



Transporte diferencial de polen por colibríes en una planta diestílica: no es lo mismo picos cortos que largos.

Israel Morales Guzmán,¹ Carlos Lara^{2*} y Citlalli Castillo-Guevara.¹

¹Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Km 10.5 Autopista Tlaxcala-San Martín Texmelucan, San Felipe Ixtacuixtla, Tlaxcala, 90120, México.

²Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala. Km 10.5 Autopista Tlaxcala-San Martín Texmelucan, San Felipe Ixtacuixtla, Tlaxcala, 90120, México. Correo electrónico: *laracar@posgradouatx.com.mx.

Resumen

Las poblaciones de plantas diestílicas usualmente tienen individuos que producen flores con estigmas largos y anteras cortas (flores longiestiladas, Pin), o individuos con estilos cortos y anteras largas (flores breviestiladas, Thrum). Estas características promueven la polinización cruzada asumiendo hercogamia recíproca. Sin embargo, se ha sugerido que cuando el forrajeo de sus polinizadores es selectivo hacia algún morfo, el flujo del polen se puede tornar altamente asimétrico. Asimismo, la correspondencia entre anteras y estigmas de ambos morfos puede desviarse de la reciprocidad perfecta, y promover un éxito reproductivo diferencial entre los morfos, y como consecuencia llevar a la especie a evolucionar otros sistemas reproductivos tales como la dioecia. Estas características hacen que las plantas diestílicas sean un modelo interesante para estudiar procesos relacionados con la especialización de las funciones sexuales y evaluar el papel de los polinizadores en promoverla. *Bouvardia ternifolia* es una planta herbácea distílica presente en el Parque Nacional La Malinche, Tlaxcala, cuyos principales visitantes son cinco especies de colibríes. En el presente estudio, evaluamos el nivel de reciprocidad de los órganos sexuales (anteras y estigmas) de los morfos de esta planta y se realizaron pruebas cualitativas y cuantitativas sobre los sitios de deposición de polen en sus colibríes visitantes. Asimismo, llevamos a cabo pruebas de polinización con colibríes de las cinco especies en ambos morfos, y la producción de semillas fue cuantificada. Los resultados obtenidos sugieren que las flores de *B. ternifolia* no son completamente recíprocas en sus estructuras sexuales, lo cual afecta la forma en que el polen de ambos morfos es depositado al ser visitado por el gremio de colibríes. Asimismo, se mostró que la deposición diferencial de polen podría ser producto tanto de la falta de reciprocidad total como de las diferencias en la talla del pico de los colibríes visitantes. Aunado a esto, la deposición diferencial de polen parece tener consecuencias desde el punto de vista del éxito reproductivo de los morfos visitados.

Palabras clave: diestilia, heterostilia, polinización, reciprocidad.

Differential transport of pollen by hummingbirds in a distyloous plant: is not the same short than long bills.

Abstract

Distyloous populations usually have individuals that produce either flowers with long styles and short stamens (short-styled, Pin) or individuals with short styles and long stamens (short-styled, Thrum). These characteristics promote disassortative pollination assuming reciprocal herkogamy. Nevertheless, it has been suggested that when the visits of pollinators are selective towards some morph, the flow of pollen may be highly asymmetric. Also, the correspondence between stamens and styles of both morphs may not be perfectly reciprocal, and promote a differential reproductive success between morphs, and consequently can lead the species to evolve other reproductive systems such as dioecy. These characteristics make dystyloous plants an interesting model to study processes related to the specialization of the sexual functions and to evaluate the role of pollinators in promoting it. *Bouvardia ternifolia* is a dystyloous plant growing in the Malinche, Tlaxcala. Its main visitors are five hummingbird species. In the present study, we evaluated the level of reciprocity of the sexual organs (anthers and styles) of the floral morphs of this plant, and we did qualitative and quantitative tests on the sites of pollen deposition on their hummingbird visitors. We also carried out tests of pollination in both morphs with these hummingbird species, and the production of seeds was quantified. The results showed that the flowers of *B. ternifolia* are not completely reciprocal in their sexual structures, which can affect the form in which the pollen of both morphs is deposited on the hummingbird visitors. Moreover, we showed that the differential deposition of pollen could be the product of a lack of total reciprocity and of differences in hummingbirds' bill length. Likewise, the differential transference of pollen seems to have consequences on the reproductive success of the visited morphs.

Keys words: distily, heterostyly, pollination, reciprocity.

Introducción

La heterostilia es un polimorfismo genético donde las flores de una especie pueden estar compuestas por dos (diestilia) o tres (triestilia) morfos que difieren recíprocamente (hercogamia recíproca) en la altura a la cual se posicionan las anteras y los estigmas (Ganders 1979, Barrett 2002a). En la diestilia, las flores con el estigma a una altura inferior a la posición de las anteras se les llama breviestiladas o “thrum” y aquellas con el patrón invertido, se denominan longiestiladas o “pin”. Este dimorfismo puede conllevar diferencias morfológicas entre morfos como son el tamaño y forma del estigma y papillas estigmáticas, tamaño de anteras y cantidad de granos de polen/antera (Valois-Cuesta *et al.* 2011), lo que conlleva a un sistema de autoincompatibilidad que permite el desarrollo de frutos y semillas solamente en cruces intermorphos (Ganders 1979). Estas características hacen de las plantas diestílicas un modelo interesante para estudiar procesos relacionados con la especialización de las funciones sexuales y los mecanismos que la promueven.

Aun cuando resulta lógico pensar que este polimorfismo en anteras y estigmas en las plantas diestílicas puede promover transferencia reciproca de polen entre individuos de distinto morfo, la eficacia de tal mecanismo depende, en gran medida, del comportamiento de los polinizadores (Beach y Bawa 1980). Cuando uno de los dos morfos es más visitado por los polinizadores y se moviliza una mayor cantidad de polen de un morfo a otro, la heterostilia puede evolucionar en otros sistemas reproductivos (Barret 1992, Lloyd y Webb 1992). Algunos estudios empíricos y teóricos han enfatizado el papel de los polinizadores como la principal influencia evolutiva en el proceso de especialización sexual de las especies diestílicas (Wyatt 1983, Barret 1992, Contreras y Ornelas 1999, Webb 1999, Leege y Wolfe 2002, Ornelas *et al.* 2004). En la mayoría de estos estudios, las plantas pin han comenzado a funcionar como hembras mientras que las thrum se comportan más como macho (Webb 1999). Sin embargo, la naturaleza e intensidad de presiones selectivas particulares tales como los polinizadores específicos que favorecen la especialización del género han sido escasamente investigadas. Por ejemplo, sólo algunos estudios han analizado la deposición de polen sobre el cuerpo de colibríes polinizadores de plantas diestílicas (Ornelas *et al.* 2004, Valois-Cuesta *et al.* 2011, 2012); sugiriendo que la variación en los tamaños de picos puede influir en la eficacia de polinización. Incluso, el posible papel de la conducta de los colibríes forrajeadores en el funcionamiento de la diestilia ha sido explorado en un sólo trabajo (Justino *et al.* 2012). De esta forma, estudios que evalúan el papel de los polinizadores en su interacción con especies de plantas diestílicas son altamente necesarios, pues sentarán las bases para un

mejor entendimiento sobre los efectos de un flujo asimétrico de polen en la especialización reproductiva de los morfos florales.

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

En un estudio realizado en dos localidades del estado de Tlaxcala (Acutlapilco y el Parque Nacional La Malinche), Hernández (2006) examinó los factores que pueden influir en la selección diferencial de morfos entre los polinizadores. Sus resultados mostraron que en ambos sitios los morfos producen igual número de flores, pero las plantas de morfo pin producen más néctar y reciben más visitas por colibríes. Estos resultados, sugieren que los colibríes en La Malinche pueden estar mostrando un preferencia por visitar más un morfo que el otro. Sin embargo, los datos de este estudio no permitieron concluir si esta preferencia conlleva diferencias en el flujo de polen y en el éxito reproductivo de ambos morfos, particularmente por las diferencias en la talla del pico de los colibríes visitantes. En el presente estudio, se evaluó el transporte de polen en *Bouvardia ternifolia* por colibríes con distintas tallas de picos y sus posibles efectos en el éxito reproductivo de los morfos florales de esta especie de planta.

Métodos

El estudio se llevó a cabo de abril a agosto de 2009, en parches florales de *B. ternifolia* cubriendo una extensión aproximada de 50 ha dentro del Parque Nacional La Malinche, Tlaxcala (19°14'N, 98°58'O; 2900 msnm). Esta zona presenta una precipitación media anual de 800 mm, con un periodo de lluvias que comprende los meses de junio a octubre, y una temperatura media anual de 15°C. La vegetación en el área de estudio está compuesta por un mosaico de bosques de abeto, de pino, de pino-roble, así como pastizales, áreas de cultivo abandonadas y vegetación secundaria en crecimiento debido a la quema del bosque.

Especies de estudio.

Bouvardia ternifolia es una planta herbácea distílica perenne (Familia Rubiaceae) que presenta un sistema de autoincompatibilidad. Su tamaño va de los 0.3 a 1.5 m,

presenta estípulas pequeñas, pecíolos de 0.5 a 11 mm de largo, láminas extremadamente variables predominando las elíptico-lanceoladas, de 1 a 10 cm de largo y 0.2 a 2.5 cm de ancho. Tiene inflorescencias generalmente en forma de cima terminal de 3 a 40 flores, pedicelos de 2 a 14 mm de largo; corola tubular de color salmón, rojo o anaranjado; el tubo de 25 a 30 mm de largo; lóbulos ovados a blancos de 1.5 a 3.5 mm de largo; anteras de 2 a 4 mm de largo; cápsulas de 4.5 a 9 mm de largo y de 5 a 10 mm de ancho; las flores duran abiertas de 4 a 5 días, siendo receptiva desde el primer día de apertura (Rzedowski y Rzedowski 1985, Faivre 2000, Hernández 2006, Torres *et al.* 2008). Esta planta se distribuye ampliamente en áreas perturbadas que comprenden desde el Valle de México hasta Oaxaca y desde Sonora hasta Texas. Llamada comúnmente “trompetilla”, esta especie presenta un crecimiento rápido de las plántulas en lugares abiertos con sustrato rico y bien drenado, en zonas con climas templados, secos y semi-secos. *B. ternifolia* solo produce semillas cuando es polinizada con polen proveniente de flores con un morfo distinto. En La Malinche la encontramos floreciendo en los meses de mayo a agosto, comenzando usualmente su desarrollo en julio; su maduración se extiende hasta octubre. Los colibríes (*Colibri thalassinus*, *Eugenes fulgens*, *Hylocharis leucotis*, *Lampornis clemenciae* y *Selasphorus platycercus*) son los principales visitantes de esta planta en la zona (Lara 2006).

Especies de colibríes.

Las especies de colibríes que visitan esta planta distílica presentan características morfológicas y conductuales distintas, abarcando todo un gradiente de longitudes, formas de pico y otras diferencias corporales. Por ejemplo, estudios previos han documentado que colibríes como *C. thalassinus*, *H. leucotis* y *S. platycercus* establecen y defienden territorios en esta planta, mientras que especies como *E. fulgens* y *L. clemenciae* visitan de forma furtiva parches defendidos por los colibríes antes mencionados o establecen un forrajeo rutero (Hernández 2006, Lara 2006). Coincidientemente, los colibríes territoriales presentan longitudes de pico menores con respecto a los colibríes ruteiros. Las longitudes de picos del ensamblaje de colibríes (rango de 16-27 mm) corresponde con las longitudes de los tubos florales de los morfos de *B. ternifolia* (25-30 mm). Por ello, estas características hacen que el ensamblaje de colibríes visitante sea un modelo adecuado para evaluar diferencias en la eficacia de transporte de polen con respecto a la morfología de los visitantes. Dado que las especies de colibríes visitantes presentan diferencias en tamaños de pico (Cuadro 1), decidimos, para fines de nuestro estudio, agrupar estas especies en dos grupos: picos largos (*E. fulgens* y *L. clemenciae*) y picos cortos (*C. thalassinus*, *H. leucotis* y *S. platycercus*). De esta

manera, considerando estas diferencias en las longitudes de sus picos, en el presente estudio evaluamos la eficacia como polinizadores de estos colibríes.

Cuadro 1. Longitud del pico (media \pm ee) de las especies de colibríes (n=15 individuos/especie) utilizadas en las pruebas de deposición de polen y las polinizaciones manuales.

Especie	Longitud del pico (mm)
<i>Hylocharis leucotis</i>	16.76 \pm 0.15
<i>Selasphorus platycercus</i>	17.18 \pm 0.21
<i>Colibri thalassinus</i>	19.18 \pm 0.18
<i>Lampornis clemenciae</i>	23.33 \pm 0.11
<i>Eugenes fulgens</i>	26.83 \pm 0.22

Evaluación de los niveles de hercogamia y separación antera-estigma en Bouvardia ternifolia.

Para evaluar la reciprocidad en la longitud de estigmas y anteras (grado de hercogamia), así como las diferencias en estas estructuras en las flores de ambos morfos, colectamos aleatoriamente 800 flores de diferentes individuos de *B. ternifolia* (400 flores por morfo) en julio. Para realizar las mediciones utilizamos un vernier digital (\pm 0.01 mm; Mitutoyo®) para determinar las longitudes de las siguientes partes florales: filamento de la antera, filamento del estigma, distancia entre antera y estigma en cada morfo. Utilizamos las medidas obtenidas para determinar diferencias en la correspondencia entre las estructuras florales de ambos morfos.

Por otro lado, utilizamos estas medidas para estimar la reciprocidad relativa o hercogamia entre las longitudes de anteras y estigmas para ambos morfos, mediante el índice de reciprocidad (R),

$$R = (A-S)/(A+S)$$

donde A es la longitud de las anteras de un morfo y S es la longitud del estigma del morfo alternativo. La reciprocidad perfecta se presenta cuando R sea igual a 0 (Richards y Koptur 1993).

Determinación de los sitios de deposición de polen en colibríes.

Para determinar los sitios posibles de deposición del polen (tanto cualitativa como cuantitativamente) sobre pico y cabeza de los colibríes al visitar flores de ambos morfos de *B. ternifolia*, realizamos pruebas experimentales utilizando jaulas desarmables (60 cm x 60 cm x 120 cm) en parches en floración, en las inmediaciones de La Malinche, entre abril y mayo de 2009. Para ello, utilizando redes de niebla, 10 individuos de cada una de las especies de colibríes visitantes fueron capturados a lo largo del estudio. Cada colibrí capturado fue sometido a una prueba experimental descrita a

continuación. Primero, seleccionamos una planta de alguno de los dos morfos al azar, la cual fue cubierta con malla de tul a manera de encierro por una jaula desarmable. Cada planta utilizada debía contar con 10 flores abiertas, por lo que las excedentes se eliminaron. Previamente, limpiamos el pico y la cabeza de cada colibrí con un pincel y papel para eliminar restos de polen. Una vez realizado esto, introdujimos un individuo a una jaula durante 15 minutos para que visitara las flores *ad libitum*, registrando el número de flores visitadas. Después de este periodo, retiramos el individuo de la jaula para registrar la posición del polen tras sus visitas a las flores de la planta. Para ello, tomamos fotografías de pico y cabeza. Posteriormente, marcamos el colibrí con un pequeño corte en la 5^a rectris (para evitar el uso de recapturas) y liberado. Para la evaluación del siguiente colibrí, utilizamos una nueva planta que contuviera nuevamente 10 flores y repetimos el protocolo antes descrito.

Las fotos digitales que obtuvimos de cada individuo las analizamos posteriormente con el programa Adobe PhotoShop CS4 versión para Macintosh. Con este programa medimos la distancia máxima hasta la mayor deposición del polen desde el extremo distal (la punta del pico). Con estos datos pudimos hacer un análisis cuantitativo sobre posibles diferencias entre especies de colibríes con respecto a los sitios de deposición.

Determinación de la eficacia de polinización por colibríes.

Con la finalidad de determinar si el transporte de polen legítimo es diferente entre los dos morfos florales, comparamos las cantidades de semillas producidas por cada morfo luego de polinizaciones legítimas mediadas por las distintas especies de colibríes. Aun cuando desconocemos posibles diferencias en el número de granos de polen entre morfos, nuestra intención no es explorar el posible efecto de estas diferencias, sino la eficacia diferencial de polinización entre los distintos colibríes visitantes. Por ello, esperamos que si el transporte de polen legítimo es distinto para cada morfo, esto se reflejará en una diferencia en el número de semillas producidas luego de una polinización legítima. Para evaluar esto, realizamos experimentos de polinización legítima utilizando a colibríes como mediadores. Para ello, dos plantas de ambos morfos fueron seleccionadas aleatoriamente como donadoras de polen a lo largo del experimento. En las polinizaciones utilizamos 10 colibríes de cada una de las 5 especies que visitan *Bouvardia*. Previo a las polinizaciones, inflorescencias completas con botones florales a punto de abrir fueron cubiertas con malla tipo tul en 50 plantas de cada morfo (n=100).

El día de las polinizaciones, destapamos las flores recién abiertas y procedimos a los siguientes

tratamientos: (1) el pico de un colibrí sujetado en la mano, lo introdujimos en dos ocasiones a una flor (a una profundidad aproximada de 20 mm) de la planta donadora (por ser el número de inserciones que un colibrí hace típicamente a esta especie de planta, en condiciones naturales; Torres *et al.* 2008); (2) posteriormente, llevamos al colibrí a una flor recién abierta (primer día de apertura) realizando 2 inserciones con el pico del colibrí a manera de simular la polinización cruzada en la planta del morfo opuesto; (3) repetimos este protocolo hasta completar 5 flores por planta por un total de 50 flores por especie-morfo. De esta manera, cada flor donadora sólo transportó polen a una sola flor receptora. El pico del colibrí utilizado fue limpiado entre las pruebas.

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

Análisis estadístico.

Evaluamos las posibles diferencias en las longitudes de anteras y estigmas de ambos morfos con un ANDEVA de dos factores. En el modelo, morfo y estructura (antera y estigma) fueron los factores fijos, y la longitud de estas estructuras (en mm) fue la variable dependiente. Asimismo, a través de un ANDEVA de un factor, evaluamos la variación en la separación antera-estigma (variable dependiente) entre morfos (factor fijo). La variación en las distancias de los sitios de deposición de polen con respecto al extremo distal del pico en las cinco especies de colibríes visitando ambos morfos, así como en el número de semillas, producto de las polinizaciones manuales, los analizamos utilizando ANDEVA de dos factores. En los modelos, morfo y especie de colibrí fueron los factores fijos y la distancia del polen al extremo distal del pico (mm) y el número de semillas fueron las variables dependientes. Todos los análisis estadísticos los llevamos a cabo con el programa JMP versión 8. Los datos en cada análisis fueron transformados al logaritmo base 10 y su normalidad corroborada mediante pruebas de Kolmogorov-Smirnov. En las figuras presentamos los valores reales.

Resultados

Mediciones florales.

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

La validación de estos valores de estimación de reciprocidad, a través del análisis estadístico de la longitud de anteras y estigmas en ambos morfos, mostró que la longitud de las anteras pin es mayor que las de thrum ($F=26.6352$, $P=0.0001$). Asimismo, independientemente del morfo evaluado, las anteras presentaron las mayores longitudes para ambos morfos ($F=40.3982$, $P=0.0001$). En consecuencia, encontramos una diferencia significativa en la falta de correspondencia entre las anteras de pin y el estigma de thrum, tal como lo muestra la significancia de la interacción entre el factor morfo y el factor estructura floral ($F=2781.562$, $P=0.0001$; Figura 1). La separación anteras-estigma fue significativamente mayor (7.4 ± 0.21 mm; media ± error estándar) que en las flores pin (6.5 ± 0.12 mm).

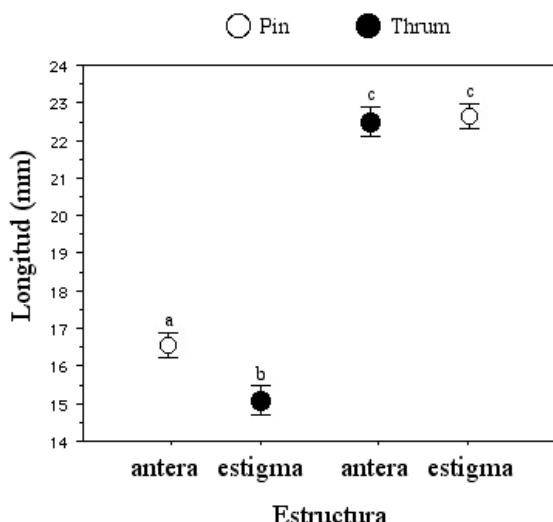


Figura 1. Reciprocidad en la longitud (media±ee) de anteras y estigmas de flores del mismo y distinto morfo de *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae). Letras distintas denotan diferencias significativas ($P<0.05$).

Deposición de polen.

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

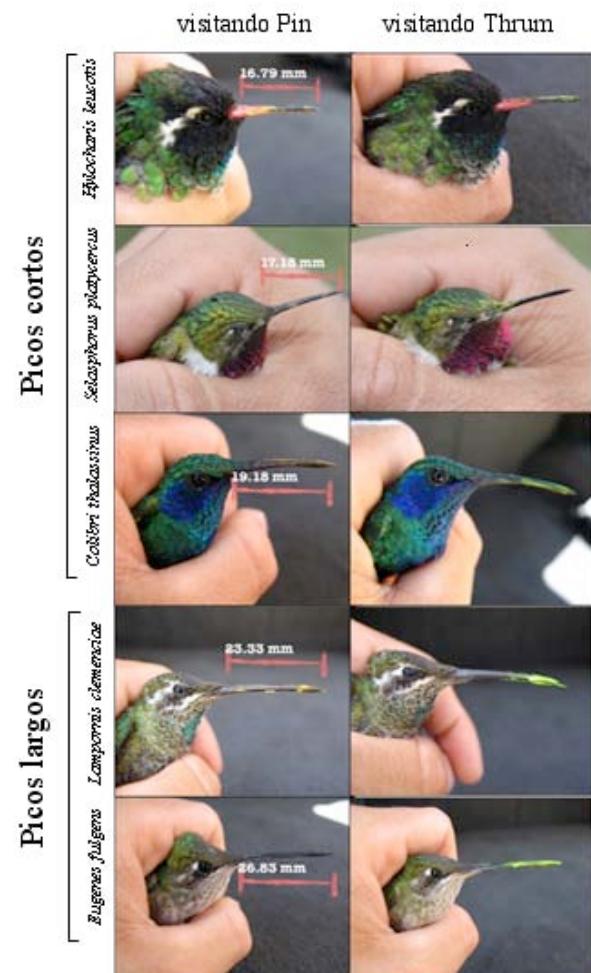


Figura 2. Deposición de polen en especies de colibríes de picos cortos (a) *C. thalassinus*, *H. leucotis*, *S. Platycercus*, y (b) picos largos *E. fulgens* y *L. clemenciae* después de visitar flores del morfo pin y thrum de *B. ternifolia*.

Estas posibles diferencias fueron validadas a través del análisis estadístico de las distancias de deposición de polen en los colibríes. De esta forma, el polen de pin es depositado mayormente en las partes distales de los picos, a diferencia del polen thrum que se

encuentra más en las partes terminales e intermedias ($F=649.483$, $P=0.001$). Asimismo, independientemente del morfo visitado, los colibríes de picos largos (*E. fulgens* y *L. clemenciae*) tuvieron la deposición de polen a mayores distancias con respecto a sus picos ($F=649.483$ $P=0.001$). Finalmente, el análisis mostró una interacción significativa entre ambos factores (morfo y especie de colibrí), lo que significa que hay un deposición diferencial en los picos de los colibríes dependiendo del morfo visitado ($F=8.771$, $P=0.003$). De esta manera, los colibríes de picos pequeños (*S. platycercus*, *H. leucotis* y *C. thalassinus*) presentan deposición de polen pin y thrum a distancias menores que las obtenidas en los colibríes de picos largos (Figura 3).

Polinizaciones manuales.

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

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los colibríes que visitan a *B. ternifolia* en la Malinche pueden transportar polen de los morfos florales de manera diferencial, como respuesta a la variación en las longitudes de sus picos. Asimismo, estas diferencias morfológicas parecen sugerir un efecto directo en la producción de semillas de ambos morfos. Estas diferencias parecen estar relacionadas con los sitios de deposición de polen (Figura 1 y 2). Nuestros resultados sugieren que los colibríes de picos cortos y largos transfieren polen de forma similar cuando visitan una flor thrum como donadora de polen, ya que al introducir sus picos durante una visita en estas flores el polen es colocado generalmente en la frente o parte proximal del pico de los individuos. Sin embargo, al visitar una flor pin, y dado que las anteras están ubicadas más internamente en la corola, las diferencias en el tamaño del pico de los visitantes determinan diferencias en la deposición de polen. De esta manera, los picos pequeños transportan polen que les queda principalmente en la punta, mientras que los picos largos muestran generalmente las cargas de polen en la parte intermedia y proximal (Figura 2).

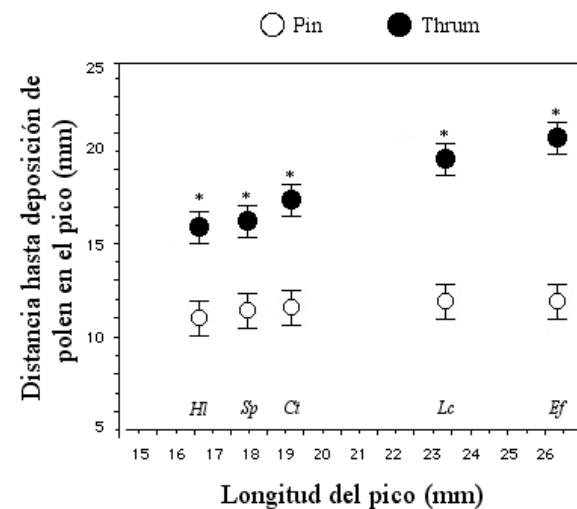


Figura 3. Distancia de deposición del polen de ambos morfos florales sobre el pico de cinco especies de colibríes medida desde el extremo distal del pico. HI (*Hylocharis leucotis*), Sp (*Selasphorus platycercus*), Ct (*Colibrí thalassinus*), Lc (*Lampornis clemenciae*) y Ef (*Eugenes fulgens*). Los asteriscos denotan diferencias significativas ($P<0.05$).

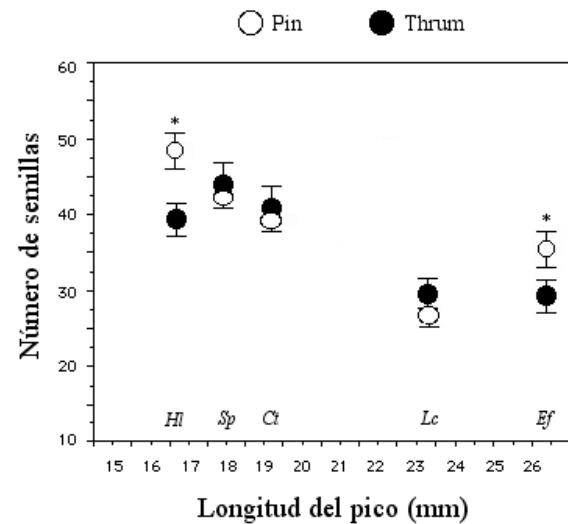


Figura 4. Número de semillas (media±ee) producidas por cada morfo tras la polinización por colibríes con distinta longitud de pico. HI (*Hylocharis leucotis*), Sp (*Selasphorus platycercus*), Ct (*Colibrí thalassinus*), Lc (*Lampornis clemenciae*) y Ef (*Eugenes fulgens*). Los asteriscos denotan diferencias significativas ($P<0.05$).

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

2003, Ornelas *et al.* 2004, Hernández y Ornelas 2007, García-Robledo 2008, Valois-Cuesta *et al.* 2011). Bajo este escenario, la mayor separación espacial anteras pin-estigma thrum (hercogamia) que observamos en *B. ternifolia* (Figura 1) podría ser el producto de presiones selectivas que favorecen el éxito de polinización de forma diferencial entre morfos; por ejemplo, en el morfo pin a través de la reducción de la interferencia física entre anteras y estigma. Mientras que en el caso del morfo thrum, se podría estar favoreciendo la disminución de la probabilidad de autodeposición espontánea de polen y la facilitación del contacto entre los polinizadores efectivos y los estigmas menos accesibles (ver Lloyd y Webb 1992, Barrett 2002a, 2002b).

Nuestros resultados sobre la producción diferencial de semillas entre morfos sugieren que los colibríes juegan un papel fundamental como vectores de polen y polinizadores de *B. ternifolia*. Torres *et al.* (2008) analizaron la producción de semillas en condiciones naturales de polinización en un grupo de plantas de ambos morfos de esta especie en el mismo sitio de estudio que el presente trabajo. Sus resultados determinaron diferencias no significativas en el número de semillas producidas entre morfos (entre 80 y 90 semillas por fruto). La comparación de estos resultados con los obtenidos en nuestro estudio parecería indicar que las diferencias morfológicas de los colibríes visitantes no afectan la producción total de semillas entre morfos. Sin embargo, es importante no perder de vista que las visitas de los colibríes no se distribuyen de forma homogénea (por la existencia de especies territoriales y ruteras en el sitio de estudio) en el mosaico espacial que forma la distribución de las plantas y esto, a la larga, sí podría tener un efecto directo en su adecuación. Por ejemplo, Justino *et al.* (2012) analizaron la conducta territorial de colibríes visitando una planta diestílica (*Palicourea rigida*); sus resultados mostraron que, aunque la territorialidad puede limitar el flujo de polen entre parches de esta planta con un gran despliegue floral (y así supuestamente tener una menor producción de semillas), esto puede ser compensado por la atracción de colibríes que invaden estos territorios, moviendo así más polen proveniente de otros parches (lo cual supone la posibilidad de mayor producción de semillas). Aun cuando las polinizaciones manuales que utilizamos en nuestro estudio muestran la eficacia de polinización de los distintos colibríes, no replica cómo su conducta territorial o rutera afecta esta eficacia, motivo por el cual probablemente el número de semillas obtenidas en nuestro experimento difiere de las semillas obtenidas en condiciones naturales.

Varios trabajos han evaluado el efecto de la morfología floral sobre la eficacia de los polinizadores en función de la polinización cruzada en plantas diestílicas. Por ejemplo, Stone y Tompson (1994) observaron que

anteras y estigmas de flores longiestiladas y brevestiladas tienden a contactar diferentes zonas del cuerpo del polinizador, tal como ocurrió en nuestro trabajo (ver también Lloyd y Webb 1992). Lau y Bosque (2003), por su parte, registraron que el colibrí *Amazilia tobaci* fue más eficiente depositando polen legítimo sobre los estigmas de las flores thrum de *Palicourea fendleri* y sugirieron que la probabilidad que tiene el polinizador de remover y transferir polen entre los morfos florales de esta especie depende de la posición relativa de anteras y estigmas (ver también Stone 1995, Ornelas *et al.* 2004). A partir de lo anterior, proponemos que la longitud del pico de los colibríes es un factor determinante de la dirección del flujo de polen entre los morfos florales, por lo que podríamos inferir que los colibríes de pico largo tienen mayor probabilidad de transferir polen entre los órganos reproductivos de niveles bajos (desde las anteras de las flores pin hacia los estigmas de las flores thrum); mientras que aquellos colibríes con pico muy corto, dada la facilidad de establecer contacto con las estructuras sexuales más expuestas en las flores, podrían ser más eficientes en el transporte de granos de polen entre los órganos reproductivos posicionados a un nivel más alto (desde las anteras de las flores thrum hacia los estigmas de las flores pin). Esta hipótesis, planteada por Ornelas *et al.* (1994), fue evaluada experimentalmente por ellos, encontrando que el colibrí de pico más largo, dentro del ensamble de polinizadores de *Palicourea padifolia*, transfirió significativamente más polen desde flores pin hacia flores thrum, que en sentido contrario.

Bajo estos planteamiento y evidencias, es razonable pensar que dentro del ensamble de colibríes registrados como visitantes de *B. ternifolia* en la Malinche, los colibríes de picos largos podrían, eventualmente, ser más eficiente en la transferencia de polen legítimo desde flores pin hacia flores thrum, mientras que los colibríes de picos cortos podrían ser más eficientes en el transporte de polen desde las flores thrum hacia las flores pin. Sin embargo, desde el punto de vista reproductivo, nuestros resultados contradicen esta predicción, pues las flores de ambos morfos visitadas por colibríes de picos cortos producen más semillas, sugiriendo una efectividad polinizadora baja por parte de los colibríes de picos largos en esta especie. Aun cuando es importante considerar que las diferencias encontradas en la producción de semillas también puede ser afectada por diferencias entre morfos en el número de óvulos, el tamaño de la superficie del estigma y el número de granos de polen producidos, aspectos todos ellos pendientes de ser evaluados. Las diferencias aquí presentadas sobre eficacia de polinización son relevantes para explicar los patrones de transferencia de polen en este sistema diestílico.

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

estigmas (Hernández y Ornelas 2007), es probable que otros atributos del comportamiento de forrajeo de los polinizadores jueguen un papel importante en el éxito de polinización de este tipo de especies. Por ejemplo, Hernández (2006) observó en una población de *B. ternifolia* en La Malinche que los territoriales *H. leucotis*, *S. platycercus* y *C. thalassinus* (picos cortos) visitan frecuentemente las flores de ambos morfos, a diferencia de los colibríes de picos largos (*E. fulgens* y *L. amethystinus*), quienes son visitantes esporádicos. Si la hipótesis sobre el efecto del tamaño del pico se cumple en *B. ternifolia*, es probable que la mayor frecuencia de visitas de las especies de colibríes con picos cortos en ambos morfos facilite que los estigmas de las flores breviestiladas reciban en el tiempo y el espacio más granos de polen provenientes desde las flores longiestiladas, las cuales a su vez tendrían menos probabilidad de recibir granos de polen legítimo desde plantas breviestiladas, dada la baja frecuencia de visitas y territorialidad de los colibríes de picos largos. Estas predicciones requieren aun ser probadas experimentalmente.

Aunque en *B. ternifolia* el flujo de polen entre los morfos es mediado principalmente por colibríes, no se descarta la posibilidad de que los insectos, pese su baja frecuencia de visitas, también jueguen un papel importante como polinizadores en esta especie, pues dada su facilidad para establecer contacto corporal con anteras de flores thrum y los estigmas de flores pin, ellos quizás podrían mediar eficazmente la polinización legítima de flores pin. Sin embargo, la baja frecuencia con que estos animales se ven visitar a las plantas thrum podría

eventualmente limitar su papel como eficientes polinizadores en esa dirección del flujo de polen en *B. ternifolia*. En todo caso, dilucidar el papel que juega el gremio de insectos como eficientes polinizadores de las plantas de *B. ternifolia* requerirá, en el futuro, una evaluación detallada mediante una enfoque experimental.

En términos generales, nuestros resultados han mostrado que las flores de *B. ternifolia* no son completamente recíprocas en sus estructuras sexuales, lo cual repercute en la forma en que el polen de ambos morfos es depositado sobre el gremio de colibríes. Además, esta deposición diferencial de polen en los picos de los colibríes parece tener consecuencias desde el punto de vista del éxito reproductivo de los morfos visitados. Así, colibríes de picos cortos funcionan como buenos polinizadores en ambos morfos, mientras que colibríes de picos largos pueden estar relacionados con un ineficiente transporte de polen y en consecuencia inefectiva polinización. No obstante, es necesario profundizar a futuro en el entendimiento del papel que juega cada uno de los visitantes florales de *B. ternifolia* (colibríes e insectos) como mediadores eficientes de polen legítimo entre los morfos florales de esta especie diestílica.

Agradecimientos

A la Estación Científica La Malinche por el apoyo otorgado y las facilidades de sus instalaciones. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca a IMG (No. 218167). A P. Lau, F. Ornelas y S. Calmé por sus sugerencias y comentarios a una versión previa del manuscrito.

Literatura citada

- Barrett, S.C.H. 1992. Evolution and function of heterostyly. Springer-Verlag. New York, EUA.
- Barrett, S.C.H. 2002a. The evolution of plants sexual diversity. *Nature Reviews* 3: 274-284.
- Barrett, S.C.H. 2002b. Sexual interference of the kind. *Heredity* 88:154-159.
- Beach, J. y K. Bawa. 1980. Role of pollinators in the evolution of dioecy from distyly. *Evolution* 34:1138-1142.
- Contreras, P.S. y J.F. Ornelas. 1999. Reproductive conflicts of *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) a distylous shrub of a tropical cloud forest in México. *Plant Systematics and Evolution* 219:225-241.
- Faivre, A.E. 2000. Ontogenetic differences in heterostylous plants and implications for development from a herkogamous ancestor. *Evolution* 54:847-858.
- Ganders, F.R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607-635.
- Garcia-Robledo, C. 2008. Asymmetry in pollen flow promotes gender specialization in morphs of the distylous neotropical herb *Arcytophyllum lavarum* (Rubiaceae). *Evolutionary Ecology* 22:743-755.
- Hernández, A. 2006. Colibríes y la especialización sexual en el arbusto diestílico *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae). Tesis de maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.
- Hernández, A. y J.F. Ornelas. 2007. Disassortative pollen transfer in distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a hummingbirds-pollinated shrub. *Ecoscience* 14:8-16.
- Justino, D.G., P.K. Maruyama y P.E. Oliveira. 2012. Floral resource availability and hummingbird territorial behavior on a Neotropical savanna shrub. *Journal of Ornithology* 153:189-197.

- Lara, C. 2006. Temporal dynamics of flowers use by hummingbirds in a highland temperate forest in México. *Ecoscience* 13:23-29.
- Lau, P. y C. Bosque. 2003. Pollen flow in the distylous *Palicourea fendleri* (Rubiaceae): an experimental test of the disassortative pollen flow hypothesis. *Oecologia* 135:593-600.
- Leege, L.M. y L.M. Wolfe. 2002. Do floral herbivores respond to variation in flower characteristics in *Gelsemium sempervirens* (Loganiaceae), a distylous vine? *American Journal of Botany* 89:1270-1274.
- Lloyd, D.G. y C.J. Webb. 1992. The evolution of heterostyly. Pp. 151-178. In: S.C.H. Barret (ed.). *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag. New York, EUA.
- Ornelas, J.F., L. Jiménez, C. González y A. Hernández. 2004. Reproductive ecology of distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) in a tropical montane forest. I. Hummingbirds effectiveness as pollen vectors. *American Journal of Botany* 91:1061-1069.
- Richards, J.H. y S. Koptur. 1993. Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 80:31-40.
- Rzedowski, J. y G.C. de Rzedowski. 1985. Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto Politécnico Nacional, Instituto de Ecología. México, DF.
- Stone, J.L. 1995. Pollen donation patterns in a tropical distylous shrub (*Psychotria suerrensis*, Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82:1390-1398.
- Stone, J.L. y J.D. Thompson. 1994. The evolution of distyly: pollen transfer in artificial flowers. *Evolution* 48:1595-1606.
- Torres, I., L. Salinas, C. Lara y C. Castillo-Guevara. 2008. Antagonists and their effects in a hummingbird-plant interaction: field experiments. *Ecoscience* 15:65-72.
- Valois-Cuesta, H., P.J. Soriano y J.F. Ornelas. 2011. Asymmetrical legitimate pollination in distylous *Palicourea demissa* (Rubiaceae): the role of nectar production and pollinator visitation. *Journal of Tropical Ecology* 27:393-404.
- Valois-Cuesta, H., P.J. Soriano y J.F. Ornelas. 2012. Gender specialization in *Palicourea demissa* (Rubiaceae), a distylous hummingbird-pollinated treelet. *Plant Systematics and Evolution* 298:975-984.
- Waser, N.M. 1978. Competition for hummingbird pollination and sequential flowering in two Colorado wildflowers. *Ecology* 59:934-944.
- Webb, C.J. 1999. Empirical studies: evolution and maintenance of dimorphic breeding systems. Pp. 61-95. In: M.A. Geber, T.E. Dawson y L.F. Delph (eds.). *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*. Springer. Berlin, Alemania.
- Wyatt, R. 1983. Pollinator-plant interactions and the evolution of plant breeding systems. Pp. 51-95. In: L. Real (ed.). *Pollination biology*. Academic Press. Orlando, Florida, EUA.

Recibido: 24 de noviembre de 2011; Revisión aceptada: 19 de junio de 2012.
 Editora asociada: Sophie Calmé.