

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DIVISIÓN DE POSTGRADO**

**COLIBRÍES Y LA ESPECIALIZACIÓN SEXUAL EN EL  
ARBUSTO DISTÍLICO *Bouvardia ternifolia* (RUBIACEAE).**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**

**ANGÉLICA HERNÁNDEZ GUERRERO**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS LARA RODRÍGUEZ**

**MÉXICO, D.F.**

**2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue posible gracias a la colaboración y apoyo de varias personas e instituciones a las cuales agradezco infinitamente su colaboración. Primero agradezco de una manera particular a mi tutor Dr. Carlos Lara por la confianza que depositó en mí para hacer esta investigación; por su paciencia y apoyo en todo. Asimismo agradezco las valiosas aportaciones de mis asesores que contribuyeron al mejoramiento de esta tesis. Al Dr. Zenón Cano Santana por todas sus enseñanzas, por mostrarme lo apasionante que es *ver la ecología en acción* y por sus emocionantes clases de ecología en la Facultad de ciencias las cuales concretaron mi orientación por esta ciencia. Al Dr. Carlos Cordero Macedo por sus interesantes clases de Ecología de la conducta, por fomentar un sentido crítico en cada uno de los que hemos tenido el privilegio de tomar clases con él así como por las facilidades para el uso de equipo de su laboratorio. A la Dra. Margarita Martínez por mostrar en su taller la interdisciplinariedad de la ciencia, gracias a lo cual conocí a mi tutor de este trabajo y al M. C. Víctor Rosas Guerrero por sus formativos consejos y por su amistad. A todos, por mostrarme el lado profesional pero también el lado humano de la ciencia.

Quiero agradecer a Adriana del laboratorio de interacción planta - animal del IE, por sus revisiones y aportaciones a los manuscritos.

A la M. en C. Silvia Espinosa Matías del laboratorio de microscopia de barrido de la Facultad de ciencias por su apoyo con el material fotográfico y por su tutoría en la obtención de las fotografías que sirvieron para ilustrar este trabajo.

Al personal del Herbario Nacional del Instituto de Biología y del Herbario de la Facultad de ciencias por su trato amable y su colaboración para preparar los ejemplares de *Bouvardia ternifolia*, que ahora forman parte de sus colecciones.

A mi familia entera, especialmente a mamá, papá y a mi hermano Héctor, por su apoyo y consejos. A mis amigos de siempre Elisa, Vero y Oscar. A todos mis compañeros y amigos de licenciatura, a los amigos becarios del museo Universum por los arduos momentos que dedicamos juntos a la divulgación con los grupos de secundaria!!! por las largas y enriquecedoras charlas interdisciplinarias y por las tardes de pizza a Chio, Karlita y Lucy. Al equipo de La Malinche: a Anita, por darme alojamiento cada vez que salíamos al campo pero sobre todo por tu amistad de muchos años, a Jessy por tu valiosa ayuda a mi trabajo de campo, a Luisa y Jorge, por adoptarme como parte del equipo de “los conejeros”, a Venado, Tobe y Mine por todas esas noches frías que acampamos en La Malinche y por las “deliciosas” cenas después de un arduo día de trabajo, y muy especialmente a mi querido José Ignacio, por su apoyo incondicional. A todos, gracias.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	4
<b>Introducción</b> .....	3
<b>Antecedentes</b> .....	6
<b>Materiales y métodos</b> .....	11
Sitio de estudio.....	11
Especie estudiada.....	12
Fenología y éxito reproductivo de <i>Bouvardia ternifolia</i> .....	12
Cuantificación de la hercogamia .....	12
Producción de néctar .....	13
Evaluación de los visitantes florales y patrones de forrajeo .....	14
Conteo y análisis del polen.....	15
<b>Análisis estadístico</b> .....	16
<b>Resultados</b> .....	17
Fenología y éxito reproductivo de <i>Bouvardia ternifolia</i> .....	17
Medidas morfométricas y hercogamia .....	18
Volumen y calidad del néctar .....	25
Evaluación de los visitantes florales y patrones de forrajeo .....	28
Deposición de polen .....	32
<b>Discusión</b> .....	35
Literatura citada .....	41

## RESUMEN

Se ha hipotetizado que la distilia (el posicionamiento recíproco de anteras y estilos entre dos morfos florales) ha evolucionado para mejorar el entrecruzamiento. Sin embargo, para cumplirse esto es necesario que ambos morfos no difieran en atributos que contribuyan a la atracción y recompensa de los visitantes florales. De no ser así, se ha sugerido que una transferencia asimétrica de polen, producto de los patrones de visita diferencial entre morfos por parte de los visitantes podría funcionar como una fuerza evolutiva en el proceso de especialización de género. El propósito de este estudio fue evaluar los atributos reproductivos (producción de botones florales, flores y frutos) y florales (hercogamia, producción y calidad del néctar) del arbusto distílico *B. ternifolia* (Rubiaceae) en las poblaciones de Acuitlapilco y La Malinche ubicadas en el centro de Tlaxcala, Tlax, además de las respuestas de sus polinizadores (comportamiento de forrajeo) a los recursos ofrecidos por ambos morfos florales en cada población. El número de botones, flores, y frutos fue similar en ambos sitios, sin embargo en Acuitlapilco algunos meses el morfo thrum tuvo significativamente mayor producción que pin. Las longitudes de anteras y estilos de ambos morfos fueron recíprocamente hercogámicas en Acuitlapilco, pero no en La Malinche. En ambos sitios, el néctar de las flores del morfo pin se encuentra en mayor volumen y concentración de azúcar. Los colibríes son los principales visitantes en ambos sitios, en Acuitlapilco se registraron dos especies y ocho en La Malinche. En ambos sitios, los colibríes visitan más rápido en el tiempo y con mayor intensidad las flores del morfo pin. Sin embargo, las flores del morfo thrum presentaron la mayor deposición de polen en los estigmas. Los resultados sugieren que poblaciones de una misma especie distílica, pueden estar sometidas a distintas presiones de sus visitantes florales, afectando diferencialmente los rasgos florales y vegetativos, e influyendo en distinto grado la función de género.

**Palabras clave:** distilia, colibríes, *Bouvardia ternifolia*, transferencia de polen, conducta del polinizador, Rubiaceae, deposición estigmática de polen y producción de néctar.

## **INTRODUCCIÓN**

El papel de los polinizadores en la diversificación del tamaño y forma floral es actualmente uno de los tópicos más activos en la biología evolutiva. Se ha sugerido que las poblaciones de plantas han divergido en el tiempo en respuesta a la selección direccional de clases alternativas de polinizadores (Galen *et al.* 1987; Nilsson 1988). Aunque hay muchos ejemplos que soportan la visión de que la selección diferencial de los polinizadores conlleva a una divergencia en el tamaño y forma de las flores entre poblaciones aisladas geográficamente (revisión en Galen 1999), es menos claro si los polinizadores promueven efectivamente la divergencia floral dentro de poblaciones simpátricas (Schemske y Bradshaw 1999). Varios estudios han documentado divergencia dentro y entre especies de plantas coexistentes, en rasgos relacionados al uso por polinizadores tales como color de las flores, producción de néctar, morfología y fenología. (Raven 1972, Kay 1976, 1979, Waser y Price 1981, Bradshaw *et al.* 1995, Fenster 1991). Cualquier factor que influya la conducta, abundancia o composición taxonómica del ensamblaje de polinizadores en un ambiente dado, incluyendo el tamaño poblacional, densidad de las plantas, presencia de competidores para la polinización, y disponibilidad de luz, puede influir la fuerza o dirección de la selección por polinizadores (Caruso 2001). Además, si estos ambientes varían en una escala local y están conectados por flujo de genes, entonces la medición de la selección en ambientes múltiples es necesaria para predecir cómo los rasgos florales pueden evolucionar.

La heterostilia, presente en 28 familias de angiospermas, es un sistema reproductivo que se caracteriza por un crecimiento diferencial de los estilos y se expresa en la mayoría de los taxa como distilia (dos morfos) y sólo en tres familias como tristilia (tres morfos) (Barrett 1992). Las poblaciones con plantas distílicas producen flores con estilos largos que se extienden más allá de la corola y anteras por debajo de esta (morfo pin), y flores con estilos cortos, por debajo de la corola, y anteras que alcanzan el largo

de esta (morfo thrum). Las especies distílicas polinizadas por animales representan un sistema modelo para estudiar evolución adaptativa dentro de las especies debido a que los morfos florales tienen vías recíprocas para el desarrollo de las flores y coexisten en el mismo ambiente compartiendo los mismos polinizadores.

El polimorfismo en anteras y estilos generalmente va acompañado por un mecanismo de incompatibilidad esporofítica en el cual sólo son posibles las cruces entre morfos distintos para la producción de semillas (Darwin 1887, Stone 1995) por lo que los dos grupos morfológicos en la distilia también forman dos grupos reproductivos. De este modo, debido a que la polinización cruzada es necesaria para la fertilización en ambos morfos, ellos no deberían diferir en atributos que contribuyan a la atracción y recompensa de visitantes florales (Leege y Wolfe 2002) llevando, por consiguiente, a un igual éxito reproductivo.

Los botánicos clásicamente han visto a este polimorfismo como un mecanismo de entrecruzamiento, debido los morfos recíprocos pueden fertilizarse. Sin embargo, diferencias reproductivas entre morfos también han sido reportadas en la mayoría de las especies distílicas estudiadas. De manera que hay morfos florales de varias especies distílicas que se especializan en su esfuerzo reproductivo a través de la función masculina y femenina (Lloyd 1979); existiendo especies con especialización tan extrema que sus morfos son funcionalmente dióicos.

Actualmente, los análisis de las presiones selectivas que influyen en el rumbo evolutivo de la distilia han permitido desarrollar modelos teóricos los cuales sugieren que el dimorfismo en la longitud del estigma se puede mantener en las poblaciones siendo evolutivamente estable (Charnov 1982). Otros establecen que la distilia, en algunos grupos de plantas, es una condición inestable y representa una etapa transicional en su evolución hacia la homostilia o bien hacia la dioecia (Charlesworth y

Charlesworth 1979, Lloyd y Webb 1992).

Aunque el polimorfismo en plantas heterostílicas parece estar diseñado para una transferencia recíproca de polen, la efectividad de tal mecanismo depende en gran medida de la efectividad de los polinizadores (Beach y Bawa 1980). Cuando el forrajeo de éstos es muy selectivo el flujo de polen se vuelve altamente asimétrico ante lo cual la heterostilia puede evolucionar en otros sistemas reproductivos (Barret 1992, Lloyd y Webb 1992). Algunos estudios empíricos y teóricos han resaltado el papel de los polinizadores como la principal fuerza evolutiva en el proceso de especialización sexual en especies distílicas (Wyatt 1983, Barret 1992, Contreras y Ornelas 1999, Webb 1999, Leege y Wolfe 2002, Ornelas *et al.* 2004a). En la mayoría de los casos las plantas pin han comenzado a funcionar como hembras y las plantas thrum se comportan más como machos (Webb 1999). Sin embargo, la naturaleza e intensidad de presiones selectivas particulares, tales como los polinizadores específicos que favorecen la especialización de género, han sido raramente investigadas (Ornelas *et al.* 2004a).

Aún cuando factores genéticos internos pueden afectar la especialización reproductiva en plantas distílicas (Domínguez *et al.* 1997, Ávila *et al.* 2000), el mantenimiento del dimorfismo sexual implica una adaptación entre un balance de otras fuerzas selectivas pobremente comprendidas (Arroyo 2002). De este modo, son necesarios estudios consistentes en evaluar el papel que juegan los polinizadores en su interacción con plantas distílicas y su posible papel en la especialización reproductiva en estas especies de plantas.



## ANTECEDENTES

Darwin (1877) propuso que la heterostilia es un mecanismo floral que promueve el entrecruzamiento. Dado que las estructuras sexuales en los morfos florales pin y thrum se corresponden complementariamente para su fecundación en la hercogamia recíproca (entre anteras y estigmas de longitud equivalente), la efectividad de un polinizador para realizar el entrecruzamiento es un factor ecológico determinante para la reproducción en estas plantas (Beach y Bawa 1980, Barret 1998, Ornelas *et al.* 2004a y b).

Ciertos trabajos teóricos sugieren que las presiones que ejercen los polinizadores pueden llevar a la distíla por dos posibles rutas evolutivas (Lloyd y Webb 1992): (1) evolucionar hacia una condición homostílica que implicaría la pérdida de uno de los morfos y la recuperación de la autofertilización, favorecida por altos niveles de autofecundación, eventos de colonización y escasez de polinizadores (Charlesworth y Charlesworth 1978), o bien (2) hacia una condición dioica, en donde los individuos ganen su adecuación a través de una de las dos vías sexuales, es decir con flores especializadas macho y hembra; morfo thrum y pin, respectivamente (Barret 1992, Lloyd y Webb 1992). Esta última condición sería favorecida por un cambio en la biología de la polinización de las poblaciones, rompiendo el curso complementario de polen entre individuos de los dos morfos (Beach y Bawa 1980), lo que generaría una transferencia direccional de polen. Esta transferencia puede ser de estambres largos a estilos largos, lo que genera diferencias en el éxito reproductivo entre los morfos florales (Ganders 1974) promoviendo la eliminación de la utilidad y eventualmente la funcionalidad de los estilos y estambres cortos (Beach y Bawa 1980).

Para poder dar una interpretación funcional de la arquitectura sexual de los morfos florales y de su evolución en especies heterostílicas se necesita, por un lado, del análisis

de su mutua interdependencia en promover la fecundación así como del efecto de las interacciones que tengan con sus polinizadores. De este modo, estudios detallados tanto de los polinizadores como de los mecanismos involucrados en el proceso de polinización son indispensables para entender la evolución de la heterostília. A este respecto, en varios trabajos se ha reportado que existen preferencias de los polinizadores hacia un tipo de morfo debido al color de la flor (Raven 1972, Kay 1976, 1979, Waser y Price 1981), el olor (Galen y Kevan 1980, Galen 1985) la cantidad del recurso ofrecido (Bradshaw *et al.* 1995), la morfología (Fenster 1991), la complejidad floral (Stout *et al.* 1998) y las densidades de cada morfo (Stout *et al.* 1998).

En un estudio realizado por Ornelas y colaboradores (2004a), se determinó la eficiencia de distintas especies de colibríes como vectores de polen entre los morfos florales de una población de la planta distílica *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). Detectaron que los recursos para atraer y recompensar a los polinizadores en términos de producción de néctar difieren entre los morfos florales así como la producción de semillas y frutos. Estas diferencias en esfuerzo reproductivo resultaron muy marcadas en las plantas de morfo con estilos cortos lo que, según los autores, sugiere que los polinizadores ejercen presiones de selección en las características florales.

Aunque los resultados de Ornelas y colaboradores (2004a) sugieren que los colibríes pueden funcionar como una fuerza de presión selectiva, asociada con las diferencias entre morfos florales en rasgos específicos relacionados con la atracción y recompensa, la variación espacial y temporal sobre la intensidad de esta interacción se desconoce. Las preferencias por algún morfo particular pueden variar de sitio en sitio, entre diversos grupos de polinizadores y entre épocas del año, y es probable que tal variación pueda llevar a un aislamiento reproductivo de los morfos (Waser 1978). De este modo, poblaciones de plantas distílicas distribuidas en un gradiente altitudinal y latitudinal

pueden estar sujetas a distintos arreglos de visitantes florales y condiciones ambientales contrastantes, lo cual puede llevar a distintos patrones de flujo de polen entre morfos y, por consiguiente, a que la condición de género entre poblaciones sea desigual. El propósito de este estudio fue examinar los factores que pueden influir en la fuerza o en la dirección de selección de los polinizadores sobre los morfos pin y thrum y por tanto la influencia de la polinización, como factor ecológico, en el sistema reproductivo de la heteroestilia. Para ello, evaluamos en cada población, la variación en algunas características florales que funcionan en la atracción de polinizadores en dos poblaciones de la planta distílica *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae): (1) la producción y calidad de néctar así como (2) la fenología (numero de botones, flores) y diferencias en el éxito reproductivo entre morfos (numero de frutos), (3) el grado de hercogamia, (4) la composición taxonómica del ensamblaje de los colibríes polinizadores y su conducta de forrajeo y, (5) los patrones de flujo y deposición de polen.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Sitio de estudio**

Para evaluar si la selección en las poblaciones de *B. ternifolia* varía en una escala local, el trabajo de campo fue realizado simultáneamente en dos poblaciones (400 plantas) de *B. ternifolia*. Para tener poblaciones con condiciones ambientales contrastantes, y con un crecimiento abundante de *B. ternifolia* se eligió ubicar una población en un Parque Nacional y la otra en un área fuertemente perturbada del centro de Tlaxcala, México en los meses de mayo a septiembre de 2004. En ambos sitios nuestras áreas de estudio fueron de 50 m<sup>2</sup> debido a que en esa extensión se encontraban principalmente las plantas de *B. ternifolia*. La primera población se ubicó en el Parque Nacional “La Malinche” (19°6’N, 98°20’O, 2,900 ms.n.m) Es un área natural protegida compuesta principalmente por bosques de pino, encino y oyamel (45,711 ha), localizada a 80 km de Tlaxcala, Tlax. La precipitación media anual es de 800 mm y la temperatura media anual es de 15°C. El clima es templado y húmedo la mayor parte del año, con una temporada seca y fría de octubre a febrero. La vegetación está representada principalmente por *Pinus montezumae*, *P. pseudostrobus*, *Abies religiosa* (Pinaceae), *Quercus laurina* y *Q. crassipes* (Fagaceae). La segunda población se ubicó en Acuitlapilco (19°17’N, 98°14’O, 2,200 ms.n.m) es un área suburbana localizada a 3 km de la ciudad de Tlaxcala, Tlax. La precipitación media anual en la zona es de 900 mm y su temperatura media anual es de 16°C. El clima es templado y húmedo la mayor parte del año, con una temporada seca y fría de noviembre a marzo. Esta área ha sido fuertemente perturbada y está conformada por remanentes de bosque dominados por *Pinus leiophylla* (Pinaceae) y árboles introducidos de *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae).

### **Especie estudiada**

*Bouvardia ternifolia*: (Cav.) Schlecht. (Rzedowski y Rzedowski 1985) pertenece a la familia Rubiaceae. Es una herbácea distílica, con sistema de autoincompatibilidad. Ampliamente distribuida en áreas perturbadas del Valle de México, Oaxaca y de Sonora a Texas. Las flores tienen corolas fusionadas formando una estructura tubular. Con inflorescencias agrupadas en cimas terminales de 3 a 40 flores las cuales duran de 4 a 5 días y cambian de color escarlata a rojo pálido o rosa por el tercer día. Anteras de 2 a 4 mm de largo; cápsulas de 4,5 a 9 mm de largo y 5 a 10 de ancho. Conocida como “trompetilla”, la especie presenta crecimiento rápido de las plántulas en lugares abiertos con sustrato rico y bien drenado en zonas con climas templados, secos y semi-secos. Se encuentra desde los 2250 m hasta los 3000 ms.n.m. en bosques, matorrales y pastizales. Se le atribuyen propiedades curativas contra la disentería y la rabia. El género comprende treinta especies (Rzedowski y Rzedowski 1985)

### **Fenología y éxito reproductivo de *Bouvardia ternifolia***

Puesto que la floración en La Malinche comenzó un mes antes que en Acuitlapilco, se marcaron al azar 20 plantas de cada morfo en la población de La Malinche a mediados del mes de mayo y a mediados de junio en la población de Acuitlapilco. Para cada planta marcada se evaluó quincenalmente y hasta el final de la floración el (1) número de botones florales, (2) número de flores y (3) número de frutos.

### **Cuantificación de la hercogamia**

Para evaluar la posición de estilos y anteras en las flores de ambos morfos (grado de hercogamia) en el mes de agosto se colectaron 400 flores de diferentes individuos de *B. ternifolia* (100 flores/morfo/sitio) y se hicieron mediciones, utilizando un vernier digital

graduado en una escala de 0.01 mm para determinar las longitudes de las siguientes partes florales: (1) tubo de la corola, (2) filamento de la antera, (3) lóbulo de la antera, (4) filamento del estigma, (5) lóbulo del estigma, y (6) abertura de la corola. Estas medidas se utilizaron para determinar diferencias entre las partes florales. Adicionalmente, se obtuvieron fotografías con microscopía electrónica para identificar las características de otras partes florales como la superficie del grano de polen y del estigma. La reciprocidad relativa entre las longitudes de anteras y estilos para ambos morfos fue determinada mediante el índice de reciprocidad ( $R$ ),  $R = (A-S)/(A+S)$ ; en donde  $A$  es la longitud de las anteras de un morfo y  $S$  es la longitud de las anteras del morfo alternativo. La reciprocidad perfecta se presenta cuando  $R$  sea igual a 0 y no perfecta cuando se registran valores diferentes de éste. (Richards y Koptur 1993).

### **Producción de néctar**

Para determinar la cantidad y calidad de la recompensa ofrecida a los polinizadores por ambos morfos florales se cuantificó mediante la técnica de cosecha en pie (que permite saber la disponibilidad temporal de néctar), la cantidad de néctar presente en las flores en distintos horarios. Durante el periodo de junio a septiembre, en cada sitio se midieron 10 flores de cada morfo, provenientes de diferentes plantas. Las mediciones se realizaron en intervalos de horas en las que observamos se presenta mayor actividad de forrajeo de los colibríes (a las 0900, 1100, 1300 y 1500 h) y en las cuales se ha determinado existe una constante correspondencia entre la cantidad de néctar y la actividad de los polinizadores (Cruden *et al.* 1983). En la población de La Malinche se hicieron mediciones de 1,110 flores (555 flores por morfo). Para la población de Acuitlapilco se obtuvieron mediciones de 320 flores (160 flores por morfo) debido a que la floración en este sitio ocurrió después que en la población de La Malinche y fue

poco abundante.

El volumen de néctar y la concentración de azúcar (porcentaje de sucrosa) fueron determinados al extraer el néctar usando micropipetas graduadas de 5  $\mu$ l. Con un vernier digital medimos la distancia recorrida por el néctar dentro de la pipeta (en milímetros), los datos fueron posteriormente convertidos a microlitros. Para determinar la concentración de azúcar, las muestras fueron analizadas utilizando un refractómetro portátil (American Optical 10431, escala de 0° a 50°. Búfalo, Nueva York, EUA) que da una lectura en grados Brix. La cantidad de azúcar producida expresada en el refractómetro fue transformada después a miligramos.

### **Evaluación de los visitantes florales y patrones de forrajeo**

Si el diseño floral (longitud de las corolas y estructuras sexuales de ambos morfos) de *B. ternifolia* muestra una distilia perfecta y los morfos ofrecen cantidades de néctar similares, el tiempo de forrajeo o la frecuencia de visita de sus polinizadores no debería variar entre morfos florales. Para probar esto, en el mes de junio, durante el pico de floración de esta especie, se llevaron a cabo en cada sitio observaciones continuas de 0800 a 1200 h sobre parches florales (conformados aproximadamente por 10-50 plantas) durante tres días consecutivos (14, 15 y 16 de mayo). Las observaciones se enfocaron en colibríes por ser los más numerosos visitantes y los principales polinizadores en esta especie (Lara 2006). Los datos de la conducta de forrajeo de colibríes fueron colectados cuando *B. ternifolia* era abundante y constituía el principal recurso alimenticio en ambas zonas. Las observaciones se realizaron cerca de los parches florales para llevar una cuidadosa observación sin interferir con los colibríes visitantes. Al comenzar el registro de las observaciones se ponían los cronómetros en tiempo cero y los subsecuentes eventos de forrajeo se marcaron como minutos después

de ese primer tiempo. Un evento fue definido como el arribo de cualquier colibrí a una de las flores de la planta. Para cada planta focal se anotó (1) hora de la observación, (2) tiempo transcurrido hasta la visita de un colibrí, (3) especie de colibrí, y (4) el número de flores visitadas por cada colibrí. Dichas observaciones permitieron identificar las especies de colibríes que componen los visitantes de la planta y sus patrones de forrajeo en ambos morfos florales.

### **Conteo y análisis del polen**

En el mes de septiembre, para evaluar el flujo de polen intermorfo, a un total de 120 flores (30 por morfo por sitio) se les cortaron cuidadosamente los estilos y se les fijó en portaobjetos utilizando una gelatina hecha con grenetina (3.5 g), glicerol (25 ml), ácido fénico (1 g), y agua purificada (21 ml). La preparación fue puesta en un microscopio compuesto y el número de granos de polen presentes en los estigmas fueron determinados con el aumento \* 40 de un microscopio Carl Zeiss A \* 100.

Para evaluar diferencias en los granos de polen, así como en los estigmas, se tomaron fotografías de sus superficies utilizando fotografía electrónica. Para poder fotografiar mediante esta técnica el material debe ser desecado primero por lo que flores de los morfos pin y thrum fueron fijadas en FAA (formol, ácido acético y alcohol etílico), después de 48 h el material fue lavado por dos horas y posteriormente deshidratado en una serie de alcoholes graduales a partir del alcohol absoluto para finalmente cubrirlo con oro puesto que la fotografía electrónica utiliza la reflexión de los átomos de oro para obtener mejores imágenes de la superficie del material expuesto.



## **Análisis estadístico**

Debido a las diferencias en la duración de la fenología de *Bouvardia ternifolia* en los sitios estudiados, la variación entre los morfos pin y thrum en el número de botones y flores producidos a lo largo del estudio fue analizada para cada sitio a través de un ANDEVA de medidas repetidas de un factor. Asimismo, el número de frutos producidos por morfo en cada sitio fueron evaluadas utilizando un ANDEVA de dos factores.

Las diferencias entre morfos y sitios en la longitud de corola, anteras, estilos y abertura de corola fue analizado con un ANDEVA de dos factores. El análisis de los volúmenes de néctar registrados en los distintos horarios para cada morfo y sitio, fue analizado con un ANDEVA de tres factores.

Se utilizó un análisis de sobrevivencia para evaluar las visitas de colibríes en cada morfo y sitio, debido a que los periodos de observación fueron muy cortos para que todos los posibles eventos ocurran. Para estos datos, el tiempo actual de ocurrencia no es conocido, solamente una mínima longitud de tiempo durante el cual los eventos no ocurrieron (datos censurados). Si un evento ocurrió para una planta dada, entonces se vuelve un evento no censurado, y si nunca ocurrió, se vuelve dato censurado. Usamos el método no-paramétrico Kaplan-Meier product-limit para el análisis de la probabilidad de que un colibrí no haya visitado una planta 240 min después de iniciada la observación, y el estadístico logrank (Mantel-Cox) se usó para probar diferencias en las visitas realizadas entre morfos y sitio, y colibríes. Las diferencias en el número de flores visitadas en cada morfo y sitio fueron analizadas a través de un ANDEVA de dos factores.

La variación en el número de granos de polen presentes en estigmas de ambos morfos y en cada sitio fue analizada con un ANDEVA de dos factores.

Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo usando modelos lineales generalizados con StatView (Abacus concepts 1996). Los datos en cada análisis fueron

transformados mediante raíz cuadrada o logaritmo base diez, según fue necesario. Presentamos las figuras con datos transformados, en donde las gráficas corresponden a promedios  $\pm$  1 error estándar.

## **RESULTADOS**

### **Fenología y éxito reproductivo de *Bouvardia ternifolia***

La floración de *Bouvardia ternifolia* fue muy abundante en la población de La Malinche. En esta localidad observamos que el periodo reproductivo de la herbácea inicia a finales de abril extendiéndose hasta finales de septiembre. La mayor cantidad de flores maduras (i.e. en antesis) se presenta en junio en La Malinche y en julio en Acuitlapilco.

Las evaluaciones quincenales realizadas a las plantas marcadas en ambas poblaciones demostró que con respecto al número de botones, no existen diferencias entre morfos (79 pin respecto a 85 thrum), sitios, ni entre la interacción de estos factores (**Tabla 1a, Figura 1a**). Sin embargo, encontramos diferencias significativas en el número de flores producidas entre morfos ( $F=18.36$ ,  $gl=1$ ,  $P<0.0001$ ) siendo el morfo thrum el que, en promedio, produjo más flores (19.72), sitios ( $F=10.74$ ,  $gl=1$ ,  $P<0.0014$ ) siendo La Malinche la población en donde, en promedio, se produjeron más flores (31.79 respecto a 22.28 en Acuitlapilco) y su interacción ( $F=8.55$ ,  $gl=1$ ,  $P<0.0041$ ) (**Tabla 1b, Figura 1b**). El número de frutos producidos por morfo en cada sitio no presentó diferencias estadísticamente significativas aunque es en el mes de agosto en La Malinche en donde se registró la totalidad de los frutos mientras que en la población de Acuitlapilco la producción de frutos se presentó de junio a agosto. El promedio de la producción de frutos de los morfos thrum y pin en La Malinche fue de 71.10 y 28.08, respectivamente mientras que los promedios de los mismos morfos en Acuitlapilco fueron de 41.23 y 81.52, respectivamente (**Tabla 2, Figura 1**).

### **Medidas morfométricas y hercogámia**

El análisis de las mediciones morfométricas de las flores colectadas a lo largo del estudio, demostró que existen diferencias significativas entre sitios, morfos, y la interacción sitio y morfo, con respecto a la longitud de las anteras, estilos y corolas. Asimismo, la abertura de la corola de las flores fue significativamente distinta entre sitios y morfos, pero la interacción entre sitio y morfo con respecto a esta variable fue no significativa (**Tabla 4**). Tampoco se registraron diferencias cualitativas entre las superficies del grano de polen y del estigma de los morfos pin y thrum (**Figura 7**). Se pueden consultar ejemplares de *B. ternifolia* que fueron colectados en los sitios de estudio y depositados en el herbario de la Facultad de Ciencias UNAM con los números de registro 97091 y 97092, y en el Herbario Nacional del Instituto de Biología de la misma universidad, con los números de registro 1174609, 1174610 y 1174611.

El cálculo del índice de reciprocidad relativa ( $R$ ) demostró que las longitudes de anteras y estilos de los morfos pin y thrum se corresponden recíprocamente un 0.072 en La Malinche y un 0.059 en la población de Acuitlapilco. Los índices de reciprocidad estimados para ambas poblaciones son cercanos a los encontrados en otras especies distílicas, sin embargo, el índice estimado para La Malinche resulta menos recíproco respecto al de Acuitlapilco (comparar en Richards y Koptur 1993). Estos resultados sugieren que las longitudes de los órganos reproductivos de *B. ternifolia* son recíprocamente hercogámicos en Acuitlapilco pero no tanto en La Malinche. como se puede apreciar en la **Figura 2**.

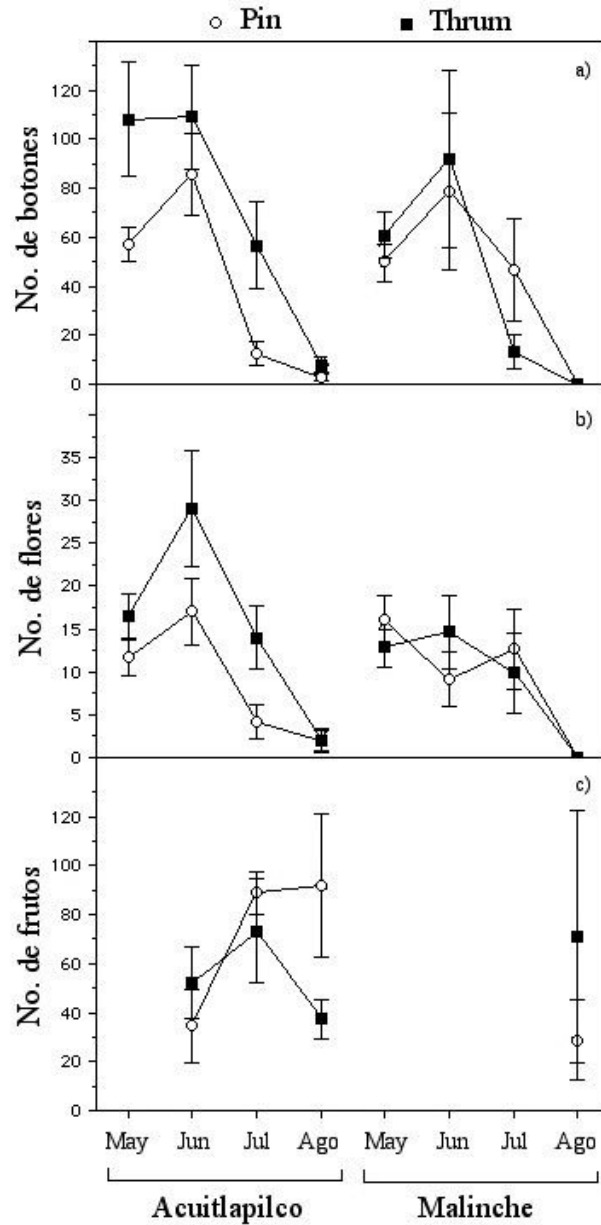
**Tabla 1.** Resultados del ANDEVA de medidas repetidas para el (A) número de botones florales y

(B) flores de *Bouvardia ternifolia*, como una función del morfo floral y sitio. En negritas se señalan los valores de  $P < 0.05$ .

Fuente	gl	CM	F	P
(A) Número de botones florales				
Variación entre plantas				
Morfo	1	0.43	0.90	0.342
Sitio	1	0.09	0.20	0.650
Morfo * Sitio	1	0.01	0.02	0.873
Variación dentro de las plantas				
Mes	3	45.93	102.12	<b>0.001</b>
Mes * Morfo	3	0.20	0.45	0.71
Mes * Sitio	3	1.23	2.73	0.04
Mes * Morfo * Sitio	3	0.61	1.37	0.25
Residual	225	0.45		
(B) Número de flores				
Variación entre plantas				
Morfo	1	0.009	18.36	<b>0.0001</b>
Sitio	1	0.005	10.74	<b>0.0014</b>
Morfo * Sitio	1	0.004	8.55	<b>0.0041</b>
Variación dentro de las plantas				
Mes	3	14.86	41.60	<b>0.001</b>
Mes * Morfo	3	0.16	0.46	0.706
Mes * Sitio	3	1.38	3.88	<b>0.009</b>
Mes * Morfo * Sitio	3	0.72	2.02	0.111
Residual	255	0.35		

**Tabla 2.** Resultado del ANDEVA de dos factores para el número de frutos producidos por los morfos pin y thrum de *Bouvardia ternifolia* en Acuitlapilco y La Malinche.

Fuente	gl	CM	F	P
Morfo	1	0.69	1.00	0.319
Sitio	1	1.71	2.49	0.119
Morfo * Sitio	1	0.44	0.64	0.426
Residual	67	0.68		



**Figura 1.** Variación en a) número de botones florales, b) flores y c) frutos de *Bouvardia ternifolia*, como una función del morfo floral y sitio a lo largo de la temporada de floración en Acuitlapilco y La Malinche en 2004.

**Tabla 3.** Medidas morfométricas (mm  $\pm$  e.e.) tomadas a flores de los morfos pin y thrum de *B. ternifolia* en Acuitlapilco y La Malinche. Las flores del morfo thrum fueron similares en

ambas poblaciones, no así las del morfo pin las cuales son más pequeñas en La Malinche (~3 mm en antera, estilo y corola) (n=100 flores/sitio/morfo).

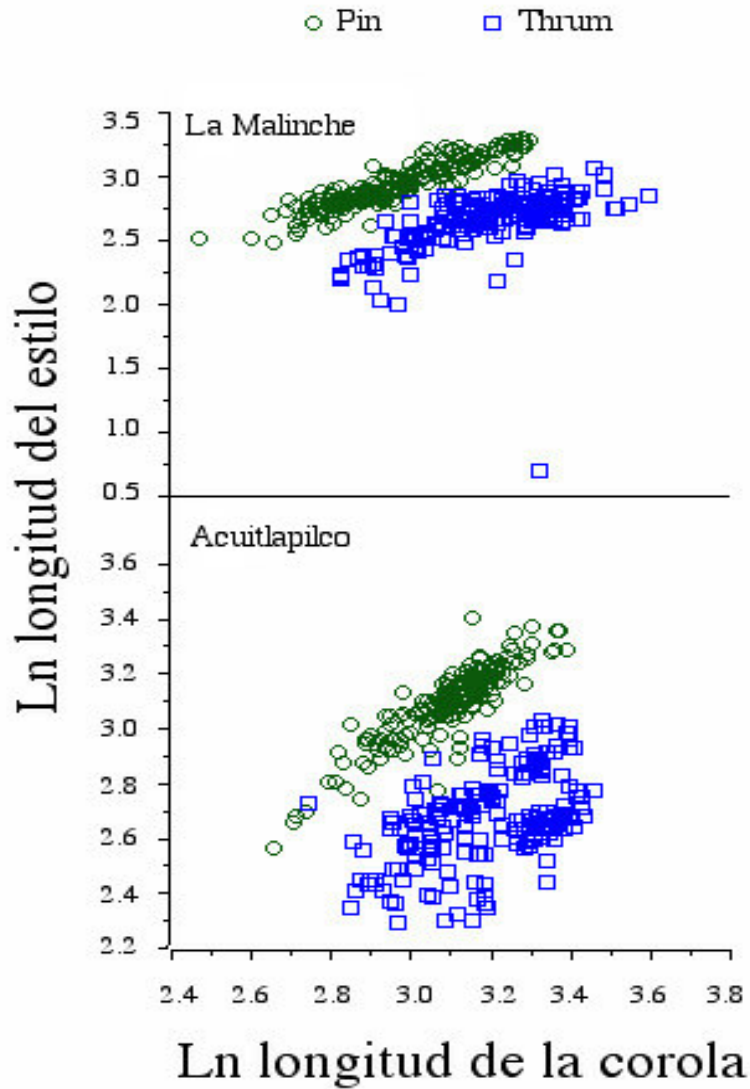
Longitud	La Malinche		Acuitlapilco	
	Pin	Thrum	Pin	Thrum
Antera	14.53 ± 0.17 <sup>a</sup>	21.51 ± 0.25 <sup>b</sup>	17.24 ± 0.15 <sup>b</sup>	21.53 ± 0.25 <sup>b</sup>
Estilo	19.46 ± 0.25 <sup>a</sup>	14.64 ± 0.18 <sup>b</sup>	22.38 ± 0.19 <sup>a</sup>	14.63 ± 0.16 <sup>b</sup>
Corola	19.93 ± 0.23 <sup>a</sup>	24.87 ± 0.27 <sup>b</sup>	22.22 ± 0.18 <sup>b</sup>	24.37 ± 0.26 <sup>b</sup>
Abertura	2.06 ± 0.03 <sup>a</sup>	2.35 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.73 ± 0.03 <sup>b</sup>	1.85 ± 0.03 <sup>b</sup>

Letras diferentes denotan diferencias significativas con  $P < 0.05$ .



**Tabla 4.** Resultados de las pruebas de ANDEVA de dos factores para la variación entre sitios y morfos para (a) longitud de la antera, (b) longitud del estilo, (c) longitud de la corola, y (d) abertura de la corola. En negritas se señalan los valores de  $P < 0.05$ .

Fuente de variación	g.l.	<i>F</i>	<i>P</i>
<b>(a) Longitud de la antera</b>			
Sitio	1	49.84	<b>&lt;0.001</b>
Morfo	1	663.35	<b>&lt;0.001</b>
Sitio * Morfo	1	67.31	<b>&lt;0.001</b>
Error	796		
<b>(b) Longitud del estilo</b>			
Sitio	1	37.09	<b>&lt;0.001</b>
Morfo	1	788.61	<b>&lt;0.001</b>
Sitio * Morfo	1	30.46	<b>&lt;0.001</b>
Error	796		
<b>(c) Longitud de la corola</b>			
Sitio	1	19.41	<b>&lt;0.001</b>
Morfo	1	208.71	<b>&lt;0.001</b>
Sitio * Morfo	1	39.30	<b>&lt;0.001</b>
Error	796		
<b>(d) Abertura de la corola</b>			
Sitio	1	111.51	<b>&lt;0.001</b>
Morfo	1	24.73	<b>&lt;0.001</b>
Sitio * Morfo	1	2.44	0.118
Error	796		



**Figura 2.** Relación entre la longitud del estilo y la longitud de la corola de flores con estilos cortos

y anteras que alcanzan el largo de la corola (morfo thrum) y flores con estilos largos que se

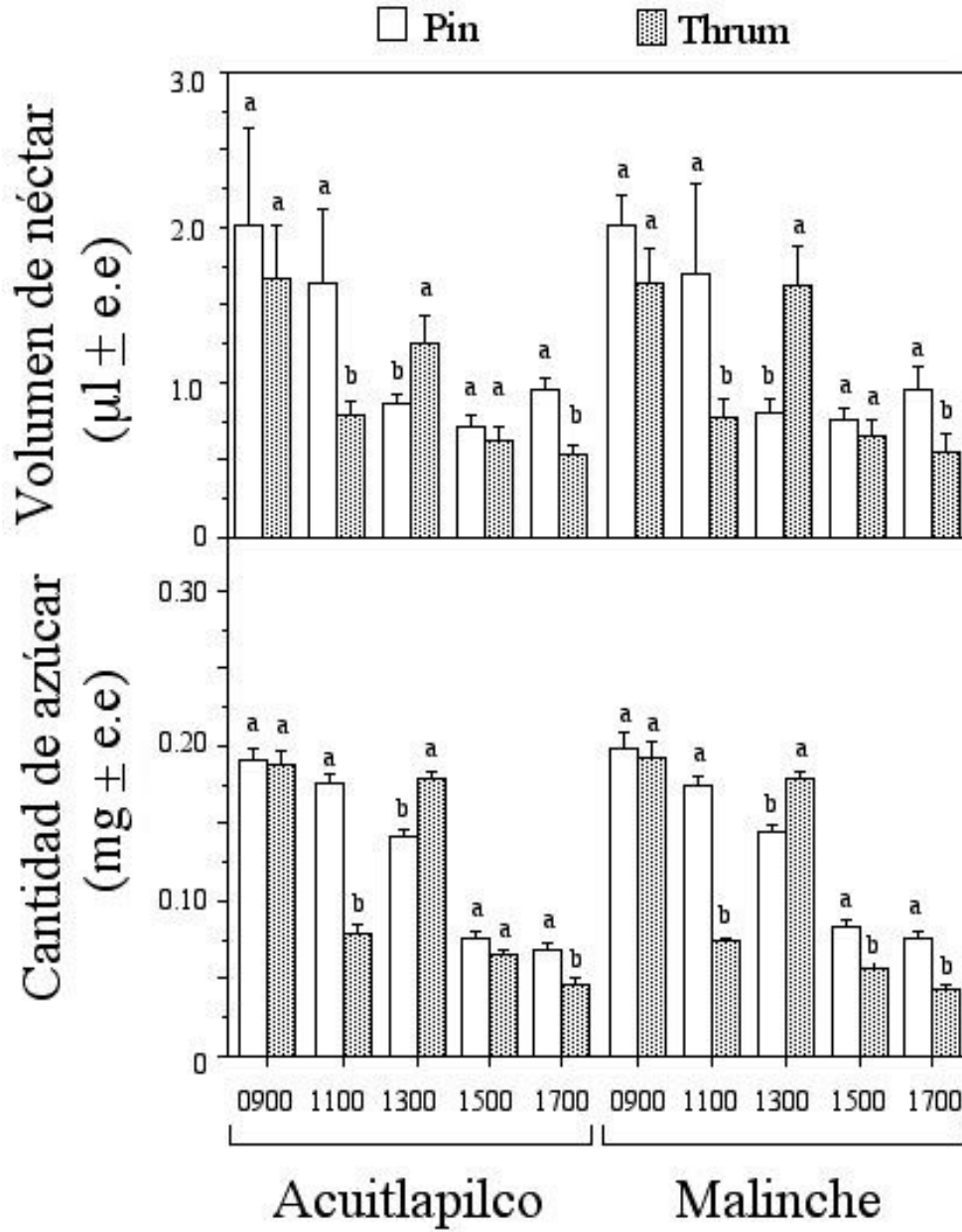
extienden más allá de la corola y anteras por debajo de esta (morfo pin) de *B. ternifolia*, colectadas en La Malinche y en Acuitlapilco en el 2004. (n=100 flores/sitio/morfo).

### **Volumen y calidad del néctar**

Hubo un efecto significativo de ambos morfos en los volúmenes de néctar cuantificados en flores de plantas ( $F= 4.34$ ,  $gl= 1$ ,  $P <0.037$ ) aunque esta variación no es afectada por el sitio en donde las plantas crecen. En ambas poblaciones el morfo pin es el que produce significativamente más néctar con un máximo de  $2 \mu\text{l}$  y un mínimo de  $1\mu\text{l}$  respecto al morfo thrum el cual tuvo un máximo de  $1.7 \mu\text{l}$  y un mínimo de  $0.5$ . Asimismo, independientemente del morfo y sitio en donde se realizaron las cuantificaciones, los volúmenes de néctar variaron significativamente con respecto al horario; el morfo thrum tiene dos picos de producción de néctar a las 0900 y a las 1300 h mientras que el morfo pin presentó la mayor producción desde las 0900 hasta las 1100 h. No encontramos un efecto de la interacción entre morfo y sitio, y sitio y horario, aunque la interacción entre morfo y horario fue estadísticamente significativa ( $F= 6.07$ ,  $gl= 4$ ,  $P <0.001$ ). La interacción entre el factor morfo, sitio y horario tampoco fue significativa (**Figura 3, Tabla 5a**).

La variación en la concentración de azúcar en néctar para cada morfo ( $F= 0.71$ ,  $gl= 1$ ,  $P <0.001$ ) y horario ( $F= 0.004$ ,  $gl= 4$ ,  $P <0.001$ ) fue estadísticamente significativa, pero no con respecto al sitio. El morfo thrum tiene dos picos de concentración de néctar a las 0900 y a las 1300 h mientras que el morfo pin presentó la mayor concentración de azúcar en el néctar desde las 0900 hasta las 1300 h. Asimismo, la interacción de los factores morfo y sitio, y sitio y horario fue no significativa, aunque si la interacción entre morfo y horario ( $F= 0.004$ ,  $gl= 4$ ,  $P <0.001$ ). La interacción entre morfo, sitio y horario mostró diferencias no significativas con respecto a las concentraciones de azúcar estimadas (**Figura 3, Tabla 5b**). Los resultados obtenidos sugieren que la producción y calidad del néctar es distinta entre morfos florales, y que esta variación es afectada por la hora del día, independientemente del sitio en donde las flores se

desarrollan.



**Figura 3.** Variación en el volumen de néctar (µl) (arriba) y la concentración de azúcar en néctar (miligramos de azúcar/mililitros de solución) (abajo) obtenidos en la cosecha en pie por morfo, sitio y horario para *B. ternifolia* en diferentes horarios a lo largo de la temporada de floración del 2004. Letras diferentes denotan diferencias significativas.

**Tabla 5.** Resultados de las pruebas de ANDEVAs de tres vías, para la variación en (a) volumen de néctar ( $\mu\text{l}$ ) y (b) concentración de azúcar (miligramos de azúcar/mililitros de solución) por morfo, sitio y horario. En negritas se señalan los valores de  $P < 0.05$ .

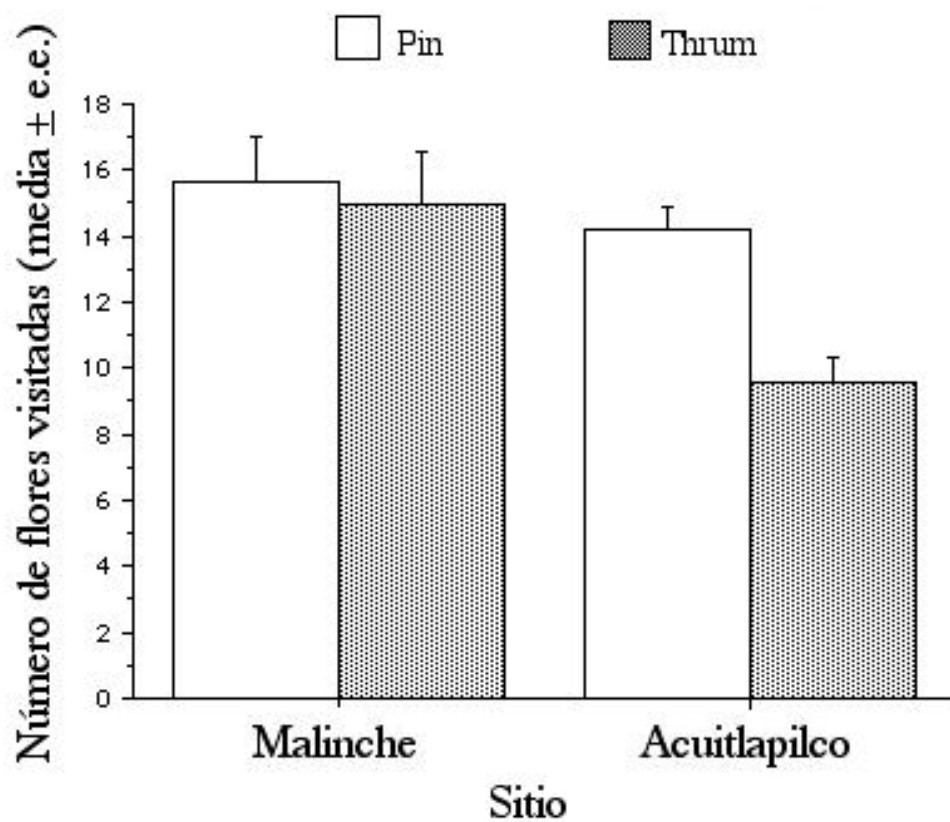
Fuente de variación	g.l.	<i>F</i>	<i>P</i>
<b>(a) Volúmen de néctar</b>			
Morfo	1	4.34	<b>0.037</b>
Sitio	1	0.34	0.560
Horario	4	17.45	<b>0.001</b>
Morfo * Sitio	4	0.003	0.985
Morfo * Horario	4	6.07	<b>0.001</b>
Sitio * Horario	4	0.73	0.569
Morfo * Sitio * Horario	4	0.80	0.522
Error	380		
<b>(b) Concentración de azúcar</b>			
Morfo	1	0.71	<b>&lt;0.001</b>
Sitio	1	2.69	0.654
Horario	4	0.004	<b>&lt;0.001</b>
Morfo $\times$ Sitio	4		0.170
Morfo $\times$ Horario	4		<b>&lt;0.001</b>
Sitio $\times$ Horario	4		0.9326
Morfo $\times$ Sitio $\times$ Horario	4		0.790
Error	380		

### **Evaluación de los visitantes florales y patrones de forrajeo**

Los principales visitantes de *B. ternifolia* en ambos sitios de estudio fueron colibríes. Para el sitio de La Malinche observamos cinco especies que se alimentaban del néctar de esta planta: *Archilocus colubris*, *Colibri talassinus*, *Eugenes fulgens*, *Hylocharis leucotis* y *Lampornis clemenciae*; en el sitio de Acuitlapilco fueron sólo dos especies las que visitaron las plantas de *B. ternifolia*: *Calothorax lucifer* e *Hylocharis leucotis*.

El análisis del número de visitas de colibríes a las flores de las plantas observadas demostró que los colibríes de La Malinche realizan un mayor número de visitas que los colibríes registrados en Acuitlapilco ( $F=7.53$ , g.l.=1,  $P=0.006$ ). Asimismo, independientemente del sitio de estudio, los colibríes realizan un mayor número de visitas a las flores del morfo pin ( $F=4.48$ , g.l.=1,  $P=0.034$ ; **Figura 4**). La interacción entre sitio y morfo fue no significativa para explicar el número registrado de visitas a las flores ( $F=7.53$ , g.l.=1,  $P=0.11$ ).

El análisis de sobrevivencia de las visitas de colibríes cuantificadas para cada morfo en Acuitlapilco y La Malinche demostró que los colibríes, en general, visitan más rápido las flores del morfo pin en ambos sitios (**Figura 5**). Al agrupar a los colibríes visitantes en especies de pico corto (*Archilochus colubris*, longitud de pico: 14-19 mm; *Hylocharis leucotis*: 16-20 mm) y los de pico largo (*Colibri thalassinus*: 21-23 mm, *Eugenes fulgens*: 21-30 mm y *Lampornis clemenciae*: 22-24 mm), el análisis de sobrevivencia determinó que las flores del morfo pin en ambos sitios son visitadas más rápido por colibríes de picos cortos (**Figura 5**).



**Figura 4.** Comparación entre el número de flores de *B. ternifolia* visitadas por colibríes en cada morfo y sitio. Las barras muestran la media  $\pm$  EE.



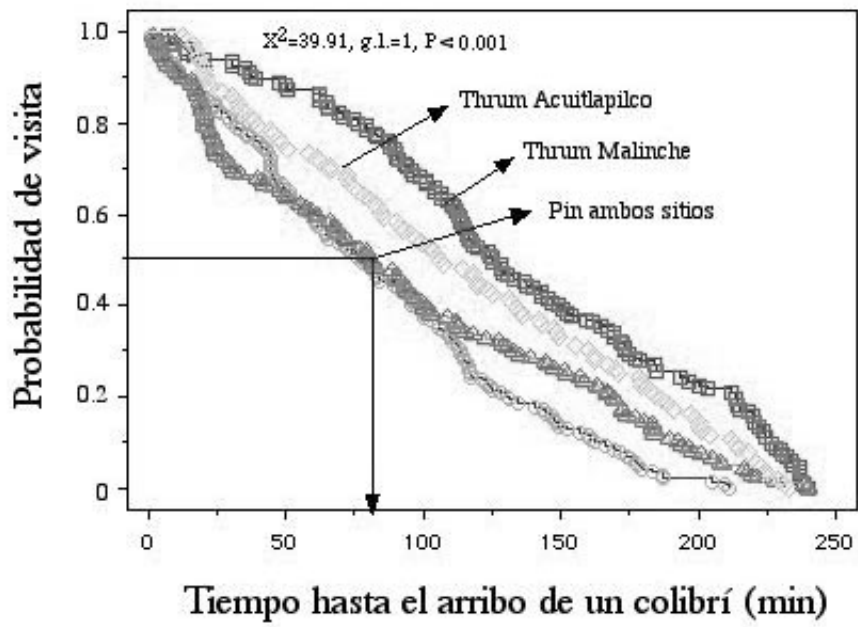
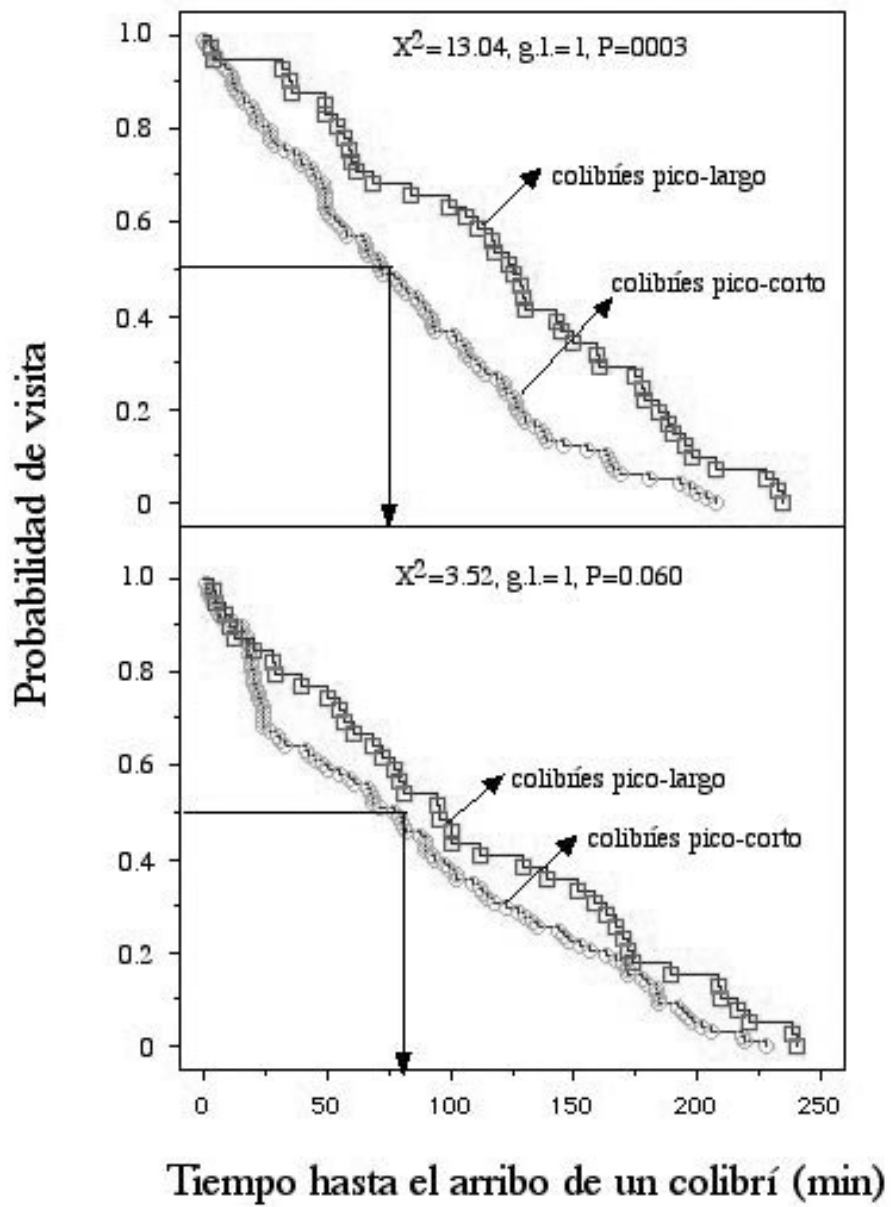


Figura 5a. Tiempos de arribo de colibríes a las flores de ambos morfos de *B. ternifolia*

en

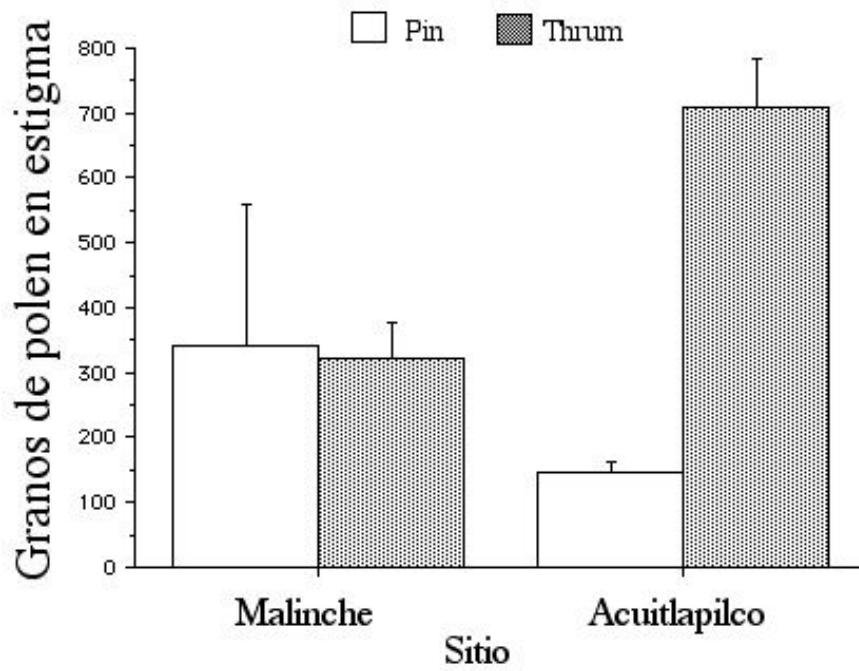
las poblaciones estudiadas.



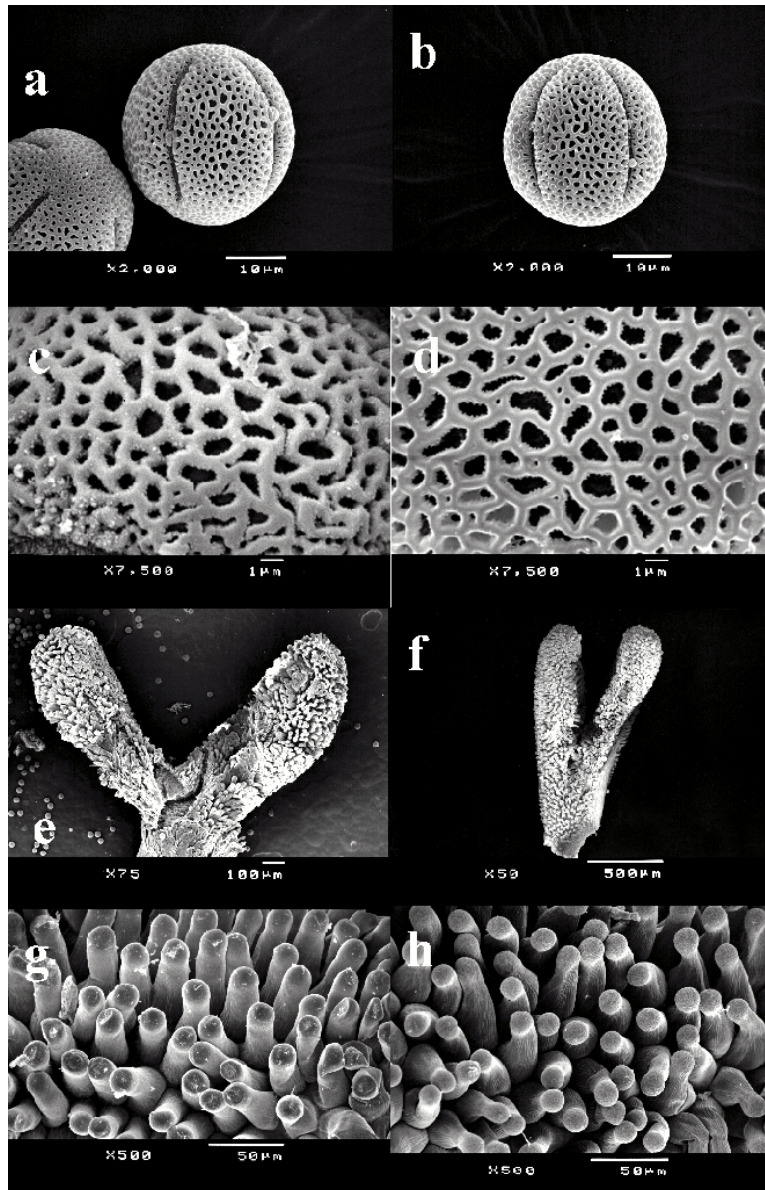
**Figura 5b.** Tiempos de arribo de colibríes de pico corto y largo visitando flores del morfo pin en en ambos sitios.

**Deposición de polen**

La cuantificación del número de granos de polen en los estigmas de flores mostró que existen diferencias significativas con respecto al sitio en donde las flores fueron colectadas ( $F_{1,107}=22,72$ ,  $P <0.001$ ) y del morfo floral en que se realizaron las cuantificaciones ( $F_{1,107}=55,10$ ,  $P <0.001$ ). El efecto de la interacción entre el sitio en donde las flores fueron colectadas y el morfo al que pertenecían resultó no significativa ( $F_{1,107}=0.0006$ ,  $P=0.99$ ). Las flores presentes en la población de Acuitlapilco presentaron un mayor número de granos de polen en sus estigmas, resultando en general, para ambos sitios, que las flores del morfo thrum presentaron la mayor deposición (**Figura 6**). Finalmente, las fotografías con microscopía electrónica mostraron que no existe dimorfismo en la ornamentación ni en la exina de los granos de polen (**Figura 7**).



**Figura 6.** Número de granos de polen en los estigmas de flores de los morfos pin y thrum de *B. ternifolia* en Acuitlapilco y La Malinche (n=30 flores/morfo/sitio).



**Figura 7.** Fotografías electrónicas de estructuras de flores con estilos cortos (thrum) y con estilos largos (pin) de flores de *B. ternifolia*. (a) Polen de thrum y (b) pin,; (c) exina del polen en thrum y (d) pin, y;(g) la superficie estigmática en thrum y (h) pin. Estigma de flores (e) thrum y, (f) pin

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran las diferencias espaciales y temporales en los rasgos florales de dos poblaciones del arbusto distílico *Bouvardia ternifolia*, los cuales contribuyen a la atracción y recompensa de sus colibríes visitantes. Nuestros datos demuestran que los morfos florales responden diferencialmente en sus patrones fenológicos, y que la disponibilidad y calidad de sus recursos ofrecidos a sus principales visitantes (los colibríes) varía significativamente a lo largo del día (durante el estudio sólo se registro el arribo de una mariposa *Danaus plexippus plexippus* en la Malinche y de también un individuo de mariposa *Diaethria anna anna* en Acuitlapilco). Las diferencias han sido explicadas como una forma de balancear la asimetría en el flujo de polen que usualmente se presenta en las poblaciones de plantas distílicas (Ornelas *et al.* 2004b).

Aparentemente, este posible desbalance puede ser compensado por el hecho de que las flores de un morfo pueden ser más grandes o producir más néctar (como en nuestro estudio), lo cual parece estar relacionado con una mayor atracción para los colibríes y en consecuencia una mayor deposición y flujo de polen. Este patrón fue observado en nuestro estudio, pues las flores pin, las cuales producen más néctar, fueron más visitadas por los colibríes. Esto podría sugerir que el flujo de polen de este morfo sea mayor. Sin embargo, dado nuestro método para determinar las cargas de polen (debido a la carencia de dimorfismo en los granos de polen de ambos morfos), no podemos determinar si efectivamente el polen de pin está más presente en el morfo opuesto y viceversa. Futuros estudios deben considerar el uso de colorantes especiales para poder hacer distinción del morfo del polen cuantificado.

Las diferencias asimétricas entre morfos en el volumen y la calidad de las recompensas colectadas a través del día pueden explicar los patrones de visitas por

colibríes cuantificados para estas poblaciones. Aún cuando las diferencias sexuales en la producción y calidad del néctar ofrecido a los visitantes florales han sido documentadas en muchas especies protándricas y dioicas (Devlin y Stephenson 1985, Klinkhamer y de Jong 1990, Aizen y Basilio 1998), pocos trabajos ha reportado estas diferencias en plantas distilicas (p. ej.: Contreras y Ornelas 1999, Leege y Wolfe 2002, Ornelas *et al.* 2004b). La variación en estos patrones de secreción de néctar asociados con los rasgos florales intrínsecos pueden representar la respuesta evolutiva a diversas presiones selectivas impuestas por los requerimientos de los polinizadores, tal como ha sido sugerido por los trabajos de Aizen y Basilio (1998) y Ornelas *et al.* (2004b con *Palicourea padifolia*). Las diferencias registradas en ambos morfos florales en la producción de néctar, en donde las flores pin secretan más néctar que las thrum en algunos horarios y viceversa, se puede traducir en una mayor tasa de visitas por polinizadores a determinado morfo dependiendo de la hora del día, lo cual fue corroborado con los registros de observación de visitas por colibríes. Sin embargo, resulta interesante que, a pesar de estas diferencias entre morfos en cuanto a recompensas, el número de visitantes, la deposición de polen y el éxito reproductivo cuantificado sean semejantes. A pesar de que los colibríes parecen responder a las diferencias en la disponibilidad de néctar en los morfos florales, su efecto sobre la adecuación de cada morfo no puede ser respondido en este estudio. Se requieren estudios que simulen artificialmente las visitas de colibríes en cada morfo, controlando las cargas de polen, para dilucidar este aspecto.

Nuestras observaciones sobre el forrajeo de colibríes en ambos morfos sugieren que las plantas del morfo pin tienen una mayor probabilidad de ser visitadas primero que las plantas del morfo thrum, hecho que posiblemente se deba a la mayor producción de néctar en las primeras horas de la mañana. Esto puede resultar en más polen

transportado en dirección pin-thrum, lo cual podría estar sugiriendo el número de granos de polen cuantificado en las flores del morfo thrum. Asimismo, el número de flores cuantificado en este estudio fue significativamente distinto entre los morfos florales, lo que nuevamente sugiere una atracción desigual en cuanto a visitantes florales.

En nuestro estudio, además de encontrar diferencias en las longitudes de las corolas, encontramos que las longitudes de anteras y estilos de flores colectadas en La Malinche son inusualmente recíprocas. Varios estudios han documentado divergencia dentro y entre especies de plantas coexistentes en rasgos relacionados al uso por polinizadores tales como el color de las flores, la producción de néctar, la morfología y la fenología (Ganders 1979, Ree 1997, Ornelas *et al.* 2004a; 2004b). Es probable que las diferencias en las longitudes de las corolas y las estructuras sexuales de las plantas de La Malinche puedan estar respondiendo a las presiones que ejercen los polinizadores, ya que las flores de la población de La Malinche son visitadas por más especies de colibríes que las de las plantas de Acuitlapilco, en la cual las estructuras sexuales de las flores están dispuestas como en aquellas especies distílicas que sí son recíprocamente hercogámicas (Richards y Koptur 1993). Cinco especies de colibríes visitan en La Malinche a *B. ternifolia*: *Archilocus colubris*, *Colibri talassinus*, *Eugenes fulgens*, *Hylocharis leucotis* y *Lampornis clemenciae*, mientras que en el sitio de Acuitlapilco sólo dos especies la visitan: *Hylocharis leucotis* y *Lampornis clemenciae*. Si existe una correlación entre las estructuras florales con las bucales de sus polinizadores tal como ha sido propuesto por Beach y Bawa (1980), y dividimos a los colibríes observados en picos cortos (*Archilochus colubris* e *Hylocharis leucotis*) y picos largos (*Colibri thalassinus*, *Eugenes fulgens* y *Lampornis clemenciae*), deberíamos esperar que tanto en Acuitlapilco como en La Malinche las corolas de las flores responderan a la gama de morfologías de sus polinizadores. Nuestro resultados sugieren que en la población en la



que arriban las cinco especies (Malinche), con variación en sus longitudes de picos, las plantas presentan marcadas diferencias en las longitudes en las corolas de sus flores (menor reciprocidad). En tanto que la reciprocidad de los morfos de *B. ternifolia* en Acuitlapilco puede deberse a que reciben típicamente las visitas de sólo dos especies (una de pico corto y otra con pico largo) por lo que las plantas idóneamente deberían ofrecer sólo dos tipos de morfología que satisfaga a sus polinizadores (mayor reciprocidad entre morfos).

En ambos sitios, los colibríes generalmente visitan más rápido las flores del morfo pin y en ambos sitios, es este morfo al que visitan más rápido los colibríes de pico corto. Considerando que tanto la morfología de la flor del morfo pin como la de los picos de este grupo de colibríes se corresponden, podemos establecer que los colibríes de pico corto visitan preferentemente aquellas flores con corolas que más se adecuan a su tamaño de pico y que ofrecen mejor recompensa, como es el caso de las flores del morfo pin con respecto de las thrum. En este sentido, las plantas del morfo thrum son visitadas tiempo después que las del morfo pin principalmente por colibríes de pico largo.

La producción de frutos determinada para cada morfo en este estudio, sugiere que el éxito reproductivo femenino en ambos morfos es similar. Sin embargo, la carencia de diferencias entre morfos, a pesar de la mayor producción de flores y el mayor número de visitas por parte del morfo thrum, puede tener explicaciones alternativas. Por ejemplo, Ornelas *et al.* (2004b), encontraron que la falta de diferencias en el éxito reproductivo del arbusto distílico *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) puede ser explicada por la acción diferencial en los morfos florales de organismos antagonistas, tales como ladrones de néctar y herbívoros. En este sentido, las flores de *B. ternifolia* son hospederas de ácaros florales de género *Tropicoseius* sp. los cuales pueden disminuir

hasta el 50% la producción de néctar de las flores (Lara y Ornelas 2001), y los herbívoros también tienen un efecto negativo diferencial sobre los morfos (C. Lara, datos no publicados).

Por definición, los taxa distílicos tienen flores de dos distintas morfologías con anteras y estigmas de alturas recíprocas (Darwin 1877, Barret 1990). Las alturas recíprocas de anteras y estigmas son componentes esenciales en los modelos que explican la evolución y mantenimiento de la heteroestilia basados en el mejoramiento del entrecruzamiento (Darwin 1877, Charlesworth y Charlesworth 1979, Lloyd y Webb 1992). Asumiendo que los polinizadores están posicionados en una manera similar cuando visitan las flores pin y thrum, las anteras y estigmas estrictamente recíprocos deberían asegurar que el polen de un morfo floral sea depositado en el cuerpo del polinizador de tal forma que su posición se ajuste a la posición del estigma del morfo floral opuesto. Si esto es cierto, el valor absoluto de las diferencias entre las alturas de anteras y estigmas debería ser la misma en las flores pin y thrum de la misma especie (Faivre y McDade 2001).

Las plantas que evaluamos en este estudio (principalmente en La Malinche) se desvían marcadamente de lo esperado en las especies heterostílicas. Las medidas de estigmas y anteras varía entre individuos del mismo morfo y se traslapa entre morfos en esta población. En consecuencia, la reciprocidad es inusual. Para entender las consecuencias de la falta de reciprocidad en la adecuación de *B. ternifolia*, la morfología floral debe ser ligada al comportamiento de los polinizadores y a la transferencia de polen, tal como lo muestran nuestros resultados. Aunque se espera una fuerte imprecisión en la transferencia de polen entre morfos producto de esta poca reciprocidad, la cuantificación del éxito reproductivo de ambos morfos parece contradecirla. Esto significa que en la evaluación de su impacto en la adecuación de los

morfos florales deben incluirse factores como mortalidad, dispersión y antagonistas para una aproximación más robusta.

En conclusión, nuestros resultados sugieren que los recursos asignados por *B. ternifolia* a la atracción y recompensa de colibríes pueden diferir entre morfos florales y poblaciones de esta especie. En consecuencia, estas diferencias en el esfuerzo reproductivo femenino, en términos de mayor producción de flores y néctar, sugieren que la especialización de género está evolucionando en al menos una de las dos poblaciones evaluadas siendo los polinizadores, en este caso colibríes, los que ejercen una fuerza de presión selectiva en los rasgos florales y vegetativos lo que puede influir en la especialización sexual. Así, el presente estudio es una aportación al conocimiento de las interacciones entre dioecia y el sistema de polinización por colibríes, ya que en la mayoría de los trabajos se han reportado abejas pequeñas o insectos oportunistas como los principales vectores que influyen en una especialización sexual (Charnov 1982)

## LITERATURA CITADA

- Aizen, M. A. y A. Basilio. 1998. Sex differential nectar secretion in protandrous *Alstroemeria aurea* (Alstroemeriaceae): Is production altered by pollen removal and receipt? *American Journal of Botany* 85:245–252.
- Arroyo, J., S. C. H. Barrett, R. Hidalgo y W. W. Cole. 2002. Evolutionary maintenance of stigma-height dimorphism in *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* 89:1242–1249.
- Ávila, S.G. y C. A. Domínguez. 2000. Parental effects and gender specialization in a tropical heterostylous shrub. *Evolution* 54:866–877.
- Barrett, S. C. H. 1990. The evolution and adaptive significance of heterostyly. *Trends in Ecology and Evolution* 5:144–148.
- Barrett, S. C. H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model system for evolutionary analysis. En: S.C.H. Barrett (ed.), *Evolution and function of heterostyly*. 1–24. Springer Verlag, Nueva York, Nueva York, EUA.
- Barrett, S. C. H. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in Plant Science* 3:335–341.
- Beach, J. H. y K. S. Bawa. 1980. Role of pollination in the evolution of dioecy from distyly. *Evolution* 34:1138–1142.
- Bradshaw, H. D. J., S. M. Wilbert, K. G. Otto y D. W. Schemske. 1995. Genetic mapping of floral traits associated with reproductive isolation in monkeyflowers (*Mimulus*). *Nature* 376:762–765.
- Caruso, C.M. 2001. Differential selection on floral traits of *Ipomopsis aggregata* growing in contrasting environments. *Oikos* 94:295–302.
- Charlesworth, D. y B. Charlesworth. 1978. Population genetics of partial male-sterility and the evolution of monoecy and dioecy. *Heredity* 41:137–153.

- Charlesworth, D. y B. Charlesworth. 1979. A model for the evolution of distyly. *American Naturalist* 114:467–498.
- Charnov, E. L. 1982. The theory of sex allocation. *Monographs in population biology*. 269–283. Princeton, Nueva Jersey.
- Contreras, P. S. y J. F. Ornelas. 1999. Reproductive conflicts of *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) a distylous shrub of a tropical cloud forest in Mexico. *Plant Systematics and Evolution* 219:225–241.
- Darwin, C. 1877. The different forms of flowers on plants of the same species. Murray, Londres, Reino Unido.
- Devlin, B. y A. G. Stephenson 1985. Sex differential floral longevity, nectar secretion, and pollinator foraging in a protandrous species. *American Journal of Botany* 72:303–310.
- Domínguez, C., G. Ávila, S. Vázquez. y J. Márquez Guzmán. 1997. Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany* 84:626–632.
- Faivre, A. E. y L. A. McDade. 2001. Population-level variation in the expression of heterostyly in three species of Rubiaceae: does reciprocal placement of anthers and stigmas characterize heterostyly? *American Journal of Botany* 88:841–853.
- Fenster, C. B. 1991. Selection on floral morphology by hummingbirds. *Biotropica* 23:98–101.
- Galen, C. y P. G. Kevan. 1980. Scent and color, floral polymorphisms and pollination biology in *Polemonium viscostum* Nutt. *American Midland Naturalists* 104:281–289.
- Galen, C. 1985. Regulation of seed set in *Polemonium viscostum*: floral scents, pollination and resources. *Ecology* 66:792–797.

- Galen, C., K. A. Zimmer y M. Ellen. 1987. Newport Pollination in Floral Scent Morphs of *Polemonium viscosum*: A Mechanism for Disruptive Selection on Flower Size. *Evolution* 4:599–606.
- Galen, C. 1999. Why Do Flowers Vary?. *BioScience* 49:631–640.
- Ganders, F. R. 1974. Disassortative pollination in the distylous plant *Jepsonia heterandra*. *Canadian Journal of Botany* 52:2401–2406.
- Ganders, F. R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17:607–635.
- Kay, Q. Q. N. 1976. Preferential pollination of yellow-flowered morphs of *Raphanus raphanistrum* by *Pieris* and *Eristalis* spp. *Nature* 261:230–232.
- Kay, Q. Q. N. 1979. The role of preferential and assortative pollination in the maintenance of flower color polymorphisms. En: A. J. Richards (Ed.). *The pollination of flowers by insects*, 175–190. Academic Press, Londres.
- Klinkhamer, P. G. L. y T. J. De Jong. 1990. Effects of plant size, plant density and sex differential nectar reward on pollinator visitation in the protandrous *Echium vulgare* (Boraginaceae). *Oikos* 57:399–405.
- Lara, C. y J.F. Ornelas. 2002. Flower mites and nectar production in six hummingbird-pollinated plants with contrasting flower longevities. *Canadian Journal of Botany* 80:1216–1229.
- Lara, C. 2006. Temporal dynamics of flower use by hummingbirds in a highland temperate forest in México. *Ecoscience* 13:23–29.
- 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 selection of heterostyly. En: S. C. H. Barrett (ed.),

- Evolution and function of heterostyly, 179–207. Springer Verlag, Nueva York, Nueva York, EUA.
- Lloyd, D. G. 1979. Evolution towards dioecy in heterostylous populations. *Plant Systematics and Evolution* 131:71–8.
- Nilsson, L. A. 1988. The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature* 334:147–149.
- Ornelas, J. F., L. Jiménez, C. González, y A. Hernández. 2004a. Reproductive ecology of distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) in a tropical montane forest. I. Hummingbirds' effectiveness as pollen vectors. *American Journal of Botany* 91:1052–1060.
- Ornelas, J. F., C. González, L. Jiménez, C. Lara y A. J. Martínez. 2004b. Reproductive ecology of distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) in a tropical montane forest. II. Attracting and rewarding mutualistic and antagonistic visitors. *American Journal of Botany* 91:1061–1069.
- Raven, P. H. 1972. Why are bird-visited flowers predominantly red? *Evolution* 26:674.
- Richards, J.H. y S. Koptur. 1993. Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 80:31–40.
- Ree, R. H. 1997. Pollen flow, fecundity, and the adaptive significance of heterostyly in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *Biotropica* 29:298–308.
- Rzedowski, J. y G. C. de Rzedowski. 1985. Flora fanerogámica del Valle de México, 393–394. IPN- IE, México, D. F.
- Schemske, D. W. y H. D. Bradshaw Jr. 1999. Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). *Evolution* 96:11910–11915.
- Stone, J. L. 1995. Pollen donation patterns in a tropical distylous shrub (*Psychotria*

- Suerrensis*, Rubiaceae). American Journal of Botany 82:1390–1398.
- Stout, J. C., J. A. Allen, y D. Goulson. 1998. The influence of relative plant density and floral morphological complexity on the behaviour of bumblebees. *Oecologia* 17:107–117.
- Waser, N. M. 1978. Competition for hummingbird pollination and sequential flowering in two colorado wildflowers. *Ecology* 59:934–944.
- Waser, N. M. y M. V. Price. 1981. Pollinator choice and stabilizing selection for flower color in *Delphinium nelsonii*. *Evolution* 35:76–390.
- Webb, C. J. 1999. Empirical studies: evolution and maintenance of dimorphic breeding systems. En: M. A. Geber, T. E. Dawson, y L. F. Delph (eds.), *Gender and sexual dimorphism in flowering plants*, 61–95. Springer, Berlín, Alemania.
- Wyatt, R. 1983. Pollinator-plant interactions and the evolution of plant breeding systems. En: L. Real (ed.), *Pollination biology*. Academic Press, Orlando, Flor