuentra ubicado en las coordenadas 20° 12' 14.58" N y 98° 34' 31.53" O, con una altitud de 2,100 msnm. El clima es templado semi-frío, con una temperatura media anual de 15° C y una precipitación anual de 500 milímetros. La vegetación se encuentra compuesta por bosques de oyamel, pino y encino (INEGI, 2015).

La distancia entre las dos localidades (43.82 Km) y la ausencia de parches continuos de plantas en la región que las separa, permiten suponer que la dinámica de apareamientos es funcionalmente independiente en ambas.

Especie de estudio

***Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltldl. (Rubiaceae)**

Es un arbusto perenne, autoincompatible, que mide de 0.3 a 1.5 m de altura. Tiene hojas verticiladas, de 3 a 4 por nodo, estípulas pequeñas, pecíolos de 0.5 a 11 mm de largo, láminas lineares, lanceoladas o elípticas, con mayor frecuencia elíptico-lanceoladas que miden de 1 a 10 cm de largo y de 0.2 a 2.5 cm de ancho, ápice agudo, base cuneiforme y nervación pinnada.

Las flores tienen una corola tubular roja, que llega a medir de 5 a 30 mm de largo, con un anillo vellosos interno hacia la base, se arreglan en inflorescencias terminales de 3 a 40 flores, con pedicelos de 2 a 14 mm de largo. El fruto es una cápsula de 4.5 a 9 mm de largo y 5 a 10 mm de ancho, las semillas miden de 2 a 3.5 mm de ancho (Rzedowski & Rzedowski, 2001).

Su periodo de floración va de julio a septiembre, como su síndrome lo indica es polinizada principalmente por colibríes y las semillas maduran de septiembre a octubre (Figura 3).

En México está ampliamente distribuida en bosques, matorrales y pastizales, es relativamente común en lugares ligeramente perturbados y se le ha reportado en los estados de Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz México, Querétaro, San Luis Potosí, Michoacán e Hidalgo, entre otros (Villaseñor & Espinosa, 1998).



Figura 3. *Bouvardia ternifolia*. Arbusto con flores (A), Inflorescencia en panícula (B), (C) longitud de las corolas pin (arriba) y thrum (abajo) y (D) posición de los órganos sexuales en los morfos pin (arriba) y thrum (abajo).

Estimación de la reciprocidad estigma-antera y DEA.

En cada población se estimó la proporción de morfos florales muestreando aleatoriamente al menos $n=30$ individuos/población. Además se registró el número de tallos por planta con la finalidad de calcular su tamaño y el número de flores/planta. Por último en esta sección se midieron con un vernier digital (Mitutoyo Absolute IP 67 Resolución 0.01mm) la longitud (LC) y ancho de la corola (AC), la longitud de estambres (LA) y estilos (LE) y la distancia entre estigmas y anteras

(DEA) de tres flores para cada una de 27 plantas pin y 28 thrum en Tlanalapa y 12 plantas pin y 18 thrum en Huasca (Figura 4).

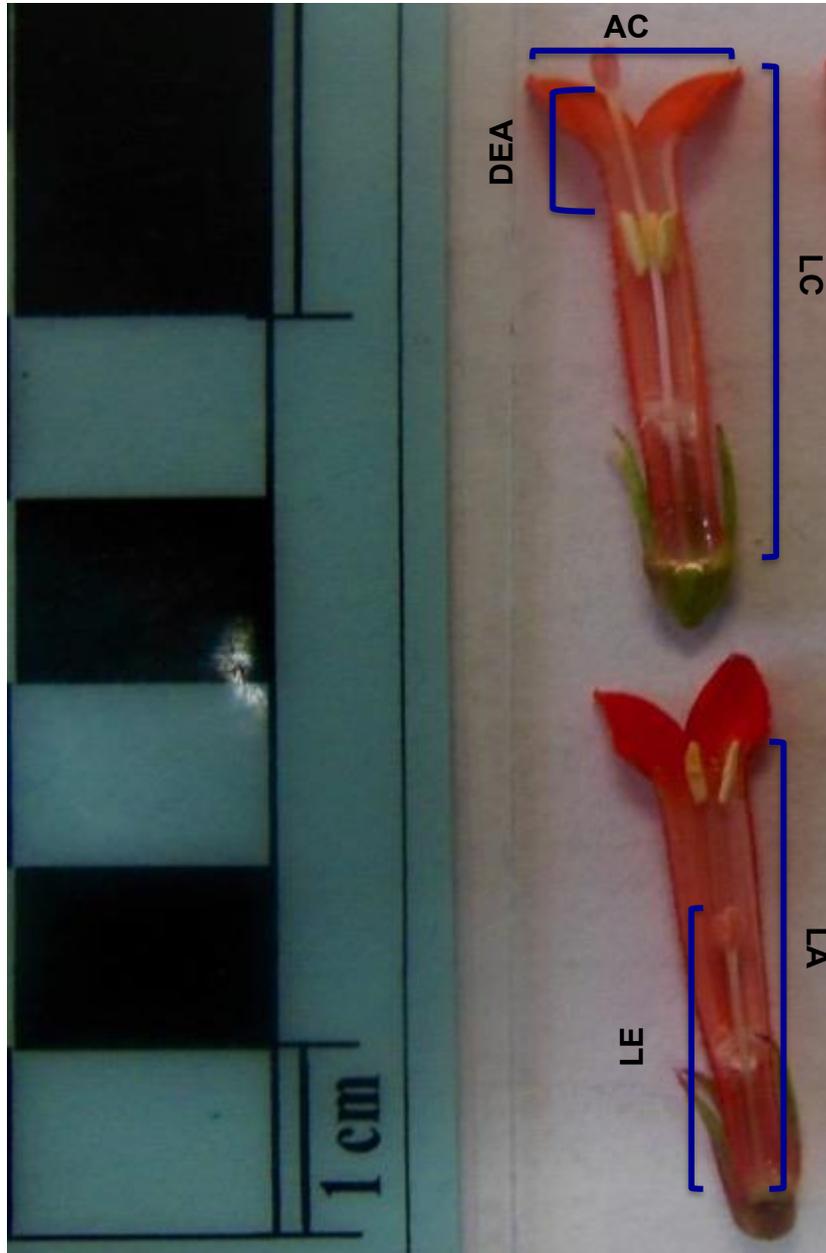


Figura 4. Atributos medidos a las flores de *Bouvardia ternifolia*. Donde LA es la longitud de estambres, LE longitud de estilo, AC ancho de la corola, LC largo de corola y DEA distancia entre estigma y anteras.

Caracterización del polen y estimación de depósito de polen legítimo.

Todas las flores cuyos órganos reproductivos fueron medidos en campo se colectaron en tubos de 1.6 ml con FAA y se trasladaron al laboratorio. De cada flor de 10 plantas/morfo/población se obtuvo una antera para hacer preparaciones semipermanentes con gelatina de fucsina para teñir los granos de polen. En total se elaboraron n 40 preparaciones que se examinaron al microscopio (AxioScope A-1 Zeis, 40X) donde se seleccionó un campo claro del que se obtuvo una micrografía. En cada imagen se midió el largo y ancho de 10 granos de polen utilizando el programa ImageJ, con la finalidad de estimar su tamaño.

De la misma manera se elaboraron preparaciones semipermanentes con los estilos y estigmas de 3 flores de 12 plantas pin y 18 thrum en Huasca y de 3 flores de 27 plantas pin y 28 thrum en Tlanalapa. El criterio para identificar el tipo de polen es que el polen propio depositado en los estigmas es considerado ilegítimo, mientras que el polen del morfo opuesto es considerado legítimo. En cada preparación y utilizando un objetivo 40X (AxioScope A-1 Zeis) fueron seleccionados dos campos en los que se identificó y contó el número de granos de polen legítimo, ilegítimo y totales depositados en el estigma (Figura 5).

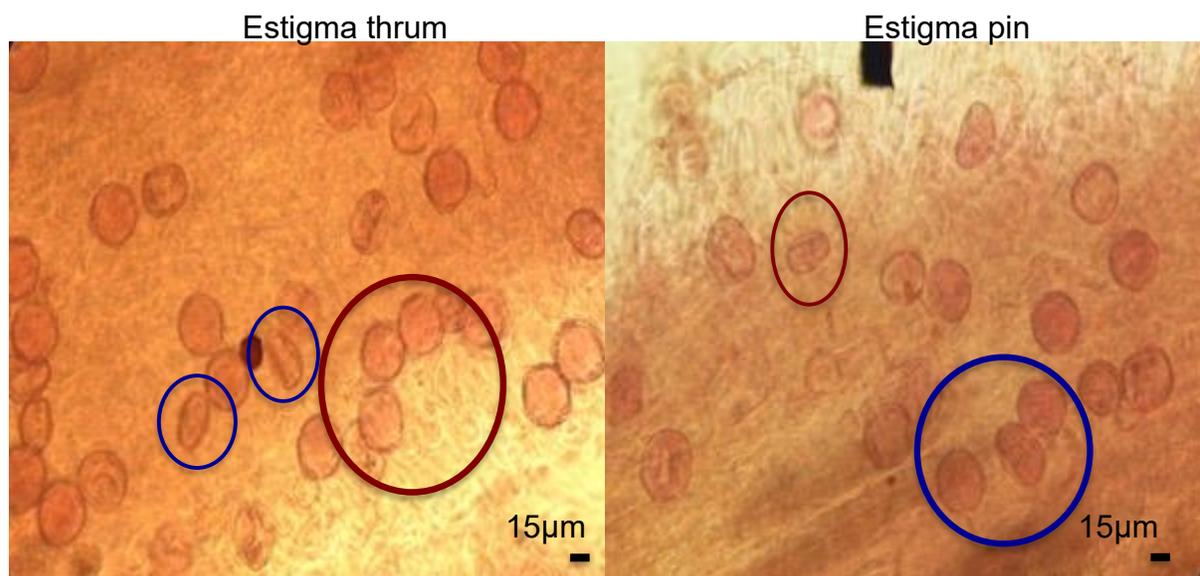


Figura 5. Micrográficas de granos de polen depositados en estigmas pin y thrum. Se resaltan en rojo los granos de polen ilegítimos y en azul los legítimos en cada tipo de estigma.

Estimación de la fecundidad

La fecundidad de las plantas se estimó registrando el número de frutos maduros por planta, en un momento puntual al final de la temporada reproductiva. Específicamente se registró la fecundidad de individuos reproductivos de ambos morfos en 42 plantas pin y 39 plantas thrum en Huasca y 27 plantas pin y 33 thrum en Tlanalapa. La identificación de los morfos se hizo, porque, las plantas aún tenían flores.

Análisis estadísticos

Para evaluar la proporción de morfos florales en cada población se realizó una prueba de chi cuadrada. Con el objetivo de documentar las diferencias en el tamaño de los granos de polen entre morfos florales se hizo una prueba t de student. Además se realizaron ANOVAS anidadas para documentar las diferencias en la DEA, el depósito de polen legítimo y fecundidad entre las poblaciones. Por último para determinar las diferencias en el tamaño de las plantas se realizó una prueba de Kruskal-Wallis. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa JMP 9-0.1. Con la finalidad de cumplir requisitos básicos del análisis empleado, en todos los casos se verificó que la distribución de la variable de respuesta fuera normal.

RESULTADOS

Reciprocidad estigma-antera y DEA.

En Tlanalapa se obtuvieron medidas de los órganos florales de 27 plantas pin y 28 thrum y de 12 plantas pin y 18 thrum en Huasca. El análisis de los datos obtenidos muestra un alto grado de reciprocidad en la longitud de los órganos sexuales entre morfos de ambas poblaciones. Es decir, no se observó que la posición de estigmas pin anteras thrum y viceversa, difiera significativamente en ninguna de las dos poblaciones. Sin embargo la DEA de ambos morfos en Huasca es significativamente menor que en Tlanalapa ($F_{3,254}=72$ $P<0.0001$). Asimismo el contraste posterior correspondiente muestra que en Huasca la DEA es

significativamente más pequeña en las plantas del morfo thrum (Tukey HSD $Q = 2.6$, $P = 0.05$) (Figura 6).

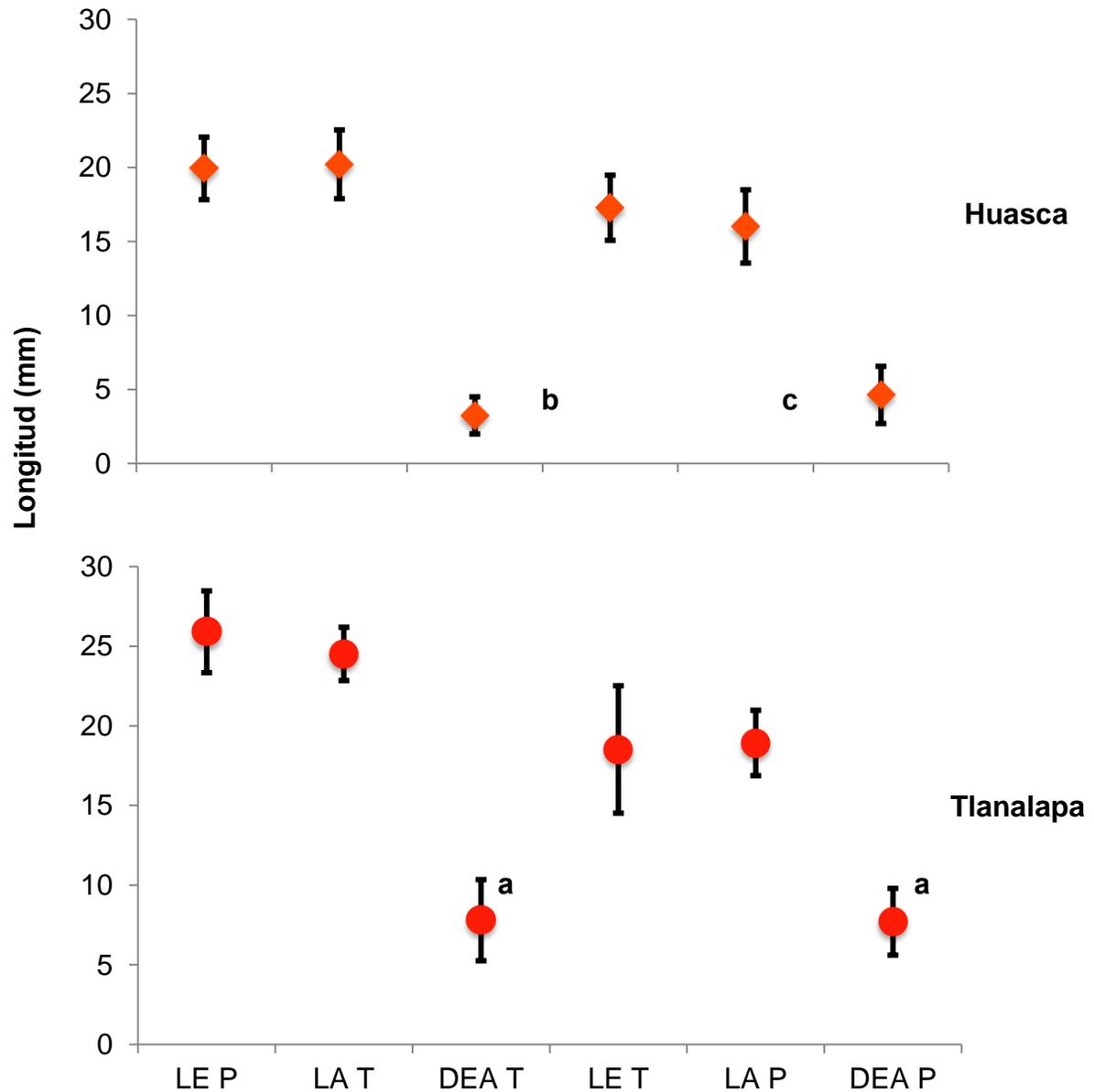


Figura 6. Reciprocidad entre órganos sexuales y DEA en Tlanalapa y Huasca. Las DEAs señaladas con letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$). Donde LEP y LET refieren la longitud de estilo, LAP y LAT la longitud de estambres, DEAP y DEAT la distancia entre estigmas y anteras de los morfos pin y thrum.

Tamaño de polen pin y thrum

Para cada población se obtuvieron medidas de 100 granos de polen pin y 100 thrum. Los análisis señalan que el tamaño de los granos de polen (morfo/población) no difiere entre poblaciones, pero sí dentro de ellas (pin vs thrum) ($t_{1,199} = 184$, $P < 0.001$, $t_{1,199} = 163$, $P < 0.001$). Los granos de polen thrum son consistentemente más grandes ($\bar{x} = 29.9$ y $\bar{x} = 29.6 \mu\text{m}$) que los pin ($\bar{x} = 23.2$ y $\bar{x} = 22.6 \mu\text{m}$) en Tlanalapa y Huasca respectivamente (Cuadro 1).

Cuadro 1. Variación en la talla (micrómetros) del polen pin y thrum en Tlanalapa y Huasca.

Población	Tamaño (μm) \pm DE		$T_{1,199}$	P
	Pin	Thrum		
Tlanalapa	23.2\pm0.0013	29.9\pm0.0014	184	<0.0001
Huasca	22.6\pm0.0016	29.6\pm0.0034	163	<0.0001

Depósito de polen legítimo

En esta sección se incluyen el número de estigmas/planta/morfo/población; teniendo 81 estigmas de 27 plantas pin y 84 estigmas de 28 thrum de Tlanalapa y 36 estigmas de 12 plantas pin y 54 estigmas de 18 thrum de Huasca, para un total de 255 estigmas. En las muestras analizadas se registró 97% de polen legítimo en estigmas pin y thrum de Tlanalapa, mientras que en Huasca se registró 69 y 37% de polen legítimo en pin y thrum respectivamente. El análisis de estos datos indica que el depósito de polen legítimo es significativamente menor en la población de Huasca ($F_{3,236}=187$ $P<0.0001$) (Figura 7). Donde además dicho estimador difiere entre los

morfos florales, en plantas thrum es significativamente menor que en plantas pin (Tukey HSD Q= 2.6, P = 0.05).

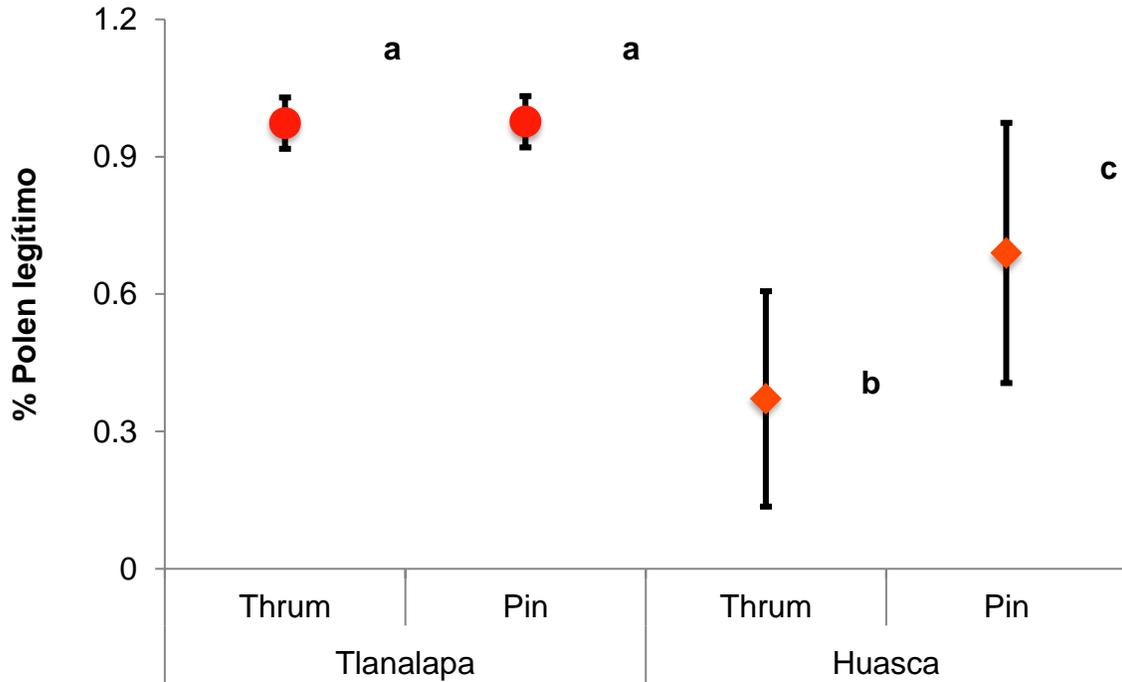


Figura 7. Porcentaje de polen legítimo depositado en estigmas pin y thrum de Tlanalapa y Huasca. Los tratamientos señalados con distinta letra indican diferencias significativas en el depósito de polen entre poblaciones y dentro de ellas, específicamente en Huasca (P < 0.05).

Evaluación de la fecundidad

Se registró el número de tallos y frutos maduros de cada planta en ambas poblaciones. Se observó que el número de tallos/planta es mayor en Huasca (Kruskal-Wallis test, $\chi^2 = 10$, P = 0.0015), pero no se detectaron diferencias en este estimador del tamaño para los morfos dentro de las poblaciones. El número de frutos producidos en promedio por individuo en Tlanalapa es de 82 en pin y 81 en thrum, mientras que en Huasca es de 24 pin y 22 en thrum. El análisis de estos

datos mostro que las plantas de Tlanalapa producen significativamente más frutos que las de Huasca ($F_{3,138} = 11.4$, $P < 0.001$) y que el número de frutos por planta no difiere entre los morfos florales dentro de cada población (Figura 8).

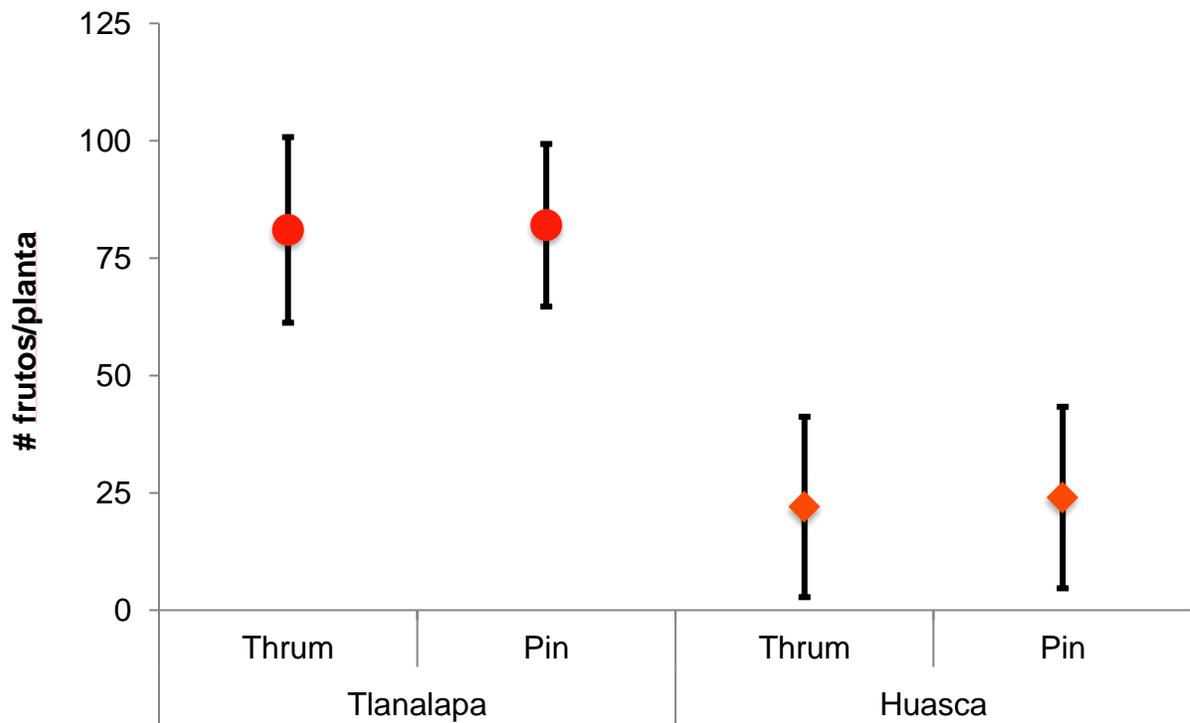


Figura 8. Fecundidad con base en la producción de frutos en plantas thrum y pin de Tlanalapa y Huasca, se observa la diferencia entre los morfos de las dos poblaciones.

DISCUSIÓN

Variación de los órganos sexuales, reciprocidad intermorfo y DEA

El principal objetivo de este trabajo es documentar las consecuencias de la variación en la posición recíproca de anteras y estigmas y su separación intrafloral sobre el depósito de polen legítimo y la fecundidad, más que conocer las causas de dicha variación. De esta manera en esta sección se pretende ilustrar la magnitud de la variación en la longitud y separación de los órganos sexuales entre morfos, dentro y entre poblaciones y contrastarlo con lo reportado para otras especies e incluso poblaciones de la misma especie.

Los coeficientes de variación (CV) de los órganos sexuales en plantas pin van de 10 a 15% y los de thrum varían de 7 a 22%. Es decir, los órganos del morfo thrum son más variables. Cuando se considera la variación general a nivel de población, los órganos florales de las plantas de Tlanalapa varían de 7 a 22% y los de Huasca de 13 a 15%. En general la identidad de los órganos florales, el morfo y la población contribuyen a la variación total. En particular los órganos florales de las plantas thrum tienen mayor variación que los de pin. Sin embargo, esta variación no afecta la reciprocidad entre anteras y estigmas.

Por su parte los CV de la DEA en plantas pin en Tlanalapa y Huasca respectivamente son de 27 y 42%, mientras que para las plantas thrum son de 33 y 38%. La magnitud de estos CV es entre 2 y 3 veces mayor que la observada en la longitud de los órganos florales. Esta diferencia es particularmente marcada en las plantas de Huasca. La explicación a este contraste es que mientras la variación en la DEA es semejante entre morfos en ambas poblaciones, el promedio de la DEA en Huasca es significativamente menor en relación al de Tlanalapa. En otras palabras, mientras la variación en el tamaño de los órganos florales no afecta la reciprocidad estigma-antera, si impacta en la DEA. Puntualmente la DEA es menor en las plantas de Huasca, principalmente en las flores de morfo thrum. Este resultado sugiere que tanto las flores como los órganos sexuales de las plantas de Huasca experimentan una reducción con la consecuente disminución en la DEA.

Estudios de la variación de los órganos sexuales de especies distílicas (*Palicourea padifolia*, Contreras, 1999; *Polygonum jucundum*, Chen, 2010; *Faramea cyanea*, Maruyama, 2010) documentan CV de 4 a 16% y de 5 a 13% en estilos y estambres respectivamente. Estos valores son semejantes a los que se han registrado en este trabajo. Estos trabajos también evidencian que los CV de la DEA van de 12 a 22% y de 8 a 27% en plantas pin y thrum respectivamente, lo cual contrasta con los CV de la DEA en Tlanalapa y marcadamente con los de Huasca.

De manera particular, Faivre & McDade (2001), estudiaron la variación de los órganos sexuales en dos poblaciones de *Bouvardia ternifolia*. Sus datos indican que los CV de estilos y estambres de ambos morfos van de 9 a 18% y de 7 a 17% respectivamente. Sus resultados además muestran que los CV de la DEA van de 15 a 31% y de 18 a 31% en plantas pin y thrum respectivamente. Estos niveles de variación en órganos sexuales y DEA son semejantes a los que se han documentado en el presente trabajo. No obstante los autores refieren que la reciprocidad estigma-anteras y la DEA se mantienen constantes en ambos morfos florales en las dos poblaciones estudiadas. Este señalamiento contrasta con los resultados del presente trabajo. Puntualmente la diferencia radica en que la DEA es significativamente menor en Huasca, aún cuando la reciprocidad estigma-antera se mantiene en ambas poblaciones.

En numerosas especies distílicas las anteras se encuentran fijadas al tubo de la corola, por lo tanto la elongación o reducción de la corola altera la longitud de los estambres o la posición relativa de las anteras dentro de la flor. La modificación correlacionada de corola y estambres puede a su vez afectar la reciprocidad estigma-antera y/o la DEA (Thompson, 2000; Keller, 2012; Faife-Cabrera *et al.*, 2014). Esto último depende del grado en el que estilo y estambres varíen por separado. Al respecto se han reportado genes modificadores que regulan la distancia estigma-antera ya sea acortando la longitud del estilo o incrementando la longitud de los estambres produciendo variantes homostilas (Mather & Winton, 1941; Fenster & Barrett, 1994). Las observaciones de este trabajo indican que la

longitud de estambres y estilos esta correlacionada, y que en las flores más pequeñas de Huasca se mantiene la reciprocidad pero los estigmas y anteras están más cercanos entre sí. Es decir, en términos absolutos la DEA de las flores de Huasca es menor a la observada en Tlanalapa.

A pesar de que no se tiene evidencia del control genético de la posición relativa de anteras y estigmas en *B. ternifolia*, la correlación observada hace suponer que los genes que regulan la distancia estigma-antera, acortan o alargan de manera conjunta la longitud del estilo y los estambres. Ello permitiría explicar la presencia de flores más pequeñas, que mantienen la reciprocidad pero con menor DEA en Huasca. Sin embargo, es relevante mencionar que se han observado algunas flores con estigmas y anteras superpuestos. Una condición que sugiere la existencia de morfos florales homostílicos. En todo caso se trata de un tema que requiere de estudios minuciosos que permitan dilucidar el mecanismo subyacente a la variación de los órganos florales en esta especie.

Los resultados obtenidos en este y otros estudios indican que en especies distílicas la variación de los órganos sexuales es frecuente o habitual. Esta variación se ha reportado incluso en otras poblaciones de *Bouvardia ternifolia* (Faivre & McDade, 2001). Sin embargo, los resultados de este trabajo señalan claramente que dicha variación puede afectar de forma asimétrica la reciprocidad y la DEA. Las consecuencias de este patrón de variación y su relación con el depósito de polen y el éxito reproductivo de las plantas se discute en las próximas secciones.

Variación en el depósito de polen, inter e intrapoblacional

El arreglo recíproco de los órganos sexuales en especies distílicas favorece la transferencia eficiente de polen entre morfos, pero por sí solo no es suficiente para asegurarla. La disminución de la DEA intra-morfo que se ha documentado en este trabajo puede propiciar la interferencia entre órganos sexuales e incrementar la probabilidad de depósito de polen propio. El depósito de polen legítimo en estigmas thrum y pin de Tlanalapa es 2.62 y 1.4 veces mayor que en las plantas de Huasca respectivamente. Y como ya se discutió, es en Huasca donde se ha registrado una DEA significativamente menor, principalmente en las plantas thrum.

Diversos estudios han documentado que el depósito de polen legítimo es asimétrico entre morfos florales. Se ha reportado que en contraste con las flores pin, las thrum presentan 1 y hasta 2 veces más polen ilegítimo en sus estigmas (Ree, 1997; Castro, 2004; Hernández & Ornelas, 2007; Brys, 2009; Martén-Rodríguez *et al.*, 2013). Este sesgo en el depósito de polen propio es en primera instancia similar al observado en este trabajo.

Un planteamiento relativamente común para explicar el flujo y depósito asimétrico de polen tiene que ver con la especialización sexual entre morfos florales. Dado que los estigmas pin y las anteras thrum se ubican en la parte superior de la corola tienen mayor probabilidad de contactar con el cuerpo de los polinizadores. Por tanto el morfo thrum es más eficiente como donador de polen y el pin como receptor (Ganders, 1974; Swamy, 1984; Stone & Thomson, 1994; Matsumura, 2002; Pailler, 2002; Keller, 2014). Sin embargo, esta hipótesis asume que la asimetría en el depósito de polen legítimo entre morfos florales está acompañada de una asimetría en fecundidad en sentido opuesto. Lo cual ha sido raramente probado (Rosas & Domínguez, 2009).

Una explicación alternativa a las diferencias en el depósito de polen legítimo entre morfos, es que se debe a la disminución correlacionada de la longitud de corola y DEA, con frecuencia observada en flores thrum. Esta modificación de las estructuras florales se ha reportado en especies distílicas como *Jasminum fruticans*, *Gaertnera vaginata* y *Palicourea padifolia* (Thompson, 2000; Pailler, 2002; Hernández & Ornelas, 2007). Esta evidencia es consistente con los resultados de este trabajo.

Además, se ha reportado que desigualdades en diversos factores como: la proporción de morfos florales (1:1), la distancia entre vecinos del morfo opuesto, el tamaño del despliegue floral y el servicio de los polinizadores, pueden influir en la deposición de polen legítimo entre morfos (Feinsinger, 1987; Björkman, 1994; Ornelas, 2004; Waites, 2004; Brys, 2008, 2009; Ferrero, 2011, 2014). En las poblaciones de *Bouvardia ternifolia* estudiadas en este trabajo se ha registrado

explícitamente que los tres primeros factores son homogéneos. Sin embargo, no se tienen registros de los polinizadores. Por lo tanto no es posible descartar que un servicio asimétrico de polinización, diferencias ambientales o distintas presiones a las que están expuestas las plantas dentro de las poblaciones estén influyendo en el depósito de polen propio (ilegítimo) observado particularmente en las plantas de Huasca.

Diversos estudios de la variación de los órganos florales en especies distílicas se han enfocado en documentar el mantenimiento de la posición recíproca de estigmas y anteras, y usualmente se asume que esta condición es suficiente para promover la polinización legítima (Ree, 1997; Massinga, 2005; Wolfe, 2009; Keller, 2012). No obstante, con menor frecuencia se ha explorado la variación en la DEA y sus repercusiones en el tipo de polen que se deposita en los estigmas (Thompson, 2000; Pailler, 2002; Hernández & Ornelas, 2007). En este trabajo se ha documentado que aún cuando existe una alta reciprocidad de órganos florales, una menor DEA en las plantas de Huasca es acompañada de mayor depósito de polen ilegítimo. Estos resultados indican que el mantenimiento de la reciprocidad no es una condición que garantice la transferencia y depósito de polen legítimo que caracterizan al dimorfismo floral de la distilia.

Variación en la fecundidad y su relación con la DEA y el depósito de polen legítimo

Las estimaciones de la fecundidad indican que el número de frutos por morfo dentro de cada población no difiere. Sin embargo, las plantas de Tlanalapa producen en promedio 3.5 veces más frutos que las de Huasca. Como ya se mencionó, la DEA en las plantas de Tlanalapa no difiere entre morfos y es significativamente mayor que la observada en las plantas pin y thrum de Huasca. El depósito de polen legítimo varía en el mismo sentido, en Tlanalapa no difiere entre morfos y es mayor que en las plantas pin y thrum de Huasca. Esta serie de resultados en conjunto sugieren que una menor separación entre estigmas y anteras incrementa la probabilidad de depósito de polen propio, lo cual se ve reflejado en una menor

producción de frutos. Esta correlación permitiría explicar la menor fecundidad registrada en las plantas de Huasca, en contraste con las de Tlanalapa. Sin embargo no es posible descartar que factores ajenos a la morfología de la planta, tales como el tipo y la eficiencia de los polinizadores, la distancia entre vecinos compatibles, diferencias ambientales dentro de las poblaciones estén ejerciendo influencia sobre el depósito de polen legítimo y fecundidad de las plantas de Huasca, específicamente.

En Huasca la fecundidad no difiere entre morfos a pesar de que tanto la DEA como el depósito de polen legítimo es menor en plantas thrum. Ello requiere una explicación alternativa. Supongamos que la fecundación de óvulos y la maduración del fruto requieren una cantidad mínima de polen legítimo depositado en el estigma. Es decir, si el depósito de polen legítimo es suficiente para fecundar una cantidad mínima necesaria de óvulos, los frutos maduran, de lo contrario son abortados. Este argumento asume que la producción de frutos esta limitada por la disponibilidad de polen legítimo, y que los frutos iniciados son abortados por las plantas cuando no se ha fecundado un fracción mínima de óvulos que justifique la maduración. De acuerdo con este planteamiento, la aborción de frutos relacionada con la limitación de polen legítimo sería mayor en Huasca y casi nula en Tlanalapa. Pero por otro lado y a nivel intrapoblacional, el grado de divergencia en la limitación por polen entre morfos probablemente no es suficiente para evidenciar diferencias en la producción de frutos en Huasca.

En este trabajo no tenemos evidencia que permita corroborar estos planteamientos. En todo caso se trata de un tema fuera del alcance y objetivo del estudio, pero que merece ser explorado con base en manipulaciones y experimentos de polinización controlados. Sin embargo, y con la finalidad de explorar y explicar este resultado, se realizo un conteo del número de semillas por fruto en plantas de ambas poblaciones. La aborción de frutos relacionada con limitación por polen legítimo, implica que no debería haber variación en el número de semillas por fruto. Efectivamente, el análisis mostró que no existen diferencias significativas en esta

variable ($t_{1,79} = 0.53$, $P = 0.6$). Es decir, la limitación por polen tiene el potencial de reducir la producción de frutos por planta pero no el número de semillas por fruto. A pesar de que se trata de evidencia correlativa, esto apoyaría el planteamiento de aborción de frutos en relación con el grado de limitación por polen legítimo.

Al respecto, diversos estudios reportan asimetrías en el depósito de polen legítimo entre morfos sin que se observen diferencias en la producción de semillas (Darwin, 1877; Nichols, 1985; Cardoso de Castro, 2004; Silva, 2010). Un señalamiento común es que la magnitud de la diferencia en el depósito de polen legítimo no limita la producción de semillas. Por otro lado, las asimetrías intermorfo en la producción de frutos se han documentado en diferentes estudios. No obstante los desequilibrios en la producción de frutos se han asociado principalmente con desviaciones en la proporción de morfos florales en las poblaciones (Waites, 2004; Brys *et al.*, 2009; Ferrero, 2014), con reducción en la reciprocidad entre órganos florales (Ganders, 1979; Feinsinger & Busby, 1987; Domínguez, 1997) y con deficiencias en el servicio de la polinización (Björkman, 1994; Rossi, 2005; Ferrero, 2011).

Dado que no se han documentado divergencias significativas en la proporción de morfos y en la reciprocidad entre órganos, en este trabajo se puede descartar la influencia de estos componentes en la producción asimétrica de frutos. En relación al servicio de polinización, este trabajo no cuenta con datos o evidencia que permitan valorar su influencia en la fecundidad. Sobre este tema, se ha argumentado que los polinizadores tiene mayor probabilidad de contactar las anteras thrum y los estigmas pin debido a que con frecuencia sobresalen de la corola floral (Swamy, 1984; Ornelas, 2004; Faivre & McDade, 2000; Brys, 2008). Lo cual resultaría en discrepancias en la polinización. En esta circunstancia las plantas pin serían más eficientes como receptoras y las thrum como donadoras de polen (Ganders, 1974; Swamy, 1984; Stone & Thomson, 1994; Matsumura, 2002; Pailler, 2002; Keller, 2014). Sin embargo, la asociación entre la asimetría en el depósito de polen y un desequilibrio de la fecundidad en sentido opuesto, se ha cuestionado por falta de evidencia sólida.

La relación entre una menor DEA y mayor depósito de polen ilegítimo, permiten suponer que las flores de Huasca en contraste con las de Tlanalapa, experimentan una mayor probabilidad de depósito automático de polen propio. Una consecuencia de esta asociación puede ser, como lo sugieren los resultados, un incremento relativo de la aborción de frutos. Este planteamiento es parsimonioso en el sentido que alude exclusivamente a factores intrínsecos de las plantas (variación en atributos florales) que determinan la dinámica de donación y recepción de polen, y no a la influencia de factores externos cuyo efecto puede ser complejo de poner a prueba y corroborar.

Implicaciones de los resultados en el funcionamiento y mantenimiento de la distilia

Dada la correspondencia reproductiva entre morfos florales, la reducción de la DEA puede deteriorar la efectividad de los apareamientos clasificados y los atributos que caracterizan a la distilia de diversas formas. La disminución de la DEA puede resultar en niveles extremos de limitación por polen para la producción de progenie por entrecruza, y en esta circunstancia se puede favorecer la pérdida del sistema de incompatibilidad (SI) y la producción de semillas por autopolinización. Esta modificación al sistema de apareamiento puede derivar en la recombinación de los atributos que caracterizan el dimorfismo floral y resultar en el establecimiento de sistemas homostílicos, es decir en la disolución de la distilia (Mather & de Winton, 1941; Charlesworth & Charlesworth, 1979; Carlson, 2008).

Otro escenario en teoría probable es la disminución en la DEA pero sin la pérdida del SI, lo cual podría resultar en asimetrías en el depósito de polen legítimo y en la fecundidad entre morfos florales. Una consecuencia directa de esta asimetría reproductiva es la especialización funcional (sexual) de los morfos florales, donde la baja adecuación masculina de un morfo floral (aquel incapaz de donar polen) se relacionaría necesariamente con baja adecuación femenina del morfo contrario y viceversa (Ornudff, 1966; Lloyd, 1979; Beach & Bawa, 1980). Al respecto se ha propuesto que esta especialización sexual de un sistema distílico puede conducir al

establecimiento de poblaciones que en el extremo sean funcionalmente dioicas, donde un morfo funcione como hembra y el otro como macho (Nichols, 1985, Rosas *et al.*, 2005; Rosas & Domínguez, 2009).

CONCLUSIÓN

La variación fenotípica de los órganos sexuales afecta su posición relativa y la separación entre órganos dentro de las flores. Es posible que los mecanismos subyacentes a la variación de los órganos operen de forma tal que se conserve la reciprocidad aunque disminuya la distancia entre órganos sexuales. Bajo este escenario la reducción del tamaño y la distancia entre órganos (DEA) puede incrementar la probabilidad de depósito de polen propio, restringir el depósito y disponibilidad de polen de entrecruza para fecundar óvulos y reducir la adecuación de plantas individuales.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los órganos sexuales de las flores de plantas pin y thrum varían considerablemente en su longitud, sin embargo, dicha variación no afecta la reciprocidad (interfloral), pero influye de manera que se reduce la separación espacial entre estigma y anteras (intrafloral). Esta reducción ocasiona que los órganos sexuales se encuentren al mismo nivel, por lo que la probabilidad de depósito de polen ilegítimo en los estigmas es alta. Lo que se traduce en una disminución en la fecundidad debida a la baja disponibilidad de polen legítimo. Las diferencias en la morfología floral, el depósito de polen legítimo y la fecundidad entre morfos y poblaciones, brindan un escenario para realizar estudios que permitan dilucidar que factores intervienen en el mantenimiento del sistema y de las poblaciones que lo presentan.

BIBLIOGRAFÍA

- Ainsworth, C. 2000. Boys and girls come out to play: The molecular biology of dioecious plants. *Annals of Botany* 86: 211-221.
- Baena-Díaz, F., Fornoni, J., Sosenski, P., Molina-Freaner, F. E., Weller, S. G., Pérez-Ishiwara, & R., Domínguez, C. A. 2012. Changes in reciprocal herkogamy during the tristylous-distylous transition in *Oxalis alpina* increase efficiency in pollen transfer. *Journal of Evolutionary Biology* 25: 574-583.
- Barrett, S. C. H. 1988. The evolution, maintenance, and loss of self-incompatibility systems. En: J & L. Lovett-Doust (eds.), *Plant Reproductive Ecology: Patterns and Strategies* pp 98-119. Oxford University Press.
- Barrett, S. C. H. 1992. *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.
- Barrett, S. C. H. 1993. The evolutionary biology of tristylous. En: D. Futuyma & J. Antonovics (eds.), *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. Vol. 9: pp 283-326. Oxford University Press, Oxford, U.K.
- Barrett, S. C. H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* 3: 274-284.
- Barrett, S. C. H., Colautti, R.I. & Eckert, C.G. 2008. Asymmetrical mating patterns and the evolution of biased morph ratios in a tristylous daffodil. *Genetics Research* 90:3-15.
- Beach, J. H. & Bawa, K. S. 1980. Role of pollinators in the evolution of dioecy from distylous. *Evolution* 34: 1138-1142.
- Björkman, T. 1994. The effectiveness of heterostyly in preventing illegitimate pollination in dish-shaped flowers. *Sex Plant Reproduction* 8: 143-146.
- Brys, R. & H. Jacquemyn. 2009. Floral display size and spatial distribution of potential mates affect pollen deposition and female reproductive success in distylous *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *Plant Biology* 12: 597-603.
- Brys, R., H. Jacquemyn, M. Hermy & T. Beeckman. 2008. Pollen deposition rates and the functioning of distylous in the perennial *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *Plant Systematics and Evolution* 273: 1-12.

- Cardoso de Castro, C. & Cardoso, A. A. 2004. Distyly and sequential pollinators of *Psychotria nuda* (Rubiaceae) in the Atlantic rain forest, Brazil. *Plant Systematics Evolution* 244: 131-139.
- Carlson, M. L., Gisler, S. D. & Kelso, S. 2008. The role of reproductive assurance in the arctic: a comparative study of a homostylous and distylous species pair. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 40: 39-47.
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B. 1979. A model for the evolution of distyly. *American Naturalist* 114: 467-498.
- Chen, M. L. & Zhang, P. X. 2010. Distyly in *Polygonum jucundum* Meins. (Polygonaceae). *Plant Systematics Evolution* 288: 139-148.
- Contreras, S. P. & Ornelas, F. J. 1999. Reproductive conflicts of *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) a distylous shrub of a tropical cloud forest in Mexico. *Plant Systematics and Evolution* 219: 225-241.
- Darwin, C. 1877. The different forms of flowers on plants of the same species. J. Murray, London, Reino Unido.
- De Vos, J. M., Keller, B., Isham, S. T., Kelso, S., Conti, E. 2012. Reproductive implications of herkogamy in homostylous primroses: variation during anthesis and reproductive assurance in alpine environments. *Functional Ecology* 26: 854-865.
- Dulberger, R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significances in the heterostylous syndrome. En: Barrett, S. C. H. (ed.), *Evolution and function of heterostyly* pp 41-84. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.
- Faivre, A. E. & McDade, L.A. 2001. Population-level variation in the expression of heterostyly in three species of Rubiaceae: does reciprocal placement of anthers and stigmas characterize heterostyly?. *American Journal of Botany* 88: 841-853.
- Feinsinger, P. & Busby, W. H. 1987. Pollen carryover: experimental comparisons between morphs of *Palicourea lasiorrachis* (Rubiaceae), a distylous, bird-pollinated, tropical treelet. *Oecologia* 73: 231-235.

- Fenster, B. C. & Barrett, S. C. H. 1994. Inheritance of mating-system modifier genes in *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Heredity* 72: 433-445.
- Ferrero, V. 2014. Heterostilia, ¿Qué sabemos hasta el momento?. *Ecosistemas* 23(3): 23-30.
- Ferrero, V., S. Castro, J. M. Sánchez & L. Navarro. 2011. Stigma-antler reciprocity, pollinators, and pollen transfer efficiency in populations of heterostylous species of *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). *Plant Syst Evol* 291: 267-276.
- Ganders, F. R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607-635.
- García-Robledo, C. 2008. Asymmetry in pollen flow promotes gender specialization in morphs of the distylous neotropical herb *Arcytophyllum lavarum* (Rubiaceae). *Evolutionary Ecology* 22: 743-755.
- Hernández-Ramírez, A. M. 2012. Distyly, floral visitors, and fructification in two natural populations of *Psychotria nervosa* (Rubiaceae). *Ecoscience* 19: 133-139.
- Hernández, A. & J. F. Ornelas. 2007. Disassortative pollen transfer in distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a hummingbird-pollinated shrub. *Ecoscience* 14(1): 8-16.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Consultado 08-09-2015 en <http://cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/hgo/territorio/clima.aspx>.
- Keller, B., de Vos, J. M., & Conti, E. 2012. Decrease of sexual organ reciprocity between heterostylous primrose species, with possible functional and evolutionary implications. *Annals of Botany* 110: 1233-1244.
- Keller, B., Thomson, J., E., & Conti, E. 2014. Heterostyly promotes disassortative pollination and reduces sexual interference in Darwin's primroses. *Functional Ecology* DOI: 10.1111/1365-2435.12274.
- Lloyd, D. G. 1979. Evolution towards dioecy in heterostylous populations. *Plant Systematics and Ecology* 131: 71-80.
- Lloyd, D. G. & C. J. Webb. 1992. The evolution of heterostyly. En: S. C. H. Barrett

- (ed.), Evolution and function of heterostyly, 179-208. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Lloyd, D. G. & J. M. A. Yates. 1982. Intrasexual selection and the segregation of pollen and stigmas in hermaphrodite plants, exemplified by *Wahlenbergia albomarginata* (Campanulaceae). *Evolution* 36: 903-913.
- Maruyama P. K., Wanderley, A. F. & Oliveira, P. E. 2010. Night and day service: Distyly and mixed pollination system in *Faramea cyanea* (Rubiaceae). *Flora* 205: 818-824.
- Massinga, P. H., Johnson, S. D., & Harder, L. D. 2005. Heteromorphic incompatibility and efficiency of pollination in two distylous *Petanisia species* (Rubiaceae). *Annals of Botany* 95:389-399.
- Mather, K. & De Winton, D. 1941. Adaptation and counter-adaptation of the breeding system in *Primula*. *Annals of Botany* 5: 297-311.
- Matsumura C. & I. Washitani. 2002. Heterostylous morph differences in pollen transfer and deposition patterns in *Primula sieboldii* on a visitation by a queen bumblebee, measured with a semi-natural experimental system. *Plant Species Biology* 17: 1-12.
- Meeus, S., Honnay, O., Brys, R. & Jacquemyn, H. 2012. Biased morph ratios and skewed mating success contribute to loss of genetic diversity in the distylous *Pulmonaria officinalis*. *Annals of Botany* 109: 227-235.
- Nichols, M. 1985. Population composition, gender specialization, and the adaptive significance of distyly in *Linum perenne* (Linaceae). *New Phytologist* 102: 209-217.
- Nishihiro, J., Washitani, I., Thomson, J. D. & Thomson, B. A. 2000. Patterns and consequences of stigma height variation in natural population of a distylous plant, *Primula sieboldii*. *Functional Ecology* 14: 502-512.
- Ornduff R. 1966. The origins of dioecism from heterostyly in *Nymphoides* (Menyanthaceae). *Evolution* 20: 309-314.
- Ornelas J, F., L. Jiménez, C. González & A. Hernández. 2004. Reproductive ecology of distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) in a tropical montane cloud

- forest. I. Hummingbirds effectiveness as pollen vectors. *American Journal of Botany* 91(7): 1052-1060.
- Paillet, T., Sandrine, M. & Thompson J. D. 2002. Pollen transfer patterns in a distylous plant with overlapping pollen-size distributions. *Oikos* 99: 308-316.
- Pérez-Barrales, R. & Arroyo, J. 2010. Pollinator shifts and the loss of style polymorphism in *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae). *Journal of Evolutionary Biology* 23: 1117-1128.
- Ree, R. H. 1997. Pollen flow, fecundity, and the adaptive significance of heterostyly in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *Biotropica* 29(3): 298-308.
- Rosas, F., Pérez-Alquicira, J. & Domínguez, C. A. 2005. Environmentally induced variation in fecundity compensation in the morph-biased male-sterile distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany* 92(1): 116-122.
- Rosas, F., & Domínguez, C. A. 2009. Male sterility, fitness gain curves and the evolution of gender specialization from distyly in *Erythroxylum havanense*. *Journal of Evolutionary Biology* 22: 50-59
- Rossi, A. A. B., Orlando, O. L. & Vieira, F. M. 2005. Distyly and variation in floral traits in natural populations of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica*. 28(2): 285-294.
- Rzedowski, G. C. & J. Rzedowski. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2ª ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- SAS. 2009. JMP User's Guide, Release 9.0.1. SAS Institute, Cary, NC.
- Silva, C. A., Faria V. M. & Hummel, A. C. 2010. Floral attributes, ornithophily and reproductive success of *Palicourea longepedunculata* (Rubiaceae), a distylous shrub in southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Botânica* 33(2): 207-213.
- Stone, J. L., & Thomson, J. D. 1994. The evolution of distyly: pollen transfer in artificial flowers. *Evolution* 48: 595-606
- Swamy, R. N. & Bahadur, B. 1984. Pollen flow in dimorphic *Turnera subulata* (Turneraceae). *New Phytologist* 98: 205-209.

- Thompson, J. D. & Dommée, B. 2000. Morph-specific patterns of variation in stigma height in natural populations of distylous *Jasminum fruticans*. *New Phytologist* 148: 303-3014.
- Valois-Cuesta, H., López-Pere, L. D. & Quinto-Valoyes, D. Y. L. Z. 2009. Reproductive ecology of *Psychotria poeppigiana* (Rubiaceae): a comparative analysis between long-styled and short-styled plants. *Ecotrópicos* 22: 1-12.
- Villaseñor, R. J. & F. J. Espinoza. 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Waites, R. A. & Ågren, J. 2004. Pollinator visitation, stigmatic pollen loads and among-population variation in seed set in *Lythrum salicaria*. *Journal of Ecology* 92: 512-526.
- Weller, S. G. 2009. The different forms of flowers – what have we learned since Darwin?. *Botanical Journal of the Linnean Society* 160: 249-261.
- Wolfe, L. M., Massinga, P. H., & Johnson, S. D. 2009. A quantitative evaluation of the distylous syndrome in *Sebaea grandis* (Gentianaceae). *South African Journal of Botany*. 75: 785-790.