



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Biología reproductiva en morfos variables en color de
Penstemon gentianoides en La Malinche, Tlaxcala,
México**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Juliana Cardona Londoño

Dr. Carlos Lara Rodríguez

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2018



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Biología reproductiva en morfos variables en color de
Penstemon gentianoides en La Malinche, Tlaxcala,
México**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Juliana Cardona Londoño

Director: **Dr. Carlos Lara Rodríguez**

Tutores: **Dra. Susana Guillen Rodríguez**

Dr. Juan Francisco Ornelas Rodríguez

Tlaxcala, Tlax.

Agosto, 2018

FINANCIAMIENTO

El trabajo de campo de la presente investigación se llevo a cabo en el Parque Nacional La Malinche, y el trabajo de laboratorio se efectuó en las instalaciones del Centro de Investigación en Ciencias Biológicas (CICB) de la Universidad Autónoma de Tlaxcala. Se conto con el financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) al recibir una beca de manutención (becario:615382) durante el tiempo de permanencia como estudiante activo de la maestría; y una beca de movilidad nacional, también otorgada por CONACYT, para una estancia de investigación realizada en el Instituto de Ecología A.C. (INECOL).



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado
Posgrado en Ciencias Biológicas



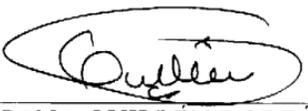
**COORDINACIÓN MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO TLAXCALA DE BIOLOGÍA DE LA CONDUCTA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del Proyecto de tesis que **Juliana Cardona Londoño** realiza para la obtención del grado de Maestra 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: **“Biología reproductiva en morfos variables en color de *Penstemon gentianoides* en La Malinche, Tlaxcala, México”**.

Sin otro particular, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., JULIO 12 DE 2018


DR. CARLOS ALBERTO LARA RODRÍGUEZ


DRA. SUSANA GUILLEN RODRÍGUEZ


DR. JUAN FRANCISCO ORNELAS RODRIGUEZ


DR. JORGE ISRAEL AYALA BERDON


DRA. CITLALLI CASTILLO GUEVARA



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Tlaxcala, al Posgrado en Ciencias Biológicas del Centro Tlaxcala Biología de la Conducta y a sus investigadores por sus enseñanzas y por la posibilidad de hacer parte de su comunidad académica.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Al Dr. Carlos Lara por sus enseñanzas, su dedicación y apoyo constante en todas las fases de este trabajo y por permitir mi participación en sus investigaciones sobre ecología.

Al Dr. Juan Francisco Ornelas y a la Dra. Susana Guillen por sus aportes y sugerencias en cada fase del proyecto, además de su evaluación.

Al Dr Jorge Ayala, a la Dra Citlalli Castillo, y a la Mtra. Gema Galindo, por sus valiosos aportes y disposición como miembros del comité evaluador del examen de titulación.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A la Dra. Bibiana Montoya por su asesoría y apoyo en la toma y análisis de datos obtenidos por espectrofotometría.

A Karla Salinas y a Hugo Curiel por su colaboración durante algunos muestreos en campo y laboratorio.

Al equipo de trabajo del laboratorio del Dr Ornelas por sus valiosos aportes para la presentación de la defensa de tesis.

A mis padres Jaime Cardona y Argelia Londoño, demás familiares y amigos por su apoyo constante en este reto profesional y personal.

RESUMEN

Dentro del género *Penstemon* se han reportado varios procesos de hibridación. Las variaciones en color floral de *Penstemon gentianoides*, son un potencial indicador de zonas híbridas en formación, un fenómeno no estudiado previamente para esta especie. La presente tesis analizó los morfos variables en color de dicha especie en el PN La Malinche, a través del estudio de su sistema de polinización; e involucrando un seguimiento de la biología floral, recompensas de néctar, visitantes florales, producción de frutos y una estimación de su aislamiento reproductivo respecto al considerado sistema parental (*Penstemon roseus* y *P. gentianoides*). Se encontraron dos morfos de color, clasificados desde nuestra percepción visual como “fucsia” y “azul”. La morfología, oferta floral y recompensa de néctar fue significativamente elevada en el morfo fucsia en relación al morfo azul, evidenciando una correspondencia por parte del ensamble de visitantes hacia este morfo; donde los colibríes fueron más frecuentes y más eficientes que los abejorros. Asimismo, cuando se evaluaron dichos visitantes como factor de aislamiento reproductivo en el sistema de estudio, se encontró que su contribución es tan mínima en ambos morfos de color, que podrían considerarse los agentes que están rompiendo con dicho mecanismo de aislamiento y son entonces los promotores de una potencial zona híbrida. Esto es apoyado por la compatibilidad encontrada en las cruza intraespecíficas realizadas en este sistema. En conclusión hay una manifestación de caracteres florales intermedios en ambos morfos de color favorecidos por la polinización por colibríes, de tal manera que estos visitantes representan una fuerza de selección importante para el flujo de genes entre poblaciones simpátricas a partir de caracteres que incrementan su atracción.

PALABRAS CLAVE: Biología reproductiva, néctar, morfología floral, aislamiento reproductivo.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Género <i>Penstemon</i>	12
1.2 Polimorfismo de color.....	13
1.3 Zonas de hibridación	14
2. ANTECEDENTES.....	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	20
4. HIPÓTESIS.....	21
5. OBJETIVOS.....	21
5.1 <i>Objetivo general</i>	21
5.2 <i>Objetivos particulares</i>	21
6. METODOLOGÍA.....	22
6.1 <i>Área de estudio</i>	22
6.2 <i>Fase de campo</i>	22
6.2.1 Especie Estudiada.....	22
6.2.2 Descripción de los parches florales.....	23
6.2.3 Biología floral	25
6.2.4 Color floral.....	25
6.2.5 Características del néctar	25
6.2.6 Visitantes florales	26
6.2.7 Caracterización de los frutos	26
6.2.8 Eficiencia del polinizador.....	26
6.2.9 Aislamiento reproductivo.....	27
6.3 <i>Fase de laboratorio</i>	29
6.3.1 Color floral	29

6.4 <i>Análisis de datos</i>	30
7. RESULTADOS.....	31
7.1 <i>Biología floral</i>	32
7.2 <i>Color floral</i>	33
7.3 <i>Características del néctar</i>	37
7.4 <i>Visitantes florales</i>	38
7.5 <i>Interacción entre morfos de plantas y especies visitantes</i>	41
7.6 <i>Forrajeo en función del color</i>	42
7.7 <i>Caracterización de los frutos</i>	43
7.8 <i>Eficiencia del polinizador</i>	45
7.9 <i>Aislamiento reproductivo</i>	45
8. DISCUSIÓN.....	50
9. CONCLUSIONES.....	57
10. PERSPECTIVAS.....	58
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
12. ANEXOS	69
13. PUBLICACIONES.....	75

1. INTRODUCCIÓN

Las interacciones planta-animal constituyen un soporte funcional para la generación y mantenimiento de la biodiversidad. Sin embargo, actividades de origen antropogénico como la transformación y la fragmentación del hábitat (Aizen 2007); además del cambio climático global (Hegland et al., 2009) afectan la estructura y organización de estas relaciones. En este contexto, la polinización representa una serie de eventos de interacción entre las plantas y sus polinizadores, a través de los recursos florales; que a su vez repercute en la dinámica de los bosques y representa un servicio ambiental importante para la humanidad (Steffan-Dewenter & Westphal 2008).

Generalmente en las angiospermas, las plantas proveen a los visitantes florales recompensas como néctar y polen, con el fin de que estos faciliten la dispersión de polen entre sus conoespecíficos (Mitchell et al. 2009), confiriéndoles una mayor capacidad de adaptación y diversificación (Rojas 2005). De esta manera, las plantas que dependen de vectores animales pueden asegurar su éxito reproductivo a través de características que incrementan su atracción (Waser 1983; Howe & Lynn 1988; Vuknin et al. 1996). Asimismo, estos rasgos de atracción pueden ser tan específicos a grupos particulares de visitantes, que pueden incluso funcionar como una barrera contra aquellos visitantes que no confieren servicios eficientes de polinización, promoviendo así mecanismos de aislamiento reproductivo en las poblaciones de plantas creciendo de forma simpátrica y compartiendo potencialmente ensambles de visitantes.

Algunos estudios se han enfocado en los componentes del aislamiento reproductivo entre especies de plantas cercanamente emparentadas y creciendo en simpatria, incluyendo color, morfología, aroma, fenología floral, e incompatibilidad (Bradshaw & Schemske 2003; Marques et al. 2007; Pascarella 2007; Yang et al. 2007; Waelti et al. 2008). Se ha demostrado que estos rasgos promueven el aislamiento al funcionar como barreras precigóticas, las cuales involucran mecanismos de atracción floral a grupos particulares de visitantes y por

consiguientes están moldeadas por la conducta del polinizador; y también barreras poscigóticas, que determinan la viabilidad de la descendencia y expresión fenotípica de rasgos. Por ejemplo, en especies simpátricas como *Penstemon spectabilis* que es polinizada por la avispa *Pseudomasaris vespoides* y *P. centranthifolius* polinizada por colibríes, se ha mostrado un aislamiento reproductivo a través de barreras precigóticas, principalmente promovidas por la especificidad del polinizador (Chari & Wilson 2001).

Aunque el aislamiento reproductivo parece ser promovido en poblaciones de especies hermanas que comparten hábitats similares, sobrelapándose su fenología de floración y compartiendo polinizadores; en éste tipo de poblaciones es común encontrar distintos niveles de hibridación (Campbell et al. 2002). La hibridación es relativamente común en las angiospermas, existiendo incluso zonas naturales de hibridación (Ellstrand et al. 1996; Malet 2005), donde los rasgos de los híbridos, en cuanto a morfología floral y recompensas de néctar, pueden influir la conducta de los polinizadores y promover potencialmente aislamiento reproductivo con respecto a sus fuentes parentales (revisión en Campbell & Aldridge 2006). Por ello, sistemas donde los ensambles de visitantes en plantas relacionadas taxonómicamente, creciendo en simpatria y con formación de híbridos, comprenden más de un grupo taxonómico (por ejemplo insectos y colibríes), representan un modelo para el estudio de las respuestas conductuales de los visitantes a rasgos florales particulares y a su relación con el aislamiento reproductivo.

1.1 Género *Penstemon*

El género *Penstemon* Mitchell, con cerca de 284 especies, es el mayor género endémico de Norteamérica (Wilson et al. 2007). Se encuentra distribuido desde Alaska hasta Guatemala, y se extiende de una costa a la otra (Wolfe et al. 2006). Actualmente *Penstemon* es clasificado como miembro de la familia Plantaginaceae (Albach et al. 2005; Shehata 2006). La diversidad dentro del género está asociada con adaptaciones evolutivas como la especialización por polinizadores o nichos ecológicos, considerándose como un ejemplo poco frecuente de la radiación evolutiva continental (Wolfe et al. 2006).

Las flores de las especies de *Penstemon* atraen una amplia variedad de insectos polinizadores como abejas, avispas, polillas y moscas-abaja. Sin embargo, numerosas especies se han especializado en la polinización por abejas (Straw 1963; Tepedino et al. 1999; Thomson et al. 2000); aunque en algunas especies ha evolucionado la polinización por colibríes. Esto ha permitido hipotetizar que tanto los polinizadores como la selección de características florales son importantes fuerzas que han conducido a la diversificación de *Penstemon* (Wilson et al. 2006).

1.2 Polimorfismo de color

Los pigmentos en las plantas se clasifican en cuatro grandes grupos: clorofilas, carotenoides, flavonoides y betalainas. Entre ellos, las antocianinas son los flavonoides más importantes, representados como el producto final de la ruta biosintética de las antocianinas (ABP), que ha sido muy conservada durante la evolución de las angiospermas (Quattrocchio et al. 1993; Hichri et al. 2011). Generalmente, se acumulan en las células superiores de la epidermis de los pétalos, proporcionando una coloración naranja, roja, azul, rosa, púrpura, y posiblemente casi negra, pero su pérdida puede conllevar a la despigmentación generando color blanco (Narbona et al. 2014).

En las angiospermas es común encontrar una enorme diversidad del color floral, lo cual implica que han existido numerosas transiciones evolutivas en dicho carácter, que al interactuar con otros rasgos florales como formas y tamaños, tradicionalmente han representado una correspondencia con agentes particulares, efectivos en la polinización (Rausher 2008). Esto ha conducido a la selección mediada por el polinizador, que reside en que el color floral es un rasgo directamente implicado en la atracción de polinizadores como insectos y aves (Hodges et al. 2002; Schaefer & Ruxton 2011; Schiestl & Johnson 2013) ya que estos pueden diferenciar colores relativamente similares (Chittka & Raine 2006; Dyer et al. 2008; Renoult et al. 2014). Así, los cambios de color en especies próximas han sido considerados como una adaptación a distintos tipos de polinizadores (Fenster et al. 2004).

Sin embargo, dichos agentes no son la única causa de este rasgo floral, debido a que se

conocen especies que utilizan agentes abióticos, especialmente anemófilas, con un claro polimorfismo de color (Wu et al. 1999); lo que sugiere que la deriva génica es la responsable de este fenómeno. Por ello, se ha propuesto que un factor que modela la evolución del color es claramente la variación de los genes vinculados a este carácter (Rausher 2008), y que está asociado a una respuesta positiva en el éxito reproductivo de las plantas, incluso cuando se consideran ciertas situaciones de estrés (Levin & Brack 1995; Warren & Mackenzie 2001).

No obstante, en la actualidad se ha sugerido que la primera causa de transición evolutiva en el color, podrían ser otros agentes que interaccionan con las plantas no necesariamente para la polinización (patógenos y herbívoros), lo cual es muy discutido en términos de selección como lo sugieren Chong et al. (2009)

1.3 Zonas de hibridación

La estructura de las zonas de hibridación es el resultado de presión de selección endógena, como por ejemplo las diferencias en los sistemas de reproducción y la compatibilidad genética, y selección exógena representada como los diferentes niveles de sobrevivencia de los híbridos basado en la selección según su adaptación al medio en que se desarrollan (Lynn 2001). Las zonas híbridas que aparecen naturalmente son de gran importancia ecológica y evolutiva debido a que las especies híbridas tiene diversas combinaciones de material genético con el potencial de influir las poblaciones maternas; por tanto su existencia indica la presencia de un aislamiento sexual débil (Kimball et al. 2008) y por consiguiente, no están operando barreras de aislamiento mecánico y etológico.

En *Penstemon* se han reportado varios procesos de hibridación (Koelling 1964; Wilson & Valenzuela 2002; Ellstrand et al. 1996; Wolfe et al. 1998; Calderón de Rzedowski & Rzedowski 2002), conformando zonas híbridas, donde incluso estos individuos pueden hallarse en mayor cantidad que sus especies parentales (Kimball et al. 2008). Sin embargo, el patrón natural marca la tendencia a que las poblaciones híbridas sean raras, debido a que se encuentran influenciadas por barreras precigóticas, que evitan que la planta madre llegue a producir semillas inviables o descendencia híbrida fértil. Un ejemplo de este tipo de barrera

en el género *Penstemon* es la competencia estructural y fisiológica impuesta por el tubo polínico durante su crecimiento, para permitir sólo determinados granos de polen cuando se trata de cargas polínicas heteroespecíficas.

En el área del volcán La Malinche, Tlaxcala, México, habitan de manera simpátrica dos especies del género *Penstemon* (*P. roseus* y *P. gentianoides*). La distribución de estas especies se sobrelapa espacial y temporalmente en algunas zonas, donde es posible encontrar numerosos individuos, que aunque similares en la morfología floral a *P. gentianoides*, el color de sus corolas es distinto, no descartándose que sean el producto de la hibridación con *P. roseus* (Lara Com. Per). Estos morfos son particularmente abundantes, presentando diferencias con respecto a las especies de *Penstemon* mencionadas, no solo en el color de sus flores, sino incluso en su morfología. Pese a su abundancia en esta zona, a la fecha estudios sobre la biología de estos morfos son inexistentes. Es por ello, que el objetivo principal de esta investigación fue estudiar la biología floral y reproductiva de los morfos de *Penstemon gentianoides* en La Malinche.

2. ANTECEDENTES

El estudio de la selección mediada por polinizadores en la variación del color floral en las plantas ha sido un tema de gran interés en ecología evolutiva, y numerosos ejemplos utilizando distintas taxa de plantas han resaltado su importancia. Uno de los trabajos que ejemplifica este fenómeno es el realizado por Fulton & Hodges (1999) quienes evaluaron la influencia que tiene la variación de las espuelas de néctar (prolongaciones del perianto) respecto al aislamiento reproductivo en zonas híbridas y naturales de *Aquilegia formosa* y *A. pubescens* (Ranunculaceae). Los autores encontraron una fuerte discriminación por parte de los visitantes florales hacia estas poblaciones, ya que las abejas y colibríes solo visitaron a *A. formosa*, debido a la limitación impuesta por las formas y orientaciones de las flores de *A. pubescens*, que por el contrario benefició a las polillas, siendo exclusivas para este grupo visitante. Asimismo, reportan que la modificación de las espuelas no afectó la presencia de los

visitantes, pero si la remoción de polen. El ejemplo mencionado indica que los rasgos florales promueven el aislamiento floral entre estas especies, pero que dicho aislamiento puede ser afectado por cuestiones de aislamiento mecánico.

Campbell et al. (1997) estudiaron zonas de plantas híbridas con poblaciones naturales y experimentales de dos especies: *Ipomopsis aggregata* e *I. tenuituba* (Polemoniaceae). Los autores evaluaron las visitas realizadas por colibríes y polillas, demostrando como la selección varía con el tipo de polinizador, las características florales y escalas espaciales; y corroborando que los polinizadores promueven las características divergentes y el aislamiento reproductivo. En el mismo sistema, estos autores evaluaron el comportamiento de forrajeo de sus polinizadores y sus efectos en el flujo de polen, demostrando que dicho flujo entre híbridos y parentales es igual al flujo encontrado entre solo las especies parentales; esto a partir de que las cargas de polen recibidas presentaron una mezcla proporcional de granos de polen de todas las poblaciones estudiadas. Esto sugiere que las visitas de los polinizadores determinan estos patrones de transferencia; además de que la variación natural en la polinización puede producir variación espacio temporal en la hibridación.

Schemske y Bradshaw (1999) evaluaron los rasgos causantes de la discriminación floral entre dos especies de plantas cercanamente emparentadas del género *Mimulus* (Phrymaceae). A partir de los cruces de estas plantas que presentaban síndromes de polinización por abejas y colibríes; encontraron contrastes en las preferencias de los visitantes respecto a la longitud, cantidad de néctar y presencia de pigmentos como antocianinas y carotenoides. Sus resultados fueron reconfirmados con el análisis de las bases genéticas de los rasgos florales, demostrando que los genes asociados a las preferencias del polinizador contribuyen a la evolución y al aislamiento reproductivo en estas plantas.

Wesselingh y Arnold (2000) evaluaron el comportamiento de los polinizadores en las plantas *Iris fulva*, *Iris brevicaulis* (Iridaceae) y en los híbridos resultantes de sus cruces, para obtener datos sobre las preferencias en función del tipo de flor y las transiciones o caracteres intermedios manifestados entre dichos tipos. Sus resultados mostraron que las flores

resultantes de los cruces fueron las más visitadas; y tanto abejorros como colibríes manifestaron movimientos generalistas entre diferentes tipos de flores, sin tener una preferencia marcada. Esto sugiere que la atracción por el visitante no es un factor causal importante para explicar la falta de genotipos intermedios en las poblaciones híbridas de *Iris*. En cambio, el comportamiento de los polinizadores si promovió el apareamiento mixto entre los tipos de flores pertenecientes a diferentes síndromes de polinización. Pero debido a la visita predominante entre plantas cercanas por parte de los polinizadores, la distribución espacial de los genotipos parentales e híbridos, podría estar influenciando los patrones de reproducción y la estructura genotípica que confiere la evolución de las zonas híbridas de este sistema.

Jones y Reithel (2001) trabajaron en poblaciones experimentales de *Antirrhinum* (Plantaginaceae), donde evidenciaron que el comportamiento de los abejorros visitantes influyó fuertemente en la reproducción de las plantas. Sus datos mostraron que el mayor número de visitas y tiempos de forrajeo aseguraban una cantidad considerable de granos de polen recibidos y aportados por las flores; lo cual estuvo también directamente relacionado con la cantidad de néctar disponible. Esto es debido a que dicha recompensa permitía que los visitantes estuviesen forrajeando por más tiempo dentro de las flores de los morfos de color asegurando la transferencia de polen. De esta manera, los autores sugieren que los polinizadores tienen preferencias que se hacen más fuertes cuando se trata de poblaciones con distribuciones agrupadas de morfos florales.

Díaz Infante et al. (2016) investigaron los rasgos de divergencia vinculados a la atracción de polinizadores y el aislamiento reproductivo en poblaciones simpátricas de los muérdagos *Psittacanthus calyculatus* y *P. auriculatus* (Loranthaceae), y una población alopátrica de *P. calyculatus*. Los autores encontraron diferencias en características como tamaño de las flores, producción de néctar, visitantes y producción de frutos cuando *P. calyculatus* era parte de la población alopátrica o estaba en simpatria con *P. auriculatus*. Sus resultados indican que esto podría deberse a los cambios en polinizadores de las comunidades locales y, por tanto, se esperaría la divergencia en poblaciones alopátricas. Al estimar el aislamiento reproductivo entre las poblaciones simpátricas notaron que este es mantenido no solo por la baja

compatibilidad obtenida por las cruza heteroespecíficas, sino en gran medida a la utilización diferencial de hospederos y los ensambles de aves dispersoras de semillas.

Algunos autores han encontrado que en morfos de color floral de varios sistemas, como *Hydrophyllum appendiculatum* (Boraginaceae) (Wolfe, 1993), zonas híbridas del género *Iris* (Iridaceae) (Cruzan & Arnold 1994) y *Linanthus parryae* (Polemoniaceae) (Schemske & Bierzychudek 2001), existe un impacto notable en la producción de semillas por polinización cruzada. Asimismo, se ha mostrado que este fenómeno genera cambios en componentes de la adecuación biológica de los híbridos; promovidos principalmente por las preferencias del polinizador que conlleva a una discriminación entre morfos (Waser & Price 1981). Sin embargo, autores como Rausher (2008) consideran que la mayoría de estos estudios donde hay presiones de selección impuestas por los polinizadores no están lo suficientemente sustentados para proponer que la divergencia en color floral sea adaptativa a los diferentes tipos de polinizador.

No obstante, los ejemplos anteriormente mencionados demuestran el papel de los polinizadores en el mantenimiento de las zonas de hibridación. Aunque, para que estas ocurran también es necesario que la fenología de las plantas simpátricas sea en cierta forma sincrónica en escala tiempo-espacio. Por ejemplo, Kameyama et al. (2008) evaluaron como la fenología de floración es alterada en los ecosistemas alpinos, afectando el flujo de genes, mediado por el polen, entre poblaciones relacionadas. En su estudio, los autores resaltan la importancia evolutiva y ecológica de las zonas de hibridación, al tener evidencia de híbridos fértiles. Estos resultados apoyan lo anteriormente propuesto por Widmer et al. (2009), quienes indican que muchas especies de plantas son aptas para formar híbridos viables y muchos de esos híbridos pueden encontrarse en poblaciones naturales.

El género *Penstemon* ha sido objeto de diferentes estudios que buscan resolver las relaciones filogenéticas entre sus especies respecto a la evolución floral, aunque en su totalidad aún no se resuelvan, debido a las discordancias en su filogenia (Wolfe et al. 2006, Wilson et al. 2007). Sin embargo, se ha confirmado que el paso evolutivo de flores adaptadas para polinización por himenópteros hacia flores adaptadas para colibríes, ha ocurrido de forma

independiente en el género (Wessinger et al. 2016). Se ha sugerido que esos cambios podrían estar dados por estrategias en presentación del polen en las anteras, sus tasas de remoción y deposición, colores de la corola, y caracteres del visitante; de manera que los polinizadores no se deben descartar como agentes responsables de su divergencia floral (Thomson et al. 2000; Wilson et al. 2004).

Sin embargo, dentro del género aún es poco lo que se conoce de los visitantes florales en los sistemas híbridos, lo cual podría ser un indicador de como los polinizadores compartidos entre especies parentales contribuyen a su formación. Por ejemplo, Kimball (2008) estudió la morfología floral, recompensas de néctar y visitas de polinizadores en *Penstemon newberryi*, *P. davidsonii* y sus híbridos. La autora mostró una relación positiva en cambios en la comunidad de polinizadores y la morfología de las plantas, que está determinada por la altitud; donde el ensamble de polinizadores comunes entre las especies estudiadas podrían ser una base importante en la estructuración de zonas híbridas de *Penstemon*.

En México se han realizado varios trabajos relacionados con especies del género *Penstemon* basados en la ecología de la polinización. En estos estudios se ha mostrado a las recompensas de las flores como un requerimiento de sus visitantes, principalmente abejas y colibríes, quienes a su vez moldean los mecanismos de regulación de la dinámica de las flores y su evolución (Lange & Scott 1999; Castellanos, Wilson & Thomson 2002, 2003; Lara & Ornelas 2008; Cane & Dunne 2013).

De esta manera, en las plantas de este género se ha resaltado la selección del fenotipo floral como estrategia de mejoramiento de la interacción con sus polinizadores, particularmente a través de caracteres que afectan la transferencia de polen. Por ejemplo, Castellanos et al. (2004) mostraron para el género una dominancia en las adaptaciones para la polinización por colibríes, como corolas tubulares con estructuras reproductivas exertas, siendo estos polinizadores beneficiados por las también llamadas adaptaciones “anti-abejas” que producen flores donde dichos insectos no pueden forrajear fácilmente, caracterizadas por corolas estrechas y pendulares. Otro ejemplo de este tipo de sistemas fue el estudiado por Lara & Ornelas (2008), quienes evaluaron las interacciones entre tasas de visita de los polinizadores

de *Penstemon roseus*, polen removido y depositado, tamaño de la flor, el néctar removido y producción de semillas. Los autores mostraron diferencias entre las variables evaluadas, pero que no afectan la producción de semillas, además de la tendencia hacia la polinización por colibríes, aunque se mantenga el síndrome de polinización por abejas de acuerdo a las características del néctar. Además de todo lo hasta aquí mencionado, en plantas de este género también es posible encontrar un fenómeno opuesto, donde son las plantas con características florales para polinización por colibríes donde las abejas parecen dominar como los principales visitantes florales. Ejemplo de esto es el estudio realizado por Cane & Dunne (2013), quienes registraron estrategias de forrajeo en abejas, que permiten la descarga de grandes cantidades de polen de *Penstemon eatonii* en los estigmas de individuos de la misma especie, a pesar de que son plantas que presentan rasgos florales típicos para la atracción y forrajeo de néctar por parte de los colibríes. Sus resultados mostraron que son las abejas las que están realizando una efectiva polinización al tener la facilidad de aterrizar en sus flores en busca de polen o néctar, sobre todo en ausencia de colibríes.

3. JUSTIFICACIÓN

La información generada en la presente tesis ayudará a conocer algunos de los mecanismos de adaptación floral de los morfos de *Penstemon gentianoides* frente a sus polinizadores, y aportará conocimiento básico que ayude a promover investigaciones, sobre cómo los rasgos florales influyen la dispersión de polen y otros eventos post-visita que impactan el aislamiento reproductivo en las poblaciones naturales. Además, a partir de este estudio se determinarán aspectos sobre fenología reproductiva y se llevarán a cabo medidas complementarias como compatibilidad de polen entre poblaciones relacionadas, para conocer potenciales causas del establecimiento de los morfos de *P. gentianoides* en la zona de estudio.

4. HIPÓTESIS

H1= Los caracteres florales de los morfos se expresan de manera diferencial en función de su color.

Predicciones:

- Por lo tanto, se espera variación en medidas morfológicas entre morfos
- Variación en cantidad y calidad de recompensa ofrecida entre morfos

H2= Los caracteres florales de los morfos determinan la atracción diferencial del recurso por parte de los visitantes

Predicciones:

- Por ello se espera que los caracteres florales de cada morfo se ajustarán a un síndrome de polinización
- Que exista correspondencia entre visitantes y síndrome de polinización
- Que exista variación en la cantidad de frutos y semillas producidos en cada morfo

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar la biología floral y reproductiva de los morfos variables en color de *Penstemon gentianoides* en el Volcán La Malinche, Tlaxcala; México.

5.2 Objetivos específicos

- Describir la fenología de floración de los morfos atípicos
- Evaluar la variación de la oferta de néctar en cantidad y concentración de azúcares

- Identificar los visitantes florales y su eficiencia de polinización
- Estimar el aislamiento reproductivo entre los morfos atípicos

6. METODOLOGÍA

6.1 Área de estudio

Este estudio se realizó en el área del volcán La Malinche o Matlalcueyatl, actualmente constituido como Parque Nacional Malinche; el cual está localizado en los Estados de Tlaxcala y Puebla, con una extensión de 46,093 ha y una altitud máxima de 4,461 m.s.n.m. El área de estudio está ubicada en el Estado de Tlaxcala, municipio de Huamantla, específicamente sobre la cara norte del volcán, entre los 3,400 y 3,900 m.s.n.m.

EL Parque Nacional La Malinche presenta un clima templado subhúmedo, combinado con semifrío, con lluvias en verano de mayor intensidad entre los meses de junio a septiembre (CONAGUA 2018). En su área predomina una cobertura de bosques de pino, oyamel, encino y diversas asociaciones entre ellos; además de pastizal natural, chaparral y páramo de altura también presenta zonas inducidas como cultivos (Villers et al. 2006).

6.2 Fase de campo

El trabajo de campo se dividió en dos temporadas, la primera temporada de floración en el año 2016 entre septiembre y diciembre, y la segunda temporada de julio a diciembre del 2017.

6.2.1 Especie Estudiada

Penstemon gentianoides es una planta herbácea de la familia Plantaginaceae, que se distribuye en la Cordillera Volcánica Transmexicana, en el Estado de México, Hidalgo, Michoacán, Oaxaca, Puebla, Tlaxcala, Veracruz, y al sur de Chiapas hasta Guatemala (Straw 1962). Está

asociada a bosques de pino y oyamel, zacatonales alpinos y matorrales secundarios y en el Parque Nacional La Malinche, su rango altitudinal es de los 3000 a los 3900 msnm (Villers et al. 2006).

Los individuos crecen hasta 1.5 m de altura, con tallos erectos y glabros, hojas opuestas, lanceoladas y numerosas, inflorescencias en panícula, de color violeta a morado, aunque puede presentar variaciones en diferentes gamas de colores que van del rosa al azul (lo cual no se descarta que sea producto de hibridación); su despliegue fenológico se da entre los meses de Julio y Noviembre (Lara, 2006). Estas flores son protándricas, con sus primeros ocho días en fase masculina y los siguientes 7 días en fase femenina (Salas-Arcos et al. 2017).

Los frutos producidos en esta especie son pequeños, ovoides y glabros de color café con numerosas semillas color negro (Calderón & Rzedowski 2002).

6.2.2 Descripción de los parches florales

En el área de estudio, sobre la ladera norte, se abarcó una zona de aproximadamente 1000 m de longitud ubicada geográficamente entre los 19°15'56.55"N- 98°1'49.41"W y los 19°14'44.36"N- 98°1'46.15"W, entre los 3457 a los 3922 m de elevación. Esta zona fue elegida teniendo en cuenta su fácil acceso, ya que abarca parte del sendero principal del parque, que se conserva con suficiente vegetación a pesar de la afluencia de turismo, y presentó una cantidad notable de morfos variables en color en estado de floración, que facilitaron la realización del estudio y los análisis estadísticos respectivos.

Para la identificación de las entidades de muestreo se delimitaron 50 m a cada lado del área descrita y se marcaron con una cinta fluorescente todos los individuos que presentaron variación extrema del color morado de las flores de *Penstemon gentianoides*. Se marcó un total de 213 individuos con flores de coloración Fucsia distribuidos en 41 parches y 68 individuos con flores de coloración Azul distribuidos en 19 parches. En cada parche se tomaron los datos de georeferenciación espacial con ayuda de GPS con el fin de registrar la ubicación espacial de cada individuo (Fig.1).

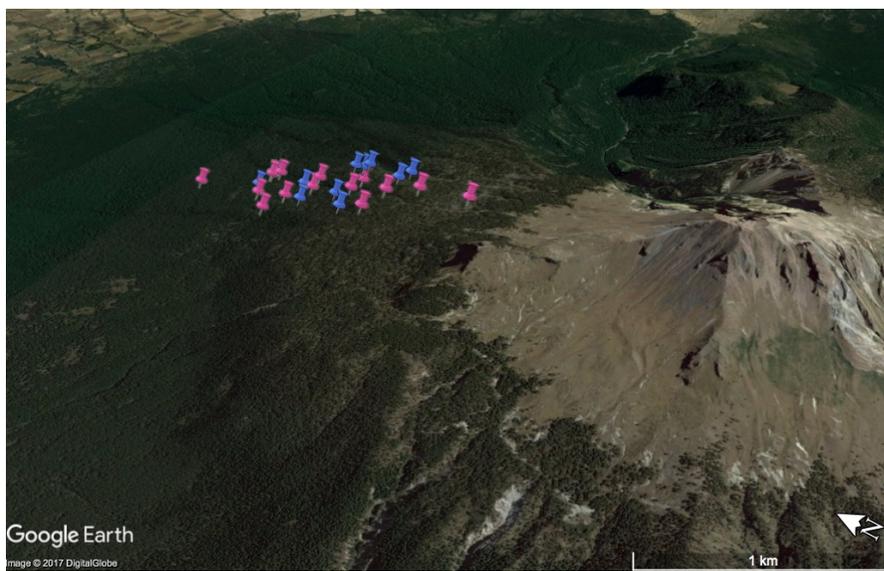


Figura 1. Parque Nacional La Malinche, Tlaxcala, México. Las marcas indican la ubicación de los parches en floración de los morfos objeto de seguimiento.

Para cada morfo se cuantificó el número de individuos presentes y a una muestra de estos (n=43), se les midió la altura y el número de hojas con el uso de una cinta métrica y conteo directo, respectivamente.

6.2.3 Biología floral

El seguimiento fenológico se realizó mensualmente durante las temporadas de floración sobre todas las entidades de la población de morfos. De manera aleatoria, en cada evento de muestreo se seleccionaron los individuos a ser evaluados, en relación a su oferta floral, para los respectivos registros basados en las sugerencias de Wolf et al. (1976): censos periódicos de flores disponibles (número de botones florales y flores abiertas).

La morfología floral se caracterizó a partir de una muestra de 2 flores frescas recolectadas por planta (en 134 plantas por morfo), donde se evaluaron variables como ancho y longitud total de la corola, corola efectiva (medida desde la entrada de la cámara de néctar hasta la entrada del tubo), longitud del pistilo y estambres, y se identificó si las estructuras reproductivas se encontraban insertas o excertas a las corolas; las mediciones se realizaron con un Vernier digital bajo la unidad de medida de milímetros.

Para determinar la longevidad floral, se marcaron 40 botones previos a la antesis floral en cada morfo, en los cuales se realizaron observaciones diarias, con el objetivo de registrar la duración de las fases masculina y femenina, y el periodo de vida de la flor hasta el marchitamiento o su caída. De esta manera, se evaluó la función sexual, mediante el registro de la liberación del polen de las anteras y el elongamiento del estilo; y la receptividad del estigma se infirió mediante la detección de burbujas al aplicarle una gota de peróxido de hidrógeno (Kearns & Inouye 1993).

6.2.4 Color floral

Debido a que los visitantes florales tienen diferentes sistemas visuales, se realizó una evaluación del color presentado por los morfos, mediante espectrofotometría; principalmente con el fin de evitar sesgos en la evaluación del color producto de la sensibilidad particular del sistema visual humano. Por tanto, el análisis de captura de fotones por cada receptor sensorial de las corolas, permite conocer si hay un ajuste de la diferenciación realizada en campo para cada morfo. Para esto se colectaron 40 flores maduras por morfo y por especie (*P. roseus* y *P. gentianoides*, considerando que pueden ser el sistema parental de estos potenciales híbridos), que fueron almacenadas en una nevera portátil (conservación en frío), hasta un periodo máximo de 24 horas, y posteriormente se analizaron en laboratorio.

6.2.5 Características del néctar

Para determinar la variación entre las características del néctar en flores disponibles para los visitantes (método de cosecha en pie), se midió la producción de néctar en 153 flores por morfo (provenientes de diferentes individuos) por medio de microcapilares calibrados (5 μ L) y su concentración se cuantificó en equivalentes de sacarosa, con un refractómetro portátil (Atago, con un rango de concentración de 0-32° grados Brix) que luego se estandarizó en mg/ml (Kearns & Inouye 1993). Este muestreo se realizó en tres horarios diferentes del día: 10:00hrs (mañana), 13:00hrs (medio día) y 16:00hrs (tarde). También se evaluó la producción total de néctar por morfo en 62 flores protegidas, de manera que los botones previos a la antesis floral fueron encerrados con bolsas de tul para evitar la visita por animales, y se midió

el volumen y la concentración del néctar al finalizar el tiempo de vida de la flor.

6.2.6 Visitantes florales

Se identificaron los visitantes florales a través de observaciones directas y/o con binoculares (10x42 mm) en plantas focales, por un periodo de tiempo de 3 horas/día a partir de las 10:00 hrs hasta las 16:00 hrs, en cada evento de muestreo. Durante las observaciones se registró el tipo de visitante (colibrí o insecto), la hora de llegada, la duración de la visita y flores visitadas. Cuando no fue posible identificar los visitantes en campo, se procedió a colectarlos en el caso de los insectos con redes entomológicas, para una determinación de las especies, y para las aves se apoyó su identificación por medio de guías de campo. Los datos obtenidos también permitieron calcular la tasa de visitas por cada evento de muestreo (Martén-Rodríguez et al. 2009).

6.2.7 Caracterización de los frutos

Inicialmente se evaluó la producción de frutos en las entidades de muestreo expuestas a los polinizadores (n=40), para conocer el *fruit set* (conjunto de frutos) de cada morfo. A continuación se realizó el seguimiento sobre los frutos formados, registrando los datos correspondientes a tamaño, número o conjunto de semillas (*seed set*) y señales de depredación, que fueron analizados con mayor detalle en laboratorio.

6.2.8 Eficiencia del polinizador

Para evaluar la eficiencia del polinizador se embolsaron 30 botones florales provenientes de distintas plantas por morfo, los cuales fueron emasculados y al momento de la receptividad estigmática se realizaron polinizaciones, manipulando algunos de sus visitantes florales de la siguiente manera (Fig.2):

- Para el caso de los colibríes se realizaron capturas con redes de niebla (12 m x 2.5 m, 3.6 mm ojo de malla) ubicadas alrededor de los morfos que contenían las flores embolsadas, así una vez capturado el colibrí, se le colocó polen proveniente de un determinado morfo y se

procedió a introducir su cabeza en las corolas del morfo correspondiente; en repetidas ocasiones para el mismo tratamiento.

- Los insectos, también fueron colectados manualmente por medio de recipientes (tubos de ensayo), donde se impregnaron con polen de un determinado morfo, para luego direccionarlos hacia las flores embolsadas del mismo morfo; de manera que tuviesen contacto con sus estructuras reproductivas más de una vez.



Figura 2. Polinizaciones dirigidas con los visitantes. A. Manipulación de *Selasphorus platycercus* para introducirlo por la apertura distal de la corola. B. Manipulación de *Bombus ephippiatus* en recipiente tubular que contenía polen proveniente del morfo a visitar.

Posterior a estas polinizaciones se registró el desarrollo o no de fruto, con el objetivo de evaluar la proporción de frutos formados en relación al tipo de polinizador, además de posibles diferencias en sus tamaños y producción de semillas (Armbruster & Herzig 1984).

6.2.9 Aislamiento reproductivo

Se tomaron los datos de morfometría floral y recompensa de néctar de los morfos, para analizarlos en función de los mismos caracteres reportados en *P. roseus* y *P. gentianoides* (Lara & Ornelas 2008; Salas-Arcos et al 2017), con el fin de obtener inicialmente una respuesta descriptiva sobre semejanzas y diferencias en configuración floral de este sistema.

Para evaluar compatibilidad genética en campo y el potencial de hibridación de las especies *P. roseus* y *P. gentianoides* que crecen simpátricamente con las poblaciones de morfos, se

realizaron experimentos de polinización controlada. Las polinizaciones fueron hechas en una flor por cada individuo (en 28 plantas), donde las cargas de polen de individuos donantes fueron puestas sobre los estigmas receptivos de flores que previo a su antesis fueron emasculadas y protegidas de polinizadores (siendo embolsados hasta la caída de la flor); bajo los siguientes tratamientos:

- flores del morfo Azul polinizadas con polen del morfo Azul (control).
- flores del morfo Azul polinizadas con polen del morfo Fucsia.
- flores del morfo Azul polinizadas con polen de *P. roseus*.
- flores del morfo Azul polinizadas con polen de *P. gentianoides*.
- flores del morfo Fucsia polinizadas con polen del morfo Fucsia (control).
- flores del morfo Fucsia polinizadas con polen del morfo Azul.
- flores del morfo Fucsia polinizadas con polen de *P. gentianoides*.
- flores del morfo Fucsia polinizadas con polen de *P. roseus*.
- flores del *P. roseus* polinizadas con polen de *P. roseus* (control).
- flores del *P. roseus* polinizadas con polen de morfo Azul
- flores del *P. roseus* polinizadas con polen de morfo Fucsia
- flores del *P. roseus* polinizadas con polen de *P. gentianoides*
- flores del *P. gentianoides* polinizadas con polen de *P. gentianoides* (control)
- flores del *P. gentianoides* polinizadas con polen de morfo Azul
- flores del *P. gentianoides* polinizadas con polen de morfo Fucsia
- flores del *P. gentianoides* polinizadas con polen de *P. roseus*

Dos meses después se evaluó la respuesta de estos tratamientos frente a la producción o no de fruto, y cuando fue positiva, se colectaron los frutos para ser medidos en laboratorio. Con esta información se cuantificó la contribución de la barreras poscigóticas entre las poblaciones evaluadas a través del método de Aislamiento Reproductivo propuesto por Sobel & Chen (2014). Los valores obtenidos se compararon con la siguiente formula: $RI_{4A} = 1 - 20(H/H+C)$; donde H son cruces heteroespecíficos y C son cruces conoespecíficos.

Igualmente, se evaluó la significancia de los visitantes florales como factor de aislamiento ecológico precigótico entre poblaciones simpátricas usando el estimador sugerido por Sobel & Chen (2014), con la siguiente ecuación: $RI_{4C} = 1 - (S/S + U)$; donde S se refiere a la cantidad de visitantes florales compartidos y U se refiere a la cantidad de visitantes florales no compartidos.

Finalmente, la fuerza absoluta y relativa que tiene cada una de estas barreras, fue cuantificada para determinar cuál de ellas, está contribuyendo en mayor medida a que las poblaciones se mantengan en simpatría.

6.3 Fase de laboratorio

En campo se colectaron 10 botones florales de los individuos objeto de seguimiento, estos fueron almacenados en alcohol al 70% hasta su análisis en laboratorio. En cada botón se contó el número total de óvulos por ovario, con ayuda de un microscopio estereoscópico (VELAB VE-S1 USA); con el objetivo de conocer el *seed set* (conjunto de óvulos) de cada morfo y evaluarlo posteriormente en función a la producción de semillas de frutos maduros, en individuos con polinización abierta.

Todos los frutos producidos tanto en polinización abierta, inducida por manipulación del visitante y tratamientos de cruza experimentales, fueron medidos (largo y ancho) con un Vernier digital (TRUPER) y pesados con una balanza digital (VELAB VE-1000 linealidad:±0.02), además de cuantificar sus semillas; para estimar posibles diferencias entre tratamientos evaluados.

6.3.1 Color floral

Para medir la reflectancia emitida por las superficies florales, se utilizó un espectrófotómetro JAZ-EL 200 con una lámpara de xenón (Ocean Optics Inc., Dunedin, FL, USA), que presenta sensibilidad para capturar la reflectancia en un espectro de luz de 300 a 700 nm dividido en intervalos de 0.22nm y el sensor del espectro fue fijado a un ángulo de 45° del área medida.

Los pétalos fueron montados sobre una cinta adhesiva para obtener una superficie relativamente plana, minimizando así la variabilidad de reflectancia, que fue medida en unidades de porcentaje; además entre cada medición se realizó la captura de un blanco, para que las mediciones posteriores no estuvieran influenciadas por la reflectancia previamente capturada.

6.4 Análisis de datos

Se utilizaron modelos lineales generalizados (GLM) con el programa R Studio 3.2.2 para evaluar diferencias entre morfos (factores fijos) de acuerdo a cada una de las variables de respuesta sobre morfometría floral, datos de forrajeo, tratamientos de polinización, disponibilidad de néctar, producción de frutos, el efecto del tratamiento por tipo de polinizador y el efecto de cada crusa para estimar compatibilidad genética entre poblaciones. Las diferencias entre factores que comprendían más de dos niveles, como el tipo de planta que incluye el sistema de *Penstemon* evaluado respecto a rasgos florales, el horario de producción de néctar y forrajeo por parte de los visitantes y la variación en reflectancia floral en cada cruma, se analizaron con una prueba *post hoc* Tukey; adicionalmente las variables de forrajeo seguido a su análisis inicial, se analizaron en función del color, néctar y oferta floral por medio de un modelo de regresión lineal.

Respecto a la asociación entre composición del color floral y el ensamble de visitantes, inicialmente se realizó un modelo de regresión lineal para conocer cuál de los cromas explicaba la variación de forrajeo en los morfos. Posteriormente, se evaluó la estimulación en fotones, producida por las flores a los cuatro receptores visuales presentes en aves con sistemas visuales tetracromáticos y sensibilidad al UV, y a los tres receptores visuales presentes en abejas. Para esto se utilizó el paquete de R “PAVO”, que incluye los porcentajes de reflectancia obtenidos para modelar la captura de fotones por cada receptor sensorial, dependiendo del tipo de sistema visual de interés.

Finalmente, por medio del análisis de sobrevivencia se comparó la probabilidad que tiene

cada morfo de ser visitado en un tiempo determinado de observación, utilizando el estimador no paramétrico Kaplan–Meier (Muenchow, 1986).

7. RESULTADOS

Se identificaron dos morfos que presentaron coloración atípica extrema en relación al color morado de *Penstemon gentianoides*, denominados “Morfo Fucsia” y “Morfo Azul” (Fig.3), categorización en relación al sistema de percepción visual humano. El morfo Fucsia se encontró distribuido en un gradiente altitudinal que va desde 3731 hasta 3922m snm, y el morfo Azul en un gradiente desde 3703 hasta 3738m snm. Encontramos formas de crecimiento aislada en el morfo Azul (individuos separados) y formas agregadas en el morfo Fucsia (parches).



Figura 3. Morfos de *Penstemon gentianoides*: “Morfo Fucsia” (derecha) y “Morfo Azul” (izquierda)

Adicionalmente, los caracteres vegetativos evaluados, muestran que los individuos tienen una producción diferencial en follaje ($X^2=4.0743$; $gl=1$; $p=0.0435$), pero son muy similares respecto al estrato que ocupan en el bosque, puesto que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la altura de las plantas consideradas en ambos morfos ($F_{1, 72}=2.825$, $p=0.097$).

7.1 Biología floral

De acuerdo al seguimiento realizado de oferta floral, se encontró que el periodo de floración en ambas poblaciones de morfos fue de 5 meses aproximadamente, de julio a noviembre; presentando diferencias en la distribución de la disponibilidad floral durante estos meses, con un patrón unimodal, es decir un solo pico de floración, en Julio ($X^2=56.21$; $gl=4$; $p=1.812e-11$). Igualmente, se presentó una variación significativa en el número de flores abiertas en relación al mes ($X^2=24.102$; $gl=4$; $p=0.00007$, Fig.4), donde el morfo Fucsia registró la mayor producción de flores disponibles por individuo (Fucsia: 6.63 ± 0.39 Azul: 5.35 ± 0.55).

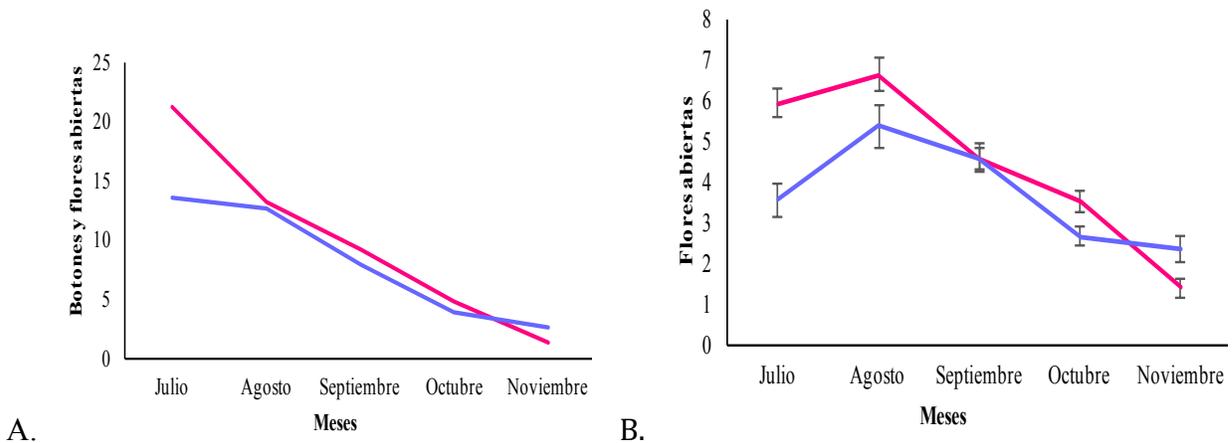


Figura 4. A. Variación mensual de la oferta floral total (botones y flores abiertas) B. Variación mensual de flores abiertas; en morfo azul y fucsia de *P. gentianoides*.

Las flores de ambos morfos, abrieron gradualmente, mostrándose totalmente abiertas al segundo día de anthesis, con cierto patrón de asincronía individual; es decir que por cada inflorescencia cerca del 30% de sus flores estaban abiertas mientras el resto permanecían como botones. Igual patrón mostró la longevidad, puesto que la vida floral duro entre 6 y 14 días, sin encontrar diferencias significativas entre morfos ($X^2=0.40707$; $gl=1$; $p=0.5235$).

En contraste, la receptividad estigmática fue diferencial, puesto que el morfo fucsia manifestó primero dicha fase, a partir de la reacción con el peróxido de hidrogeno, en promedio al octavo día, mientras que el morfo azul lo hizo a partir del noveno día ($X^2=3.9213$; $gl=1$;

$p=0.04768$). Además, se encontraron diferencias significativas en la cantidad de óvulos que puede formar el ovario de cada morfo, registrando más óvulos en el morfo azul (241 ± 4.1) que en el morfo fucsia (208 ± 5.7) ($X^2=101.92$; $gl=1$; $p=2.2e-16$).

En relación a los atributos florales, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todas las medidas morfométricas evaluadas; de manera que el morfo fucsia presentó corolas más grandes respecto al morfo azul, aunque los estambres manifestaron longitudes inversas al tamaño de las flores (Tabla 1).

Tabla 1. Variables de morfometría floral evaluadas en los morfos atípicos de color de *Penstemon gentianoides*, con valores promedio, error estándar y rangos.

<i>Morfo</i>	<i>Longitud de la corola (mm)</i>	<i>Ancho de la corola (mm)</i>	<i>Corola efectiva (mm)</i>	<i>Longitud estambres (mm)</i>		<i>Longitud pistilo (mm)</i>
				<i>Pequeños</i>	<i>Grandes</i>	
<i>Azul</i> <i>n=134</i>	$30,45 \pm 0,25$ (24,03-38,9)	$9,56 \pm 0,08$ (7,7-14,1)	$25,98 \pm 0,25$ (20,4-35,1)	$19,34 \pm 0,20$ (12,7-24,4)	$22,33 \pm 0,20$ (15,3-27,4)	$21,20 \pm 0,21$ (12,8-26,9)
<i>Fucsia</i> <i>n=134</i>	$31,73 \pm 0,24$ (23,5-38,1)	$10,13 \pm 0,08$ (7-12,5)	$27,32 \pm 0,23$ (20-36,7)	$18,81 \pm 0,16$ (12,3-25,1)	$21,67 \pm 0,17$ (15,9-28,8)	$21,92 \pm 0,22$ (12,7-29,5)
<i>GLM (F)</i> <i>gl=1</i>	13.086; $p=0.0003$	21.875; $p=4.6e-6$	14.656; $p=0.0001$	4.1236; $p=0.0432$	6.1418; $p=0.0138$	5.3525; $p=0.0214$

7.2 Color floral

El espectro de reflectancia de las corolas, inicialmente mostró una pequeña elevación en el segmento UV, sobre los 400 nm, cuya tendencia fue similar en ambos morfos ($F_{1,37} = 26.163$, $p < 0.001$, (Fig.5). Sin embargo, sobre el segmento rojo fue notable un pico, a los 700 nm, donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas, puesto que el rango en porcentaje de reflectancia fue mayor en el morfo fucsia ($F_{1,37} = 26.163$, $p < 0.001$).

Este resultado podría ser un indicador de por qué dicho morfo se ve de un color más rosa que

el morfo azul desde el sistema visual humano; y por el contrario, podría tratarse (aunque no se evaluó) que el pico rojo en el morfo azul se encuentre fuera del rango de nuestra visión (superior a 700 nm) y por tal motivo lo vemos de ese color.

Adicionalmente, el análisis de color entre los morfos y lo que se considera sus sistema parental (*P. gentianoides* y *P. roseus*), indicó diferencias estadísticamente significativas en los promedios de reflectancia para los cuatro cromas evaluados (UV: $F_{3, 75} = 17.422$, $p = 1.113e-7$; azul: $F_{3, 75} = 11.136$, $p = 3.985e-5$; verde: $F_{3, 75} = 5.7396$, $p = 0.0013$; rojo: $F_{3, 75} = 13.683$, $p = 3.303e-6$; anexos). Donde los mayores porcentajes de reflectancia según la prueba Tukey post hoc en relación al cromas se registraron en el morfo azul sobre los cromas UV y azul, difiriendo significativamente de *P. gentianoides* y *P. roseus* (UV: $p < 0.0001$, azul: $p = 0.0002$) y en el morfo fucsia sobre los cromas verde y rojo igualmente difiriendo de *P. gentianoides* y *P. roseus* (verde: $p = 0.029$, rojo: $p < 0.0001$).

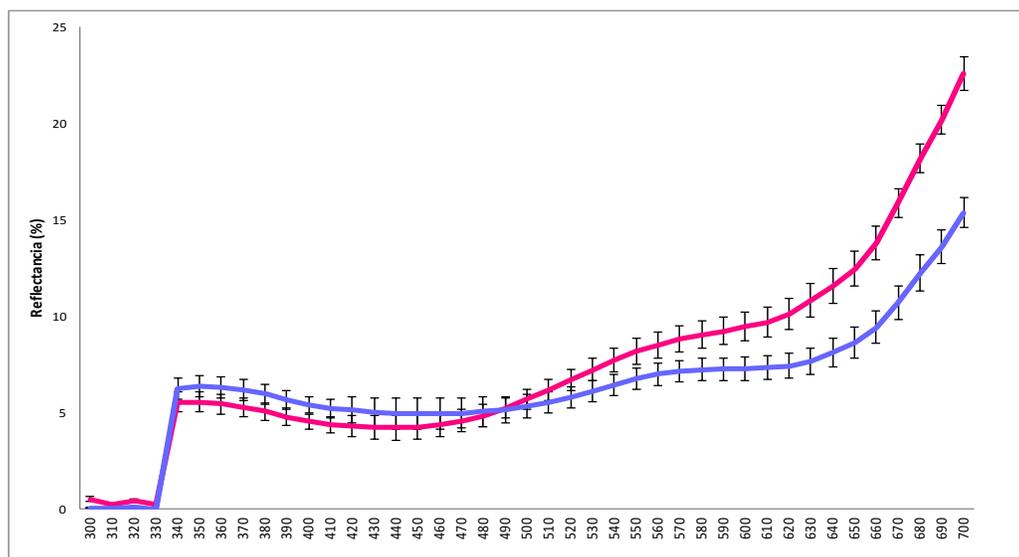


Figura 5. Curvas medias del espectro de reflectancia de las corolas del morfo azul y fucsia de *P. gentianoides*., con errores estándar correspondientes.

Por otro lado, el análisis de reflectancia en función de los modelos visuales preestablecidos en el paquete PAVO para sistemas policromáticos con sensibilidad al UV (colibríes) y sistemas tricromáticos (abejorros), indicó que de acuerdo a las distancias mínimas perceptibles las

poblaciones de *Penstemon* evaluadas pueden ser percibidas como objetos diferenciales dentro del entorno que habitan por parte de estos visitantes (Fig.6). Esto, debido a que la captura de fotones relativa supera el umbral perceptual de sus receptores sensoriales (calculado bajo la fracción de Weber descrita en Vorobyev et al. 1998); y además las distancias registradas fueron significativamente diferentes ($F_{3, 75} = 179.41, p < 2e-16$).

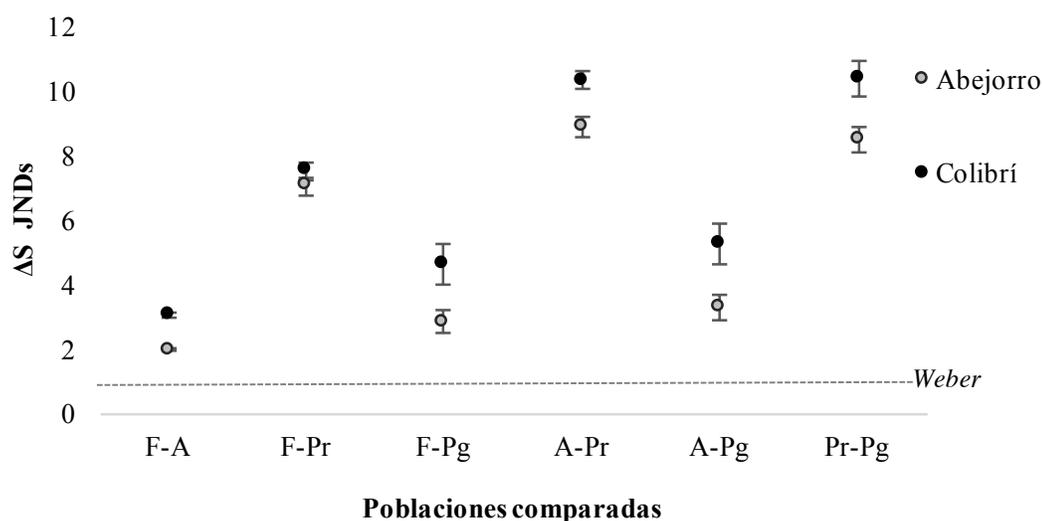


Figura 6. Distancias cromáticas del color (ΔS) entre todas las posibles comparaciones del sistema de estudio (A=morfo azul, F=morfo fucsia, Pg=*Penstemon gentianoides*, Pr=*Penstemon roseus*), en función de la percepción visual de los colibríes y de los abejorros.

La representación tridimensional y bidimensional para el sistema visual de los visitantes (Tabla 2, anexos), indica que el mayor porcentaje de estimulación relativa proveniente de la reflectancia floral, está asociada a los conos receptores de longitudes largas (L) para ambos visitantes (colibrí: $F_{2,234} = 176.24, p < 2.2e-16$; abejorro: $X: F_{2,234} = 176.2, p < 2e-16$). Sin embargo, la estimulación que les permite discernir entre las flores del sistema evaluado, como se mostró en la Figura 6, actúa en función de la recepción de ondas medias (M) en colibríes y de ondas medias (M) y cortas (S) en abejorros. Esto es debido a los valores muy cercanos a cero y negativos en el ángulo evaluado; siendo la señal visual significativamente diferente en

cada población (colibrí: X: $F_{3,75}=40.517$, $p=1.128e-15$; Y: $F_{3,75}=6.1889$, $p=0.0008158$; $h_{.theta}$: $F_{3,75} = 7.0267$, $p=0.0003157$; abejorro: X: $F_{3,75}=27.465$, $p=4.324e-12$; Y: $F_{3,75}=38.421$, $p=3.781e-15$; $h_{.theta}$: $F_{3,75} = 50.442$, $p< 2.2e-16$, Tabla.2)

Asimismo, en la Tabla 2 se indican los valores obtenidos en el ángulo $h_{.phi}$ sobre el eje Z, correspondiente a colibríes, evidenciando un desplazamiento angular negativo, lo que confirma una estimulación visual a partir de ondas cortas medias y largas (S, M, y L); donde las flores del morfo azul y de *P. roseus*, difieren significativamente de las flores del morfo fucsia y *P. gentianoides* (Z: $F_{3,75}=65.088$, $p<2.2e-16$; $h_{.phi}$: $F_{3,75}=6.3837$ $p=0.000653$).

Tabla 2. Variables de percepción de color evaluadas en el sistema de estudio.

	% Estimulación relativa de los conos				% ocupación del color en los ejes del espacio tetrahedral			$h_{.theta}$	$h_{.phi}$	croma r	Croma alcanzado r_A
	u	s	m	l	X	Y	Z				
Colibrí											
<i>Morfo fucsia</i>	0.1542	0.1631	0.2918	0.3908	0.1394	0.0105	-0.0958	0.0893	-0.6084	0.1699	0.3854
<i>Morfo Azul</i>	0.2059	0.2049	0.2706	0.3186	0.0697	0.0063	-0.0441	0.1074	-0.5630	0.0831	0.1934
<i>P. roseus</i>	0.0658	0.1052	0.3132	0.5158	0.2514	0.0019	-0.1842	0.0174	-0.6395	0.3121	0.7369
<i>P. gentianoides</i>	0.1572	0.1675	0.2900	0.3854	0.1334	0.0096	-0.0928	0.0860	-0.6084	0.1631	0.3742
Abejorro											
<i>Morfo fucsia</i>	N/A	0.2486	0.2921	0.4594	0.1183	-0.1038	N/A	-0.7292	N/A	0.1581	N/A
<i>Morfo Azul</i>	N/A	0.2764	0.3315	0.3922	0.0429	-0.0698	N/A	-1.0228	N/A	0.0822	N/A
<i>P. roseus</i>	N/A	0.1295	0.2078	0.6628	0.3217	-0.2497	N/A	-0.6843	N/A	0.4081	N/A
<i>P. gentianoides</i>	N/A	0.2358	0.2937	0.4705	0.1250	-0.1195	N/A	-0.8242	N/A	0.1745	N/A

Adicionalmente, la señal visual recibida por los colibríes presentó un alcance de pureza espectral (r_A) elevado en *P. roseus* ($r_A=0.73$), que se diferenció significativamente del resto de las poblaciones (r_A : $F_{3,75}=62.542$ $p<2.2e-16$). Esta condición, fue similar en abejorros, aunque en ellos no se generaron valores de alcance (r_A) debido a que su percepción visual consta de solo dos dimensiones, pero se obtuvo el valor cromático (r), donde la tendencia fue similar a lo manifestado por colibríes, siendo *P. roseus* quien obtuvo un valor significativamente alto ($r=0.40$), respecto a *P. gentianoides* y los morfos ($F_{3,75}=30.183$

$p=6.646e-13$, Tabla 2).

7.3 Características del néctar

De acuerdo al seguimiento de cosecha en pie, se encontraron diferencias significativas entre morfos, siendo el morfo fucsia quien presentó los registros más elevados en volumen y concentración (volumen: Fucsia= 1.06 ± 0.05 , Azul= 0.87 ± 0.04 $F_{1,300}=9.7276$, $p=0.001992$; concentración: Fucsia= 0.25 ± 0.01 , Azul= 0.20 ± 0.01 $F_{1,300}=7.9934$, $p=0.00501$). Sin embargo, cuando se evaluó dicha variación entre horarios (mañana, medio día y tarde) no hubo un patrón diferencial (volumen: $F_{2,300}=1.1822$, $p=0.308013$; concentración: $F_{2,300}=1.0468$, $p=0.35235$), evidenciando mayor disponibilidad de solución de néctar y azúcar en la mañana; independientemente del morfo (volumen: $F_{2,300}=37.1984$, $p=3.701e-15$; concentración: $F_{2,300}=56.2098$, $p< 2e-16$; Fig.7).

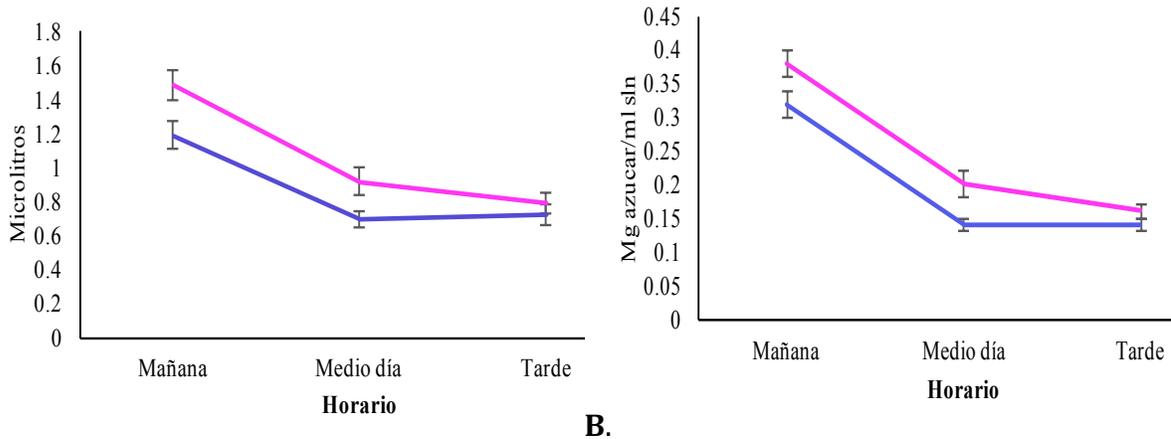


Figura 7. Variación de néctar en flores disponibles (cosecha en pie) del morfo azul y fucsia de *P. gentianoides*. A. Volumen medido en microlitros de solución, B. Concentración medida en miligramos de azúcar por mililitro de solución.

Asimismo, el volumen de néctar acumulado durante la vida floral varió significativamente, donde el morfo fucsia se mantuvo con la mayor producción (Fucsia= 7.63 ± 0.49 , Azul= 5.98 ± 0.48 ; $F_{1,110}=5.5022$, $p=0.02078$), aunque la concentración siguió una tendencia similar en ambos morfos (Fucsia= 2.80 ± 0.20 , Azul= 2.44 ± 0.22 ; $F_{1,110}=1.4361$, $p=0.2333$, anexos).

7.4 Visitantes florales

Se registraron en total 284 visitas de 7 especies, 2 de ellas pertenecientes al grupo de los abejorros (himenópteros): *Bombus ephippiatus* y *Bombus huntii*, y 5 especies de colibríes (Trochilidae): *Archilochus colubris*, *Colibri thalassinus*, *Eugenes fulgens*, *Hylocharis leucotis*, *Lampornis clemenciae* y *Selasphorus platycercus*. De acuerdo al análisis de frecuencias realizado por grupo de visitante, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre abejorros y colibríe ($X^2=1.1408$; $gl=1$; $p=0.2855$). Sin embargo, cuando se realizó el análisis en función del morfo visitado si hubo diferencias, encontrando que el mayor porcentaje de visitas fue en el morfo fucsia, predominando los colibríes ($X^2=8.6862$; $gl=1$; $p=0.003206$, Fig.8).

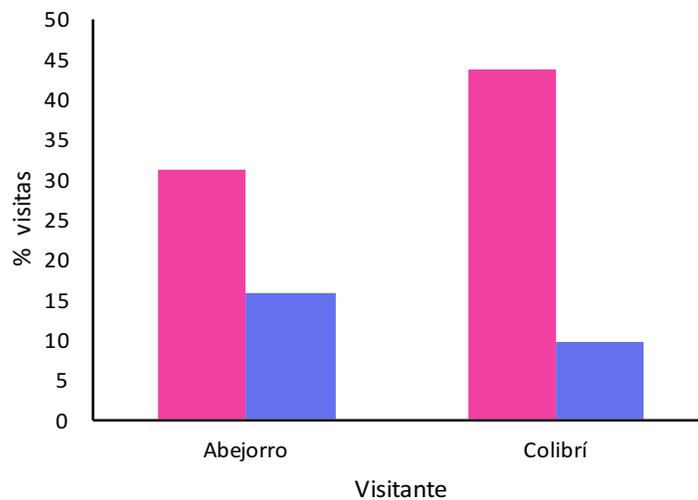


Figura 8. Porcentaje de visitas realizadas al morfo fucsia y azul por parte de abejorros y colibríes.

Este patrón de visitas no estuvo influenciado por el horario, debido a que el promedio de visitas realizadas por ambos grupos, en cada morfo, no fue diferencial en la mañana, medio día y/o en la tarde (colibríes: $X^2=3.484$; $gl=2$; $p=0.1751$; abejorros: $X^2=4.9353$; $gl=2$; $p=0.0847$). Sin embargo, en los colibríes el promedio de visitas fue mayor en la mañana y decreció hacia la tarde (mañana= 3.45 ± 1.05 , medio día= 2.72 ± 0.96 , tarde= 0.68 ± 0.19 ; $X^2=47.397$; $gl=2$; $p=5.104e-11$, Fig.9).

Por otro lado, la duración de la visita a cada morfo bajo los mismos tres horarios, varió significativamente ($X^2=11.846$; $gl=2$; $p=0.00267$), con un mayor registro en tiempo de forrajeo para el morfo fucsia durante la mañana; lo cual podría deberse a la duración del forrajeo de los colibríes, que se diferenció significativamente de los abejorros, al ser más extenso sobre el morfo fucsia ($X^2=45.565$; $gl=1$; $p=1.476e-11$).

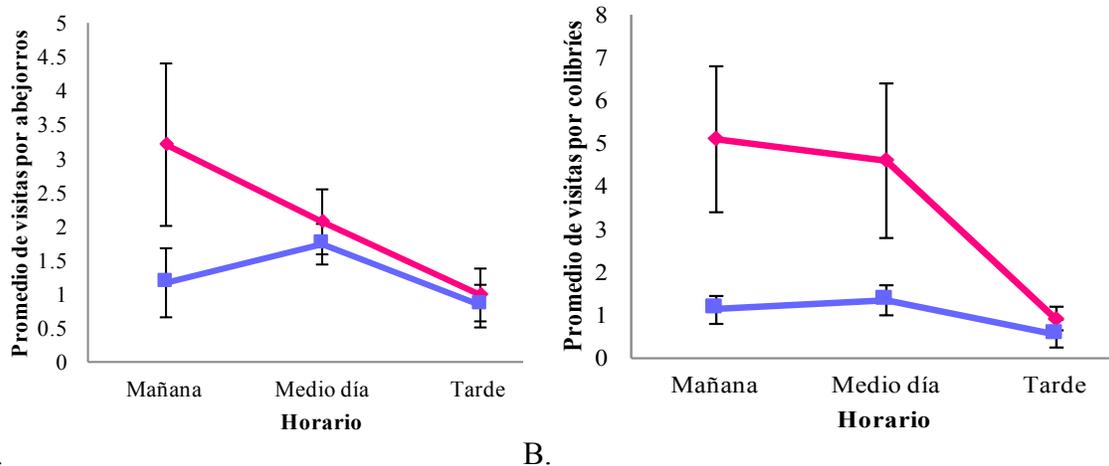


Figura 9. Visitas registradas en tres horarios del día al morfo azul y fucsia de *P. gentianoides* por A. abejorros y B. colibríes;

Los registros de tiempo ocupado por visitante suelen estar influenciados por el número de flores que visitan. De manera que se encontraron diferencias en la intensidad de forrajeo, donde el promedio de flores visitadas por colibríes fue mayor en el morfo fucsia (6.9 ± 0.42) respecto al morfo azul (1.85 ± 0.17) y el promedio correspondiente a los abejorros fue mayor en el morfo azul (2.75 ± 0.23), que en el morfo fucsia (3.88 ± 0.37) ($X^2=31.978$; $gl=1$; $p=1.559e-08$, Fig.10). En este sentido, se encuentra cierta repartición del recurso por parte de los visitantes en una escala espacial, pero no temporal (considerando periodos de observación al día), puesto que el número de flores visitadas no vario significativamente entre la mañana, el medio día y la tarde ($X^2=4.010$; $gl=2$; $p=0.1346$).

Igualmente, la duración de la visita al ser evaluada en función del mes para cada morfo, mostró diferencias estadísticamente significativas ($X^2=10.862$; $gl=3$; $p=0.0125$). Así, en el

morfo fucsia durante julio (11.76 ± 0.86) y septiembre (13.67 ± 1.26), los promedios de duración de visita fueron más elevados que en el resto de los meses, coincidiendo con la oferta de flores abiertas durante el mismo tiempo. Sin embargo, el modelo de regresión, indicó una relación muy débil entre dichas variables cuando se evaluaron a escala mensual ($Coef = -0.08$, $r^2 = 0.003$, $p = 0.384$), por lo tanto la duración de forrajeo no es explicada por el despliegue floral temporal para los visitantes.

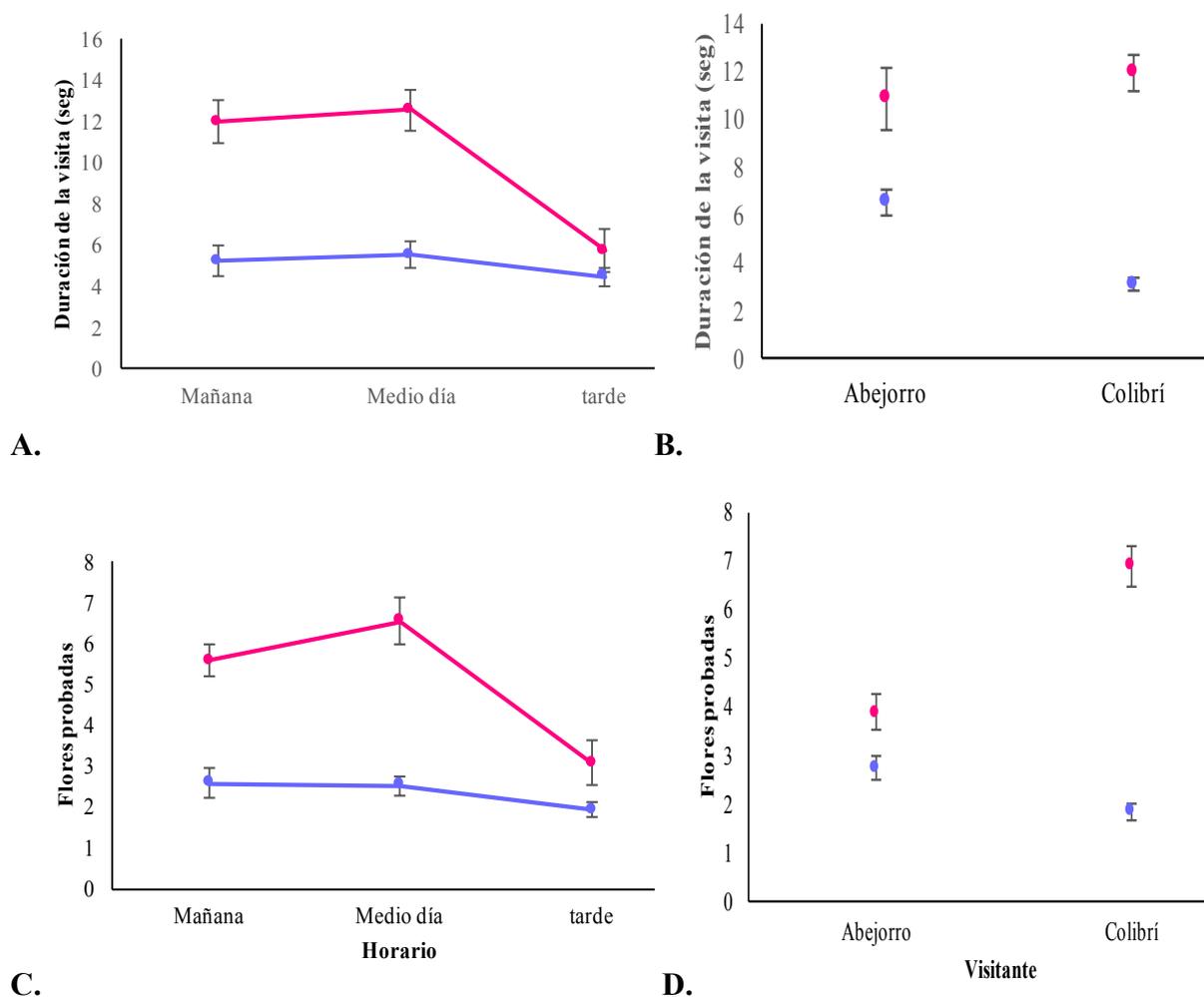


Figura 10. Duración de la visita en segundos al morfo azul y fucsia de *P. gentianoides*. A. en tres horarios del día, y B. por grupo visitante; y promedio de flores visitadas C. en tres horarios del día, y D. por grupo visitante.

Asimismo, el promedio de flores visitadas también fue elevado durante esos meses, variando significativamente en el periodo evaluado ($X^2=47.000$; $gl=3$; $p=3.476e-10$), pero no hubo diferencias significativas en la intensidad de forrajeo mensual en interacción con el morfo ($X^2=3.735$; $gl=3$; $p=0.2916$).

Finalmente, la probabilidad de visita evaluada en cada morfo, indicó que es más probable que el morfo fucsia sea visitado inicialmente por abejorros que por colibríes (*Mantel-Cox*, x^2 : 4.359; $gl:1$; $p=0.0386$), mientras que para el morfo azul, no se encontraron diferencias significativas entre grupos de visitantes (*Mantel-Cox*, x^2 : 0,114; $gl:1$; $p=0.7351$, Fig.11)

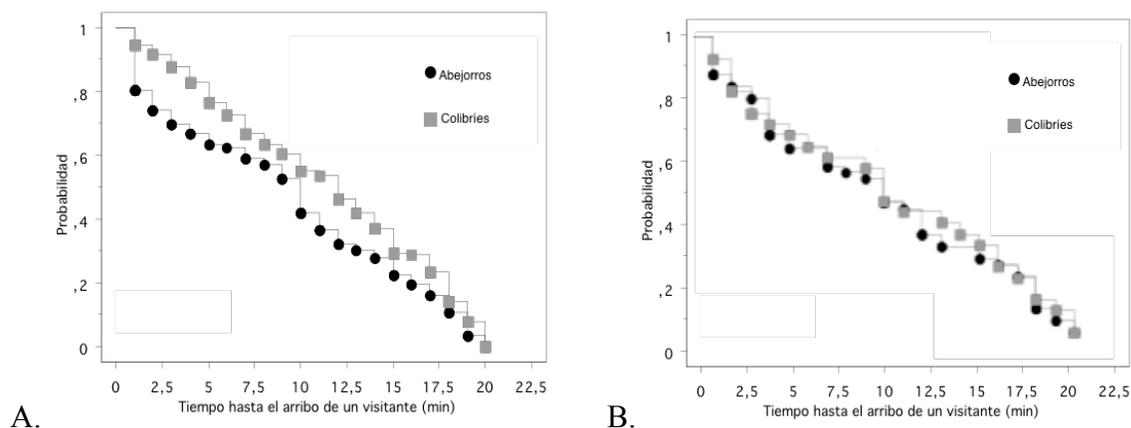


Figura 11. Comparación de la probabilidad de que un morfo sea visitado por abejorros y colibríes durante periodos de observación de 20 minutos A. Morfo fucsia, B. Morfo azul.

7.5 Interacción entre morfos de plantas y especies visitantes

De acuerdo a las frecuencias registradas por el ensamble de especies visitantes, la especie más común fue el abejorro *B. ephippiatus*, tanto para el morfo fucsia (16.9%) como para el morfo azul (8.8%), seguido de los colibríes *S. platycercus* (16.1%) en el morfo fucsia, y *C. thalassinus* (7.7%) en el morfo azul ($X^2=14.051$, $gl=7$ $p=0.05028$, Fig.12). Ambas especies de colibríes manifestaron conductas territoriales en los parches en floración.

El análisis de forrajeo indicó una interacción estadísticamente significativa entre la especie y el morfo, como un determinante de la duración de la visita y del número de flores visitadas

(tiempo: $X^2=49.429$, $gl=5$ $p=1.813e-8$, flores: $X^2=39.537$, $gl=5$ $p= 1.851e-07$). Esto evidencia un patrón de forrajeo diferencial entre las especies de colibríes más frecuentes: *S. platycercus* y *C. thalassinus*, que presentaron tendencia a forrajear con mayor intensidad en el morfo fucsia que en el morfo azul (anexos).

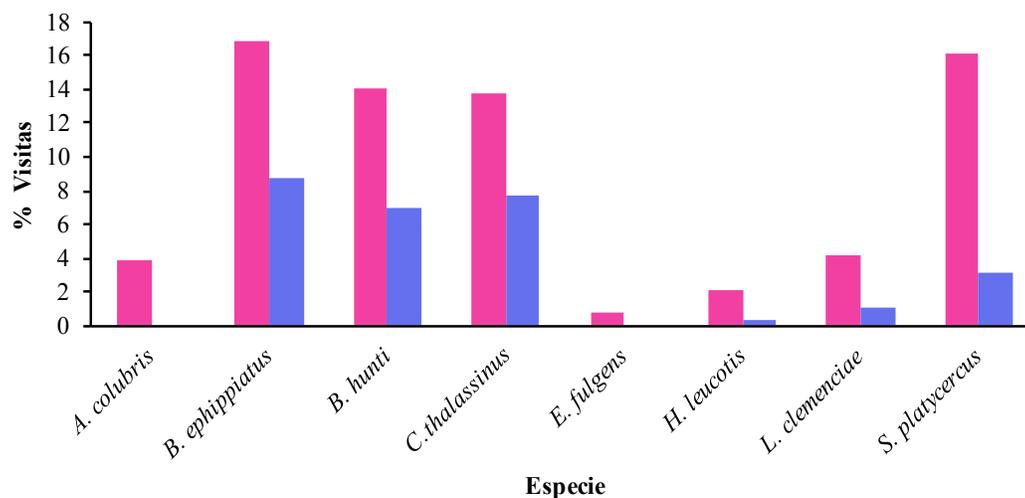


Figura 12. Porcentaje de visita al morfo azul y fucsia de *P. gentianoides*, por parte de las especies que conformaron el ensamble de visitantes correspondiente.

7.6 Forrajeo en función del color

El análisis de regresión para grupo de visitante en función de la variación en reflectancia de cada uno de los cromas evaluados del color floral, indicó que en los abejorros no existe una asociación en frecuencia de visita, duración de la visita y número de flores forrajeadas con la reflectancia emitida en ambos morfos (Tabla 3). Esto sugiere que el color en este caso, podría considerarse una señal irrelevante para su intensidad de forrajeo.

En contraste, el forrajeo de los colibríes si parece estar determinado por la reflectancia de las flores, aunque solo en el morfo fucsia, donde presentó variación significativa en la duración de la visita y el número de flores forrajeadas con relación al croma UV (duración: *Coef. Corr*=-1.0965±0.34, $r^2 = 0.0753$, $p=0.002$; flores forrajeadas: *Coef. Corr*=-0.5549±0.203, $r^2 = 0.05742$, $p=0.0073$) y marginalmente no significativo en la duración de las visitas en relación al croma verde (*Coef. Corr*=-0.3601±0.18, $r^2 = 0.030$, $p=0.05171$).

Tabla 3. Resultados de análisis de regresión realizado entre las variables de forrajeo: duración de visita (DV), flores visitadas (FV) y frecuencia de visitas(F) con la reflectancia floral del morfo fucsia y azul

<i>Morfo</i>	<i>Grupo visitante</i>	<i>Variable de forrajeo</i>	r^2	<i>r ajustada</i>	<i>f</i>	<i>p</i>
Azul	Abejorros	Dv	0.05242	-0.042	0.5532	0.6978
		Fv	0.0373	-0.058	0.3874	0.8163
		F	0.1537	-0.329	0.3177	0.8576
	Colibríes	Dv	0.1913	0.04423	1.301	0.3004
		Fv	0.1353	-0.02191	0.8607	0.5028
		F	0.2793	-0.4414	0.3875	0.8096
Fucsia	Abejorros	Dv	0.03166	-0.01501	0.6784	0.6088
		Fv	0.05163	0.005921	1.13	0.3483
		F	0.4595	0.2192	1.913	0.1925
	Colibríes	Dv	0.1079	0.0779	3.598	0.008324*
		Fv	0.09829	0.06798	3.243	0.01453*
		F	0.4375	0.1562	1.556	0.2753

7.7 Caracterización de los frutos

El *seed fruit*, fue diferencial entre los morfos ($X^2=38.878$; $gl=1$; $p=4.51e-10$), con una producción de frutos mayor en el morfo fucsia (20.12±1.21) que en el morfo azul (14.35±0.89). Sin embargo, cuando se evaluó la proporción de frutos depredados en cada morfo, no se encontraron diferencias significativas, de manera que en ambos morfos es igual de probable que los frutos sean consumidos por algunos animales, específicamente larvas de

insectos, como se evidenció en campo ($X^2=0.5827$; $gl=1$; $p=0.4453$).

El *seed set* varió significativamente entre morfos ($X^2=738.69$; $gl=1$; $p < 2.2e-16$), con una tendencia a reflejar valores inversos a lo registrado en el número de óvulos. Sin embargo, los datos indican que no hay correlación entre dichas variables (fucsia: *Coef. Corr*=-0.054, $p=0.7341$, azul: *Coef. Corr*=-0.031, $p=0.8445$). Igualmente, el tamaño de los frutos fue significativamente diferencial entre morfos, a excepción de la longitud ($F_{1,72}=0.8158$, $p=0.3694$), encontrando que el morfo fucsia produce frutos más anchos y más pesados que los frutos del morfo azul (*ancho*: $F_{1,72}=24.887$, $p=4.07e-50$ *peso*: $F_{1,72}=74.148$, $p=1.109e-12$), además de presentar mayor cantidad de semillas (Fig.13).

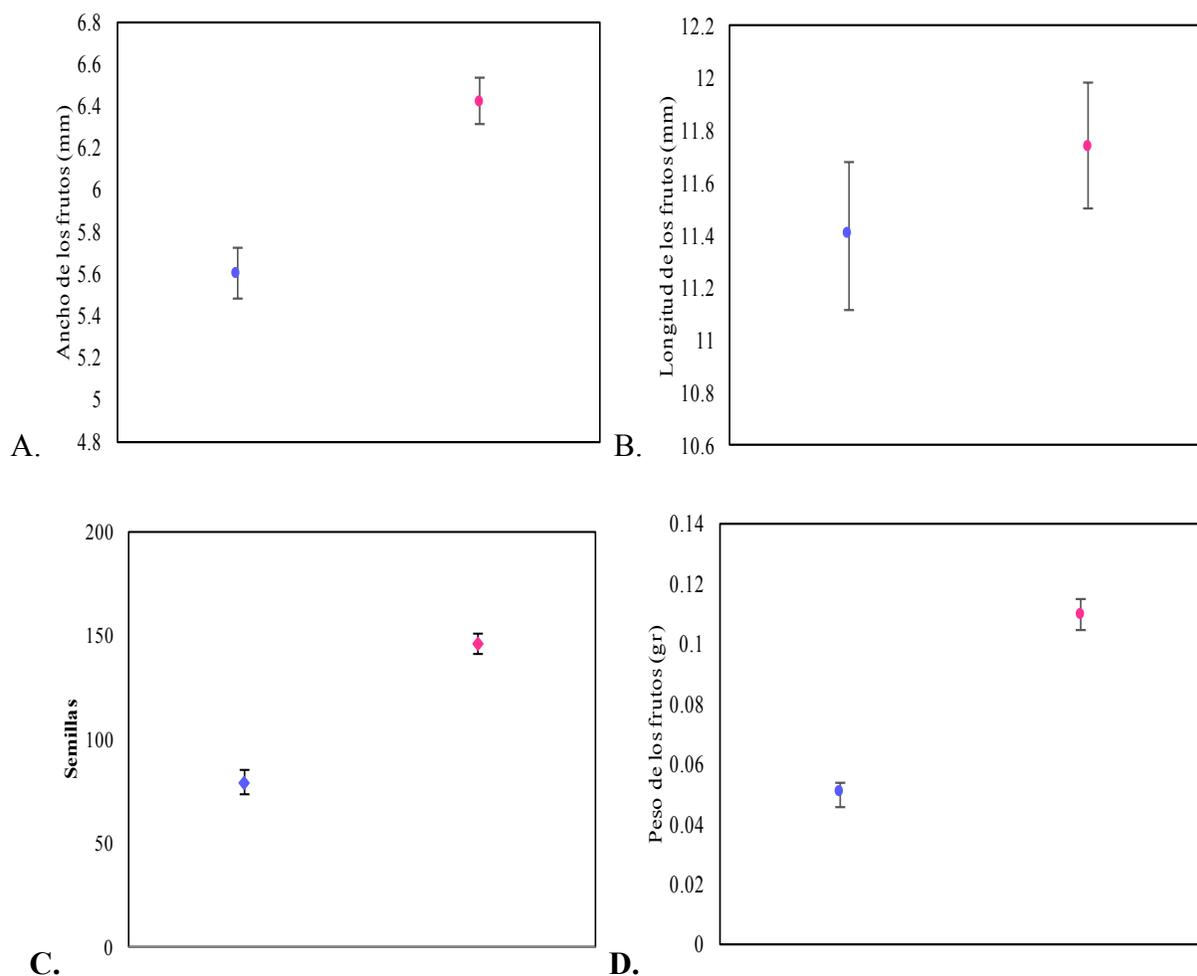


Figura 13. Comparación de promedios asociados a caracteres de los frutos de cada morfo A. Ancho de los frutos, B. Longitud de los frutos, C. Número de semillas por fruto y D. Peso de los frutos.

7.8 Eficiencia del polinizador

La producción de frutos fue significativamente diferente entre el tipo de polinizador ($X^2=5.2969$; $gl=1$; $p=0.02136$), sin embargo dicha respuesta de efectividad del polinizador no estuvo afectada por el morfo ($X^2=0.4573$; $gl=1$; $p=0.49890$, Fig.14). De esta manera, se obtuvo un mayor número de frutos producidos cuando las flores fueron polinizadas por colibrí (*Selasphorus platycercus*, 75.8%), con respecto a cuando fueron polinizadas por abejorro (*Bombus ephippiatus* 58.1%).

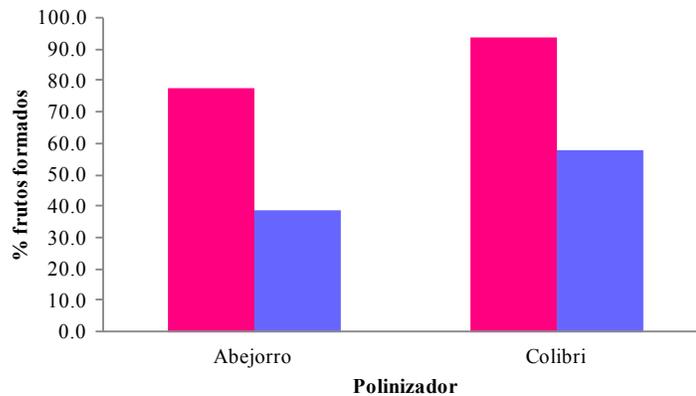


Figura 14. Porcentaje de frutos formados por colibrí y abejorro en cada morfo.

No obstante, hubo diferencias estadísticas en el tamaño de los frutos producidos en cada caso, que fueron afectadas por el morfo (ancho: $F_{1,79}=9.0406$, $p=0.00354$; largo: $F_{1,79}=19.5368$, $p=0.00003$; peso: $F_{1,79}=30.597$, $p=3.98e-6$), además del número de semillas producido en cada fruto, que fue diferente cuando un abejorro (azul: 141.5 ± 9.08 fucsia: 130.1 ± 6.03) o un colibrí (azul: 123.7 ± 4.65 fucsia: 165.5 ± 4.96) fue el polinizador ($X^2=84.294$; $gl=1$; $p < 2.2e-16$ Fig.15).

7.9 Aislamiento reproductivo

El análisis de los tamaños de las corolas y de las estructuras reproductivas de los morfos respecto a lo que se considera su sistema parental o especies (*P. gentianoides* y *P. roseus*) con las que se solapa su distribución en el área de estudio mostró resultados interesantes. Las

cuatro poblaciones se diferencian significativamente en morfometría floral (longitud: $F_{3,574}=820.28$, $p<2.2e-16$, ancho: $F_{3,574}=124.96$, $p<2.2e-16$, estambres: $F_{3,574}=787.62$, $p<2.2e-16$, pistilo: $F_{3,574}=156.79$, $p<2.2e-16$). La prueba Tukey post hoc mostró que las flores de los morfos son más largas y más anchas que las flores de las especies evaluadas ($p<0.0001$), sin descartar que hay una tendencia en longitud de la corola a ser más parecida a *P. roseus* y en apertura de la corola a ser más parecida a *P. gentianoides* ($p<0.0001$). Por el contrario, el pistilo y los estambres en los morfos, presentan tamaños intermedios respecto a ambas especies (anexos).

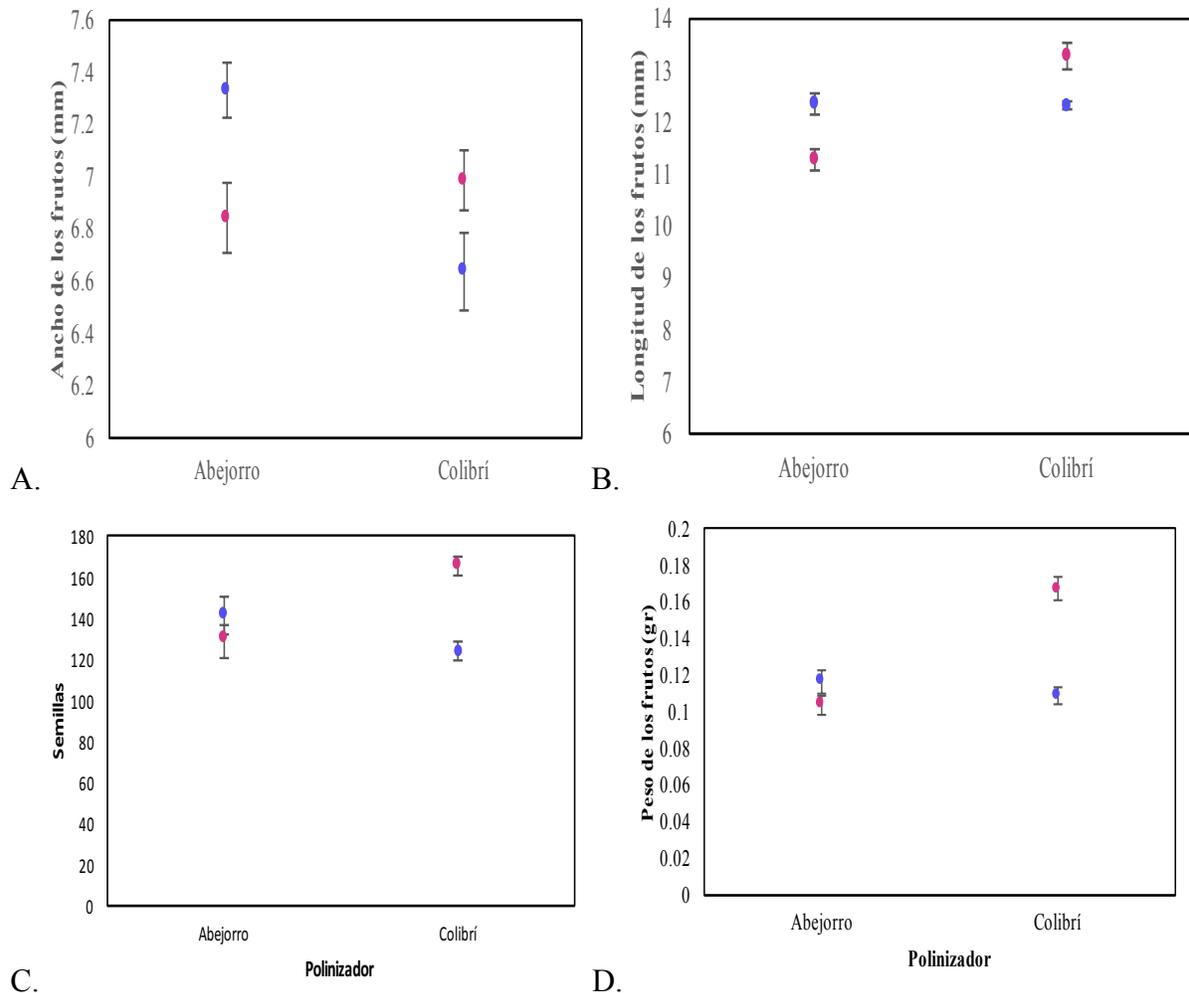


Figura 15. Comparación de promedios asociados a caracteres de los frutos de cada morfo bajo polinizaciones dirigidas con abejorros y colibríes A. Ancho de los frutos, B. Longitud de los frutos, C. Número de semillas por fruto y D. Peso de los frutos.

Igualmente, las características del néctar al ser comparadas en todo el sistema manifestaron diferencias significativas (concentración: $F_{3,488}=33.12$ $p<2.2e-16$, volumen: $F_{3,488}=100.43$, $p<2.2e-16$). Sin embargo, se encontró con la prueba Tukey post hoc, un solapamiento en la concentración de azúcares del morfo fucsia con *P. roseus* ($p=0.22$) pero difiriendo significativamente de los registros elevados de *P. gentianoides* ($p<0.0001$). Por otro lado, aunque el volumen de néctar contrastó entre las cuatro poblaciones ($p<0.0001$), fue posible observar que los morfos presentaron valores que potencialmente estarían más asociados a la producción de *P. gentianoides* (anexos).

En relación a los tratamientos de compatibilidad genética en campo en la mayoría de los casos hubo formación de frutos, donde la probabilidad de formar fruto no fue independiente del tratamiento de polinización ($\chi^2=177.77$; $gl=11$; $p<2.2e-16$), obteniendo el mayor porcentaje de frutos formados entre cruces conespecíficos. Sin embargo, la respuesta a los cruces heteroespecíficos: *P. roseus* con *P. gentianoides*, y *P. roseus* con los morfos, indica cierto grado de compatibilidad entre las especies, aunque con baja producción de frutos (*P. roseus* x *fucsia*: 3-10%, *P. roseus* x *P. gentianoides*: 7-10%, Fig.16). Estos resultados sugieren que potencialmente no están actuando las barreras precigóticas atribuidas a mecanismos de germinación de los granos de polen y posterior fecundación.

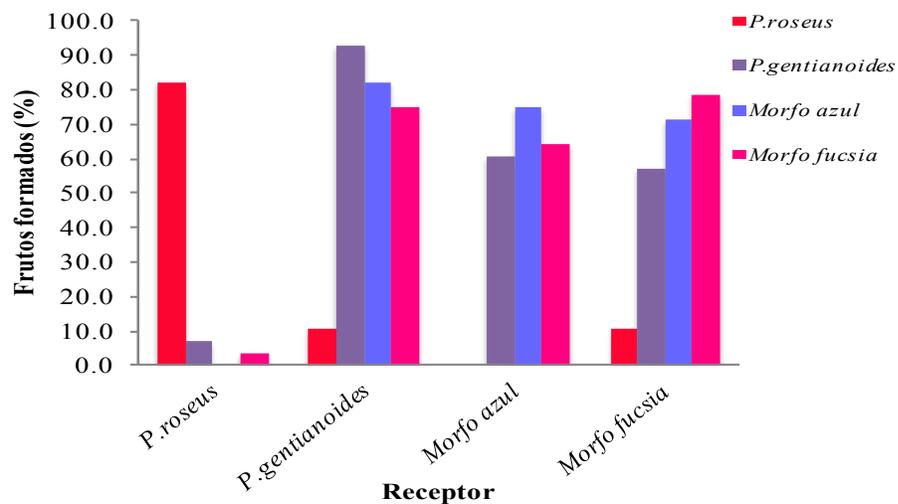


Figura 16. Porcentaje de frutos formados en los tratamientos de polinización entre morfos y sistema parental.

De los frutos generados en estos tratamientos, el número de semillas varió significativamente ($X^2=799.32$; $gl=9$; $p<2.2e-16$), esto atribuido a los cruces realizados entre *P. gentianoides* y el morfo azul, que presentaron una cantidad de semillas diferencial cuando se cambió el rol de donante o receptor entre estas 2 poblaciones ($p=0.0456$). Asimismo, *P. roseus* tanto con el morfo fucsia como con *P. gentianoides*, donde se encontró una baja producción de semillas en relación a el resto de tratamientos ($p<0.0001$). Asimismo, el tamaño y el peso de los frutos presentó diferencias que fueron estadísticamente significativas entre los cruces donde *P. roseus* actuó como receptor y el resto de tratamientos (longitud: $F_{9,114}=44.73$ $p<2.2e-16$, ancho: $F_{9,114}=10.249$ $p=1.871e-11$, peso: $F_{9,114}=13.484$ $p=1.627e-14$, anexos).

La estimación de aislamiento reproductivo, indica que hubo compatibilidad en los cruces heteroespecíficos tanto para el morfo fucsia ($RI_{AA}= 0.04$) como para el morfo azul ($RI_{AA}= 0.08$). Además, cuando se consideraron los visitantes florales como un factor que podría afectar la co-ocurrencia de aislamiento ecológico, el valor obtenido, mostró en contraste, que este sería importante para la heteroespecificidad encontrada entre los morfos ($RI_{AC}= 0.25$). Esto es acorde con los valores de fuerza acumulada absoluta y relativa que indican una débil contribución a que estas poblaciones se mantengan aisladas (Tabla.4).

Tabla 4. Contribución de barreras pre-cigóticas (1) y pos-cigóticas (2), para el aislamiento reproductivo (RI), entre: morfo azul y morfo fucsia (A), morfo azul y *P. roseus* (B), morfo azul y *P. gentianoides* (C), morfo fucsia y *P. roseus* (D), morfo fucsia y *P. gentianoides* (E), *P. gentianoides* y *P. roseus* (F); donde el componente de aislamiento varía de cero (no hay barrera) a uno (completo aislamiento).

Barrera de aislamiento	Valores crudos	Valor RI. (Sobel & Chen 2014)	Fuerza acumulativa absoluta	Fuerza acumulativa relativa	RI total
(A) 1. Visitantes florales					
compartidos	0.75	0.25	0.25	0.696	
No compartidos	0.25				
2. Formación de frutos					0.3589
Morfo azul					
H	0.46	0.08	0.073	0.204	
C	0.54				

Morfo fucsia					
H	0.48	0.04	0.035	0.098	
C	0.52				
(B) 1. Visitantes florales					
compartidos	0.4	0.6	0.6	0.6	
No compartidos	0.6				
2. Formación de frutos					
Morfo azul					
H	0	1	0.4	0.4	1
C	1				
P. roseus					
H	0	1	0	0	
C	1				
(C) 1. Visitantes florales					
compartidos	0.44	0.6	0.6	0.865	
No compartidos	0.56				
2. Formación de frutos					
Morfo azul					
H	0.45	0.1	0.06	0.087	0.6929
C	0.55				
P. gentianoides					
H	0.47	0.06	0.032	0.047	
C	0.53				
(D) 1. Visitantes florales					
compartidos	0.6	0.4	0.4	0.402	
No compartidos	0.4				
2. Formación de frutos					
Morfo fucsia					
H	0.12	0.76	0.489	0.492	0.9951
C	0.88				
P. roseus					
H	0.04	0.92	0.105	0.106	
C	0.96				
(E) 1. Visitantes florales					
compartidos	0.5	0.5	0.5	0.81	
No compartidos	0.5				
2. Formación de frutos					
Morfo fucsia					
H	0.42	0.16	0.111	0.18	0.6168
C	0.58				
P. gentianoides					
H	0.54	0.009	0.005	0.009	

C	0.55				
(F) 1. Visitantes florales					
compartidos	0.3	0.7	0.7	0.702	
No compartidos	0.7				
2. Formación de frutos					
<i>P. roseus</i>					0.9966
H	0.08	0.84	0.269	0.27	
C	0.92				
<i>P. gentianoides</i>					
H	0.1	0.8	0.026	0.026	
C	0.9				

Adicionalmente, dicha estimación de aislamiento reproductivo respecto a las fuentes parentales, fue diferencial. En el caso de *P. roseus*, se evidencia un aislamiento muy elevado con las poblaciones de morfos (fucsia: $RI_{AA}=0.92$, azul: $RI_{AA}=1$), mientras que en *P. gentianoides* fue más probable encontrar cruces heteroespecíficos (fucsia: $RI_{AA}=0.009$, azul: $RI_{AA}=0.06$). En este sentido es posible que el factor de aislamiento ecológico evaluado (visitantes), sea la barrera que actué con mayor fuerza para el aislamiento entre *P. roseus* y los morfos, especialmente el morfo azul ($RI_{AC}=0.6$). Por ello, acorde con el aislamiento encontrado en *P. roseus* ($RI_{AA}=0.84$) y *P. gentianoides* ($RI_{AA}=0.8$), los visitantes son potencialmente importantes para el aislamiento entre estas dos especies ($RI_{AC}=0.7$).

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio muestran una variación en rasgos florales de *P. gentianoides* potencialmente asociados al comportamiento del polinizador, donde gran parte de esta variación favorece la polinización por colibríes. Al igual que en otros sistemas es muy probable que la variación fenotípica evidenciada, sea una manifestación de zona híbrida, formada a partir del flujo de polen interespecífico de especies relacionadas, que ocurren en diferentes altitudes sobre distancias relativamente cortas (Campbell et al 1997).

En las plantas objeto de estudio, fue evidente un patrón de floración unimodal, que se solapa

entre las poblaciones de morfos, estando sujeto a los picos de floración ya reportados para *P. gentianoides*, entre los meses de julio y septiembre (Salas- Arcos et al. 2017). Sin embargo, fue notable que los morfos difieran no solo en tamaño de sus flores y estructuras reproductivas, sino también en la recompensa que ofrecen. Bajo este escenario, podría considerarse la diferencia en atributos morfológicos como un mecanismo para reducir la competencia por polinizadores, como se ha sugerido para especies simpátricas con patrones de floración que se traslapan (Stiles 1975). Por ello, nuestros datos sugieren que el patrón fenológico evidenciado puede sustentarse a partir de la hipótesis planteada por Ratcke & Lacey (1985), donde las especies que coexisten se benefician al incrementar la oferta de recursos y la atracción visual para los visitantes, lo que puede resultar en un aumento de la tasa de visitas por parte de los polinizadores.

Al igual que lo reportado previamente para *P. gentianoides* (Salas-Arcos et al. 2017), ambos morfos presentaron una longevidad floral que va de 6 a 14 días, con una disposición de estructuras reproductivas asociadas a un mecanismo de dicogamia, de tipo protándrico, con la fase masculina más prolongada, que la posterior fase femenina. Este sistema reproductivo, reduce la autopolinización, al contar con una separación temporal de dichas funciones sexuales (Darwin 1862); en lo que se consideraría un mayor éxito reproductivo masculino, influenciado por la duración de las fases, cuya causa potencial puede ser la lenta remoción de polen por los visitantes (Weiss 1996).

De acuerdo al número de óvulos por ovario, producidos en los morfos, la cantidad registrada es semejante a lo reportado en *P. gentianoides* (morfo azul: 241 ± 4.1 , morfo fucsia: 208 ± 5.7 , *P. gentianoides*: 218.02 ± 4.42 , Salas-Arcos et al. 2017). Sin embargo, la diferencia de este conjunto de óvulos respecto al *seed set* por morfo, podría referirse a una limitación en polen, especialmente en el morfo azul (80-150); siendo posible que más de la mitad de los óvulos no sean fertilizados debido a un polinizador poco eficiente (Barrett, 2014). Esto sugiere que parte del éxito de los morfos, deba involucrar una polinización intensa que se ajuste a un determinado patrón de presentación del polen (Thomson et al. 2000; Ornelas & Lara, 2009)

Los morfos florales estudiados presentaron caracteres morfológicos asociados a *P.*

gentianoides y a *P. roseus*. Este patrón es contrario a lo reportado en zonas de hibridación dentro del género, donde los híbridos se asemejan más a una de las especies parentales (Kimball 2008). De manera que este resultado sugiere un proceso morfológico clinal (Slatkin 1973), donde las condiciones ambientales tienden a favorecer la combinación de caracteres manifestada en los morfos. No obstante, en función de la distancia de flujo génico y la fuerza de selección propuestas por Barton & Gale (1993), podría sugerirse que los rasgos florales intermedios de los potenciales híbridos que crecen simpátricamente con *P. gentianoides*, están dados por presiones de selección que se comparten con la zona de distribución de *P. roseus*.

También fue evidente que tanto el volumen como la concentración de néctar, fue muy baja para ambos morfos, lo cual podría ser una respuesta fisiológica que potencialmente está influenciada por las condiciones ambientales, particularmente la humedad (Plowright 1987, Leiss et al. 2004). Desafortunadamente, este factor no fue controlado, debido a que las mediciones se realizaron en días diferentes y posiblemente bajo condiciones distintas. Adicionalmente, fue recurrente encontrar flores vacías, como una posible causa de la remoción por los visitantes florales, robadores y/o ladrones de néctar, lo cual es una tendencia muy común en flores expuestas a los visitantes, donde el volumen de néctar es bastante fluctuante (McDade & Weeks 2004).

No obstante, fue notable una variación significativa de la recompensa entre morfos, con una mayor cantidad y concentración en el morfo fucsia (vol: $0.38 \pm 0.02 \mu\text{L}$, con: $1.49 \pm 0.09 \text{mg}$ de azúcar/mL solución); y una tendencia en disponibilidad a lo largo del día, muy similar a lo reportada para *P. gentianoides* (Salas-Arcos et al. 2017): mayor concentración y volumen de néctar en la mañana, en ambos casos. En este sentido, la diferencia en producción de néctar, no solo se atribuye a la actividad de los visitantes, sino también a la respuesta de las plantas frente a dicha remoción, donde los visitantes actúan en función de recompensas disponibles (McDade & Weeks 2004).

Pese a este patrón de producción de néctar, las visitas realizadas especialmente por colibríes fueron más frecuentes cuando el néctar presento su mayor concentración, diferenciándose de

lo encontrado en flores típicas de *P. gentianoides*, donde la mayor cantidad de visitas se registró cuando el néctar fue más diluido (Salas- Arcos et al. 2017). Adicionalmente, aunque el morfo fucsia presentó la mayor concentración de néctar, dichos valores siguen siendo bajos en relación a otras especies de *Penstemon* polinizadas por colibríes (Roberts 1995, Lange et al. 2000, Wilson et al. 2004, Lara & Ornelas 2008); y en el mismo sentido, el morfo azul contrasta con los reportes para especies de *Penstemon* polinizadas por abejas y abejorros (Freeman & Worthington 1985; Kimball 2008; Kimball & Campbell 2009) donde el néctar es muy concentrado.

Por otro lado, el ensamble de visitantes florales contiene pocas especies, similar a previos estudios que analizan zonas de hibridación (Campbell et al 2002, Schemske & Bradshaw 1999, Chari & Wilson 2001, Ramsey et al 2003). En nuestro estudio, los morfos se asocian a un bosque de alta montaña, y se conoce que en zonas muy elevadas, es característico la ausencia de polinizadores a causa de las condiciones ambientales extremas a las que están expuestos, lo que consecuentemente promueve una baja actividad en ellos y a su vez representa una limitante en el éxito reproductivo de las plantas que polinizan (Totland & Sottocornola 2001, Fabbro & korner 2004).

Investigaciones que abordan recursos florales y colibríes, en amplios rangos altitudinales, reportan un patrón de segregación, donde su efectividad como polinizadores se asocia a tierras bajas, debido a que las tasas de visitas son inversamente proporcionales a la altitud (Campbell et al. 1997, Scott 2002, Kay & Schemske 2003). Sin embargo, en nuestro estudio, como en otras zonas híbridadas, se propone a los colibríes como importantes polinizadores de elevaciones intermedias y superiores (Fulton & Hodges 1999, Schemske & Bradshaw 1999), al representar el 75% del ensamble.

La dominancia como polinizadores de los colibríes frente a los abejorros encontrada en nuestro estudio, puede presentarse por adaptaciones fisiológicas frente al consumo de néctar que pueden tener efecto en su distribución, y a ventajas termorregulatorias y morfológicas que facilitan su vuelo y forrajeo en elevados pisos altitudinales (Altshuler et al. 2004). Adicionalmente, en la comunidad de colibríes registrada, tanto especies residentes y

migratorias manifestaron conductas territoriales, de tal manera que dicha habilidad competitiva, también podría estar influenciando el papel dominante de este grupo dentro del ensamble de polinizadores en todo el sistema evaluado. Lo contrario podría estar ocurriendo con los abejorros, quienes generalmente experimentan cambios poblacionales muy marcados como los reportados por Duennes & Vandame (2015), que podrían afectar el sistema de polinización ancestral en el sistema evaluado y promover un sistema derivado con un grupo más funcional como los colibríes (Zung et al. 2015).

En relación al aislamiento promovido por visitantes florales, Kimball (2008), propone que diferencias en la comunidad de dichos visitantes, están asociadas al aislamiento ecológico o etológico, que a su vez potencializan barreras precigóticas para el flujo de genes. Sin embargo, en nuestro estudio los colibríes visitantes registrados para ambos morfos son en su mayoría los mismos que visitan *P. roseus*, y para *P. gentianoides* tanto colibríes como abejorros. De esta manera, hay una elevada posibilidad de que el flujo de genes sea incrementado en este sistema, e incluso tanto las especies como los morfos pueden experimentar una selección similar mediada por el polinizador.

No obstante, cuando los polinizadores visitan con mayor frecuencia una especie y sus híbridos, transfiriendo eficientemente su polen, incrementa el flujo en esa dirección, favoreciendo que los rasgos morfológicos de uno de los parentales se dispersen a través de la zona híbrida (Campbell et al. 1997). Este escenario de flujo de genes asimétrico, es probablemente lo que ha ocurrido con las poblaciones estudiadas, considerando que morfológicamente las flores se parecen más a *P. gentianoides*, creciendo en simpatría, como una estrategia de atracción para abejorros, pero que en cuestión de recompensa y color presenta variaciones para ser polinizadas por colibríes.

La mencionada estrategia, consecuente con la intensidad de forrajeo y efectividad del polinizador, en ambos morfos estuvo asociada a los colibríes, siendo estos quienes estarían contribuyendo en mayor medida al éxito reproductivo de estas plantas; sin descartar el potencial flujo de polen que pudiese ocurrir a partir de estos vectores, entre las poblaciones

evaluadas y *P. roseus*, donde dicho grupo de visitantes son los principales polinizadores (Lara & Ornelas, 2008).

Por el contrario, los abejorros, al mantener una tasa baja de visitas en los morfos, podrían limitar la formación de híbridos, siendo una posible causa de la baja abundancia del morfo azul, que fue poco visitado; e incluso esto respondería a la ausencia de otras formas florales en la zona de distribución de *P. roseus*, ya que en esta especie dichos visitantes pueden actuar como robadores de néctar (Lara & Ornelas, 2008). Sin embargo, no se descarta que los *Bombus* sean efectivos polinizadores, debido a las grandes cantidades de polen detectado en su cuerpo, durante las observaciones en campo y a su efectiva transferencia de polen en algunas de las réplicas de los experimentos realizados, tal y como lo reportan otros autores en *Penstemon* (Tepedino et al. 1999, Castellanos et al. 2003).

Sin embargo, esta conducta de forrajeo, también pudo estar afectada por la capacidad sensorial de los abejorros para detectar las flores, debido a que existe una variación interespecífica e intraespecífica en la estructuración de omatidios (Spaethe & Chittka 2003). Dichas unidades de percepción se asocian al tamaño corporal de los individuos, siendo los abejorros de gran tamaño los más eficientes en la búsqueda de flores, y por tanto los que forrajean más néctar por unidad de tiempo (Spaethe & Weidenmüller 2002). Asimismo, esta asociación, es un determinante de la actividad diaria de forrajeo, donde el pico de actividad registrado en la mañana, pudo estar influenciado por abejorros de tamaños pequeños, que suelen manifestar periodos de forrajeo extensos a mayor intensidad de luz (Spaethe & Chittka 2003)

Por otro lado, la formación de híbridos, suele estar determinada por la frecuencia y efectividad interespecífica dentro de los eventos de forrajeo de los visitantes (Campbell et al. 1991, 2002). De tal manera que en este estudio, podría considerarse a los colibríes con un papel relevante dentro de la polinización de los morfos, y para el entrecruzamiento de *P. roseus* y *P. gentianoides*; como ya había sido sugerido en ambas especies por Lara & Ornelas (2008) y Salas-Arcos et al. (2017) respectivamente. Además, esto permitiría suponer, un aislamiento reproductivo pobre entre los morfos y *P. gentianoides*, basado en la frecuencia de visitas

registradas por colibríes compartidos entre estas plantas.

Por consiguiente la efectividad que han demostrado los colibríes, los posiciona como un grupo funcional dentro del sistema de *Penstemon* que se encuentra en el área del volcán la Malinche, con potenciales consecuencias evolutivas en la polinización de estas plantas. De esta manera, las variaciones en rasgos florales siguen la tendencia por la atracción de una comunidad más amplia de polinizadores, que incluye a los colibríes, y consecuentemente adopta un sistema de polinización mixto en los híbridos, como lo han reportado Lange & Scott (1999) en zonas de hibridación de *Penstemon spectabilis*.

Asimismo, la variación en la reflectancia del color floral, donde los morfos presentaron valores de porcentaje elevado sobre longitudes de onda largas (Segmento Rojo), es acorde a lo encontrado en especies de *Penstemon* que han adquirido a los colibríes como polinizadores, donde los colores predominantes son el rosa o magenta (Wilson et al. 2006). En adición, la estimulación de fotones que están recibiendo los visitantes, permite apoyar la preferencia de los colibríes por flores con las tonalidades mencionadas, ya que es una señal que logra ser diferenciada por ellos y no por abejorros, debido al alcance del sistema visual que poseen (Chittka 1997).

En síntesis, la selección evidenciada por los polinizadores no solo responde a la funcionalidad de la recompensa, como el característico néctar diluido encontrado en los morfos, sino también a la atracción por formas, tamaños y colores de las corolas, que representan señales bien aceptadas dentro de la interacción planta-animal. Por ello, nuestros resultados apoyan la hipótesis de Wolfe et al (2006), que propone a los polinizadores como una de las fuerzas más importantes para la diversificación de *Penstemon*. No obstante, es importante considerar otros interactuantes como herbívoros, robadores de néctar, depredadores y dispersores de semillas que podrían contribuir a dichos rasgos reproductivos en las plantas (Galen 1999).

De acuerdo a los experimentos de polinización manual, los cruces realizados manifestaron una baja cantidad de semillas en relación al *seed set* conocido en *P. gentianoides* bajo polinización

abierta (Salas-Arcos et al. 2017). Este resultado sugiere un mecanismo que contribuye al mantenimiento de los parentales como especies diferentes, donde hay una reducción en semillas de los híbridos que podría llegar a afectar su adecuación (Chari & Wilson 2001, Ramsey et al. 2003, Johansen-Morris & Latta 2006).

De este modo, el aislamiento reproductivo evidenciado entre *P. gentianoides* y *P. roseus* ($RI_{4A}=0.8$), probablemente esté actuando bajo un mecanismo de adaptación a distintos ambientes (Schwarzbach et al. 2001), debido a que es posible que estas especies tengan distintos rasgos fisiológicos, que resulten ser apropiados para los rangos altitudinales en los cuales ocurren. Por ello nuestros datos podrían sugerir que la especialización al hábitat, sea un responsable de mantener las especies como entidades diferentes (Kimball 2008).

9. CONCLUSIONES

Los morfos evaluados representan poblaciones cuyos picos de máxima floración se superponen, pero exhiben diferencias en su densidad poblacional, mecanismos florales de antesis, morfología floral y producción de néctar.

Se evidencia una tendencia de caracteres florales en los morfos hacia sistemas de polinización adoptados en sus aparentes especies parentales, donde la estructura y recompensa floral se asocia en mayor medida a plantas de *Penstemon* con el síndrome de polinización por colibríes, sin dejar de lado a los abejorros, quienes aún actúan como vectores de polen en el sistema evaluado.

Los caracteres florales evaluados, parecen ser una representación de rasgos intermedios, no limitantes, para que tanto abejorros como colibríes puedan acceder al recurso. Sin embargo, considerando el rol del polinizador, se evidencia que los colibríes son el grupo más efectivo dentro de esta interacción mutualista, y quienes probablemente promuevan el mantenimiento de una potencial zona híbrida.

10. PERSPECTIVAS

Los patrones de floración entre especies de *Penstemon* que crecen simpátricamente, deben ser objeto de estudios rigurosos, que abarquen una escala espacial y temporal amplia. El fenómeno evidenciado en el Parque Nacional La Malinche, donde la arquitectura y señal floral cambian respecto a las descripciones típicas, puede estar sucediendo en otras áreas, incluso de distribución de las mismas especies aquí consideradas. Por consiguiente, resulta oportuno tomar datos de la interacción, bajo el mismo tiempo en todo el sistema, donde se incluyan covariables, como condiciones ambientales e interacciones antagónicas, que pueden afectar la respuesta de las plantas en rasgos florales y de fructificación, como el comportamiento de los polinizadores.

En futuras investigaciones de este tipo, se recomienda utilizar filmaciones de visitas, observaciones directas combinadas con análisis palinológico para evidenciar de forma más clara la dinámica de la selección mediada por el polinizador; además de analizar la variación en los rasgos florales, mecanismos de polinización y redes de interacción en un contexto filogenético y geográfico.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aizen, M.A. 2007. Enfoques en el estudio de la reproducción sexual de las plantas en ambientes alterados: limitaciones y perspectivas. *Ecología Austral* 17:7–19.
- Albach, D.C., Meudt H.M. & Oxelman, B. 2005. Piecing together the “new” Plantaginaceae. *American Journal of Botany* 92:297-315.
- Altshuler, D., Dudley, R., McGuire, J., & Wake, D. 2004. Resolution of a Paradox: Hummingbird Flight at High Elevation Does Not Come without a Cost. *Proc Natl Acad Sci USA*, 01:17731-17736.

Armbruster, W.S. & Herzig, A.L. 1984. Partitioning and sharing of pollinators by four sympatric species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Panama. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 71:1–16.

Barrett, S.C.H. 2014. Evolution of mating systems: outcrossing versus selfing. In: *The Princeton Guide to Evolution* (Ed. J. Losos) Princeton University Press, Princeton, New Jersey, pp. 356-362.

Barton, N.H. & Gale, K.S. 1993. Genetic analysis of hybrid zones. In: *Hybrid Zones and the evolutionary process* (ed. Harrison RG) Oxford university press. New York, pp 13-45.

Bradshaw, H.D. & Schemske, D.W. 2003. Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. *Nature* 426:176-178.

Calderón de Rzedowski, G. & Rzedowski, J. 2002. *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2nd edition. Pátzcuaro: Instituto de Ecología, AC, Centro Regional del Bajío y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, pp 692-694.

Campbell, D.R., Waser, N.M. & Meléndez-Ackerman, E.J. 1997. Analyzing pollinator-mediated selection in a plant hybrid zone: hummingbird visitation patterns on three spatial scales. *American Naturalist* 149:295-315.

Campbell, D.R., Waser, N.M. & Pederson, G.T. 2002. Predicting patterns of mating and potential hybridization from pollinator behavior. *American Naturalist* 159:438–50.

Campbell, D.R. & Aldridge, G. 2006. Floral biology of hybrid zones. In: *Ecology and Evolution of Flowers*, ed. L.D Harder, S.C.H Barrett. Oxford: Oxford Univ. Press, pp. 326–45.

Cane, J.H. & Dunne, J.A. 2013. Generalist bees pollinated red flowered *Penstemon eatonii*: Duality in the hummingbird pollination syndrome. Pollinating insect research Unit, Utah State University, 171:365-370.

Castellanos, M.C., Wilson, P. & Thomson, J.D. 2002. Dynamic nectar replenishment in flowers of *Penstemon* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*. 89:111–118.

Castellanos, M.C., Wilson, P. & Thomson, J.D. 2003. Pollen transfer by hummingbirds and bumblebees, and the divergence of pollination modes in *Penstemon*. *Evolution* 57: 2742-2752

Castellanos, M.C., Wilson, P. & Thomson, J.D. 2004. ‘Anti-bee’ and ‘pro-bird’ changes during the evolution of hummingbird pollination in *Penstemon* flowers. *Journal of Evolutionary Biology* .17:876–85.

Chari, J., & Wilson, P. 2001. Factors limiting hybridization between *Penstemon spectabilis* and *P. centranthifolius*. *Can. J. Bot.* 79:1439–1448

Chittka, L., Gumbert, A., Kunze, J. 1997. Foraging dynamics of bumble bees: correlates of movements within and between plant species. *Behavioral Ecology*. 8:239-249.

Chittka, L. & Raine, N.E. 2006. Recognition of flowers by pollinators. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9, 428–435.

Chong, J., Poutaraud, A. & Hugueney, P. 2009. Metabolism and roles of stilbenes in plants. *Plant Science* 177:143-155.

Clements, R., Baskin, J. & Baskin, C. 1999. The Comparative Biology of the Two Closely Related Species *Penstemon tenuiflorus* Pennell and *P. hirsutus* (L.) Willd. (Scrophulariaceae, Section Graciles): 72 II. Reproductive Biology. *Castanea*, Vol. 64, No. 4, pp. 299-309.

CONAGUA 2018. Precipitación (mm) a nivel nacional y por entidad federativa. URL:<http://smn.cna.gob.mx/tools/DATA/Climatolog%C3%ADa/Pron%C3%B3stico%20clim%C3%A1tico/Temperatura%20y%20Lluvia/PREC/2017.pdf>

Cruzan, M.B. & Arnold, M.L. 1994. Assortative Mating and Natural Selection in an Iris Hybrid Zone. *Evolution*. 48:1946-1958.

Darwin, C. R. 1862. On the Various Contrivances by which British and Foreign Orchids are Fertilised by Insects. London: John Murray. URL: <http://darwin-online.org.uk/>

Duennes, M.D. & Vandame, R.V. 2015. *Bombus ephippiatus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T21215149A21215217. URL: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T21215149A21215217>.

Ellstrand, N.C., Whitkus, R. & Rieseberg, L.H. 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA*93: 5090–3.

Fabbro, T. & Körner, C.H. 2004. Altitudinal differences in flower traits and reproductive allocation. *Flora*. 199:70–8.1

Freeman, C.E. & Worthington, R.D. 1985. Some floral nectar-sugar compositions of species from southeastern Arizona and southwestern New Mexico. *Madroño* 32:78-86.

Fulton, M. & Hodges, S.A. 1999. Floral isolation between *Aquilegia formosa* and *Aquilegia pubescens*. *Proc. R. Soc. Lond. B* 266, 2247:2252.

Galen, C. 1999. Why do flowers vary? *Bioscience* 49:631-640.

Hegland, S.T., Nielsen, A., Lazaro, A., Bjercknes, A.L. & Totland, O. 2009. How does climate warming affect plant-pollinator interactions? *Ecology Letters* 12:184–195.

Howe, H.F. & Lynn, L.C. 1988. Ecological relationships of plants and animals. Oxford University Press, New York.

Johansen-Morris, A.D., & Latta, R.G. 2006. Fitness consequences of hybridization between ecotypes of *Avena barbata*: hybrid breakdown, hybrid vigor, and transgressive segregation. *Evolution* 60:1585–1595.

Kay, K.M. & Schemske, D.W. 2003. Pollinator assemblages and visitation rates for 11 species of Neotropical *Costus* (Costaceae). *Biotropica* 35:198–207.

Kameyama, Y., Kasagi, T. & Kudo, G. 2008. A hybrid zone dominated by fertile F1s of two alpine shrub species, *Phyllodoce caerulea* and *Phyllodoce aleutica*, along a snowmelt gradient. *Journal of Evolutionary Biology* 21: 588–597.

Kearns, C.A. & Inouye, D.W. 1993. *Techniques for Pollination Biologists*. University Press of Colorado, Niwot, CO. 583 pp.

Kimball, S. 2008. Links between floral morphology and floral visitors along an elevational gradient in a *Penstemon* hybrid zone. *Oikos* 117:1064–1074.

Kimball, S., Campbell, D. & Lessin, C. 2008. Differential performance of reciprocal hybrids in multiple environments. *Journal of Ecology* 96:1306–1318.

Kimball, S. & Campbell, D. 2009. Physiological differences among two *Penstemon* species and their hybrids in field and common garden environments. *New Phytologist* 181: 478–488.

Koelling, A.C. 1964. Taxonomic studies in *Penstemon deamii* and its allies. Ph.D. dissertation, University of Illinois, Urbana.

Lara, C. 2006. Temporal dynamics of flower use by hummingbirds in a highland temperate forest in Mexico. *Ecoscience* 13:23–29

- Lara, C. & Ornelas, J.F. 2008. Pollination ecology of *Penstemon roseus* (Plantaginaceae), an endemic perennial shifted toward hummingbird specialization? *Plant Systematics and Evolution* 271: 223–237.
- Lange, R.S. & Scott, P.E. 1999. Hummingbird and bee pollination of *Penstemon pseudospectabilis*. *Journal of the Torrey Botanical Society* 126: 99–106.
- Lange, R.S., Scobell, S.A. & Scott, P.E.. 2000. Hummingbird-syndrome traits, breeding system, and pollinator effectiveness in two syntopic *Penstemon* species. *Int. J. Plant Sci.* 161:253–263.
- Leiss, K.A., Vrieling, K. & Klinkhamer, P.G.L. 2004. Heritability of nectar production in *Echium vulgare*. *Heredity* 92:446–451.
- Lynn, S. 2001. Evolution and dynamics of hybridization in *Penstemon* subgenus *Dasanthera* (Scrophulariaceae S.L.) Thesis Degree Doctor of Philosophy. Ohio, United States. The Ohio State University. 114 p.
- McDade, L. & Weeks, J. 2004. Nectar in hummingbird pollinated neotropical plants I: Patterns of production in variability in 12 species. *Biotropica*. 36: 196- 215.
- Marques, I., Rosselló-Graell, A., Draper, D. & Iriondo, J.M. 2007. Pollination patterns limit hybridization between two sympatric species of *Narcissus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* 94:1352–1359.
- Martén-Rodríguez, S., Almarales-Castro, A. & Fenster, C.B. 2009. An evaluation of pollination syndromes in Antillean Gesneriaceae: evidence for bat, hummingbird and generalized flowers. *Journal of Ecology* 97: 348-359.

Mitchell, R.J., Flanagan, R.J., Brown, B.J., Waser, N.M. & Karron, J.D. 2009. New frontiers in competition for pollination. *Annals of Botany* 103:1403-1413.

Ornelas, J. F. & Lara. C. 2009. Nectar replenishment and pollen receipt interact in their effects on seed production of *Penstemon roseus*. *Oecologia* 160:675–685.

Pascarella, J.B. 2007. Mechanisms of prezygotic reproductive isolation between two sympatric species, *Gelsemium rankinii* and *G. sempervirens* (Gelsemiaceae), in the southeastern United States. *Am. J. Bot.* 94:468–476.

Ramsey, J., Bradshaw, H.D. Jr & Schemske, D.W. 2003. Components of reproductive isolation between the monkey flowers *Mimulus lewissii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution* 57:1520–1534.

Rojas, S.N. 2005. Ecología de la comunidad de pinchaflores (Aves: Diglossa y Diglossopsis) en un bosque altoandino: Tesis, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de ciencias, Bogotá.

Roberts, W.M. 1995. Hummingbird licking behavior and the energetics of nectar feeding. *Auk* 112:456-463.

Salas-Arcos, L., Lara, C. & Ornelas, J.F. 2017, Reproductive biology and nectar secretion dynamics of *Penstemon gentianoides* (Plantaginaceae): a perennial herb with a mixed pollination system? *PeerJ* 5:e3636.

Shehata, A. 2006. On the Taxonomy of Plantaginaceae Juss. Sensu Lato: evidence from SEM of the Seed Coat. *Turkish Journal of Botany* 30:71-84.

Schemske, D.W. & Bradshaw, H.D. 1999. Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkey flowers (*Mimulus*). *Proc Natl Acad Sci USA* 96:11910–11915.

- Schemske, D.W. & Bierzychudek, P. 2001. Perspective: evolution of flower color in the desert annual *Linanthus parryae*: Wright revisited. *Evolution* 55:1269–1282.
- Schwarzbach, A.E., Donovan, L.A. & Rieseberg, L.H. 2001. Transgressive character expression in a hybrid sunflower species. *American Journal of Botany* 88:270–277.
- Sobel, J.M. & Chen, G.F. 2014. Unification of methods for estimating the strength of reproductive isolation. *Evolution* 68:1511–1522.
- Spaethe, J. & Weidenmüller, A. 2002. Size variation and foraging rate in bumblebees (*Bombus terrestris*). *Insectes Sociaux* 49:142-146.
- Spaethe, J. & Chittka, L. 2003. Interindividual variation of eye optics and single object resolution in bumblebees. *Journal of Experimental Biology* 206:3447–3453.
- Steffan-Dewenter, I. & Westphal, C. 2008. The interplay of pollinator diversity, pollination services and landscape change. *Journal of Applied Ecology*. 45:737–741.
- Stiles, F.G. 1975. Ecology, flowering phenology, and hummingbird pollination of some costarican *Heliconia* species. *Ecology*. 56:285-301.
- Straw, R.M. 1962. The penstemons of Mexico. II. *Penstemon hartwegii*, *Penstemon gentianoides*, and their allies. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 27:1–36.
- Straw R. M. 1963. Bee-fly pollination of *Penstemon ambiguus*. *Ecology* 44:818-819.
- Tepedino, V.J., Sipes, S.D. & Griswold, T.L. 1999. The reproductive biology and effective pollinators of the endangered beardtongue *Penstemon penlandii* (Scrophulariaceae). *Plant Systematics and Evolution* 219: 39-54
- Thomson, J.D., Wilson, P., Valenzuela, M. & Malxone, M. 2000. Pollen presentation and pollination syndromes, with special reference to *Penstemon*. *Plant Species Biology* 15:11-29.

Totland, Ø. & Sottocornola, M. 2001. Pollen limitation of reproductive success in two sympatric alpine willows (Salicaceae) with contrasting pollination strategies. *American journal of Botany* 88:1011-1015.

Vaknin, Y., Tov, Y.Y. & Eisikowitch, D. 1996. Flowering seasonality and flower characteristics of *Loranthus acaciae* Zucc. (Loranthaceae): implications for advertisement and bird-pollination. *Plant Sexual Reproduction* 9:279– 285.

Villers, V.R., Rojas G.F. & Tenorio, L.P. 2006. Guía botánica del Parque Nacional Malinche, Tlaxcala-Puebla. México. D.R. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. 171.

Waelti, M.O., Muhlemann, J.K., Widmer, A. & Schiestl, F.P. 2008. Floral odour and reproductive isolation in two species of *Silene*. *Journal of Evolutionary Biology* 21:111–121.

Waser, N.M. & Price, M.V. 1981. Pollinator choice and stabilizing selection for flower color in *Delphinium nelsonii*. *Evolution* 35:376-390.

Waser, N.M. 1983. The adaptive nature of floral traits: ideas and evidence. *Pollination Biology* (ed. L.A. Real). Academic Press, New York, pp. 241– 285.

Weiss, M.R. 1996. Pollen-feeding fly alters floral phenotypic gender in *Centropogon solanifolius* (Campanulaceae). *Biotropica* 28:770–773.

Wesselingh, R.A. & Arnold, M.L. 2000 Pollinator behaviour and the evolution of Louisiana iris hybrid zones. *Journal of Evolutionary Biology* 13:171–180.

Wessinger, C.A., Freeman, C.C., Mort, M.E., Rausher, M.D & Hileman, L.C. 2016. Multiplexed shotgun genotyping resolves species relationships within the North American genus *Penstemon*. *American Journal of Botany* 103:912-22.

Widmer, A., Lexer, C. & Cozzolino, S. 2009. Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity* 102:31–38.

Wilson, P. & Valenzuela, M. 2002. Three Naturally Occurring *Penstemon* Hybrids. *Western North American Naturalist* 62:25–31.

Wilson, P., Castellanos, M.C., Hogue, J.A., Thomson, D.J. & Armbruster, W.S. 2004. A multivariate search for pollination syndromes among penstemons. *Oikos* 104:345–361

Wilson, P., Castellanos, M.C., Wolfe, A.D. & Thomson, D.J. 2006. Shifts between bee and bird pollination in penstemons. In: *Plant-pollinator Interactions: from Specialization to Generalization*. ed. M.N Waser, J. Ollerton. Oxford University of Chicago Press, Chicago, pp.47-65.

Wilson, P., Wolfe, A.D., Armbruster, S.W. & Thomson, J. 2007. Constrained lability in floral evolution: counting convergent origins of hummingbird pollination in *Penstemon* and *Keckiella*. *New Phytologist* 176:883–890.

Wolfe, L.M. 1993. Reproductive consequences of a flower color polymorphism in *Hydrophyllum appendiculatum*. *American Midland Naturalist Journal* 129:405–408.

Wolfe, A.D., Xiang, Q.Y. & Kephart, S.R. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter simple sequence repeat markers. *Molecular ecology* 7:1107-1125.

Wolfe, A.D., Randle, C.P., Datwyler, S.L., Morawetz, J.J., Arguedas, N. & Diaz, J. 2006. Phylogeny, taxonomic affinities, and biogeography of *Penstemon* (Plantaginaceae) based on ITS and cpDNA sequence data. *Amer J Bot* 93:1699–1713.

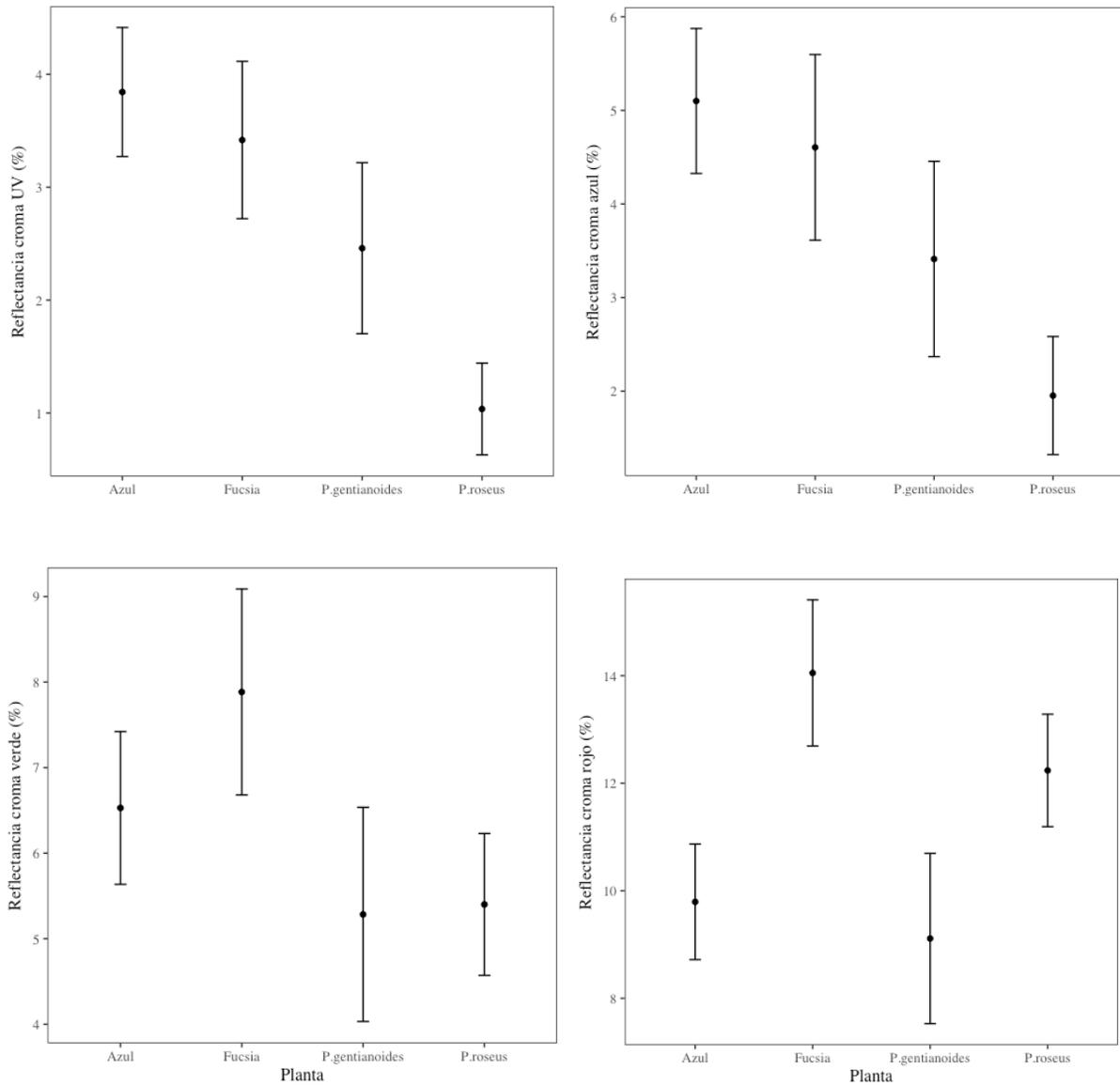
Yang, C.F., Gituru, R.W. & Guo, Y.H. 2007. Reproductive isolation of two sympatric

louseworts, *Pedicularis rhinanthoides* and *Pedicularis longiflora* (Orobanchaceae): how does the same pollinator type avoid interspecific pollen transfer? *Biological Journal of the Linnean Society* 90:37-48.

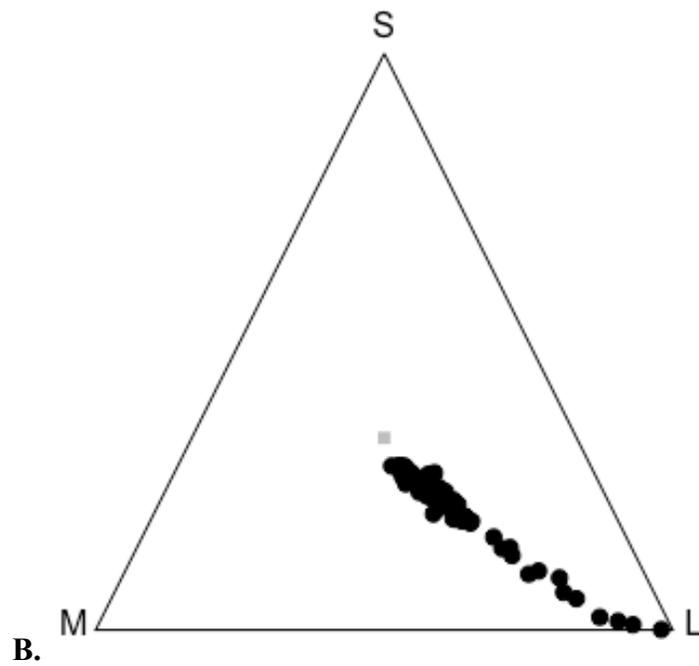
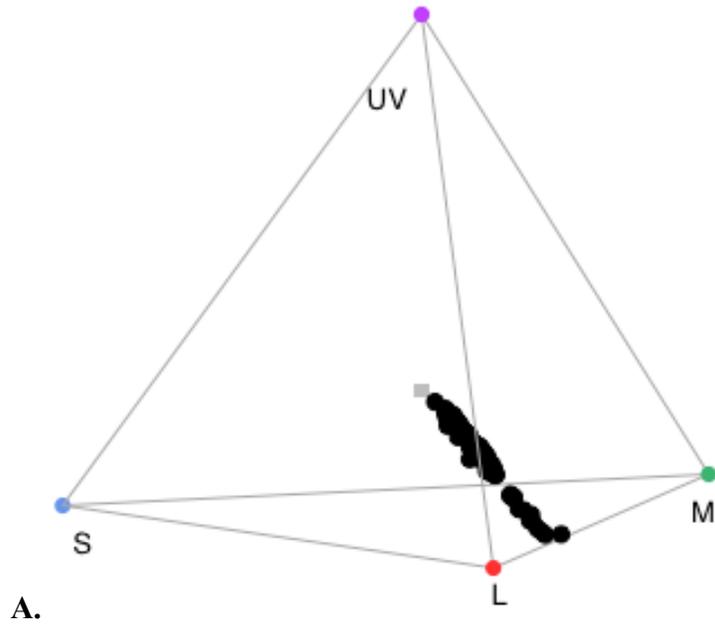
Zung, J.L., Forrest, J.R., Castellanos, M.C. & Thomson, J.D. 2015. Bee-to bird-pollination shifts in *Penstemon*: effects of floral-lip removal and corolla constriction on the preferences of free-foraging bumble bees. *Evolutionary Ecology* 29:341–354.

12. ANEXOS

Anexo 1. Variación en los porcentajes de reflectancia en cada cromina evaluado para las cuatro poblaciones del sistema de estudio (Azul=morfo azul, Fucsia=morfo fucsia, P.gentianoides=*Penstemon gentianoides*, P.roseus=*Penstemon roseus*).



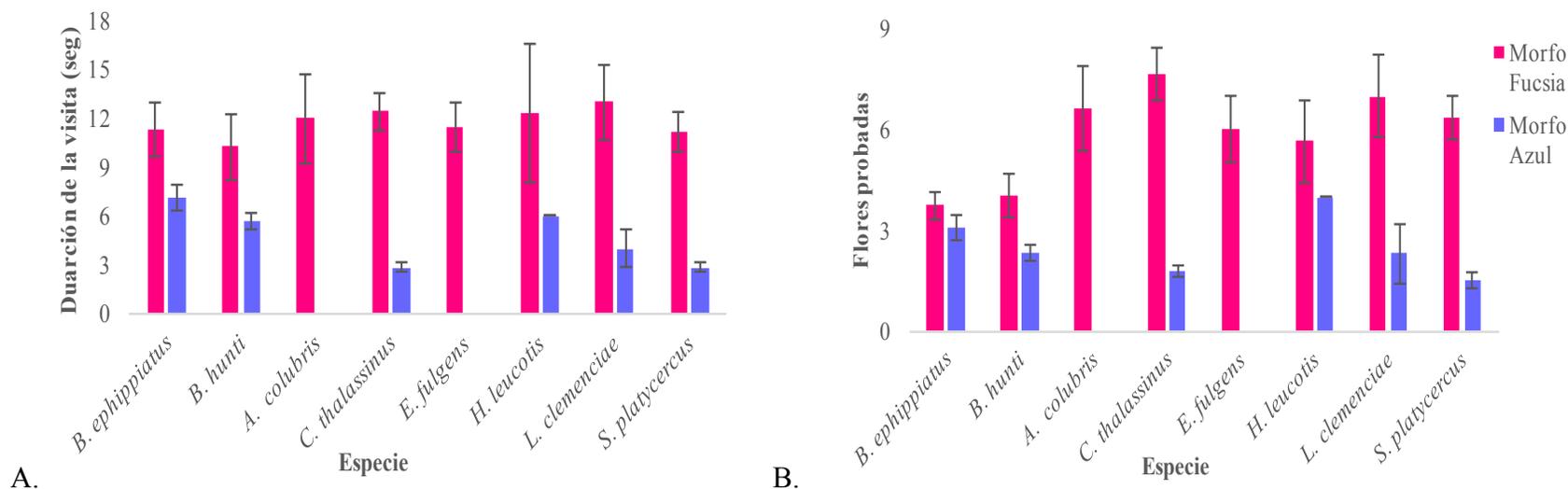
Anexo 2. Representación gráfica de la distribución espacial del color desde la percepción visual de A. los colibríes y de B. los abejorros. Donde los vértices corresponden a longitudes de onda percibidas en cada sistema; UV: ultravioletas , S: cortas, M: medianas, L: largas.



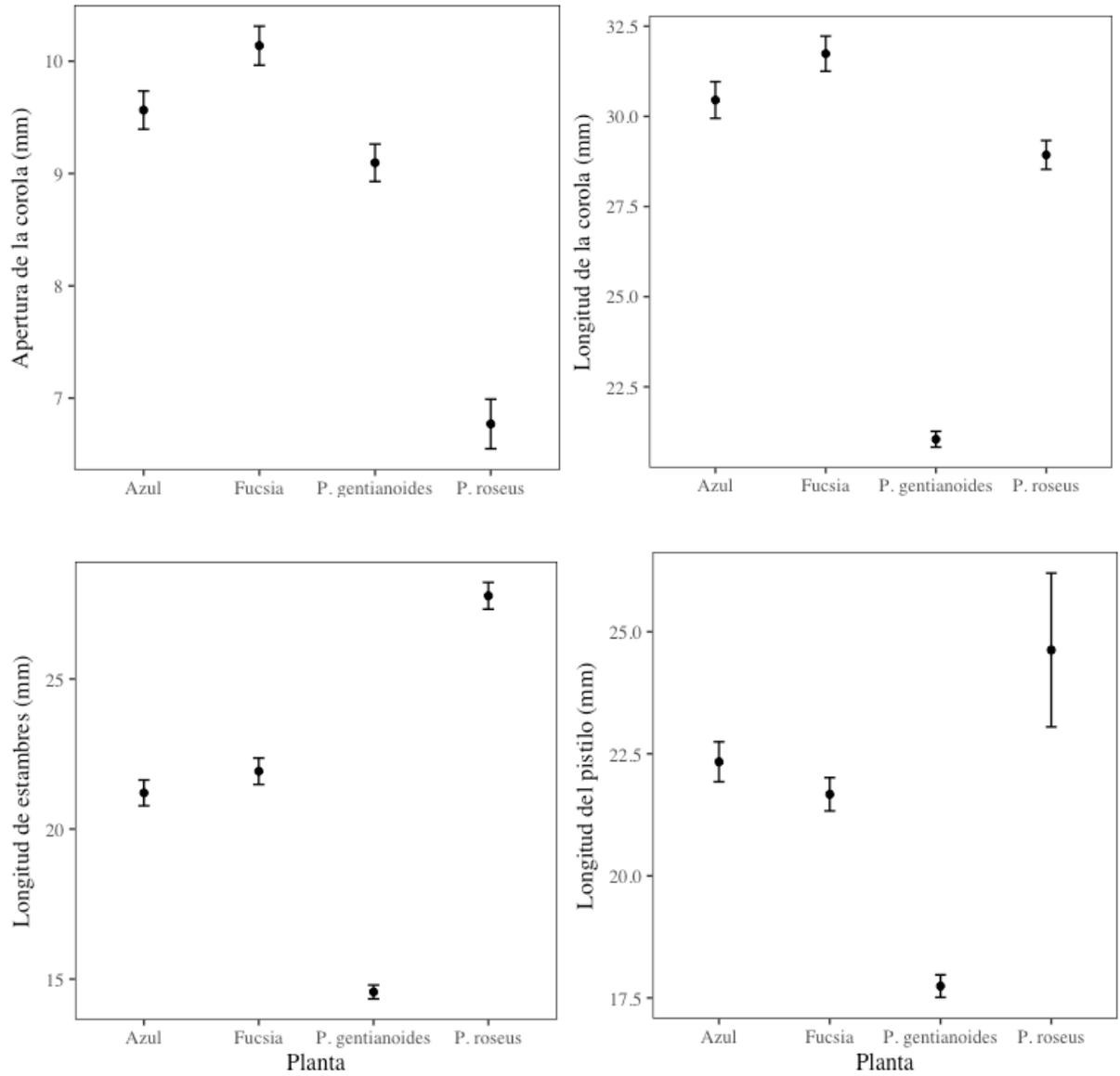
Anexo 3. Variables del néctar evaluadas en los morfos con valores promedio, error estándar y rangos.

<i>Morfo</i>	<i>Mañana</i>		<i>Medio día</i>		<i>Tarde</i>		<i>Acumulado</i>	
	<i>Vol</i>	<i>[]</i>	<i>Vol</i>	<i>[]</i>	<i>Vol</i>	<i>[]</i>	<i>Vol</i>	<i>[]</i>
<i>Fucsia</i>	1,49 ± 0,09	0,38 ± 0,02	0,92 ± 0,08	0,20 ± 0,02	0,79 ± 0,06	0,16 ± 0,01	7,63 ± 0,49	2,80 ± 0,20
<i>n=51</i>	(0,37-3,11)	(0,09-0,82)	(0,28-3,11)	(0,04-0,69)	(0,18-2,17)	(0,03-0,47)	(1,61-18,13)	(0,33-5,97)
<i>Azul</i>	1,19 ± 0,08	0,32 ± 0,02	0,70 ± 0,05	0,14 ± 0,01	0,72 ± 0,06	0,14 ± 0,01	5,98 ± 0,48	2,43 ± 0,22
<i>n=51</i>	(0,28-3,21)	(0,05-0,92)	(0,28-1,79)	(0,04-0,38)	(0,28-2,64)	(0,04-0,54)	(1,13-17,56)	(0,49-7,54)

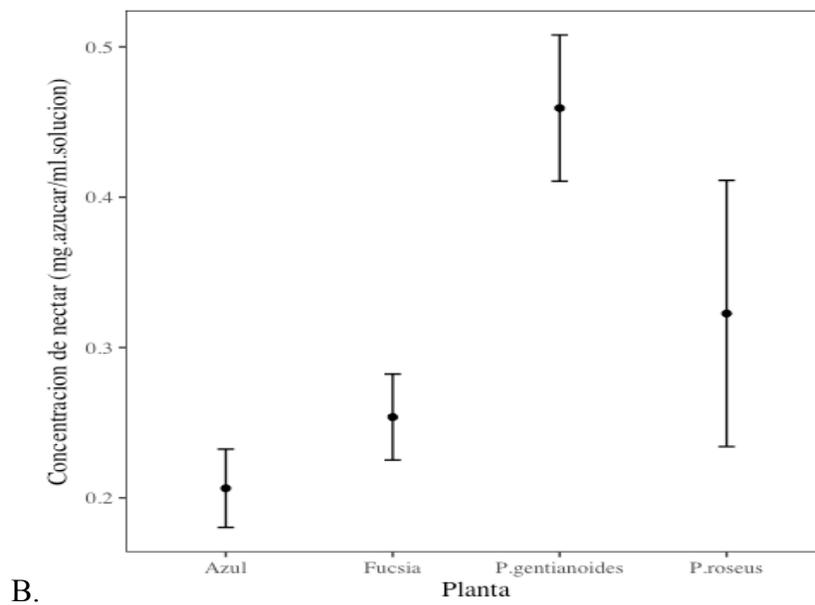
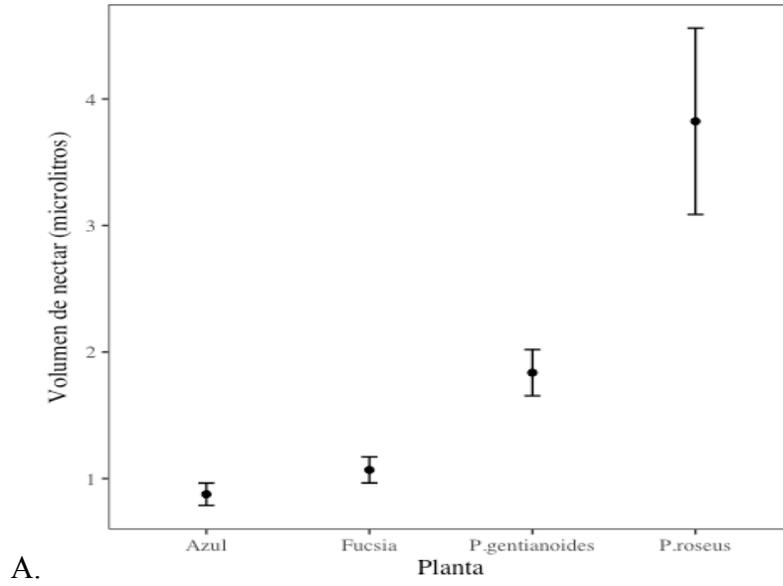
Anexo 4. Variación de forrajeo en función de A. promedio de flores visitadas y B. duración de visita por cada especie registrada.



Anexo 5. Variación en morfometría floral para las cuatro poblaciones del sistema de estudio (Azul=morfo azul, Fucsia=morfo fucsia, P.gentianoides=*Penstemon gentianoides*, P.roseus=*Penstemon roseus*)



Anexo 6. Variación en las características del néctar floral para las cuatro poblaciones del sistema de estudio. A. volumen B. concentración de néctar (Azul=morfo azul, Fucsia=morfo fucsia, P.gentianoides=*Penstemon gentianoides*, P.roseus=*Penstemon roseus*).



Anexo 7. Número de frutos producidos en los tratamientos de polinización del sistema *P.roseus*, *P. gentianoides* y morfos objeto de estudio, con sus respectivas medidas y número de semillas. Se indican valores promedio y error estándar, D=donante y R=receptor

Tratamiento	n	frutos producidos (%)	medidas de los frutos			Promedio de semillas /fruto
			Longitud (mm)	Ancho (mm)	peso (gr)	
Morfo azul (D) x Morfo fucsia (R)	28	20 (71.42)	12.38 ± 0.13	7.55 ± 0.11	0.12 ± 0.003	139.15 ± 3.69
Morfo azul (D) x <i>P. gentianoides</i> (R)	28	23 (82.14)	12.43 ± 0.09	7.50 ± 0.13	0.12 ± 0.003	138.39 ± 3.06
Morfo fucsia (D) x Morfo azul (R)	28	18 (64.28)	12.47 ± 0.10	7.53 ± 0.10	0.11 ± 0.005	122.88 ± 8.74
Morfo fucsia (D) x <i>P. gentianoides</i> (R)	28	21 (75)	11.92 ± 0.20	7.07 ± 0.15	0.11 ± 0.005	136.28 ± 7.57
Morfo fucsia(D) x <i>P.roseus</i> (R)	28	1 (3.57)	11.90 ± N/A	7.1 ± N/A	0.09 ± N/A	0.09 ± N/A
<i>P. gentianoides</i> (D) x Morfo azul (R)	28	17 (60.71)	12.40 ± 0.17	7.4 ± 0.16	0.11 ± 0.004	126.58 ± 2.82
<i>P. gentianoides</i> (D) x Morfo fucsia (R)	28	16 (57.14)	12.30 ± 0.17	7.43 ± 0.22	0.11 ± 0.004	127.00 ± 3.99
<i>P. gentianoides</i> (D) x <i>P. roseus</i> (R)	28	2 (7.14)	12.30 ± 0.30	7.35 ± 0.65	0.11 ± 0.005	140.50 ± 1.50
<i>P. roseus</i> (D) x Morfo fucsia (R)	28	3 (10.71)	6.86 ± 0.03	5.30 ± 0.05	0.02 ± 0.003	24.66 ± 2.02
<i>P. roseus</i> (D) x <i>P. gentianoides</i> (R)	28	3 (10.71)	6.90 ± 0.05	4.43 ± 0.72	0.03 ± 0.003	27.00 ± 1.52

13.PUBLICACIONES

Resumen de memorias de XV congreso para el estudio y conservación de las aves en México:

Segregación Altitudinal Entre los Polinizadores de un Híbrido del Género *Penstemon* (Plantaginaceae)

Juliana Cardona Londoño¹, Carlos Lara² y Karla Salinas Flores³.

¹Maestría en Ciencias Biológicas, Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta-UAT. ²Centro de Investigación en Ciencias Biológicas-UAT. ³Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Chiapas.

En 1972, Robert W. Cruden postuló una hipótesis sobre la variación en la efectividad de los polinizadores en diferentes rangos altitudinales, donde a mayores elevaciones la eficacia de polinización es mayor en flores visitadas por aves que por insectos. Esto, sustentado en que los insectos serán más afectados por bajas temperaturas bajo esas condiciones, reduciendo su actividad de forrajeo; sin embargo, esta hipótesis ha sido puesta a prueba raramente. Las especies del género *Penstemon* (Plantaginaceae) que habitan en el Parque Nacional La Malinche, resultan ser un buen modelo para evaluar la hipótesis planteada. Dos especies de este género, *P. gentianoides* y *P. roseus* producen híbridos con flores color fucsia visitadas por himenópteros y colibríes, y con amplia distribución altitudinal; dicha característica posibilita evaluar si la actividad de forrajeo es diferencial a lo largo del gradiente elevacional. Con este objetivo, se realizaron observaciones de los visitantes florales de las plantas híbridas, en diferentes rangos altitudinales, de 3200 msnm a 3800 msnm, entre las 10:00 y 15:00 h. Los datos registrados fueron: (1) tipo de visitante, (2) hora de llegada, (3) número de flores visitadas y (4) duración del forrajeo. El ensamble de visitantes está conformado por seis especies de colibríes (*Selasphorus platycercus*, *Lampornis clemenciae*, *Atthis heloisa*, *Eugenes fulgens*, *Colibri thalassinus*, *Archilochus colubri*), dos especies de abejorros (*Bombus weisi*, *B. Huntii*) y la abeja europea (*Apis mellifera*). Nuestros resultados sugieren que entre 3200 y 3400 msnm, la mayor tasa de visitas e intensidad de forrajeo es mostrada por los himenópteros. Sin embargo, a mayor elevación, los colibríes muestran mayor actividad; y en zonas intermedias (3400-3600) ambos grupos presentan tasas de visita similares. Nuestro estudio soporta la hipótesis de Cruden y sugiere que en plantas con sistemas mixtos de polinización y con un rango de distribución elevacional, sus visitantes mostrarán una eficiencia de polinización diferencial.