



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Evaluación de la eficiencia polinizadora de los colibríes y su efecto en los niveles de hercogamia en *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Israel Morales Guzmán

Director de tesis

Dr. Carlos Alberto Lara Rodríguez.

Comité tutorial:

Dr. Amando Bautista Ortega.

Dr. Raúl Ortíz Pulido.

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2011.



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Posgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta

Maestría en Ciencias Biológicas

maestría en
ciencias
biológicas

**COORDINACIÓN DE LA MAESTRÍA
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis de **Israel Morales Guzmán** realiza para la obtención del grado de Maestro en Ciencias Biológicas, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Evaluación de la eficiencia polinizadora de los colibríes y su efecto en los niveles de hercogamia en Bouvardia ternifolia (Rubiaceae)”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A tentamente
Tlaxcala, Tlax., febrero 18 de 2011

DR. CARLOS ALBERTO LARA RODRÍGUEZ

DR. AMANDO BAUTISTA ORTEGA

DR. MARTÍN ALEJANDRO SERRANO MENESES

DRA. CITLALLI CASTILLO GUEVARA

DRA. MARIANA DEL SOCORRO CUAUTLE ARENAS



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado Bajo la Norma:
ISO 9001:2000-NMX-CC-9001-IMNC-2000



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070 Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradooctbcuat@gmail.com
Tlaxcala, Tlax.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a las siguientes instituciones y personas que intervinieron en la realización de este trabajo:

Al postgrado del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta (CTBC) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala por la realización de estudios de maestría. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con el número de registro 218167. A la institución ECOES por el apoyo de beca de movilidad. A la estación científica de La Malinche por la realización de mi trabajo de campo. A los doctores Carlos A. Lara, Raúl Ortíz, Amando Bautista, Martín Serrano, Mariana Cuatle, Citlalli Castillo y Margarita Martínez por el apoyo incondicional para la culminación de este trabajo.

El siguiente trabajo va dedicado a todas estas personas que estuvieron en este proceso formativo y comprensivo, extendiendo mi agradecimiento incondicional a ustedes: Hermelid Guzmán (Madre), Rubén Morales, Francisca Peralta (Abuela), Angélica Morales (tía), Salomón Morales (Tío), Julio Morales, Omar Rodríguez, Carlos A. Lara, Francisco Pérez, Araceli Meneses, Laura Nieto, Alexa Nieto y familiares, Dulce Becerrera, Vero Mendiola, Israel Paul, Armando Reyes, Jesús Paul, Víctor Segundo, Marino Aguilar, Mariano Torres, Omar Sereno, Fernando Pelayo y Familia, Chapa (One love), Myrna Oropeza, Angie Saénz, Angel Morales, Valeria Morales, Diego Rodríguez, Rodrigo Morales, Arantxa Morales, Ale Fabila, Ulices Conejo, Rox López, Viri Bejarano, Luis Salinas, Vanesa Martínez, Celes Soria, Maria Cristina Tello, Chefa Crespo, Hellen Martínez, Jah Selassie, Abdi, Othon.

RESUMEN

Las especies de plantas distílicas tienen individuos que producen flores con pistilos que se prolongan más allá de la corola y anteras por debajo de ella (morfo Pin) e individuos que producen flores con pistilos cortos y anteras que sobresalen por la entrada de la corola (morfo Thrum). Estas características promueven el flujo simétrico de polen y asumen una estabilidad en la transferencia recíproca entre los morfos. Sin embargo, se ha sugerido que cuando el forrajeo de sus polinizadores es selectivo hacia algún morfo, el flujo del polen se puede tornar altamente asimétrico. Asimismo, la correspondencia entre anteras y pistilos de ambos morfos puede desviarse de la reciprocidad perfecta, y promoverse un éxito reproductivo diferencial entre los morfos, y como consecuencia llevar a la especie a evolucionar otros sistemas reproductivos tales como la dioecia. Estas características hacen que las plantas distílicas sean un modelo interesante para estudiar procesos relacionados a la especialización de las funciones sexuales y evaluar el papel de los polinizadores en promoverla. *Bouvardia ternifolia* es una planta herbácea distílica presente en La Malinche y cuyos principales visitantes son cinco especies de colibríes. En el presente estudio, se evaluó el nivel de reciprocidad de los órganos sexuales (anteras y pistilos) de los morfos de esta planta, y se realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas sobre los sitios de deposición de polen en sus colibríes visitantes. Asimismo, se llevaron a cabo pruebas de polinización con colibríes de las cinco especies en ambos morfos, y la producción de semillas fue cuantificada. Los resultados obtenidos demostraron que las flores de *B. ternifolia* no son completamente recíprocas en sus estructuras sexuales, lo cual afecta la forma en que el polen de ambos morfos es depositado al ser visitado por el gremio de colibríes. Asimismo, se demostró que la deposición diferencial de polen podría ser producto tanto de la falta de reciprocidad total y de las diferencias en la talla del pico de los colibríes visitantes. Aunado a esto, la transferencia diferencial de polen parece tener consecuencias desde el punto de vista del éxito reproductivo de los morfos visitados.

ÍNDICE

Introducción.....	1
Antecedentes.....	4
Justificación.....	7
Hipótesis.....	7
Objetivos.....	8
Objetivo general.....	8
Objetivos particulares.....	8
Metodología.....	9
Sitio de estudio.....	9
Especies de estudio.....	9
Especies de colibríes.....	10
Evaluación de los niveles de hercogamia en <i>Bouvardia ternifolia</i>	11
Determinación de los sitios de deposición de polen en colibríes	12
Determinación de la eficiencia de polinización por colibríes	13
Análisis estadístico.....	14
Resultados.....	15
Discusión.....	23
Conclusiones.....	29

Perspectivas.....	30
Referencias.....	31

INTRODUCCIÓN

Las plantas con flores son predominantemente hermafroditas (Bawa y cols. 1985, Fetscher 2001, Barrett 2002 a y b, Cesaro y cols. 2004). Esta condición sexual, en la que ambos órganos sexuales se ubican dentro de la misma flor, puede representar algunos costos reproductivos ya que facilita la interferencia física entre anteras y pistilos, promoviendo así, imprecisiones en la transferencia de polen (Lloyd y Webb 1986, Webb y Lloyd 1986, Fetscher 2001, Barrett 2002 a y b) y aumentos en su autodeposición, lo cual puede impedir que polen proveniente de plantas coespecíficas fecunde óvulos (Galen y cols. 1989, Waser y Price 1991, Broyles y Wyatt 1993, Dinnézt 1997, Sage y cols. 1999). De esta manera, se pueden aumentar los niveles de desperdicio de gametos masculinos a través de autopolinizaciones y acarrear posibles consecuencias negativas sobre la adecuación de las especies como consecuencia de la endogamia (Charlesworth y Charlesworth 1987, Barrett 2002 a y b, Cesaro y cols. 2004, Bailey y McCauley 2006). A pesar de ello, una estrategia que permite a especies hermafroditas reducir tales costos reproductivos, es la separación espacial de anteras y pistilos dentro de la misma flor (hercogamia) (Lloyd y Webb 1986, Webb y Lloyd 1986, Fetscher 2001, Barrett 2002 a y b, Murcia 2002).

La heterostilia es un polimorfismo genotípico caracterizado por diferencias en la longitud del pistilo y la altura de las anteras en las flores de una misma especie de planta, esto resulta en un mecanismo que promueve la polinización cruzada evitando así la autopolinización (Ganders 1979). La heterostilia se presenta en 25 familias de angiospermas, de las cuales la distilia (dos morfos) está en la mayoría de los taxa y sólo en tres familias se presenta la tristilia (tres morfos) (Barrett 1992). Las especies distílicas producen flores con pistilos que se prolongan por encima de la corola (aparentemente maximizando la función femenina) y anteras por debajo de la corola (morfo Pin), y flores con anteras que sobresalen por la cavidad de la corola (sugiriendo maximización de la función masculina) (morfo Thrum). Estas características hacen de las plantas distílicas un modelo interesante para estudiar procesos relacionados con la especialización de las funciones sexuales y los mecanismos que la promueven.

Actualmente se reconocen dos papales funcionales para explicar el significado adaptativo de la distilia; por un lado, el polimorfismo promueve una mayor precisión en la transferencia de polen y por otro, el sistema de autoincompatibilidad evade pasivamente autofecundaciones y endogamia (Barrett 2002a). A pesar de ello, algunas de las

características morfológicas asociadas a la distilia pueden no manifestarse o presentar considerables variaciones entre especies (Ganders 1979, Dulberger 1992, Faivre y McDade 2001); por su parte, la autoincompatibilidad es un atributo que no se expresa en algunas especies heterostílicas (Dulberger 1992, Castro y Oliveira 2001), en otras lo hace parcialmente (Sobrevila y cols. 1983) y en una gran mayoría se desconoce su manifestación (Barrett 1992).

Existen tres modelos que sugieren una explicación acerca de la evolución de la heterostilia. Darwin (1877) al igual que Barret (1992) manifestaron que la distribución bimodal en las alturas de los pistilos y las anteras a nivel poblacional es lo que permite una transferencia segura del polen en flores que presentan morfología opuesta, asumiendo que la proporción de los morfos en una población es la misma al igual que la producción de polen, frutos y semillas. Otra posible explicación la ofrecen Lloyd y Webb (1992), quienes proponen que la heterostilia evolucionó partiendo de poblaciones de flores autocompatibles con la morfología aproximándose a la hercogamia (longitud recíproca entre anteras y pistilos), resaltando la importancia de la limitación del polen y los recursos para la intrusión de las poblaciones con estas características. Sin embargo como explicación alternativa, Beach y Bawa (1980) sugieren que las flores heterostílicas son típicamente visitadas por dos tipos de polinizadores, el tipo I que son polinizadores de lengua y/o picos largos (colibríes, lepidópteros) y el tipo II que son polinizadores de lenguas y/o picos cortos (abejas y moscas). Por lo tanto hace una predicción en el supuesto de no esperar ninguna desviación de la distribución bimodal en el largo de pistilos y anteras en las poblaciones de transición de heterostilia a dioecia siempre y cuando las visitas de ambos tipos de polinizadores no sea sesgada hacia ningún morfo floral, y mientras las proporciones de morfos florales en la población sean iguales, y de no ser así, habría una selección hacia la producción de flores hembras y machos. Esta última propuesta, sugiere en consecuencia que es posible analizar diferencias en el flujo de polen entre morfos, producto de la efectividad de transporte del mismo por parte de los polinizadores.

El polimorfismo en anteras y pistilos generalmente va acompañado por un mecanismo de incompatibilidad esporofítica en el cual sólo son posibles las cruces entre morfos opuestos para la producción de semillas (Darwin 1887, Stone 1995), por lo que ambos morfos también forman dos grupos reproductivos. De este modo, debido a que la

polinización cruzada es necesaria para la fertilización de los morfos, ellos no deberían diferir en atributos que contribuyan a la atracción y recompensa de los visitantes florales (Leege y Wolfe 2002) llevando por consiguiente, a un igual éxito reproductivo. Sin embargo, diferencias a este respecto han sido reportadas en la mayoría de las especies distílicas, sugiriendo una especialización ya sea en la función masculina o femenina, existiendo casos tan extremos que los morfos pueden llegar a ser funcionalmente dioicos (Lloyd 1979).

Existen modelos teóricos que analizan las presiones selectivas que pueden influir en el rumbo evolutivo de plantas distílicas, los cuales sugieren que el dimorfismo en la longitud del pistilo se puede mantener en las poblaciones siendo evolutivamente estable (Charnov 1982). Sin embargo, otros modelos establecen que la distilia en algunos grupos de plantas, es una condición inestable y representa una etapa transicional en su evolución hacia la homostilia o hacia la dioecia (Charlesworth y Charlesworth 1979, Lloyd y Webb 1992).

Aun cuando el polimorfismo en anteras y pistilos en las plantas distílicas, parece estar diseñado para una transferencia recíproca de polen, la efectividad de tal mecanismo depende en gran medida de la eficiencia de los polinizadores (Beach y Bawa 1980).

Cuando el forrajeo de éstos es selectivo el flujo del polen se torna altamente asimétrico ante lo cual la heterostilia puede evolucionar en otros sistemas reproductivos (Barret 1992, Lloyd y Webb 1992). Algunos estudios empíricos y teóricos han enfatizado el papel de los polinizadores como la principal influencia evolutiva en el proceso de especialización sexual de las especies distílicas (Wyatt 1983, Barret 1992, Contreras y Ornelas 1999, Webb 1999, Leege y Wolfe 2002, Ornelas y cols. 2004a). En la mayoría de estos estudios, las plantas pin han comenzado a funcionar como hembras mientras que las thrum se comportan más como macho (Webb 1999). Sin embargo, la naturaleza e intensidad de presiones selectivas particulares, tales como los polinizadores específicos que favorecen la especialización del género, han sido escasamente investigadas (Ornelas y cols. 2004a). De esta forma, estudios consistentes en evaluar el papel de los polinizadores en su interacción con especies de plantas distílicas, son altamente necesarios, pues sentarán las bases para un mejor entendimiento sobre los efectos de un flujo asimétrico de polen en la especialización reproductiva de los morfos florales.

ANTECEDENTES

Darwin (1877) propuso que la heterostilia es un mecanismo que estimula el entrecruzamiento. Dado que las estructuras sexuales de los morfos florales Pin y Thrum se complementan para fecundarse en hercogamia recíproca (entre anteras y pistilos de longitud equivalente), la efectividad del polinizador para realizar el entrecruzamiento es un factor ecológico determinante para la reproducción en estas plantas (Beach y Bawa 1980, Barret 1998, Ornelas y cols. 2004a,b). Lloyd y Webb (1992) sugieren que las presiones que ejercen los polinizadores pueden llevar a la distílica por dos posibles rutas evolutivas: Por un lado evolucionar hacia una condición homostílica que implica la pérdida de uno de los morfos y la recuperación de la autofertilización, favorecida por altos niveles de autofecundación, eventos de colonización y escasez de polinizadores (Charlesworth y Charlesworth 1978), y por el otro una condición dioica, en donde los individuos ganen su adecuación a través de una de las dos vías sexuales, es decir con flores especializadas hembra y macho respectivamente (Barret 1992, Lloyd y Webb 1992). Esta última condición sería favorecida por un cambio en la biología de la polinización de las poblaciones, fracturando el curso complementario del polen entre los individuos de ambos morfos (Beach y Bawa 1980), lo que ocasionaría una transferencia direccional de polen. Dicha transferencia puede ser de estambres largos a pistilos largos, lo que genera diferencias en el éxito reproductivo entre los morfos florales (Ganders 1974) originando la eliminación de la utilidad y eventualmente la función de los pistilos y estambres cortos (Beach y Bawa 1980).

Estudios detallados de los polinizadores así como de los mecanismos involucrados en el proceso de polinización son indispensables para entender la evolución de la heterostilia. Estudios previos han reportado la existencia de preferencias de los polinizadores hacia un tipo de morfo debido al color de la flor (Raven 1972, Kay 1976 1979, Waser y Price 1981), el olor (Galen y Kevan 1980, Galen 1985), la cantidad de recompensa ofrecida (Bradshaw y cols. 1995), la morfología (Fenster 1991), la complejidad floral y las densidades de cada morfo (Stout y cols. 1998).

Un estudio realizado por Ornelas y colaboradores (2004), determinó que la eficiencia de distintas especies de colibríes como vectores de polen es distinta entre los morfos florales de una población distílica de *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), debido principalmente a diferencias en la calidad y cantidad de la recompensa ofrecida por ambos

morfos y a su producción de semillas y frutos. Dichas diferencias en el esfuerzo reproductivo resultan importantes en las plantas distílicas, lo que sugiere que los polinizadores ejercen presiones de selección en las características florales.

Las preferencias por algún tipo de morfo en particular, por parte de los polinizadores, pueden variar de sitio en sitio, entre diversos grupos de polinizadores y épocas del año. Probablemente dicha variación pueda llevar a un aislamiento reproductivo de los morfos (Waser 1978), de tal modo que las poblaciones de plantas distílicas distribuidas en un gradiente altitudinal y latitudinal pueden estar sujetas a distintos arreglos de visitantes florales y condiciones ambientales contrastantes, lo cual puede ocasionar distintos patrones de flujo de polen entre los morfos y, por consiguiente, a que la condición de reciprocidad entre morfos (hercogamia) pueda variar.

La hercogamia recíproca se ha interpretado hipotéticamente como un mecanismo que promueve la polinización cruzada (entre morfos florales) por medio de animales (Darwin 1877). Acorde a esta idea, el polen contenido en anteras dispuestas a diferentes niveles podría adherirse en distintas partes del cuerpo del polinizador, las cuales a su vez, corresponderían al punto donde los pistilos del morfo compatible contacten al animal (Barrett y Glover 1985, Lloyd y Webb 1992, Barrett 2002a, de Jong y Klinkhamer 2005). De esta manera, el polimorfismo podría limitar los niveles de desperdicio de gametos masculinos (polen) y a su vez, podría promover una mayor precisión en su transferencia, en comparación a lo que podría ocurrir en poblaciones donde las flores exhiben los órganos sexuales en un arreglo uniforme (Barrett 2002a, de Jong y Klinkhamer 2005).

La efectividad de la hercogamia recíproca en función de la polinización cruzada se ha evaluado principalmente a través de pruebas de cargas de polen estigmáticas en flores de ambos morfos bajo condiciones naturales (Olesen 1979a, Ganders 1979, Barrett y Glover 1985; Stone 1995, Ornelas y cols. 2004a, Hernández y Ornelas 2007a, García-Robledo 2008) o experimentales (Lau & Bosque 2003). Ganders (1979) y Olesen (1979a) entre otros, han resaltado la importancia de la emasculación floral (remoción de anteras) para evaluar si el dimorfismo estilar promueve la polinización cruzada, pues esta práctica elimina el componente ilegítimo de la carga de polen estigmática proveniente de la misma flor. No obstante, algunos investigadores no han encontrado diferencias significativas en la cargas de polen estigmáticas de flores emasculadas y sin emascular (Nishihiro y Washitani 1998, Cesaro y cols. 2004) y otros han asumido que la carga de polen estigmática es

principalmente el resultado de la actividad de los polinizadores (Cariveau y cols. 2004). Por otra parte, emasculación algunas flores puede ser una tarea poco práctica, especialmente en especies donde las anteras se encuentran fusionadas al tubo de la corola (ver Hernández & Ornelas 2007a, obs. pers. en este trabajo) y, de realizarse, podría alterar los patrones naturales de deposición de polen (Stone 1995), pues tal manipulación, seguramente reduce el atractivo de las flores a sus polinizadores (ver Cruden y Lyon 1989, Kearns y Inouye 1993, Strauss 1997).

En un estudio realizado en dos localidades del Estado de Tlaxcala (Acuitlapilco y el Parque Nacional La Malinche), Hernández (2006) examinó los factores que pueden influir en la selección diferencial de morfos entre los polinizadores. Sus resultados demostraron que en ambos sitios los morfos producen igual número de flores, pero las plantas de morfo pin producen más néctar y reciben más visitas por colibríes. Asimismo, reporta que las poblaciones de La Malinche no son recíprocamente hercogámicas. Estos resultados, sugieren que los colibríes en La Malinche pueden estar mostrando una preferencia por visitar más un morfo que el otro, sin embargo, los datos de este estudio no pueden concluir si esta preferencia conlleva diferencias en el flujo de polen y en el éxito reproductivo de ambos morfos; particularmente por las diferencias en la talla del pico de los colibríes visitantes.

JUSTIFICACIÓN

Se han realizado estudios empíricos y teóricos relacionados con el papel de la transferencia del polen asimétrico entre morfos florales como la principal presión evolutiva en el proceso de la especialización en géneros de especies distílicas. Sin embargo, son escasos los estudios que evalúan el efecto de los responsables directos de tal asimetría, como son los polinizadores y su eficiencia en el transporte de polen entre morfos. Por lo tanto se pretende en este trabajo aportar información sobre posibles efectos de la transferencia diferencial de polen y éxito reproductivo entre morfos, producto de las diferencias morfológicas entre los visitantes, y evaluar las posibles consecuencias en la hercogamia de la población de plantas estudiada.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Las diferencias en el transporte de polen entre los colibríes visitantes de *Bouvardia ternifolia*, determinan la variación del éxito reproductivo entre los morfos de esta especie y sus niveles de hercogamia?

HIPÓTESIS

1. Si la población de plantas estudiadas ha estado sujeta a un transporte diferencial de polen entre sus morfos florales, entonces sus niveles de hercogamia se alejarán de la reciprocidad.
2. Si los colibríes que visitan a los morfos florales varían en su longitud de pico, entonces los sitios de deposición de polen variarán con respecto al morfo visitado.
3. Si la deposición de polen varía entre colibríes con respecto al morfo visitado, entonces el éxito reproductivo será distinto entre ellos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficiencia de polinización por colibríes y su posible efecto en los niveles de hercogamia en la planta distílica *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae).

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Explorar posibles asimetrías en el flujo de polen a través de la medición de la reciprocidad en la posición de los órganos sexuales de ambos morfos.
2. Determinar si diferencias en la longitud del pico de los colibríes visitantes en los morfos de *Bouvardia ternifolia* se relacionan con diferencias en los sitios de deposición de polen en ellos.
3. Evaluar si diferencias en la deposición de polen en colibríes determinan diferencias en la eficiencia de polinización de ambos morfos florales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sitio de estudio

El estudio se realizó en los meses de Abril a Agosto del 2009 en parches florales de *B. ternifolia* con una extensión aproximada de 50 ha del Parque Nacional La Malinche, Tlaxcala (19° 14'N, 98° 58'W, 2900 msnm). Esta zona presenta una precipitación media anual de 800 mm, con periodo de lluvias que comprende de Junio a Octubre, y una temperatura media anual de 15 °C. La vegetación en el área de estudio esta compuesta por mosaicos de bosque abeto, bosque de pino, bosque de pino-roble, pastizales, y una vegetación secundaria en crecimiento debido a la quema del bosque y áreas de cultivo abandonadas. La descripción completa del área fue realizada por Díaz-Ojeda (1992).

Especies de estudio

Bouvardia ternifolia es una planta herbácea distíllica perenne (Familia Rubiaceae) que presenta un sistema de autoincompatibilidad. Su tamaño va de los 0.3 a 1.5 m, presenta estípulas pequeñas, pecíolos de 0.5 a 11 mm de largo, laminas extremadamente variables predominando las elíptico-lanceoladas, de 1 a 10 cm de largo y 0.2 a 2.5 cm de ancho. Tiene inflorescencias generalmente en forma de cima terminal de 3 a 40 flores, pedicelos de 2 a 14 mm de largo, corola tubular, de color salmón, rojo o anaranjado, el tubo de 5 a 30 mm de largo, lóbulos ovados a blondos, de 1.5 a 3.5 mm de largo, anteras de 2 a 4 mm de largo; cápsulas de 4.5 a 9 mm de largo y a 5 a 10 mm de ancho, semillas de 2 a 3.5 mm (Rzedowski y Rzedowski 1985). Esta planta se distribuye ampliamente en áreas perturbadas que comprenden del Valle de México a Oaxaca y de Sonora a Texas. Llamada comúnmente “trompetilla”, esta especie presenta un crecimiento rápido de las plántulas en lugares abiertos con sustrato rico y bien drenado, en zonas con climas templados, secos y semi-secos. *B. ternifolia* solo produce semillas cuando es polinizada por el morfo opuesto evitando así la autopolinización. En La Malinche la encontramos floreciendo en los meses de Mayo a Agosto, comenzando usualmente su desarrollo en Julio y su maduración se extiende hasta Octubre. Los colibríes (*Colibri thalassinus*, *Eugenes fulgens*, *Hylocharis leucotis*, *Lampornis clemenciae* y *Selasphorus platycercus*) son los principales visitantes de esta planta en la zona (Lara 2006).

Especies de colibríes

Las especies de colibríes que visitan esta especie de planta distílica presentan características morfológicas y conductuales distintas, abarcando todo un gradiente de longitudes, formas de picos y diferencias corporales. Estas características hacen que el ensamblaje de colibríes que visitan *B. ternifolia* sea un modelo ideal para evaluar diferencias en la eficiencia de transporte de polen con respecto a la morfología de los visitantes. Por ello, dado que las especies de colibríes visitantes presentan diferencias en tamaños de picos (largos: *Eugenes fulgens* (35–56 mm), medianos: *Lampornis clemenciae* (22–27 mm) y chicos: *Colibri thalassinus* (18–22 mm), *Hylocharis leucotis* (16–19 mm) y *Selasphorus platycercus* (16–20 mm) se decidió para fines de nuestro estudio trabajar con las especies representantes de cada uno de estos rangos y así evitar utilizar especies de colibríes cuyas medidas puedan sobrelaparse. De esta manera, en el presente estudio se evaluará la eficiencia en cargas de polen de *Colibri thalassinus*, *Eugenes fulgens*, *Hylocharis leucotis*, *Lampornis clemenciae* y *Selasphorus platycercus*.

Colibri thalassinus (colibrí oreji violeta-verde), es una especie que se encuentra principalmente en bosque de montaña al sureste de México y centro América. Presenta un tamaño grande (110–115 mm), muy similar al colibrí magnífico, pico negro moderadamente curvo (18–22 mm). Presenta coloraciones que van del verde brillante al verde dorado brillante por la parte superior mientras que por la parte baja es un verde esmeralda brillante. Las hembras se diferencian por una banda azul violeta más estrecha en la barbilla (Howell 2003, Williamson 2001, Johnsgard 1997).

Eugenes fulgens (colibrí magnífico) es una especie de tamaño grande (110–135 mm), pico negro (40–48♀ mm - 35–56♂ mm), y su cuerpo presenta coloraciones que van del verde manzana brillante a verde turquesa y una corona violeta metálico a púrpura en machos, y las hembras se diferencian por una frente oscura con un triángulo postcolor blanca (Howell 2003, Williamson 2001, Johnsgard 1997). En un estudio previo realizado en la Malinche, se reporta que *E. fulgens* es un colibrí generalista y residente de la zona durante todo el año, registrando su mayor abundancia en el mes de julio (Lara 2006).

Hylocharis leucotis (zafiro de orejas blancas) es una especie de tamaño pequeño (90–100 mm), pico pequeño (16–18 mm) de color rojo a anaranjado. Se distingue por la combinación de la línea blanca en su ojo y su mejilla negra, mientras que por la parte baja

es verde con una línea blanca, la hembra se diferencia por tener colores de verde dorado a bronce verde en la parte superior.

Lampornis clemenciae (gema de garganta azul) tiene un tamaño que va de los 120–135 mm con un pico mediano (24–27♀ mm - 22–24♂ mm) y recto, cola larga y ancha, contraste poste-ocular blanco de la raya con la corona verde y la máscara auricular oscura, con un típico azul brillante iridiscente confinado por un bigote blanco y corto. La hembra completamente gris con partes brillantes iridiscentes a menudo abigarrado (Howell 2003, Williamson 2001, Johnsgard 1997). *L. clemenciae* es una especie migrante altitudinal, muestra conductas territoriales defendiendo los parches florales de *B. ternifolia* (Lara 2006), al igual que *E. fulgens* presenta su mayor abundancia en Julio.

Selasphorus platycercus (colibrí de cola ancha) es de talla pequeña (90–110 mm), con un pico corto (17–20♀ mm - 16–19♂ mm), la coloración de la garganta en machos va del rojo fuego brillante iridiscente a rosa rojizo contrastando con el blanco vivo de su pecho, siendo el verde brillante el predominante en su cuerpo. La hembra presenta un verde brillante al igual que el macho pero con una coloración blanca por la parte baja de su cuerpo y decorado con una línea laterales de color bronce. Registros obtenidos en la Malinche (Lara 2006) muestran que *S. platycercus* es una especie migratoria latitudinal, cuya mayor abundancia se da en el mes de octubre. Sin embargo, actualmente se sabe que existen poblaciones residentes en las faldas de la Malinche durante los meses de Abril-Julio (Carlos Lara com. pers.).

Evaluación de los niveles de hercogamia en Bouvardia ternifolia

Para evaluar la reciprocidad en la longitud de pistilos y anteras en las flores de ambos morfos (grado de hercogamia), en el mes de Julio se colectaron 800 flores arbitrariamente de diferentes individuos de *B. ternifolia* (400 flores/morfo). Para realizar las mediciones, se utilizó un vernier digital (Mitutoyo®) graduado a una escala de 0.01 mm para determinar las longitudes de las siguientes partes florales: Filamento de la antera y filamento del pistilo. Las medidas obtenidas se utilizaron para determinar diferencias en la correspondencia entre las estructuras florales de ambos morfos.

Por otro lado, estas medidas se utilizaron para estimar la reciprocidad relativa o hercogamia entre las longitudes de anteras y pistilos para ambos morfos, mediante el índice de reciprocidad (R), $R = (A-S)/(A+S)$; donde A es la longitud de las anteras de un

morfo y S es la longitud del pistilo del morfo alternativo. La reciprocidad perfecta se presenta cuando R sea igual a 0 y no perfecta cuando se muestran valores diferentes de éste (Richards y Koptur 1993).

Determinación de los sitios de deposición de polen en colibríes

Para determinar los sitios posibles de deposición del polen (tanto cualitativa como cuantitativamente) sobre pico y cabeza de los colibríes al visitar flores de ambos morfos de *B. ternifolia*, de Abril a Mayo 2009 en parches en floración en las inmediaciones de La Malinche (19° 6'N, 19° 20'W, 2,900 m.s.n.m), se realizaron pruebas observacionales utilizando jaulas desarmables (60 cm x 60 cm x 120 cm). Para ello, 10 individuos de cada una de las especies (*C. Thalassinus*, *E. fulgens*, *H. Leucotis*, *L. clemenciae*, *S. platycercus* por presentar diferencias conductuales, morfológicas como la forma, medida del pico y abundancia) visitantes fueron capturados a lo largo del estudio, utilizando redes de niebla. Cada colibrí capturado se sometió a una prueba observacional descrita a continuación. Primero, se seleccionó arbitrariamente una planta de alguno de los dos morfos, la cual fue cubierta con malla de tul a manera de encierro por una jaula desarmable. La planta utilizada contaba con 10 flores abiertas y las excedentes se eliminaron. Previamente cada colibrí se limpió del pico y cabeza con un pincel y papel para eliminar restos de polen. Una vez realizado esto, el individuo se introdujo a la jaula durante 15 minutos para que visitara las flores *ad libitum*, registrando el número de flores visitadas. Después de este periodo el individuo fue retirado de la jaula para registrar la posición del polen tras sus visitas a las flores de la planta. Para ello, se tomaron fotografías de pico y cabeza. Posteriormente, el colibrí fue marcado con un pequeño corte en la 5ª rectris (para evitar el uso de recapturas) y liberado. Para la evaluación del siguiente colibrí, se utilizó una nueva planta que contuviera nuevamente 10 flores y se repitió el protocolo antes descrito.

Las fotos digitales obtenidas de cada individuo, fueron posteriormente analizadas en computadora con el programa Adobe PhotoShop CS4 versión para Macintosh (2008). Con este programa, se midió la distancia con respecto al pico, en donde se encontró depositado el polen. Con estos datos se pudo hacer un análisis cuantitativo sobre posibles diferencias entre especies de colibríes con respecto a los sitios de deposición.

Determinación de la eficiencia de polinización por colibríes

Para determinar la eficiencia de los colibríes para polinizar ambos morfos florales se realizaron experimentos de polinización cruzada del polen utilizando colibríes vivos como donadores. Para ello, y con la finalidad de minimizar efectos genéticos, dos plantas de ambos morfos fueron seleccionadas plantas arbitrariamente (Abundancia floral) como donadoras de polen a lo largo del experimento. En las polinizaciones se utilizaron 10 colibríes de cada una de las 5 especies que visitan *Bouvardia*. Previo a las polinizaciones, inflorescencias completas con botones florales a punto de abrir fueron cubiertas con malla tipo tul en 50 plantas de cada morfo (N=100).

El día de las polinizaciones las flores recién abiertas fueron destapadas y se procedió a los siguientes tratamientos: (1) el pico de un colibrí sujetado en la mano, fue introducido a una flor de la planta donadora en dos ocasiones (por ser el número de inserciones que un colibrí hace típicamente a esta especie de planta en condiciones naturales; Torres y cols. 2008), (2) posteriormente el colibrí se llevo a una flor recién abierta realizando 2 inserciones con el pico del colibrí a manera de simular la polinización cruzada en la planta del morfo opuesto. (3) Este protocolo fue repetido hasta completar 5 flores por planta (un total de 50 flores por especie/morfo).

Para cada evento de polinización se utilizó una flor nueva de las plantas donadoras para evitar que las cargas de polen disminuyeran. El procedimiento fue repetido al usar los colibríes de cada especie en ambos morfos florales. Después de las polinizaciones, las flores utilizadas se cubrieron con las bolsas de tul y se conservaron embolsadas por 5 semanas hasta la producción de semillas, justo antes de que los frutos maduraran y expulsaran sus semillas por acción del viento. Las plantas polinizadas fueron marcadas con el nombre de la especie de colibrí utilizada, fecha, morfo polinizado y número planta, esto con el fin de evitar confusión al momento de la recolección de frutos. Al cabo de este tiempo, los frutos y las semillas fueron contabilizadas con la ayuda de un bisturí y un microscopio.

Análisis estadístico

Las posibles diferencias en la correspondencia en las longitudes de anteras y pistilos de ambos morfos, fue evaluada con un ANDEVA de dos factores. En el modelo morfo y

estructura (antera y pistilo) fueron los factores fijos, y la longitud de estas estructuras (en mm) fue la variable dependiente.

La variación en las distancias, con respecto al pico, de los sitios de deposición de polen en las cinco especies de colibríes visitando ambos morfos, así como las posibles diferencias en el número de semillas producto de las polinizaciones manuales fueron analizadas utilizando ANDEVAS de dos factores. En los modelos morfo y especie de colibrí fueron los factores fijos y la distancia al polen (mm) y el número de semillas fueron las variables dependientes.

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el programa JMP versión 8. Los datos en cada análisis fueron transformados al logaritmo base 10 y su normalidad corroborada mediante pruebas de Kolmogorov-Smirnov. En las figuras se presentan los valores reales.

RESULTADOS

Mediciones florales

La población de *Bouvardia ternifolia* examinada en este trabajo, es típicamente distílica pues identificamos individuos que exhiben flores con el pistilo a una altura superior a la posición de las anteras (flores Pin) e individuos con este patrón en forma inversa (flores Thrum). Asimismo, nuestras mediciones en anteras y pistilos mostraron variaciones en tamaño según el morfo floral, lo cual quedó corroborado al encontrar que la separación espacial anteras-pistilo (hercogamia) fue diferente entre morfos (alejándose del valor de cero). De esta manera, encontramos mayor reciprocidad entre la posición de las anteras de las flores thrum y los pistilos de las flores pin (reciprocidad= -0.0033), que entre las anteras de las flores pin y los pistilos de las flores thrum (reciprocidad= 0.0462).

La validación de estos valores de estimación de reciprocidad a través del análisis estadístico de la longitud de anteras y pistilos en ambos morfos, así como su correspondencia, demostró que independientemente de los estructuras, las mayores longitudes corresponden al morfo pin ($F=26.6352$, $P=0.0001$). Asimismo, independientemente del morfo evaluado, las anteras presentaron las mayores longitudes para ambos morfos ($F=40.3982$, $P=0.0001$). En consecuencia, encontramos una diferencia significativa en la falta de correspondencia entre las anteras de pin y el pistilo de thrum, tal como lo muestra la significancia de la interacción entre el factor morfo y el factor estructura floral ($F=2781.562$, $P=0.0001$; Figura 1).

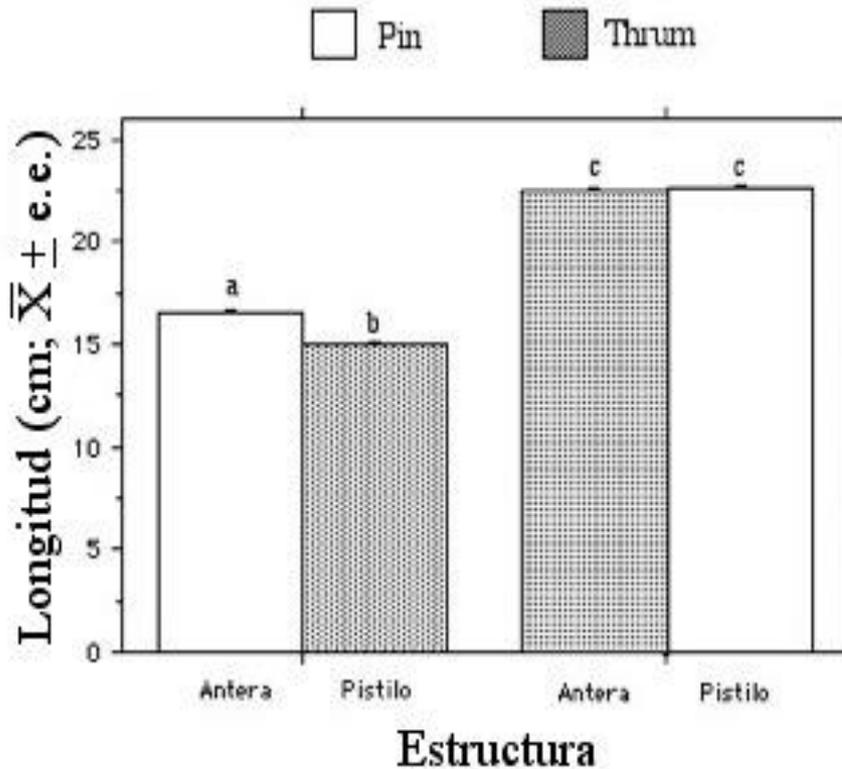


Figura 1. Hecogamia intramórfica y recíproca entre flores pin y thrum de *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae). Diferencias en la posición de órganos recíprocos $P < 0.001$.

Deposición de polen.

La evaluación cualitativa sobre la deposición de polen en las cinco especies de colibríes al visitar flores de ambos morfos, mostró evidencia sobre diferencias a este respecto. Las fotografías digitales sugieren que el polen de ambos morfos es depositado en la parte distal (zonas cercanas al inicio de la cabeza) en especies de colibríes con picos cortos (Foto 1), mientras que en colibríes con picos largos, el polen podría estar siendo depositado en la parte distal e intermedia de los picos (Foto 2).

Estas posibles diferencias fueron validadas a través del análisis estadístico de las distancias de deposición de polen en los colibríes. De esta forma, el ANDEVA de dos factores demostró que el polen de pin es depositado mayormente en las partes distales de los picos, a diferencia del polen thrum que se encuentra más en las partes terminales e intermedias ($F=649.483$, $P=0.001$).

Asimismo, independientemente del morfo visitado, los colibríes de picos largos tuvieron la deposición de polen a mayores distancias con respecto a sus picos ($F=649.483$

$P=0.001$). Finalmente, el análisis demostró una interacción significativa entre ambos factores (morfo y especie de colibrí), lo que significa que hay una deposición diferencial en los picos de los colibríes dependiendo del morfo visitado ($F=8.771$, $P=0.003$). De esta manera, los colibríes de picos pequeños presentan deposición de polen pin y thrum a distancias menores que las obtenidas en los colibríes de picos largos (Figura 2).

Pin a Thrum

Thrum a Pin

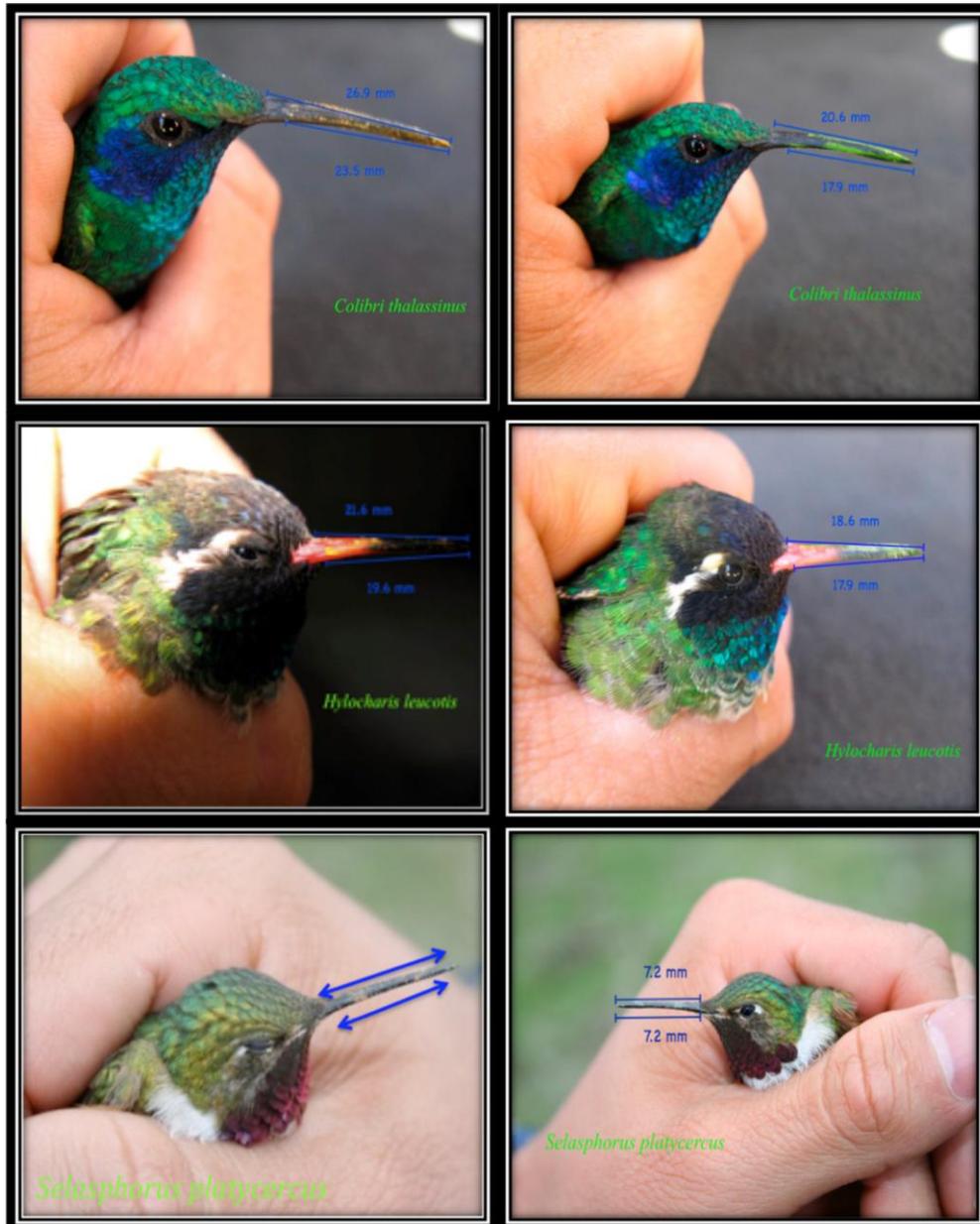


Foto 1. Deposición de polen *ad libitum* con las cinco especies de colibríes agrupados en picos cortos (*C. thalassinus*, *H. Leucotis*, *S. platycercus*) y picos largos (*E. fulgens*, *L. clemenciae*) después de visitar a *B. ternifolia*.

Pin a Thrum

Thrum a Pin

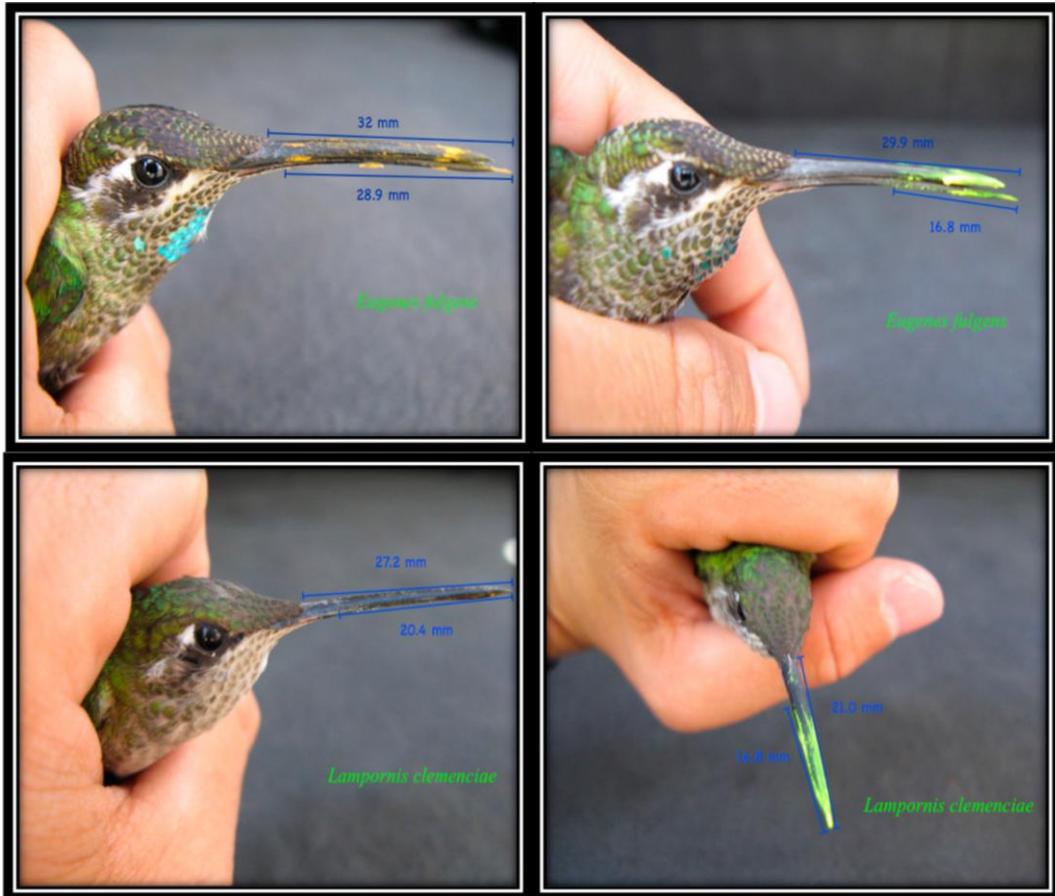


Foto 2. Deposición de polen *ad libitum* con las cinco especies de colibríes agrupados en picos cortos (*C. thalassinus*, *H. Leucotis*, *S. platycercus*) y picos largos (*E. fulgens*, *L. clemenciae*) después de visitar a *B. ternifolia*.

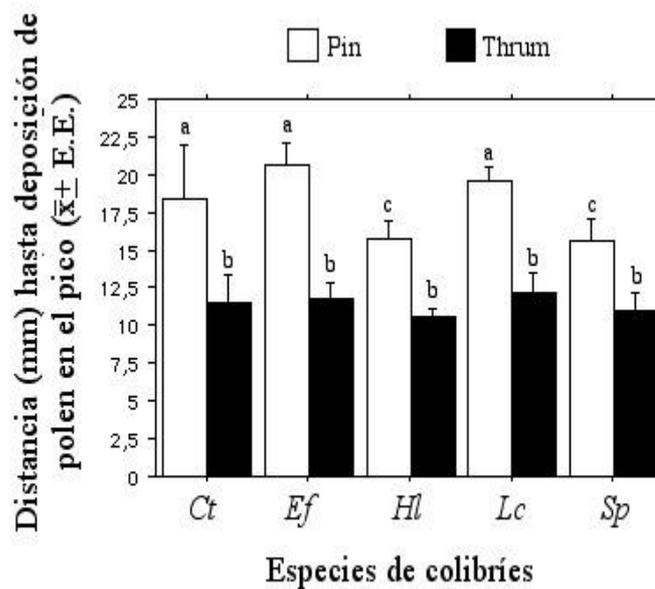
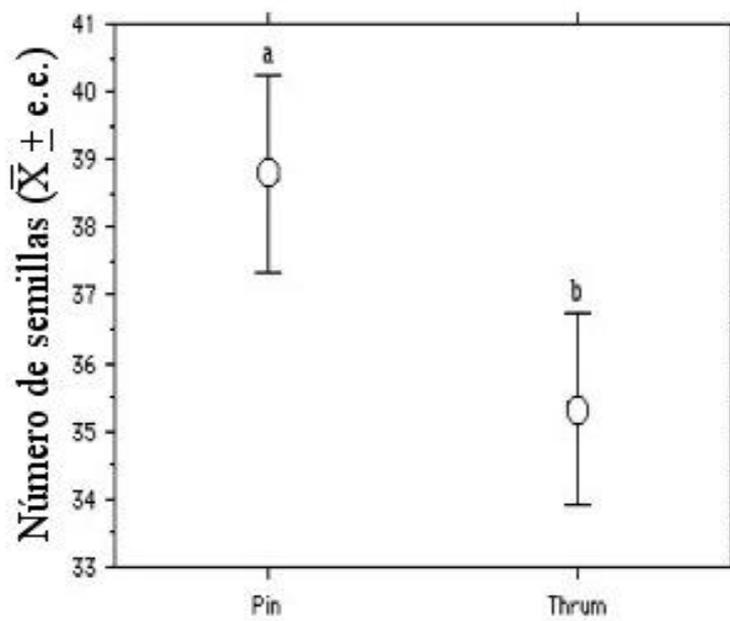


Figura. 2. Distancia de la deposición del polen con respecto al morfo visitado por las cinco especies de colibríes. Ct (*Colibrí thalassinus*), Ef (*Eugenes fulgens*), Hl (*Hylocharis leucotis*), Lc (*Lampornis clemenciae*) y Sp (*Selasphorus platycercus*).

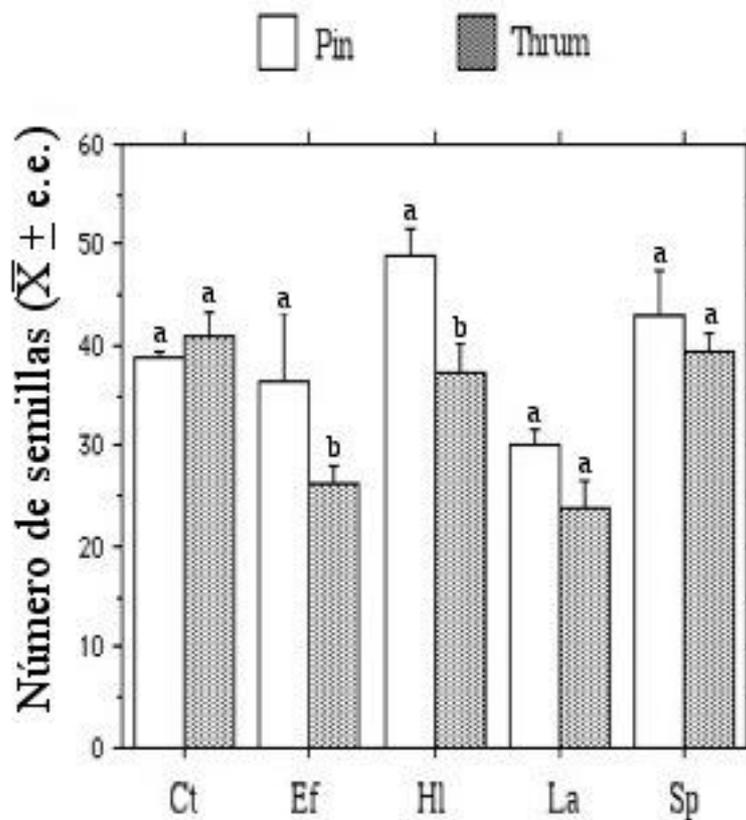
Polinizaciones manuales

El análisis sobre las posibles diferencias en la eficiencia de polinización entre las especies de colibríes que visitan ambos morfos de *B. ternifolia*, demostró que independientemente del colibrí utilizado para las polinizaciones, las flores del morfo pin producen más semillas que las thrum ($F=9.2022$, $P=0.028$; Figura 3). Asimismo, independientemente del morfo polinizado, las flores polinizadas por colibríes de picos cortos (*Hylocharis*, *Selasphorus*) e intermedios (*Colibrí*), producen más semillas que las polinizadas por colibríes con picos largos (*Eugenes* y *Lampornis*) ($F=12.4304$, $P=0.001$; Figura 4). Por consecuencia, la interacción entre los factores morfo y especie de colibríes fue no significativa ($F=2.0293$, $P=0.0927$; Figura 5).



Morfo

Figura 3. Número de semillas producidas por ambos morfos, produciendo más semillas el morfo Pin respecto a Thrum.



Especie de colibrí

Figura 4. Número de semillas producidas por las cinco especies de colibríes en ambos morfos, produciendo más semillas el morfo Pin respecto a Thrum.

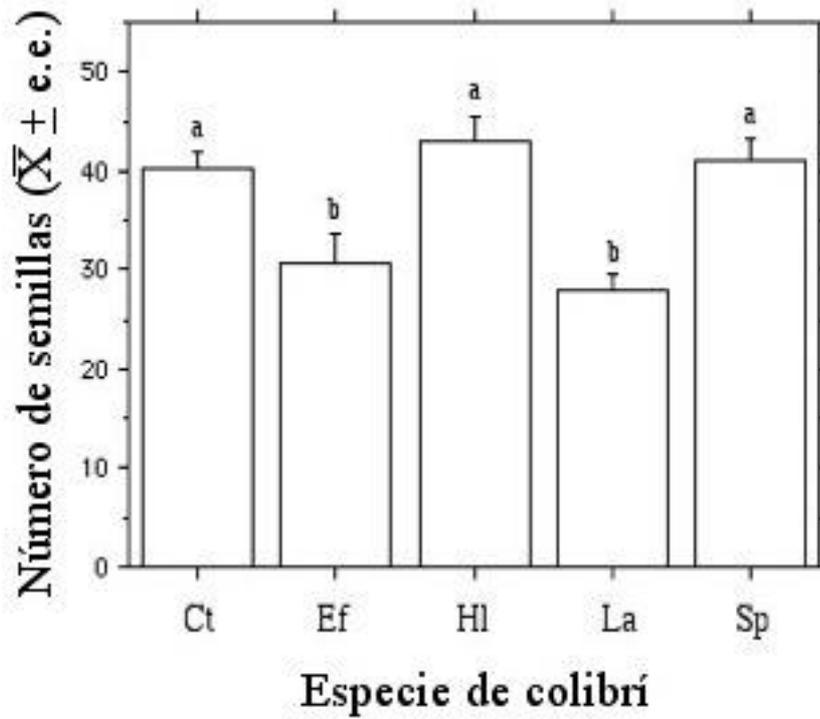


Figura 5. Número de semillas producidas al visitar ambos morfos por el grupo de los picos cortos: *Colibri thalassinus* (Ct), *Hylocharis leucotis* (Hl) y *Selasphorus platycercus* (Sp); y colibríes de picos largos: *Eugenes fulgens* (Ef) y *Lampornis clemenciae* (Lc).

Discusión

Una de las principales características que define a las especies heteroestílicas (diestílicas o triestílicas) es la presencia de hercogamia recíproca (Darwin 1877, Webb y Lloyd 1986, Barrett 2002a). Nuestra evaluación a las estructuras florales de *B. ternifolia*, describe a esta especie como distílica, ya que la misma presenta dos morfos florales que exhiben reciprocidad en la altura de anteras y pistilos, tal como se ha documentado en varias familias de angiospermas y especialmente en muchas especies de Rubiaceae (Anderson 1973, Ganders 1979, Barrett 1992, 2002a, Taylor 1989, 2002).

Sin embargo, en *B. ternifolia* la posición relativa de las anteras de las flores pin con relación a la posición de los pistilos en las thrum, no fue estrictamente recíproca, mientras que en el patrón opuesto si lo fue (Figura 1). Estos patrones espaciales en la posición de los órganos sexuales entre los morfos, quizás podrían estar influenciados por diferencias en el tamaño de la corola en cada morfo. Por ejemplo, Hernández (2006) al evaluar flores de *B. ternifolia* en La Malinche, encontró que las corolas pin (media \pm e.e= 19.93 \pm 0.23 mm; n=100), son más pequeñas que las thrum (media \pm e.e= 24.87 \pm 0.27 mm; n=100). A pesar de ello, con relación a la posición relativa del pistilo, es difícil explicar cómo posibles restricciones en el desarrollo del tubo de la corola podrían influenciar la posición de este órgano dentro de las flores en ambos morfos, ya que el pistilo es una estructura floral que no se encuentra unida al tubo de la corola (ver Hernández y Ornelas 2003). Sin embargo, es probable que diferencias en las tasas de crecimiento de los pistilos durante la fase de desarrollo de las flores influya en ello. En este sentido, Hernández y Ornelas (2007b) encontraron que en *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) el pistilo de las flores thrum cesa su crecimiento en etapas tempranas del desarrollo de las yemas florales, mientras que el pistilo de las flores pin lo incrementa. Así, los pistilos de las flores pin podrían disponerse a una altura mayor que los pistilos de las flores thrum.

Aunque existe evidencia sobre ciertos controladores genéticos asociados al componente morfológico de la heteroestilia (Ganders 1979, Lewis y Jones 1992, Richards y Barrett 1992), prácticamente falta mucho por conocer sobre la genética del desarrollo de este síndrome (ver Barrett 2002a). Sin embargo, desde el punto de vista funcional y adaptativo, existe consenso en que el dimorfismo en la altura del pistilo en especies distílicas, es el resultado de presiones selectivas que favorecen la transferencia de polen entre los morfos (Ganders 1979, Lloyd y Webb 1992, Barrett 2002a).

El posicionamiento recíproco de anteras y pistilos en plantas distílicas se ha interpretado hipotéticamente como un mecanismo que facilita la polinización cruzada entre los morfos (Darwin 1877, Lloyd y Webb 1992, Barrett 2002a, de Jong y Klinkhamer 2005), ello sugiere que a mayor reciprocidad en la posición de los órganos sexuales, las flores de cada morfo deberían experimentar mayores niveles de polinización legítima. Al respecto, Stone y Tompson (1994) usando flores artificiales, encontraron que la probabilidad de transferencia de polen legítimo entre los morfos de especies heteroestílicas, se relaciona negativamente con asimetrías en la posición recíproca de anteras y pistilos (ver también Lau y Bosque 2003, Ornelas y cols. 2004a), ello se debe a que la falta de reciprocidad entre anteras y pistilos, genera imprecisiones en la transferencia de polen legítimo entre los morfos (Lloyd y Webb 1992, Barrett 2002a).

Acorde con estas evidencias, es razonable pensar que en la población de *B. ternifolia* objeto de estudio, el flujo de polen entre los morfos florales sea predominantemente asimétrico ya que en esta población, las plantas pin podrían ser más eficientes receptoras de polen legítimo mientras que las thrum quizás podrían ser más eficaces donadoras de polen, tal como sugirieron nuestras pruebas de polinizaciones (ver Figura 3).

Esta aparente asimetría en el flujo de polen parece estar relacionada con las diferencias en los sitios de deposición de sus colibríes visitantes (Foto 1 y 2). Nuestros resultados sugieren que los colibríes de picos cortos y largos transfieren polen indistintamente cuando visitan una flor thrum (la función donadora maximizada), ya que al introducir sus picos durante una visita en estas flores el polen es colocado en la frente de los individuos pequeños (*Hylocharis leucotis* y *Selasphorus platycercus*) y en la parte final y/o frente del pico en las especies mayores (*Colibrí thalassinus*, *Lampornis clemenciae* y *Eugenes fulgens*). Sin embargo, al visitar una flor pin, y dado que las anteras están en la parte interna de la corola, las diferencias en el tamaño del pico de los visitantes comienza a ser importante. De esta manera, los picos pequeños transportan muy poco polen que les queda principalmente en la punta de sus picos, mientras que los picos largos muestran grandes cargas de polen en la parte intermedia y final de sus picos (Figura 2).

Patrones de transferencia de polen como el que predecimos aquí para *B. ternifolia*, se han documentado bajo condiciones naturales y experimentales en otras especies distílicas de la familia Rubiaceae, las cuales, exhiben hercogamia recíproca imperfecta

(Lau y Bosque 2003, Ornelas y cols. 2004a, Hernández y Ornelas 2007a, García-Robledo 2008). Bajo este escenario, la mayor separación espacial anteras pin-pistilo thrum (hercogamia) que observamos en *B. Ternifolia* (Figura 1), podrían ser el producto de presiones selectivas que favorecen el éxito de polinización del morfo pin, a través de la reducción de la interferencia física entre anteras y pistilo, la disminución de la probabilidad de autodeposición espontánea de polen y la facilitación del contacto entre los polinizadores efectivos y los pistilos menos accesibles en el morfo thrum (ver Lloyd y Webb 1992, Barrett 2002a y b).

Además del posicionamiento recíproco de anteras y pistilos, los morfos florales de especies heterostílicas también pueden diferir en otros atributos florales tales como la cantidad de granos de polen por flor, tamaño de anteras, granos de polen, lóbulos estigmáticos y papilas estigmáticas (Anderson 1973, Ganders 1979, Barrett 1992, Dulberger 1992). En la mayoría de los casos, el morfo thrum exhibe corolas, anteras, granos de polen y pistilos de mayor tamaño que el morfo pin (Anderson 1973, Ganders 1979, Sobrevilla y cols. 1983, Dulberger 1992, Paillet y Thomsom 1997, Contreras y Ornelas 1999, Thompson y Domme 2000, Ornelas y cols. 2004, Texeira y Machado 2004b), tal como fue documentado en *P. demissa*; en contraste, el morfo longiestilado generalmente produce más granos de polen por flor (Ganders 1979, Sobrevilla y cols. 1983, Dulberger 1992, Paillet y Thomsom 1997, Ree 1997, Contreras y Ornelas 1999, Ornelas y cols. 2004a), aunque se han documentado casos opuestos (Feinsinger y Busby 1987, Dulberger 1992, Texeira y Machado 2004a).

Nuestros resultados sobre la producción diferencial de semillas entre morfos sugieren que los colibríes, juegan un papel fundamental como vectores de polen y polinizadores de *B. ternifolia*. Sin embargo, dado que las flores de esta especie son dimórficas (las flores thrum exhiben corolas más largas que las flores pin y los órganos sexuales entre los morfos se posicionan recíprocamente) y que los colibríes que las forrajean presentan diferencias en la talla de sus picos, era probable que la eficiencia de polinización de cada uno de ellos, dependiera del ajuste morfológico entre sus picos y las flores de esta especie, tal como había sido anteriormente sugerido para otros sistemas (ver Murcia y Feinsinger 1996). Efectivamente, esto fue corroborado con nuestras pruebas de polinización.

Varios trabajos han evaluado el efecto de la morfología floral sobre la eficiencia de los polinizadores en función de la polinización cruzada en plantas distílicas. Por ejemplo, Stone y Tompson (1994) observaron que anteras y pistilos de nivel alto y de nivel bajo tienden a contactar diferentes zonas del cuerpo del polinizador tal como ocurrió en nuestro trabajo (ver también Lloyd y Webb 1992). Lau y Bosque (2003) por su parte, registraron que el colibrí *Amazilia tobaci* fue más eficiente depositando polen legítimo sobre los pistilos de las flores thrum de *Palicourea fendleri* y sugirieron que la probabilidad que tiene el polinizador de remover y transferir polen entre los morfos florales de esta especie, depende de la posición relativa de anteras y pistilos (ver también Stone 1995, Ornelas y cols. 2004a).

A partir de lo anterior, nuestros resultados parecen sugerir a la longitud del pico de los colibríes como un factor determinante de la dirección del flujo de polen entre los morfos florales, por lo que podríamos inferir que los colibríes de pico largo seguramente tienen mayor probabilidad de transferir polen entre los órganos reproductivos de niveles bajos (desde las anteras de las flores pin hacia los pistilos de las flores thrum); mientras que aquellos colibríes con pico muy corto, dada la facilidad de establecer contacto con las estructuras sexuales más expuestas en las flores, podrían ser más eficientes en el transporte de granos de polen entre los órganos reproductivos posicionados a un nivel más alto (desde las anteras de las flores thrum hacia los pistilos de las flores pin). Esta hipótesis fue evaluada experimentalmente por Ornelas y cols. (2004a) quienes encontraron que el colibrí de pico más largo dentro del ensamble de polinizadores de *Palicourea padifolia*, transfirió significativamente más polen desde flores pin hacia flores thrum.

Bajo estos planteamiento y evidencias, es razonable pensar que dentro del ensamble de colibríes registrados como visitantes de *B. ternifolia* en la Malinche, los colibríes de picos largos, podrían eventualmente ser más eficiente en la transferencia de polen legítimo desde flores pin hacia flores thrum, mientras que los colibríes de picos cortos podría eventualmente ser más eficiente en el transporte de polen desde las flores thrum hacia las flores pin. Sin embargo, desde el punto de vista reproductivo, nuestros resultados contradicen esta predicción pues las flores de ambos morfos visitadas por colibríes de picos cortos producen más semillas, sugiriendo una efectividad polinizadora baja por parte de los colibríes de picos largos en esta especie.

Aunque la frecuencia de visitas puede explicar en gran medida los patrones de recepción

de polen sobre estigmas (Engel y Irwin 2003), es probable que otros atributos del comportamiento de forrajeo de los polinizadores jueguen un rol importante en el éxito de polinización de este tipo de especies. Por ejemplo, Hernández (2006) observó en una población de *B. ternifolia* en La Malinche que *H. leucotis*, *S. platycercus* y *C. thalassinus* (picos cortos) visitan frecuentemente las flores de ambos morfos, a diferencia de los colibríes de picos largos (*E. fulgens* y *L. amethystinus*), quienes son visitantes más esporádicos. Este tipo de comportamiento, podría eventualmente aumentar la probabilidad de polinización entre las flores de ambos morfos. Aunque en *B. ternifolia* el flujo de polen entre los morfos es mediado principalmente por colibríes, no se descarta la posibilidad de que los insectos, pese su baja frecuencia de visitas (Carlos Lara comm. pers.) también jueguen un rol importante como polinizadores en esta especie, pues dada su facilidad para establecer contacto corporal con anteras de flores thrum y los pistilos de flores pin, ellos quizás podrían mediar eficazmente la polinización legítima de flores pin. Sin embargo, la baja frecuencia con que estos animales se ven visitar a las plantas thrum, podría eventualmente limitar su papel como eficientes polinizadores en esa dirección del flujo de polen en *B. ternifolia*. En todo caso, dilucidar el papel que juega el gremio de insectos como eficientes polinizadores de las plantas de *B. ternifolia*, requerirá en el futuro una evaluación detallada mediante un enfoque experimental.

En términos generales nuestros resultados han demostrado que las flores de *B. ternifolia* no son completamente recíprocas en sus estructuras sexuales, lo cual repercute en la forma en que el polen de ambos morfos es depositado sobre el gremio de colibríes. Asimismo, demostramos que la deposición diferencial de polen parece ser producto tanto de la falta de reciprocidad total y de las diferencias en la talla del pico de los colibríes visitantes. Además, esta transferencia diferencial de polen, parece tener consecuencias desde el punto de vista del éxito reproductivo de los morfos visitados. Así, colibríes de picos cortos funcionan como buenos polinizadores en ambos morfos, mientras que colibríes de picos largos pueden estar relacionados con un ineficiente transporte de polen y en consecuencia efectiva polinización. No obstante, dado que el ajuste morfológico entre flores y polinizadores, al igual que el comportamiento de forrajeo de los mismos, quizás afecta la transferencia de polen entre los morfos, se hace necesario profundizar a futuro en el entendimiento del papel que juega cada uno de los visitantes florales de *B. ternifolia* (colibríes e insectos) como mediadores eficientes de polen legítimo entre los morfos

florales de esta especie distílica de La Malinche.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este estudio podemos concluir lo siguiente:

1. Que la reciprocidad imperfecta que presenta *B. ternifolia* parece ocasionar una transferencia asimétrica del polen por sus visitantes.
2. Que esta transferencia asimétrica de polen es afectada por la talla del pico de sus colibríes influyendo directamente en los sitios donde el polen es depositado.
3. Que estas diferencias en los sitios de deposición en los colibríes, repercute en diferencias en su eficiencia como polinizadores.
4. Que ambos morfos muestran un éxito reproductivo diferencial dependiendo de si son polinizados por colibríes de picos cortos o largos.

Que los colibríes visitantes parecen ser un importante factor de presión selectiva sobre los rasgos florales de ambos morfos en *B. Ternifolia*.

PERSPECTIVAS

El siguiente trabajo proporciona información en cuanto al transporte de polen, eficiencia reproductiva y los niveles de hercogamia de un sistema distílico (*B. ternifolia*) al ser visitado por los colibríes, y genera potenciales preguntas ecológicas para el desarrollo de futuros trabajos tales como:

- 1.- Evaluar la posible variación, a escala temporal y espacial, en los tamaños de las estructuras reproductivas de *B. ternifolia* para determinar la tasa de cambio en los niveles de hercogamia, y relacionarla con la dinámica del ensamble de visitantes a las mismas escalas.
- 2.- Cuantificar en distintos sitios a lo largo de la distribución de esta planta, la proporción de ambos morfos florales, y determinar la estabilidad del sistema.
- 3.- Evaluar a través de pruebas experimentales el posible efecto de la visita secuencial de las especies de colibríes a los distintos morfos, con el número de semillas que estas visitas producen.

REFERENCIAS

- Anderson WR. 1973. A morphological hypothesis for the origin of heterostyly in the Rubiaceae. *Taxon* 22: 537 - 542.
- Barret SCH. 1992. Evolution and function of heterostyly. Springer-Verlag. pp 279
- Barret SCH. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in plant Science*. 3: 335–341.
- Barrett SCH. 2002a. The evolution of plants sexual diversity. *Nature Reviews*. 3: 274-284.
- Barrett SCH. 2002b. Sexual interference of the kind. *Heredity*. 88: 154-159.
- Barrett SCH y Glover D. 1985. On the Darwinian hypothesis of the adaptive significance of tristily. *Evolution*. 39:766-774.
- Beach J y Bawa K. 1980. Role of pollinators in the evolution of dioecy from distily. *Evolution*. 34: 1138-1142.
- Bailey MF y McCauley DE. 2006. The effects of inbreeding, outbreeding and long-distance gene flow on survivorship in North American populations of *Silene vulgaris*. *Journal of Ecology*. 94: 98-104.
- Bawa KS, Perry DR y Beach JH. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees I. Sexual system and incompatibility mechanisms. *American Journal of Botany*. 72: 331-345.
- Bradshaw HDJ, Wilbert SM, Otto KG y Schemske DW. 1995. Genetic zapping of floral traits associated with reproductive isolation in monkey flowers (*Mimulus*). *Nature*. 376: 762–765.

- Broyles SB y Wyatt R. 1993. The consequences of self pollination in *Asclepias exaltata*, a self-incompatible milkweed. *American Journal of Botany*. 80: 41- 44.
- Cariveau D, Irwin RE, Brody AK, Garcia-Mayeya LS y Von der OA. 2004. Direct and indirect effects of pollinators and seed predators to selection on plant and floral traits. *Oikos*. 104: 15-26.
- Castro CC y Oliveira PEA. 2001. Reproductive biology of the protandrous *Ferdinandusaspeciosa* Pohl (Rubiaceae) in southeastern Brazil. *Revista Brasil. Bot.* 24: 167 - 172.
- Cesaro AC, Barrett SCH, Maurice S, Vaissiere BE. y Thompson JD. 2004. An experimental evaluation of self-interference in *Narcissus assoanus*: functional and evolutionary implications. *Journal Evol. Biol.* 17: 1367-1376.
- Charlesworth D y Charlesworth B. 1978. Population genetics of partial male-sterility and the evolution of monoecy and dioecy. *Heredity*. 41: 137-153.
- Charlesworth D y Charlesworth B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 237-268.
- Conner JK y Via S. 1993. Patters of phenotypic and genetic correlations among morphological and life-history traits in wild raddish *Raphanus raphanistrum*. *Evolution*. 47: 704- 711.
- Contreras PS y Ornelas JF. 1999. Reproductive conflicts of *Palicourea padifolia* (Rubiacea) a distylous shrub of a tropical cloud forest in México. *Plant Systematics and Evolution*. 219: 225–241.
- Cruden RW y Lyon DL. 1989. Facultative xenogamy: examination of a mixes mating system. J. H. Book & Y. B. Linhart (eds.), *The evolutionary ecology of plants*. Westvies Press, Boulder, Colorado, USA. pp 171-207.

- Darwin CR. 1877. The different forms of flowers on plants of th especies. John Murray; London; facsimile of 1888 ed. Reprinted by the University of Chicago, IL.
- De Jong T J y Klinkhamer P. 2005. Evolutionary ecology of plant reproductive strategies. Cambridge University Press. New York. Pp. 333.
- Díaz-Ojeda EV. 1992. Informe del Parque Nacional La Malinche. Jefatura del Programa Forestal de Tlaxcala.
- Dinnétz P. 1997. Male sterility, protogyny, and pollen-pistil interference in *Plantago Maritime* (Plantaginaceae), a wind pollinated, self-incompatible perennial. American Journal of Botany. 84: 1588-1594.
- Dulberger R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. *En*: S. C. H. Barrett (ed). Evolution and function of heterostyly. Springer-Verlag. New York. pp. 41-84.
- Faivre AE y McDade LA. 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. y Busby WH. 1987. Pollen carryover: experimental comparisons between morphs of *Palicourea lasiorrachis* (Rubiaceae), a distylous, bird-pollinated, tropical treelet. Oecologia. 73: 231 - 235.
- Fenters CB. 1991. Selection on floral morphology by hummingbirds. Biotropica. 23: 98–101.
- Fetscher AE. 2001. Resolution of male – female conflicts in a hermaphroditic flower. Proc. R. Soc. Lond. B. 268: 525-529.

- Galen C y Kenvan PG. 1980. Scent and color, floral polymorphisms and pollination biology in *Polemonium viscostum* Nutt. American Midland Naturalists. 104: 281–289.
- Galen C. 1985. Regulation of seed set in *Polemonium viscostum*: floral scent, pollination and resources. Ecology. 66: 792–797.
- Galen C, Gregory T y Galloway LF. 1989. Costs of selfpollination in a self-incompatible plant, *Polemonium viscosum*. American Journal of Botany. 76: 1675-1680.
- Ganders FR. 1974. Disassortative pollination in the distylous plant *Jepsonia heterandra*. Canadian Journal of Botany. 52: 2401–2406.
- Ganders FR. 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.
- Harder LD. y Barrett SCH. 1993. Pollen removal from tristylous *Pontederia cordata*: effects of anther position and pollinator specialization. Ecology. 4: 1059-1072.
- Hernández, A. & J. F. Ornelas. 2003. Correlación morfo-específica en flores de *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). Bol. Soc. Bot. Mex. 73: 35 - 41.
- Hernández A. y Ornelas JF. 2007a. Disassortative pollen transfer in distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a hummingbirds-pollinated shrub, *Écoscience*. 14: 8-16.
- Hernández A. y Ornelas JF. 2007b. Development of distylous flowers and investment of biomass in male and female function in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *Plant Biol*. 9:694 - 704.

- Howell SNG. 2003. Hummingbirds of North America. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- Johnsgard PA. 1997. The hummingbirds of North America, 2nd Edition. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- Kay QQN. 1976. Preferential pollination of Bellow-flowered morphs of *Raphanus raphanistrum* by *Pieris* and *Eristalis* spp. *Nature*. 226: 230–232.
- Kay QQN. 1976. The role of preferential and assortative pollination in the maintenance of flower color polymorphisms. En: A. J. Richards (Ed.). The pollination of flowers by insects. Academic Press, Londres. pp. 175–190.
- Kearns, C. A. y D. W. Inouye. 1993. Techniques for pollination biologists. University Press of Colorado, Nwot, Colorado. p. 583.
- Lara C. 2006. Temporal dynamics of flowers use by hummingbirds in a highland temperate forest in México. *Ecoscience*. 13: 23–29.
- Lau P y Bosque C. 2003. Pollen flow in the distylous *Palicourea fendleri* (Rubiaceae): an experimental test of the disassortative pollen flow hypothesis. *Oecologia* 135: 593 - 600.
- Leege LM y Wolfe LM. 2002. Do floral herbivores respond to variation in flower characteristics in *Gelsemium sempervirens* (Loganiaceae), a distylous vine? *American Journal of Botany*. 89: 1270–1274.
- Lewis D. y Jones DA. 1992. The genetics of heterostyly. En: S. C. H. Barrett (eds.). Evolution and function of heterostyly. Springer-Verlag. New York. pp.129-150.
- Lloyd DG y Webb CJ. 1986. The avoidance of interference between the presentation of

- pollen and stigmas in angiosperms I. Dichogamy. *New Zealand Journal of Botany*. 24: 135-162.
- Lloyd DG y Webb CJ. 1992. The evolution of heterostyly, In S.C.H. Barret (eds.). *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag, New York., N.Y. pp. 151–178.
- Murcia C. 2002. Ecología de la polinización *en*: Guanguata, M. & G. Kattan (eds). *Ecología y conservación de bosques neotropicales*. Ediciones LUR. Costa Rica. pp. 493-530.
- Murcia C y Feinsinger P. 1996. Interspecific pollen loss by hummingbirds visiting flower mixtures: effects of floral architecture. *Ecology*. 77: 550-560.
- Motten AF y Stone JD. 2000. Heritability of stigma height position and the effect of stigma-anther separation on outcrossing in a predominantly self-fertilizing weed *Datura stramonium* (Solanaceae). *American Journal of Botany*. 87: 339-347.
- Nishihiro J y Washitani I. 1998. Patterns and consequences of self-pollen deposition on stigmas in heterostylous *Persicaria japonica* (Polygonaceae). *American Journal of Botany*. 85: 352-359.
- Nishihiro J, Washitani I, Thomson JD y Thomson BA. 2000. Patterns and consequences of stigma height variation in natural population of a distylous plant, *Primula sieboldii*. *Functional Ecology*. 14: 502-512.
- Olesen JM. 1979a. Differential anther eating by snails in the heterostylous plant species, *Primula elatior* (L.) Hill. *Acta Botanica Neerlandica*. 28: 519-521.
- Ornelas JF, Jiménez L, González C y Hernández A. 2004a. Reproductive ecology of distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) in a tropical montane forest. I. Hummingbirds effectiveness as pollen vectors. *American Journal of Botany*. 91:

1061–1069.

- Ornelas JF, González C, Jiménez L, Lara C y Martínez AJ. 2004b. Reproductive ecology of distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) in a tropical montane forest. II. Attracting and rewarding mutualistic and antagonistic visitors. *American Journal of Botany*. 91: 1061–1069.
- Pailler T y Thomsom JD. 1997. Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in *Gaertnera vaginata* (Rubiaceae) endemic to La Reunion Island. *American Journal of Botany*. 84: 315 - 327.
- Raven PH. 1972. Why are bird-visited flowers predominantly red? *Evolution*. 26: 674.
- Ree RH. 1997. Pollen flow, fecundity, and the adaptive significance of heterostyly in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *Biotropica*. 29: 298 - 308.
- Richards JH y Barrett SCH. 1992. The development of heterostyly. En: S. C. H. Barrett (ed.). *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag. New York. pp 85-227.
- Richards JH y Koptur S. 1993. Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*. 80: 31–40.
- Rzedowski, J. Y G. C. de Rzedowski. 1985. *Flora fanerogámica del valle de México*. IPN-IE, México, D.F. pp. 393–394.
- Sage TL, Strumas F, Cole WW y Barrett SCH. 1999. Differential ovule development following self- and crosspollination: the basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany*. 86: 855 - 870.
- Sobrevila C, Ramirez N y De Enrech NX. 1983. Reproductive biology of *Palicourea flendleri* and *Palicourea petiolaris* (Rubiaceae), heterostylous shrubs of a tropical cloud forest in Venezuela. *Biotropica*. 15: 161 – 169.

- Strauss SY. 1997. Floral characters link herbivores, pollinators and plant fitness. *Ecology*. 78: 1640-1645.
- Stone JL. 1995. Pollen donation patterns in a tropical distylous shrub (*Psychotria suerrensis*, Rubiaceae). *American Journal of Botany*. 82: 1390 - 1398.
- Stone JL. y Thompson JD. 1994. The evolution of distyly: pollen transfer in artificial flowers. *Evolution* 48: 1595 - 1606.
- Stout JC, Allen A y Goulson D. 1998. The influence of relative plant density and floral morphological complexity on the behaviour of bumblebees. *Oecologia*. 17: 107-117.
- Taylor CM. 1989. Revision of *Palicourea* (Rubiaceae) in Mexico and America Central. *Systematic Botany Monographs*. 26: 102.
- Taylor CM. 2000. New species and a new name in *Palicourea* (Rubiaceae: Psychotrieae) from Northwestern South America. *Novon*. 10: 78-87.
- Teixeira LA. y Machado IC. 2004a. Biologia da polinização e sistema reproductivo de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). *Acta Bot. Bras.* 18: 853-862.
- Teixeira LA. y Machado IC. 2004b. *Sabicea cinerea* Aubl. (Rubiaceae): diestilia e polinização em um fragmento de floresta Atlântica em Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Revista Brasil Bot.* 27: 193-204.
- Thompson JD y Domme B. 2000. Morph-specific patterns of variation in stigma height in natural populations of distylous *Jasminum fruticans*. *New Phytologist*. 148: 303 - 314.
- Thomson JD y Stratton DA. 1985. Floral morphology and cross-pollination in *Erythronium grandiflorum* (Liliaceae). *American Journal of Botany*. 72: 433-437.

- Torres I, Salinas L, Lara C y Castillo C. 2008. Antagonists and their effects in a hummingbird– plant interaction: Field experiments. *Ecoscience*. 15: 65–72.
- Waser NM. 1978. Competition for hummingbird pollination and sequential flowering in two colorado wildflowers. *Ecology*. 59: 934–944.
- Waser NM y Price MV. 1981. Pollinator choice and stabilizing selection for flower color in *Delphinium nelsonii*. *Evolution*. 35: 76–390.
- Webb CJ y Lloyd DG. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24: 163-178.
- Webb CJ. 1999. Emperical Studies: evolution and maintenance of dimorphic breeding systems. En: M. A. Geber, T. E. Dawson, y L. F. Delph (eds.), *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Springer, Berlin, Alemania. Pp. 61–95.
- Williamson SL. 2001. *Hummingbirds of North America*. Peterson Field Guides, Boston, New York.
- Wyatt R. 1983. Pollinator-plant interactions and the evolution of plant breeding systems. En: L. Real (ed.). *Pollination biology*. Academic press, Orlando, Florida, EUA.