



---

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

Evolución del sistema reproductivo  
de *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae).

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

P R E S E N T A

**ADRIANA LÓPEZ VILLALOBOS**

DIRECTOR DE TESIS:  
DR. CÉSAR AUGUSTO DOMÍNGUEZ PÉREZ-TEJADA

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## RECONOCIMIENTOS

La realización de este proyecto fue posible gracias a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

El material y trabajo de laboratorio fue financiado por los proyectos CONACYT (47858) y DGAPA (IN-217803). Asimismo reconozco el apoyo otorgado por la fundación TELMEX al otorgarme la extensión a beca de maestría “Apoyo a ciencias” 2003-2006”.

A la Biol. Yolanda Hornelas Orozco del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología por el servicio de microscopía electrónica barrido de los granos de polen y estigmas de las flores de *B. ternifolia*.

A todos los miembros de mi Comité Tutorial cuya asesoría fue fundamental durante el desarrollo de este trabajo. A la Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga y al Dr. Francisco Molina Freaner por su gran disposición y apoyo durante mi estancia en la Maestría en Ciencias Biológicas y por sus valiosos comentarios al manuscrito de la tesis.

Un reconocimiento especial al Dr. César A. Domínguez Pérez-Tejada por su dedicación y entrega durante este tiempo. Porque gracias a ti descubrí mi pasión por este magnífico campo de la biología que es el estudio evolutivo de los sistemas reproductivos en plantas. De ahora en adelante todo el entrenamiento que adquirí bajo tu tutoría formará parte de mi vida profesional y de mis futuras investigaciones.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres Lourdes Villalobos y Rubén López por su apoyo en todo momento y por haber contribuido a formar parte de la persona que soy ahora. Ustedes son y serán la única empresa que confía incondicionalmente en que algún día toda su inversión dará frutos. Gracias por su apoyo económico y moral en todo momento, pero sobre todo por estar siempre conmigo cuando mas los he necesitado. Y, aunque creían que esto nunca pasaría, al fin esta tesis esta escrita!! . Papa, mama gracias por la vida son lo máximo!!!

Al Dr. Luis Eguiarte Fruns por sus valiosos comentarios al manuscrito de la tesis y por habarme permitido montar la técnica de extracción del material genético en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología UNAM.

Al Biol. Aldo Valera porque tu gran ayuda y asesoría fue fundamental durante todo el proceso de la extracción del material genético y el montaje de la técnica con los marcadores moleculares ISSRs en el laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología UNAM.

A la Dra. Judith Márquez por su excelente dedicación como profesora y por brindarme su valioso tiempo y apoyo en todo momento.

A Jessica Pérez Alquicira, Rubik y Fernando por sus enseñanzas y tips en las técnicas del laboratorio, porque sin su ayuda y agradable compañía en el lado radioactivo del laboratorio este proceso hubiera sido muy aburrido!

A mis compañeros y amigos de laboratorio de Interacción Planta-Animal Jessica Pérez, Fernando Rosas, César Abarca, Ruben Pérez, Lluvia Flores, Paula Sosenski, Fernanda Baena, Mariana Abarca, Mariano Ordano, Juan Fornoni y Karina Boege por haber compartido conmigo discusiones académicas, salidas de campo, stress, momentos difíciles, divertidos y todo lo que implica al menos 8 horas diarias durante esto años.

A “Mari” Marisela Ramirez y a Fernandita Baena por su ayuda en el trabajo de campo

A mis super compañera(o)s y amiga(o)s de la maestría. a cada uno de ustedes gracias por formar parte fundamental de mi vida académica y personal durante esta etapa de mi vida: Lau, Betsa, Octavio, Verito, Mariana Munguia, Rodrigo Vega, Ricardo Ozuna y Paula Meli. Ricardo amiguissississimo al fin!!! El que sigue no???

Lau Zente, Marga y Lis las mejores rumis del mundo!!! Gracias por su apoyo.

A mis amigas de siempre! Abiga y Olguis por seguir allí y compartir los mejores y peores momentos.

Carlos Ibarra alias “Perú”. Este logro es mio pero te lo presto. Te lo mereces tu también por importantissississimo en este ultimo jalón. Te adoro!!!!!!!!!!!!!! Crua, cruac, cruac.....

## INDICE GENERAL

1. Reconocimientos.....	v
2. Agradecimientos.....	vi
3. Resumen.....	1
4. Abstract.....	3
5. Introducción.....	5
6. Heterostilia.....	9
Objetivos de la investigación.....	19
7. Sistema de estudio.....	20
7.1. <i>Bouvardia ternifolia</i> Rubiaceae.....	20
7.2. Zona de estudio.....	22
8. Métodos y Materiales.....	24
8.1. Morfología floral.....	25
8.2. Análisis de datos de la morfología floral.....	25
8.3. Colecta de frutos y germinación de la progenie para la estimación de la tasa de entrecruzamiento.....	28
8.4. Marcador molecular: ISSRs.....	29
8.5. Extracción del ADN y amplificación de los marcadores moleculares ISSRs.....	32
8.6. Estimación de la tasa de entrecruzamiento .....	34
9. Resultados .....	38
9.1. Morfología floral.....	38
9.2. Estimación de la tasa de entrecruzamiento.....	50
10. Discusión.....	53
10.1. Variación morfológica.....	54
10.2. Estimación de la tasa de fertilización cruzada.....	63
11. Conclusiones.....	75
12. Bibliografía.....	76
13. Apéndices.....	88

## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema de las cruces legítimas en los morfos florales de especies distílicas y tristílicas.
- Figura 2. Distribución de *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae).
- Figura 3. Medidas para el análisis de la morfología floral de *B. ternifolia*.
- Figura 4. Morfos homostílicos cortos y homostílicos largos de *B. ternifolia*.
- Figura 5. Índice de reciprocidad para los niveles de órganos altos y cortos de una población distílica (Richards & Koptur 1993).
- Figura 6. Polimorfismos en geles de poliacrilamida.
- Figura 7. Distribución de la longitud de la corola, los estilos y los estambres de las plantas de *B. ternifolia* en el Pedregal de San Ángel.
- Figura 8. Microscopía electrónica de barrido de los granos de polen y de la ornamentación de la exina de los morfos Pin y Thrum de *B. ternifolia*.
- Figura 9. Relación de la longitud de los estambres y los estilos de las plantas de *B. ternifolia* en el pedregal de San Ángel.
- Figura 10. Relación de la longitud de la corola con la longitud de los estilos y estambres de las plantas de *B. ternifolia* en el pedregal de San Ángel.
- Figura 11. Distribución de la hercogamia en las plantas de *B. ternifolia*.
- Figura 12. Índice de Reciprocidad calculado para varias especies distílicas.
- Figura 13. Proporción de plantas Pin y Thrum de *B. ternifolia* que se desvían de la reciprocidad absoluta en la población del Pedregal de San Ángel.
- Figura 14. Promedio de los órganos sexuales de cada uno de los cuatro morfos florales de *B. ternifolia* (Pin, Thrum, homostílicos cortos y largos).
- Figura 15. Microscopía electrónica de barrido de los granos de polen y de la ornamentación de la exina de los morfos homotípico corto y homotípico largo de *B. ternifolia*

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hipótesis de evolución de la distilia.

Tabla 2. Primers de ISSR´s probados en las plantas de *B. ternifolia*

Tabla 3. Medias de los caracteres florales de los morfos Pin y Thrum de *B. ternifolia*.

Tabla 4. Estimación de la tasa de entrecruzamiento de *B. ternifolia*

## INDICE DE APENDICES

Apéndice 1. Método y material que se utilizó en la extracción del material genético (DNA) de *Bouvardia ternifolia*.

Apéndice 2. Protocolo para la preparación de los buffers y la poliacrilamida.

Apéndice 3. Procedimiento y materiales para la electroforesis en geles de poliacrilamida.

Apéndice 4. Procedimiento para la tinción de los geles de poliacrilamida.

Apéndice 5. Tabla de frecuencias alélicas de los morfos Pin y Thrum de *Bouvardia ternifolia*.

### 3. RESUMEN

La heterostilia es un polimorfismo morfológico y genético que combina la hercogamia recíproca con un sistema heteromórfico de incompatibilidad. La hercogamia recíproca promueve la fertilización cruzada, mientras que el sistema de incompatibilidad evita la endogamia. *Bouvardia ternifolia* es una especie distílica que presenta una amplia variación en la distancia estigma-antenas, en el largo de la corola, el estilo y los estambres entre plantas del mismo morfo. Asimismo, evidencia preliminar indica que la especie es capaz de producir frutos de cruces intramorfo y de autopolinizaciones. Esta situación permitió evaluar la importancia de la hercogamia en la tasa de fertilización cruzada en ausencia de un sistema de incompatibilidad. Se caracterizó la morfología floral de 114 plantas de *B. ternifolia* y se estimó la tasa de fertilización cruzada con marcadores moleculares ISSR de 20 familias maternas, 10 del morfo Pin y 10 del morfo Thrum. Cada morfo con un total de 166 y 121 individuos de progenie respectivamente. Se encontraron diferencias significativas entre los morfos florales en el largo de la corola, los estilos, los estambres, las antenas y la hercogamia. La hercogamia fue prácticamente continua con valores máximos de 12 mm y mínimos de 1.1 mm (homostílica). El morfo Thrum presentó flores más grandes y mayor variación en la longitud de la corola, los estambres y la hercogamia. Si bien los resultados muestran que la mayoría de las plantas de *B. ternifolia* presentan órganos complementarios recíprocos, existen plantas cuyos órganos sexuales se desvía hasta 9 mm de sus órganos complementarios. Usando cuatro primers de ISSR utilizados en este trabajo se encontraron un total de 67 loci polimórficos repetibles. El valor de la tasa de entrecruzamiento reveló que, en el Pedregal de San Ángel, *B. ternifolia* reproduce principalmente por fertilización cruzada ( $t_{m\text{ pob}} = 0.955$ ,  $t_{m\text{ Pin}} = 0.948$ ,  $t_{m\text{ Thrum}} = 0.966$ ,  $t_{m\text{ herco baja}} = 0.959$ ,  $t_{m\text{ herco alta}} = 0.960$ ). A pesar de esto, la  $t_{m\text{ poblacional}}$  difiere de 1 y por lo

tanto el 4.5% de la progenie de la población proviene de cruzas endogámicas. No obstante el coeficiente de endogamia de la población parental ( $F = -0.200$ , S.D. = 0.003) indica un exceso de heterocigosis. Se encontró que esta población presenta un porcentaje importante (10%) de progenie que proviene de cruzas entre parientes, probablemente producto de una interacción entre la estructura espacial de los individuos en la población, el proceso de polinización y el mecanismo de dispersión. La gran mayoría de la progenie de fertilización cruzada presenta paternidad múltiple, es decir las semillas de un solo fruto proceden de diferentes donadores de polen. Sólo entre el 8 y 9% de la progenie de una planta son hermanos completos. Estos valores de  $r_p$  son de los más bajos reportados hasta el momento para especies polinizadas por insectos o aves. Para las plantas de *Bouvaria ternifolia* en el Pedregal de San Ángel la hercogamia entre morfos florales es lo suficientemente importante para mantener un sistema reproductivo de fertilización cruzada y evitar la depresión por endogamia.

#### 4. ABSTRACT

Heterostyly is a morphological and genetic polymorphism that combines reciprocal herkogamy with an heteromorphic incompatibility system. Reciprocal herkogamy promotes cross-fertilization, while the incompatibility system avoids inbreeding. *Bouvardia ternifolia* is a distylic shrub that shows a wide range of variation in herkogamy, corolla length, style length and stamen length among plants of the same floral morph. Preliminary evidence has shown that this species produces fruits from intramorph crosses and self-fertilization providing the opportunity of evaluating the importance of herkogamy on the rate of cross-fertilization without the effects of the incompatibility system. I characterized the floral morphology of 114 plants of *B. ternifolia* and estimated the outcrossing rates for 20 maternal families (10 Pin and 10 Thrum) using ISSR molecular markers. A total of 166 progeny individuals from Pin morph and 121 from Thrum morph were used to estimate outcrossing rates. There were significant differences between the floral morphs in corolla, style, stamen and anther length as well as herkogamy. Herkogamy variation was almost continuous with values ranging from 1.1 mm (homostylous plants) to 12 mm. Thrum plants had bigger flowers and showed more variation in corolla length, style length and herkogamy. Pin flowers in contrast, showed more variation in stamen and anther length. Although these results indicate that most plants of *B. ternifolia* have complementary reciprocal organs, the sexual organs of some plants deviate up to 9mm for their reciprocal organ. The four ISSR primers produced 67 polymorphic loci that were highly reproducible. Outcrossing rate estimations indicate that *B. ternifolia* reproduce predominantly through outcrossing ( $t_m$  pob = 0.955,  $t_m$  Pin = 0.948,  $t_m$  Thrum = 0.966,  $t_m$  herco baja = 0.959,  $t_m$  herco alta = 0.960). Nevertheless  $t_m$  was significantly different from 1, indicating that 4.5% of the progeny is the result of inbreeding. There was, however, an excess of

heterozygous in the parental population ( $F = -0.200$ , S.D. = 0.003) suggesting selection against homozygous progeny. It was found that 10% of the progeny resulted from biparental inbreeding, probably as a result of the interaction between the spatial distribution of the individuals within the population, the plant-pollinator interaction and the seed dispersal mechanisms. Most of the progeny of a given plant results of multiple paternity, since only between 8% and 9% of the progeny are full sibs. Accordingly, the correlation of paternity is low compared with other insect or bird pollinated flowering plants. For *B. ternifolia* plants in the Pedregal de San Ángel, the herkogamy is enough to maintain a predominantly outcrossing reproductive system and avoid inbreeding depression.

## 5. INTRODUCCIÓN

La estructura floral básica que exhiben la mayoría de las angiospermas es la presencia de ambos órganos sexuales (gineceo y androceo) en una flor (Dellaporta & Calderon-Urrea, 1993; Barrett, 1998; Barrett *et al.*, 2000<sub>a</sub>; Barrett, 2002<sub>a y b</sub>). Esta situación en las flores hermafroditas presenta dos principales problemas. Por un parte, optimizar la adecuación de las dos funciones evitando la interferencia sexual y por otra asegurar una transferencia eficiente de polen evitando la autofertilización y promoviendo la fertilización cruzada. Como resultado de esto las plantas con flores han desarrollado una gran variedad de diseños florales que pueden influir notablemente en las estrategias reproductivas de las angiospermas. Los sistemas reproductivos de las angiospermas conforman un ámbito continuo que va desde la autogamia obligada hasta la polinización cruzada (Barrett & Harder, 1996). La disposición de las estructuras reproductivas en las flores influye en la cantidad y la calidad del polen que puede dispersarse durante la polinización, mientras que los mecanismos fisiológicos de incompatibilidad actúan controlando el tipo de polen que fecundará a los óvulos de una planta (Barrett, 1998).

Cuando los estigmas y las anteras están juntos dentro de una flor, la recepción (función femenina) y la remoción del polen (función masculina) pueden interferir, provocando conflictos y/o compromisos que resultan en la pérdida de oportunidades de apareamiento, desperdicio de gametos y bajo potencial reproductivo (Darwin, 1877; van der Pijl, 1978; Lloyd & Yates, 1982; Barrett *et al.*, 2000<sub>a</sub>; Barrett, 2002<sub>a</sub>). La interferencia sexual surge de conflictos funcionales entre rasgos que promueven el depósito de polen en los estigmas y la remoción de polen de las anteras. Al interior de una flor, la estructura y/o la posición de los órganos sexuales (interferencia polen-estigma o polen-pistilo) pueden impedir una

polinización eficiente (Bertin & Newman, 1993). Si se da una baja transferencia de polen a los estigmas se afecta a la función femenina, porque algunos óvulos quedan sin fertilizar (descuento de óvulos). Mientras que al impedirse una buena remoción de polen, la función masculina pierden oportunidades de fertilizar los óvulos de otras plantas. Cuando la interferencia sexual ocurre por “obstrucción” (“clogging effect”), la presencia de polen de la misma flor en estigmas de plantas autoincompatibles puede impedir la germinación de granos de polen compatibles. Esto se traduce en la reducción de la fertilidad femenina de la planta al producir menos frutos y semillas de los que potencialmente puede producir. Con respecto a la función masculina, el polen que se deposita en el estigma de la misma flor no puede ser transportado a otras plantas, lo cual también disminuye la adecuación por la vía paterna (Harder & Wilson, 1998). En este sentido la interferencia por autopolinización, tanto en especies autocompatibles como en especies con sistemas de incompatibilidad retardados (el tubo polínico se detiene en el tejido estilar o llegando al ovario), puede actuar a tres niveles. 1) En la superficie estigmática. El polen propio ocupa espacio y restringe el acceso al polen de entrecruza. 2) En el tejido estilar. Los tubos polínicos de autopolinización compiten con los de entrecruzamiento. 3) En el ovario. La competencia ocurre a la hora de fertilizar los óvulos (interacciones polen-pistilo). El resultado negativo para las especies autocompatibles es que la proporción de óvulos fertilizados con polen propio sea mayor a la de óvulos fecundados con polen de entrecruza. En el caso de las especies con sistemas de incompatibilidad, al detenerse el crecimiento de los tubos polínicos antes de llegar a fertilizar a los óvulos, el resultado es el desperdicio de óvulos (Barrett, 2000).

La interferencia sexual es un problema asociado con la arquitectura floral, y casi todas las especies que se reproducen principalmente por fertilización cruzada tienen algún mecanismo de separación del polen y los estigmas, ya sea temporal (dicogamia) o espacial

(hercogamia). Esta situación hace difícil percibir los efectos de la interferencia sexual y de la autofertilización. Por esta razón el principal argumento para explicar el mantenimiento y la evolución de la hercogamia y la dicogamia es que maximizan la fertilización cruzada y evitan la autofecundación. Sin embargo, se ha propuesto que evadir la interferencia sexual, podría ser una hipótesis alternativa o auxiliar para explicar la separación de las estructuras reproductivas en las flores, principalmente en especies auto-incompatibles, donde los beneficios del entrecruzamiento se aseguran a través de los sistemas de incompatibilidad (Yeo, 1975; Thomson & Barrett, 1981; Bawa, 1982; Charnov, 1982; Givinish, 1982; Lloyd, 1982; Lloyd & Webb, 1986; Webb & Lloyd, 1986; Barrett *et al.*, 1996; Baker *et al.*, 2000<sub>a</sub> y <sub>b</sub>; Barrett *et al.*, 2000<sub>a</sub>; Fetscher, 2001; Barrett, 2002<sub>a</sub>).

Aunque la separación de las funciones sexuales dentro de una flor previene la interferencia sexual, los diferentes diseños de hercogamia funcionan de manera distinta para ambos sexos. La hercogamia de aproximación (“approach herkogamy”) es el diseño más común entre las angiospermas. En estas flores los estigmas están por encima de las anteras, de manera que el polinizador aterriza en el estigma, depositando el polen de entrecruza y posteriormente se dirige a las anteras para coleccionar el polen, o hacia la base de los pétalos para tomar el néctar, impregnándose de polen una vez que sale de la flor (Webb & Lloyd, 1986). Al estar expuesto el estigma, la función femenina se beneficiará al incrementar la probabilidad de recibir polen de entrecruza, mientras que la función masculina podría disminuir la exportación de polen a otras plantas si el polinizador no es eficiente (o su diseño no se lo permite) coleccionando el polen de las anteras que se encuentran al interior del tubo de la corola. Otro diseño de hercogamia menos común entre las angiospermas es la hercogamia reversa (estilos por debajo de los estambres principalmente en flores tubulares). En este diseño, la probabilidad de que el estigma reciba polen de entrecruza es menor, mientras que las anteras tienen una alta

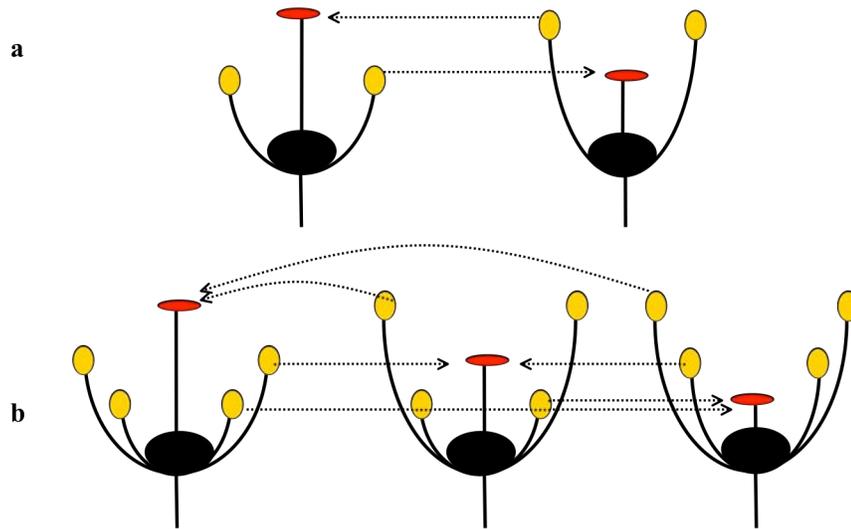
probabilidad de exportar polen a otras plantas. Por otra parte, para las plantas autocompatibles con hercogamia reversa existe una mayor probabilidad de autofecundación por la caída incidental de su polen. Una combinación de plantas con hercogamia de aproximación y con hercogamia reversa, favorecería a ambas funciones sexuales, resolviendo al menos dos de los principales conflictos por los cuales evolucionan los sistemas reproductivos en las angiospermas: aumentar la eficiencia en la fertilización cruzada de ambas funciones sexuales, evitando la interferencia sexual. Si a este diseño floral, conocido como hercogamia recíproca, le sumamos un mecanismo fisiológico que impida la fecundación del polen propio, entonces se resuelven tres de los principales problemas evolutivos que moldean los sistemas reproductivos en las angiospermas: evitar la depresión por endogamia, asegurar la fertilización cruzada y evadir la interferencia sexual. El sistema reproductivo que combina estos 3 mecanismos se le conoce como heterostilia. En este trabajo estudie la variación en la morfología floral de *Bouvardia ternifolia*, una especie distílica, y estime la tasa de fertilización cruzada de la población, cada uno de los morfos florales y de plantas con hercogamia baja y alta.

## 6. LA HETEROSTILIA

La heterostilia es un polimorfismo morfológico controlado genéticamente que combina la hercogamia recíproca con un sistema de incompatibilidad que impide la autofertilización y las cruza entre individuos del mismo morfo. Las especies heterostílicas están compuestas de dos (distilia) o tres (tristilia) morfos florales que difieren recíprocamente en la altura a la cual se localizan los estigmas y las anteras. Las poblaciones distílicas están compuestas de plantas Pin que tienen estilos largos y estambres cortos, y de plantas Thrum con estilos cortos y estambres largos (Fig. 1<sub>a</sub>). En las poblaciones tristílicas hay tres morfos caracterizados por estilos largos, intermedios y cortos, cada uno con dos niveles de anteras en las posiciones complementarias (Fig. 1<sub>b</sub>) (Barrett, 1990; 1992<sub>a y b</sub>). Además de la hercogamia recíproca y el sistema de incompatibilidad dialélico, existen otra serie de características morfológicas que difieren entre los morfos florales. Las más comunes son las diferencias en el tamaño y forma de las papilas estigmáticas y el polen (Vuilleumier, 1967; Dulberger, 1974). Otras que sólo están presentes en la minoría de las poblaciones heterostílicas son la forma y el tamaño de la corola, la orientación de los estigmas y los estambres, el color del polen y de los filamentos de los estambres, así como el tamaño y el número de óvulos (Ganders, 1979). Lloyd y Webb (1992) dividen las diferencias entre los morfos en tres categorías: 1) caracteres que contribuyen a la hercogamia recíproca, 2) los componentes del sistema de incompatibilidad y 3) el resto de los caracteres que se agrupan como “características auxiliares” de la heterostilia (Lloyd & Webb, 1992<sub>a</sub>).

En la mayoría de los casos la heterostilia está asociada a un sistema de incompatibilidad dialélico esporofítico SIDE, que mantiene la proporción de morfos 1:1 en la

población, así como una distribución dispersa y al azar en el espacio (Ornduff & Weller, 1975; Ganders, 1976; Ganders, 1979).



**Figura 1.** a) distilia y b) tristilia. Las flechas representan las cruza legítimas compatibles entre estigma y anteras del mismo nivel.

No obstante, en algunas especies heterostílicas de los géneros *Villarsia* (Ornduff, 1988) y *Narcissus* (Sage *et al.*, 1999), el polimorfismo morfológico no está asociado a un sistema de incompatibilidad. En el SIDE, la reacción de rechazo del polen incompatible está dada por la interacción entre el genotipo de incompatibilidad del pistilo, y el genotipo de la planta donadora de polen, por lo que el fenotipo de cada grano de polen está determinado por el genotipo diploide de la antera (el esporofito). En una población distílica con (SIDE), solo hay dos genotipos de incompatibilidad con dos alelos en la población, uno de los cuales es

dominante sobre el otro, tanto en el polen, como en el pistilo. De esta manera, el polen de un morfo floral sólo podrá fertilizar pistilos del otro morfo (Fig. 1) (Ganders, 1979).

La heterostilia está reportada en 28 familias de angiospermas, de las cuales en 24 hay especies distílicas y en 6 tristílicas (Lythraceae, Oxalidaceae, Pontederaceae, Amaryllidaceae, Linaceae, Connaraceae) (Ganders, 1979; Barrett, 1993; Barrett, 2002<sub>b</sub>). Las especies heterostílicas incluyen Monocotiledóneas (Iridaceae, Amarillidaceae, Pontederiaceae) y dicotiledóneas, aunque es mucho más común en las dicotiledóneas. La presencia de heterostilia no parece estar correlacionada con el hábitat, hay especies en todo tipo de ambientes (desde desiertos hasta hábitats acuáticos). La mayoría son perennes aunque también hay algunas especies anuales (*Amsinckia* spp., *Fagopyrum esculentum*). No hay reportes de especies heterostílicas en las subclases más primitivas (Magnoliidae, Alismatidae, Hamamelidae, Arecidae, o Commelinidae), ni en familias muy especializadas. Esto sugiere que para que la heterostilia evolucione, el tipo de flor (tanto el androceo como el gineceo) debe de tener un nivel intermedio de especialización (Vuilleumier, 1967). Dado que las familias que presentan heterostilia no forman un grupo relacionado, la heterostilia, como sistema reproductivo, es de origen polifilético y aparentemente ha evolucionado en repetidas ocasiones (Barrett, 2000).

En muchas familias y géneros heterostílicos el polimorfismo está restringido a un número pequeño de especies. Por ejemplo en el caso de Lamiaceae y Polemoniaceae han evolucionado aparentemente en una sola especie, mientras que en otros taxa como *Primula*, *Oxalis* y *Rubiaceae* hay cientos de especies (Barrett, 2000). La distribución taxonómica de la heterostilia entre las familias de angiospermas no es independiente (Darwin, 1877; Ganders, 1979; Lloyd & Webb, 1992<sub>a y b</sub>). La evidencia sugiere que el origen de la heterostilia puede estar relacionado a presiones de selección convergentes asociadas a promover la polinización

cruzada, evitar la interferencia sexual, y la depresión por endogamia. Por este motivo no es de sorprenderse que muchos taxa heterostílicos compartan ciertos atributos morfológicos y fisiológicos, que probablemente hayan sido moldeados por la evolución para mantenimiento de este polimorfismo.

Uno de los aspectos más fascinantes de la distilia es su similitud con un sistema reproductivo de sexos separados, tanto por las consecuencias genéticas, como por la segregación en bloque de un conjunto de características que difieren entre los dos morfos florales de la población (Lewis & Jones, 1992). Estas diferencias físicas entre los morfos heterostílicos están determinadas por un sistema genético de un locus con dos alelos, denominado locus-S. Este locus comprende una serie de genes ligados en un cromosoma que controlan el desarrollo de los dos tipos florales. La evidencia sugiere que estos genes se encuentran muy cerca del centrómero y que a mayor distancia entre el locus y el centrómero se incrementan las probabilidades de recombinación (Dowrick, 1956; Lewis & Jones, 1992). El modelo de herencia mas común es aquel en donde el genotipo heterócigo (Ss) determina el fenotipo del morfo Thrum, y el homócigo recesivo (ss) el del morfo Pin. El genotipo SS también produciría el fenotipo Thrum, sin embargo, es muy raro en la naturaleza debido a que el sistema de incompatibilidad previene su formación (Shore & Barrett, 1985; Lewis & Jones, 1992; Richards, 1997). También se ha sugerido que un gen recesivo letal ligado al cromosoma de los Thrum (Lewis & Jones 1992; Richards, 1997) podría ser el causante de la ausencia de este genotipo en la naturaleza.

La presencia de individuos homostílicos autocompatibles en poblaciones distílicas, así como de especies o subespecies homostílicas en géneros donde hay especies heterostílicas, ha sido el motivo de estudios genéticos y ecológicos que constituyen la base para entender muchos aspectos del la evolución y el mantenimiento de este polimorfismo. El término

homostílica fue usado por primera vez por Darwin en 1877 para describir individuos poco frecuentes de una especie de distílica *Primula* con anteras y estigmas al mismo nivel. Estos individuos podían ser homostílicos largos, si tenían estambres y estilos equivalentes a los órganos largos de ambos morfos u homostílicos cortos si los dos órganos reproductivos tenían la altura de los dos los estilos del morfo Thrum (Ganders, 1979). Originalmente Ernst (1936) y Crosby (1949) propusieron que la presencia de estas formas aberrantes en poblaciones distílicas era debido a mutaciones puntuales. Sin embargo, en 1955 Ernst mostró que en algunos casos, los homostílicos provenían de especies heterostílicas, mientras que en otros no (Ernst, 1955; Ganders, 1979). En este sentido, a las plantas provenientes de especies distílicas se les conoce como homostílicos secundarios (Wedderburn & Richards, 1992), y a las que provienen de una condición ancestral homostílica (que no presentan rasgos de especies heterostílicas), se les considera como homostílicos primarios (Al Wadi & Richards, 1993).

En 1956 Dowrick propuso que los homostílicos secundarios autocompatibles podrían haber surgido por recombinación dentro del supergene de la distílica y reanalizó los datos de Ernst (1925, 1933, 1936 y 1955) de varias especies homostílicas y distílicas del género *Primula*. Basado en estos análisis sugirió un modelo para el locus-S compuesto de dos grupos de genes ligados (GPA y gpa) con 3 elementos recombinables G, P y A. En donde G/g controla las características del estilo, el estigma y el sistema de incompatibilidad femenino, P/p las características del polen y del sistema de incompatibilidad masculino, y A/a que controla la posición de las anteras. El orden de los factores G, P y A dentro del locus-S se debe a la ausencia de dobles recombinantes y a las distancias estimadas entre los genes (Ernst, 1955; Dowrick, 1956; Piper *et al.*, 1984; Wedderburn & Richards, 1992; Lewis & Jones, 1992; Richards, 1997).

En ausencia de recombinación dentro del supergene, una población distílica en

equilibrio consta de los genotipos GPA/gpa del morfo Thrum y gpa/gpa del Pin (Ernst, 1955, 1957; Dowrick, 1956; Ganders, 1979; Charlesworth & Charlesworth, 1979; Lewis & Jones 1992, Wedderburn & Richards, 1992; Mandfield, 2005), pero si ocurre recombinación, se pueden producir 6 genotipos más (gPA y GPa homostílico largo y corto autocompatible respectivamente, gpA y GPa homostílico largo y corto autoincompatible, gPa Pin autocompatible y GpA Thrum autocompatible), de los cuales, 4 son fenotípicamente diferentes a los morfos Pin y Thrum. Los genotipos producto de recombinación más comunes son Gpa (homostílicos cortos) y gPA (homostílicos largos), estos pueden presentarse en forma homóciga si la planta se autofertiliza o heteróciga cuando se combina con una planta Pin (Gpa/Gpa, Gpa/gpa y gPA/gPA, gPA/gpa respectivamente). Ambos genotipos son autocompatibles y pueden fertilizarse automáticamente, lo cual les confiere una ventaja selectiva sobre los heterostílicos. Esta situación puede ocurrir siempre y cuando no haya depresión por endogamia. Los otros dos genotipos gpA (homostílicos largo) y GPa (homostílicos cortos), al ser autoincompatibles carecen de la reproducción asegurada (“reproductive assurance”) y de la ventaja que les da a los morfos Pin y Thrum, la hercogamia recíproca y la posibilidad de fertilizarse únicamente con individuos del morfo opuesto (dissortative mating) gracias al sistema de incompatibilidad. Esto podría explicar su baja frecuencia y probabilidad de permanecer en poblaciones naturales (Ernest, 1950, 1957, 1958; Richards, 1997).

En la mayoría de las poblaciones distílicas en donde el supergene ha recombinado, los homostílicos se mantienen en muy bajas frecuencias o son eliminados por efectos de la depresión por endogamia. No obstante el modelo de Charlesworth & Charlesworth (1979b) del rompimiento de la distilia, menciona que si el alelo que determina el morfo corto es dominante, entonces el homostílico largo incrementará su frecuencia hasta fijarse en la

población con mayor probabilidad que cualquier otro fenotipo autocompatible. Lo que se ha observado en poblaciones naturales es que la frecuencia del morfo homostílico largo es mayor a la del homostílico corto (Lewis, 1975; Charlesworth & Charlesworth, 1979; Wedderburn & Richards, 1992; Richards, 1997). No obstante, por recombinación ambos deberían producirse con la misma frecuencia. En el género *Primula* se sabe que el 6% de las especies son homostílicas largas que han evolucionado de ancestros heterostílicos (Richards, 1997). La mayoría de las poblaciones distílicas en donde se ha reportado la presencia de plantas homostílicas muestran una baja frecuencia de individuos homostílicos largos (comparada con pin y thrum) y solo en un par de casos se ha reportado la presencia de individuos homostílicos cortos en *Primula* (Washitani *et al.*, 1994; Richards, 1997) en *Turnera ulmifolia* (Urban, 1883; Barrett, 1978) y en *Pemphis acidula* (Lewis, 1975). *Limonium*, *Armeria* y *Amsinkia* son la excepción a este patrón. En *Limonium* 15 especies son homostílicas cortas producto de recombinación y solo una presenta individuos homostílicos largos (Baker, 1966). En *Amsinkia* (Boraginaceae) la mayoría de las especies son homostílicas cortas y solo en una especie (*A. spectabilis*) existen los dos tipos de homostílicos. Crosby (1949) argumenta que esta situación ocurre porque los homostílicos largos presentan una ventaja automática debido a que su polen (del tipo Thrum) compite con el de las plantas Thrum por fertilizar estigmas Pin. Esto, aunado a la posibilidad de autofertilización y autopolinización, así como a la ventaja genética sobre los heterostílicos, favorece que los homostílicos largos invadan la población. En un principio cuando el supergene ha recombinado los individuos homostílicos son escasos, mientras que las plantas Pin y Thrum se encuentran en proporciones iguales. Una vez que los homostílicos logran ser abundantes, las plantas Thrum disminuyen o desaparecen quedando solo algunos individuos Pin y homostílicos (Richards, 1997). Esto es consistente en la mayoría de las

poblaciones distílicas en donde los homostílicos secundarios se han fijado (Fisher, 1949; Crosby, 1949; Bodmer, 1958, 1960; Ganders, 1974; Boyd, *et al.*, 1990).

La probabilidad de que ocurra un evento de recombinación en una población distílica depende, en gran medida, de que se mantengan los apareamientos al azar, de que los polinizadores sean eficientes en la remoción y transporte de polen entre morfos y de algunos factores ambientales. Altos niveles de autofecundación, eventos de colonización y escasez de polinizadores son algunos de los componentes que favorecerían la evolución de la homostilia (Charlesworth & Charlesworth, 1979). Asimismo la limitación por polen es uno de los principales factores involucrados en el rompimiento de la distilia (Charlesworth & Charlesworth, 1979). La presencia de plantas homostílicas sin alteraciones en sus reacciones de incompatibilidad, que resultan de gran variación en la hercogamia dentro de una población distílica, también se ha atribuido al efecto de genes, que en forma recesiva, actúan como modificadores de la longitud de los estilos, los estambres y el polen (Mather & de Winton, 1941; Mather, 1950; Ganders, 1975; Kurian & Richards, 1997; Matsui *et al.*, 2004). La presencia de fenotipos homostílicos en algunas poblaciones distílicas y común entre las angiospermas, ha generado en especulaciones acerca de si éste es el ancestro de las especies distílicas o es el producto del rompimiento del sistema. A lo largo del siglo XX se han generado varias hipótesis para entender la evolución y el mantenimiento de la distilia. No obstante, a pesar de la gran cantidad de estudios, todavía no se ha alcanzado un consenso en cuanto a los factores clave que determinan la aparición y el mantenimiento del este sistema (Barrett, 1992<sub>b</sub>; Arroyo, 2002). Existen al menos dos aproximaciones para abordar el origen de la distília. Una es suponer que las diferencias morfológicas entre los morfos florales son características agregadas al sistema de incompatibilidad preexistente y la otra es que el sistema de incompatibilidad genético surgió posterior a los rasgos morfológicos (Anderson, 1973). Por

lo tanto la discusión se centra en cuál de estos rasgos evolucionó primero: la hercogamia recíproca como resultado de un proceso selectivo a favor de la polinización entre anteras y estigmas del mismo nivel (Darwin, 1877; Lloyd & Webb, 1992<sub>a y b</sub>), o el sistema de incompatibilidad para evitar la endogamia (Charlesworth & Charlesworth, 1979).

El primer modelo cuantitativo de evolución de la distilia fue propuesto por Charlesworth y Charlesworth en 1979. Ellos plantearon que la heterostilia evolucionó a partir de un ancestro homostílico autocompatible en un escenario de alta depresión por endogamia. Ellos proponen que primero surgió el sistema de incompatibilidad y posteriormente se seleccionaron mutaciones en la longitud del estilo y los estambres ligadas al locus de la incompatibilidad. Estos mutantes favorecerían la transferencia de polen compatible entre los dos tipos florales, evitando las polinizaciones ilegítimas (Tabla 1). En contraste con el modelo de Charlesworth y Charlesworth (1979), Lloyd y Webb (1992) retoman la idea original de Darwin (1877) y proponen que la heterostilia evolucionó para aumentar la eficiencia en la transferencia de polen en un ancestro autocompatible con hercogamia positiva. Es decir, antes del establecimiento de los grupos de incompatibilidad (Tabla 1). En 1998 Richards propone un tercer modelo más complejo y exclusivamente genético (Tabla 1) en el cual la carga genética y el ligamiento son los factores determinantes. Richards (1998) menciona que existen dos rasgos que presentan muchos géneros distílicos que sugieren que la distilia no siempre evoluciona mediante la secuencia propuesta por Lloyd y Webb (1992). El primero está relacionado con la existencia de especies monomórficas homostílicas (principalmente) que parecen ser ancestrales a la aparición de la heterostilia y el segundo es la presencia de un gen letal ligado al cromosoma del morfo Thrum. Recientemente Sakai y Toquenaga (2004) propusieron un cuarto modelo de evolución y mantenimiento de la heterostilia basado en la interferencia sexual y en la disponibilidad de parejas potenciales. Este modelo difiere de los anteriores en

que no supone la invasión de un nuevo mutante con fenotipo drásticamente diferente al normal. Al contrario, ellos muestran que la heterostilia puede establecerse en poblaciones con variación fenotípica continua en la longitud de los estilos y los estambres, siempre y cuando exista ligamiento entre los genes que controlan la altura de los estigmas y las anteras (Tabla 1).

Tabla 1. Principales argumentos de los cuatro modelos más importantes de evolución de la distilia.

	Charlesworth & Charlesworth (1979)	Lloyd & Webb (1992)	Richards (1998)	Sakai & Toquenaga (2004)
Fuerza de selección responsable	Depresión por endogamia	Aumentar la adecuación ♂ mediante la polinización cruzada	Carga genética	Interferencia sexual y apareamientos entre individuos diferentes
Secuencia de aparición de las características principales	Homostilia, Sistema de incompatibilidad, dimorfismo, hercogamia recíproca	Hercogamia de aproximación, dimorfismo, hercogamia recíproca, sistema de incompatibilidad y características auxiliares	Homostilia (con algún grado de hercogamia), dimorfismo asociado a ligamiento de genes	Distribución unimodal en la altura de estigmas y anteras
Supuestos genéticos	Compatibilidad, incompatibilidad, 2 alelos, n alelos	No necesarios	Ligamiento de genes	Ligamiento de genes
Base del modelo	Teórico. Basado en la genética del polimorfismo	Datos de historia natural y morfología floral de especies distílicas y de familias o generos con heterostilia.	Especies homostílicas monomórficas ancestrales y presencia de un gen letal asociado al morfo Thrum	Teórico. Basado en iteraciones de modelos de individuos ("Individual-based-models") con distancias estigma-anteras hipotéticas y diferencias en la disponibilidad de parejas potenciales
Evidencias	Staticeae (Plumbaginaceae)	Anchusa, Lithodora, Narcissus, Nivenia, Villarsia	Primula Sect. Sphondylia, Amsinckia	Ninguna
Modelo cuantitativo	Si	Si	No	Si

Existen pocos estudios donde se haya evaluado la hercogamia en relación a la tasa de fertilización cruzada en especies distílicas (Barrett & Shore, 1987; Barrett & Shore, 1989; Barrett & Shore, 1988; Barrett & Husband, 1990; Husband & Barrett 1991; Pérez-Nasser, *et al.*, 1993; Kohn & Barrett, 1994; Belaoussoff & Shore, 1995; Shoen *et al.*, 1997; Barrett *et al.*, 1997). Esto debido a que la mayoría de las especies distílicas presentan al mismo tiempo la hercogamia recíproca y el sistema de incompatibilidad, situación que hace difícil poner a

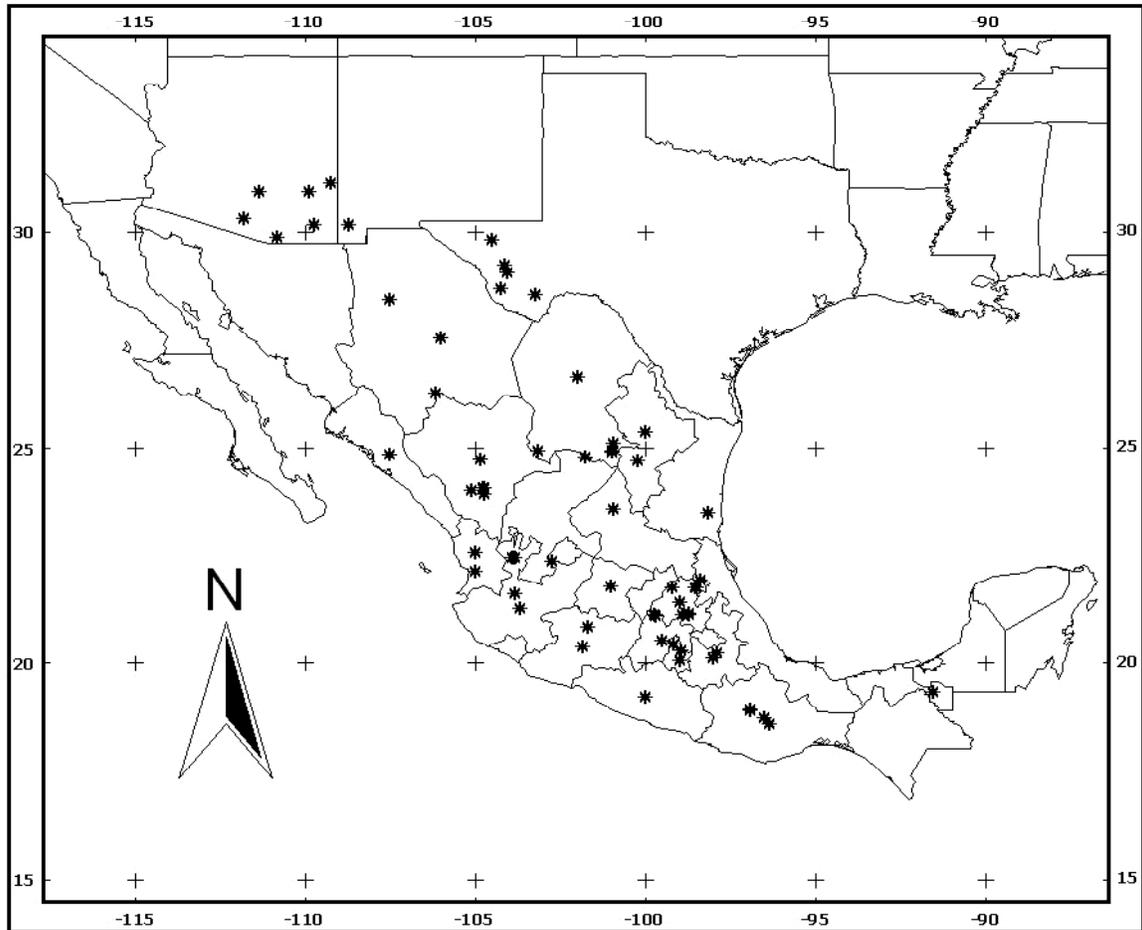
prueba las hipótesis evolutivas. *Bouvardia ternifolia* es una especie distilica para la cual existe evidencia que en el Pedregal de San Ángel, la especie es capaz de producir frutos en las cruzas intramorfo y en las autopolinizaciones. Coello-Coutiño y colaboradores (1984) realizaron cruzas experimentales legítimas, intramorfo y autopolinizaciones en plantas de *B. ternifolia* en el Pedregal de San Ángel. Cada tratamiento consistió de 250 flores, de las cuales 125 fueron donadoras y 125 fueron receptoras de polen. El porcentaje de frutos obtenido de las cruzas intramorfo fue muy alto ( $P \times P = 23.91\%$  y  $T \times T = 20.62\%$ ) en comparación con una de las cruzas legítimas ( $\sigma^T \times \phi^P = 11.71$  y  $\sigma^P \times \phi^T = 35.9\%$ ). El porcentaje de frutos de los experimentos de autopolinización fue bajo, no obstante en las autopolinizaciones del morfo Pin la producción de frutos fue mayor que en las cruzas legítimas  $\sigma^T \times \phi^P$  ( $T \times T = 8.7\%$  y  $P \times P = 13.7\%$ ) (Coello-Coutiño *et al.*, 1984). Esta evidencia aunada a la presencia de gran variación en la hercogamia y plantas homostílicas representa un sistema ideal para evaluar la importancia de la hercogamia (sin la influencia del sistema de incompatibilidad) promoviendo la fertilización cruzada y evitando la endogamia. Por lo tanto **el objetivo principal** de este trabajo es evaluar el efecto de la variación en la hercogamia sobre la tasa de fertilización cruzada de la población. Para lograr esto dividí este objetivo general en **dos objetivos particulares** 1) caracterizar la morfología floral de las plantas de *B. ternifolia* en la población del pedregal de San Ángel y 2) estimar la tasa de entrecruzamiento de la población y de los morfos florales, así como de individuos con distinto nivel de hercogamia.

## 7. SISTEMA DE ESTUDIO

### 7.1. *Bouvardia ternifolia* Rubiaceae

*Bouvardia ternifolia* es una especie distilica de la familia Rubiaceae que pertenece a la subfamilia Rubioideae. Es un arbusto distílico y perenne que puede medir hasta 1.5 m de alto. Presenta hojas opuestas cortamente pecioladas de forma elíptico-lanceolar con la base atenuada y el borde entero. Las flores son actinomorfas de corola tubular, color rojo escarlata y agrupadas en cimas terminales (Rojo y Rodríguez, 2002). Las inflorescencias presentan botones y flores de distintas edades. Dependiendo del tamaño y del vigor, las plantas pueden tener entre 2 y 20 flores abiertas y entre 1 y 15 flores por inflorescencia (Lara & Ornelas, 2002). Las flores duran entre 4 y 5 días, los dos primeros días son de color rojo escarlata pero después del tercer día de antesis cambian a rojo pálido (Faivre, 2000). En el Pedregal de San Ángel *Bouvardia ternifolia* florece desde mayo hasta finales de septiembre con un pico máximo de floración entre mayo y principios de julio. *B. ternifolia* se distribuye ampliamente en zonas abiertas, principalmente en bosques de pino-encino, desde Arizona en los Estados Unidos hasta el sur de México (Fig. 2) de hasta 3000 msnm.

En el Pedregal de San Ángel *B. ternifolia* interactúa con muchas especies de organismos. Es polinizada principalmente por los colibríes *Amazilia beryllina* e *Hylocharys leucoti*. Ocasionalmente se han observado a otras especies como *Cynanthus latirostris*, *Eugenes fulgens*, *Lampornis clemenciae*, *Calothorax lucifer*, *Tilmatura dupontii* (Arizmendi *et al.*, 1994) y *Selasphorus platycerus* (Coello-Coutiño *et al.*, 1984). En mucho menor



**Figura 2.** Mapa que muestra el rango de distribución de *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae). Los asteriscos indican sitios en donde la especie ha sido colectada. Las coordenadas se obtuvieron del portal del Global Biodiversity Information Facility ([www.gbif.org](http://www.gbif.org)) y del portal del Missouri Botanical Garden ([www.mobot.org](http://www.mobot.org)).

proporción y con menor eficacia en el forrajeo (tiempo x No de flores visitadas), *B. ternifolia* también es polinizada por la mariposa *Phoebis sennae* (Coello-Coutiño *et al.*, 1984). *Carpodacus mexicanus* es una especie que no poliniza, pero si se alimenta del néctar de *B. ternifolia* (Arizmendi *et al.*, 1994). Se ha observado una alta incidencia de daño por herbívoros (obs. pers.), principalmente durante la temporada de lluvias. Las hojas son atacadas por el grillo *Sphenarium purpurascens*, mientras que las flores son visitadas asiduamente por escarabajos y ácaros que consumen el néctar y el polen. También son atacadas por hormigas y

por larvas del lepidóptero *Choristostigma perpulchralis* (Crambidae) (identificado por M. Alma Solis, The Systematic Entomology Laboratory, Smithsonian Institution) que además de alimentarse del néctar, también se alimenta de partes de la corola, el estilo y el estigma. Esta última, a su vez, es parasitada por una avispa de la familia Braconidae. Asimismo, las anteras son colonizadas por hongos parásitos. Los frutos de *B. ternifolia* son parasitados por una larva de lepidóptero que se alimenta de las semillas en desarrollo. Una vez que el adulto emerge, la humedad penetra al interior de los frutos que quedaron perforados y las semillas que sobrevivieron a la depredación son atacadas por hongos (obs. pers).

## **7.2. Zona de estudio**

El estudio se realizó en la Reserva del Pedregal de San Ángel ubicada al sur de la ciudad de México, dentro de los terrenos de Ciudad Universitaria (19° 20' 33'' N y 99° 08' 26'' O; 2,290-2310 msnm.). El área de la reserva es de 146.8 ha y está constituida por un matorral xerófito que crece sobre un sustrato volcánico. Su origen se remonta a la erupción del volcán Xitle en la Sierra del Ajusco hace aproximadamente 2,500 años (año 300 a. C.). La lava cubrió un área de 80 km<sup>2</sup> generando una topografía volcánica heterogénea que dio lugar a toda clase de grietas, fisuras y depresiones, donde se acumula una capa de suelo que no sobrepasa unos pocos centímetros. Todos los suelos sobre la lava son arenoso-limosos, moderadamente ácidos, poseen gran cantidad de materia orgánica, de potasio y calcio y son pobres en nitrógeno y fósforo. La formación de estos sitios propició micro ambientes donde habitan especies con distintos requerimientos ecológicos.

En el Pedregal predomina un ambiente seco, con una vegetación semejante a la de zonas áridas, a pesar de estar en una zona templada a 2,240 msnm. Rzedowski (1994) se

refiere a la comunidad vegetal del Pedregal de San Ángel como un matorral xerófilo, constituido principalmente por un estrato herbáceo bien desarrollado, uno arbustivo y pocos elementos arbóreos. Su estructura está constituida por un matorral abierto muy heterogéneo, con grandes diferencias en su composición florística. Las herbáceas representan la forma de crecimiento más abundante (77%), mientras que los arbustos y los árboles representan un porcentaje minoritario (Rzedowski, 1994). La especie dominante y más típica del estrato arbustivo es *Senecio praecox*. Existen un total de 301 especies agrupadas en 61 familias, 254 géneros y alrededor de 320 especies de flora vascular. Las familias que tienen mayor número de géneros en la Reserva del Pedregal de San Ángel son: Compositae (41), Gramineae (25), Leguminosae (15), Cyperaceae (14), Commelinaceae (14) y Orchidaceae (21) (Valiente-Banuet & de Luna, 1994).

En la Reserva se pueden observar dos temporadas de floración bien definidas: la seca (de noviembre a mayo) y la de lluvias (de junio a octubre). El periodo de lluvias abarca los meses de junio-septiembre y el periodo de sequía corresponde a los meses de octubre-mayo. El clima se ha definido como Cwl en el sistema de Köepen modificado por García-Miranda (1964) y representa un clima templado sub-húmedo con lluvias en verano. La temperatura media anual es de 14.6° C con una variación anual media de 6°C de diferencia entre el mes más caliente y el más frío. La precipitación media anual es de 810.5 mm. Durante los meses de enero a febrero se registran las menores temperaturas y durante abril-junio las mayores (Rzedowski, 1994).

## 8. MÉTODOS

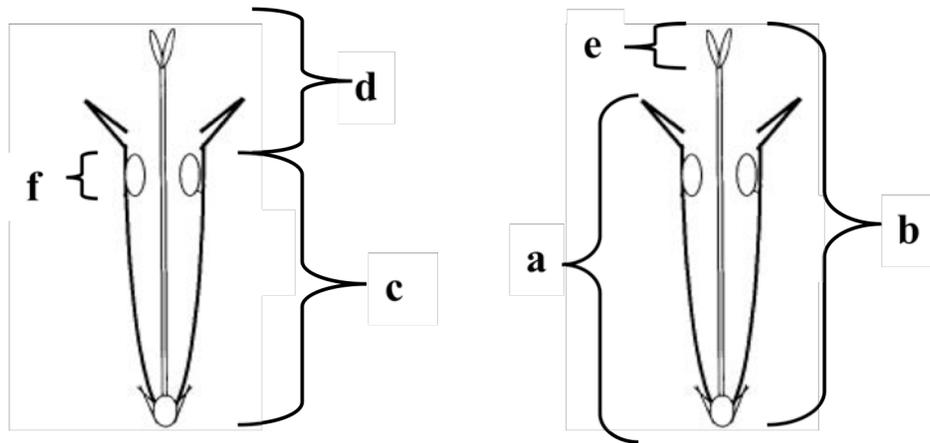
Con el fin de cumplir con el objetivo principal de este proyecto y de llevar una secuencia ordenada de cómo se obtuvieron los datos, dividí esta sección en dos partes que responden a cada uno de los objetivos particulares: 1) la caracterización de la morfología floral y 2) la estimación de la tasa de entrecruzamiento.

### 8.1. Morfología floral

En los meses de mayo y junio del 2003 se realizaron censos en la población de *Bouvardia ternifolia* en el Pedregal de San Ángel. Se identificó el morfo de 165 plantas y cada una se marcó con una etiqueta de aluminio en la que se anotó el número y el morfo floral. De junio a septiembre del 2003 se colectaron entre 6 y 10 flores por planta, de un total de 114 plantas. En cada flor se midieron las siguientes variables: largo de la corola, largo del estilo, largo de los estambres, hercogamia (distancia de la punta del estigma hasta la punta de las anteras), longitud de la antera, y longitud del estigma (Fig. 3). Se midieron un total de 1067 flores de las cuales 511 fueron del morfo Pin y 556 del morfo Thrum.

Con el fin de ver si existían diferencias en la ornamentación de la exina de los granos de polen y en las papilas estigmáticas de los morfos florales de *B. ternifolia*, se analizó con microscopía electrónica de barrido estas estructuras. Las anteras de los morfos Pin, Thrum e intermedios fueron colectadas de flores frescas y colocadas en bolsas de papel cinco días antes de la observación al microscopio, mientras que los estigmas se deshidrataron en series de distintas concertaciones de etanol. Una vez en punto crítico de deshidratación las muestras

fueron cubiertas con oro y examinadas en el microscopio electrónico de barrido del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM.



**Figura 3.** Medidas de la morfología floral de las flores de *B. ternifolia*. a) Longitud de la corola, b) longitud del estilo, c) longitud de los estambres, d) hercogamia (distancia estigma-antenas), e) longitud del lóbulo estigmático, f) largo de la antera.

## 8.2 Análisis de datos de la morfología floral-

Se calculó la media y el error estándar de cada uno de los atributos florales y se usaron pruebas paramétricas para determinar si existen diferencias significativas entre los morfos Pin y Thrum. Para ilustrar la variación en la longitud de la corola, los estilos, los estambres y la hercogamia, se graficaron las distribuciones de frecuencias de cada uno. Con el fin de evaluar si las relaciones entre los atributos florales difieren entre los morfos, es decir son morfo específicas, se realizó un MANOVA y pruebas univariadas. Las plantas fueron categorizadas en cuatro morfos florales (Pin, Thrum, Homostílicos largos y Homostílicos cortos) utilizando como referencia la distancia estigma-antena mínima para cada morfo. En el caso de las plantas Thrum la distancia estigma-antena mínima absoluta correspondió a la longitud de las anteras y

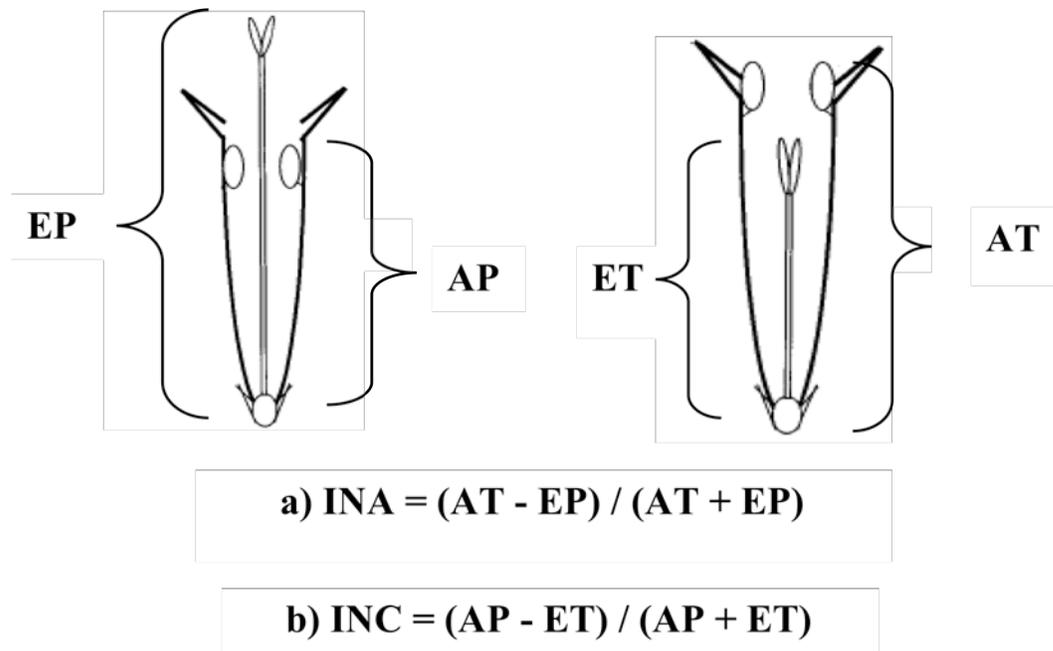
en el caso de las plantas Pin al estigma (Fig.3). De esta manera, que aquellas plantas  $< 3\text{mm}$  y  $> -3\text{mm}$ , fueron consideradas como Homostílicos largos y Homostílicos cortos, respectivamente (Fig. 4).

Con el fin de evaluar el nivel de reciprocidad de *B. ternifolia* con respecto a otras especies distílicas, realicé una revisión de 19 trabajos en donde se publicaron los valores promedio de la longitud de los estilos y los estambres de los morfos Pin y Thrum de especies distílicas. Se analizaron un total de 30 especies distílicas, 26 de las cuales son de la familia Rubiaceae y una especie de cada una de las siguientes familias: Lamiaceae, Linaceae, Olaceae, Santalaceae y Primulaceae. Con esta información se calculó el índice de reciprocidad relativa (Richards & Koptur, 1993). Este índice calcula la reciprocidad que existe entre los órganos de un mismo nivel, por lo tanto, está compuesto por dos valores, el del nivel bajo y el del nivel alto (Fig. 5). El índice del nivel alto (INA) se calcula como  $(AT - EP) / (AT + EP)$ , mientras que el índice del nivel corto (INC) es igual a  $(AP - ET) / (AP + ET)$ . AT es la posición de las anteras o el promedio en la longitud de los estambres del morfo thrum y AP del morfo pin; mientras que EP, ET es la posición del estigma del morfo Pin y Thrum, respectivamente, o bien el promedio en la longitud del estilo (Fig. 5). Con el fin de mostrar la variación entre los individuos de una población en los niveles de reciprocidad entre órganos, se analizó mediante un análisis de regresión, la relación entre la frecuencia (expresada como proporción) y la magnitud de la diferencia entre estilos y estambres recíprocos. Esta magnitud se expresó en un intervalo de 0 a 10 mm que indica la diferencia entre la longitud del órgano femenino o masculino de un individuo (estilo ó estambres) y el promedio de la longitud del órgano recíproco en la población (estambres ó estilos, respectivamente). Cada individuo se agrupo en una clase correspondiente a



**Figura 4.** Flores de las plantas a) homostílicas cortas y b) largas de *B. ternifolia* del Pedregal de San Ángel. Los números en la escala representan centímetros.

intervalos de 1mm. En el caso de órganos largos, el índice es igual a: [Longitud del órgano largo del individuo i] – [longitud promedio del órgano largo del morfo complementario]. Para órganos cortos: [longitud del órgano corto del individuo i] – [longitud promedio del órgano corto del morfo complementario].



**Figura 5.** índice de reciprocidad relativa del nivel de órganos altos y cortos (Richards & Koptur, 1993). a) INA índice para el nivel de órganos altos y b) INC índice para el nivel de órganos cortos. El índice se calcula con el promedio en la longitud de los estilos y los estambres de las plantas Pin y Thrum de una población distílica.

### 8.3. Colecta de frutos y germinación de las semillas para la estimación de las tasas de entrecruzamiento.

Una vez concluida la temporada de floración (enero del año 2004), colecté los frutos de todas las plantas marcadas en las que había medido la morfología floral. Estos se colocaron en

bolsas de plástico y se etiquetaron con el número de la planta. Las semillas se sembraron en macetas que contenían una mezcla de tierra negra tamizada, agrolita y vermiculita. En todos los casos se mantuvo la identidad de las familias maternas de donde provenían las semillas.

La germinación ocurrió entre 2 y 4 semanas después de haber sembrado las semillas. Este tiempo depende de las condiciones de humedad y temperatura, aunque pude observar que las semillas germinan más rápido entre los 25 y 30°C siempre y cuando la tierra se mantenga húmeda. No todas las plantas produjeron frutos viables, así como no todas las semillas colectadas germinaron, esto provocó que no obtuviera progenie para todas las plantas caracterizadas. Observé que uno de los factores mas importantes que determinan la sobrevivencia de las plántulas, una vez germinadas, es la humedad de la tierra. Las plántulas de *B. ternifolia* son muy susceptibles a la desecación y dado que las condiciones de invernadero no fueron apropiadas, muchas de ellas murieron.

#### **8.4. Marcador Molecular: ISSR-PCR**

Los marcadores moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa resultan de mucha utilidad para analizar parametros del sistemas reproductivo. En las plantas, los marcadores moleculares basados en reacciones de PCR que mas de han usado son los RAPD (Random amplified polymorphic DNA), los AFLP (Amplified fragment lenght polymorphism), y recientemente los SSRs o microsatélites (Staub *et al.*, 1996; Gupta & Varshney, 2000; Reddy *et al.*, 2002). Los diferentes tipos de marcadores moleculares se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en un locus o varios loci y pueden ser de tipo dominante o co-dominante (Simpson, 1997). Algunas de las limitaciones de estos marcadores radican en la obtencion de datos confiables, repetibles y en un tiempo

relativamente corto. Por ejemplo, los RAPDs presentan problemas con la repetibilidad de los resultados, la coomigración de bandas y la inespecificidad de algunas bandas (bandas fantasmas). Asimismo, en muchos casos no es posible detectar los alelos raros en la población o estos pueden ser mal interpretados (Zhivotovsky, 1999). Por otro lado, como los loci son dominantes, los RAPD dan menos información genética por locus que los marcadores codominantes. Los AFLP presentan mucha dificultad en el montaje de la técnica, requieren de un gran número de pasos para producir resultados y su costo es muy elevado. Las bandas observadas en los geles de AFLP son clasificadas como presencia o ausencia de cada individuo y el análisis se desarrolla como un sistema dominante recesivo (Simpson, 1997). Actualmente los microsatélites han tomado la ventaja sobre estos y otros marcadores genéticos dada su naturaleza codominante y el alto grado de polimorfismo que pueden revelar. No obstante, para trabajar con primers de microsatélites (puesto que no son universales), es necesario conocer las secuencias que flanquean los SSR de la especie de estudio o alguna especie cercana, lo cual puede resultar tomar mucho tiempo.

Una técnica que se ha utilizado con éxito en los últimos años son los ISSR (Inter-simple sequence repeat). Este marcador evade muchas de las limitaciones anteriores y a su vez combina muchos de los beneficios de los AFLP y microsatélites (tasas evolutivas de cambio muy altas por lo que se puede esperar mucho polimorfismo) con la universalidad de los RAPDs. Con pocos primers de ISSRs se puede obtener mucho polimorfismo, además de que presentan un porcentaje importante de repetibilidad (92% a 95%) dada la longitud de sus primers y las altas temperaturas de alineación (Wolfe *et al.*, 1998; Bornet & Branchard, 2001; Reddy *et al.*, 2002). También se ha observado que al hacer cambios en las concentraciones de DNA, los patrones de bandeo no cambian (Fang & Roose, 1997; Nagaoka & Ogihara, 1997). Dado que los ISSR (Inter-simple sequence repeat) son capaces de revelar mucho

polimorfismo, han sido utilizados principalmente en la clasificación de cultivos de importancia económica, en la identificación de individuos muy relacionados. y en estimaciones de la diversidad genética de las poblaciones. (Yang *et al.*, 1996; Fang & Roose, 1997; Nagaoka & Ogihara, 1997; Parsons *et al.*, 1997; Moreno *et al.*, 1998). En plantas silvestres se han utilizado exitosamente para analizar la variación genética (Tsumura *et al.*, 1996; Tani *et al.*, 1998; Esselman *et al.*, 1999; Wolfe *et al.*, 1998), para identificar clones asexuales de genets sexuales (Robinson *et al.*, 1997), así como en estudios filogenéticos, mapeo del genoma (Kojima, 1998) y genética de la conservación (Hollingsworth, 1998; Ge *et al.*, 2005).

Los ISSR segregan como marcadores dominantes siguiendo el modelo de herencia mendeliana simple (Gupta *et al.*, 1994; Tsumura *et al.*, 1996). A partir de una muestra de DNA nuclear amplifican (mediante una reacción de PCR) la región entre dos microsatélites iguales orientados en direcciones opuestas. En esta técnica se utilizan como primers microsatélites de 10 a 25 pares de bases en una sola reacción. Las repeticiones microsatélite pueden ser di, tri, tetra o pentanucleótidos, y pueden o no tener entre 1 y 4 bases a cada lado que sirven de anclaje, ya sea en el extremo 3' o en el 5'. Una vez que los primers localizan exitosamente dos regiones microsatélite dentro de una distancia amplificable a lo largo de la cadena de DNA, la reacción de PCR generará una banda de tamaño particular para ese locus. Generalmente se encuentran varias de estas regiones pareadas por microsatélites a lo largo de la muestra de DNA, por lo que uno puede obtener muchas bandas de diferentes tamaños para una reacción.

Tradicionalmente los estudios de biología evolutiva con plantas en los que se han estimado los parámetros del sistema reproductivo con marcadores moleculares, han utilizado marcadores codominantes como las allo-isoenzimas (Sun & Ritland, 1998; Sun *et al.*, 1998). Sin embargo en ausencia de suficiente polimorfismo con allo-isoenzimas, marcadores

dominantes como los RAPD, los AFLPS (Fritsch & Riesberg, 1992; Giaotto *et al.*, 1997) y mas recientemente los ISSRs (Ge & Sun, 1998; Silvertown *et al.*, 2002) han mostrado ser de gran utilidad para estimar la tasa de entrecruzamiento de poblaciones naturales.

#### **8.5. Extracción del ADN genómico y amplificación de los marcadores moleculares (ISSRs)**

Obtuve un total de 20 familias maternas en la temporada reproductiva del 2003, 10 del morfo Pin y 10 del morfo Thrum. El número mínimo de progenie por familia fue de 10 y el máximo de 30 individuos. El ADN genómico fue extraído de tejido foliar de plántulas con más de 6 hojas verdaderas utilizando el protocolo “mini-prep” (Doyle & Doyle, 1987) modificado por Aldo Varela descrito en el Apéndice 1. Posteriormente, se cuantificó la concentración del DNA utilizando un biofotometro Eppendorf. Con la mitad del volumen total del DNA se hicieron diluciones a una concentración final de entre 20 y 30 ng/ $\mu$ L. Se realizaron alícuotas de 50  $\mu$ L con las cuales se hicieron todas las pruebas de optimización de los ISSRs. El DNA restante (del volumen concentrado) se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para tener un respaldo de todas las muestras. Un total de trece primers de ISSRs de la serie No 9 del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de British Columbia (Tabla 2) fueron probados bajo las mismas condiciones de amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los siete primers que mejor amplificaron a partir de esta primera prueba de PCR fueron seleccionados para ajustar sus temperaturas de alineación y concentración de  $\text{MgCl}_2$ . Una vez que las condiciones fueron ajustadas, se utilizaron geles de agarosa al 2% para determinar cuáles primers eran los más polimórficos y que por lo tanto se utilizarían en la estimación de las tasas de fertilización cruzada. Se eligieron cuatro primers que presentaron un mayor número de bandas polimórficas

y que mostraron mayor repetibilidad #809, #810, #840 y #841 (nomenclatura usada por la Universidad de British Columbia) Tabla 2. Las reacciones consistieron en un volumen total de 15  $\mu$ L por reacción de PCR. En cada reacción se utilizaron entre 25 y 30 nanogramos de ADN genómico, buffer de reacción para PCR 1x (Invitrogen), 0.2 mM de cada uno de los deoxinucleótidos dNTPs (Invitrogen), 0.5  $\mu$ M de oligonucleótido y 0.05 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen). Cada primer se ajustó con diferentes concentraciones de  $MgCl_2$ : 2 mM de  $MgCl_2$  (Invitrogen) para el primer 810, 2.25 mM  $MgCl_2$  para el primer 809, 2.3 mM para el primer 841 y 2.5 mM de  $MgCl_2$  para el primer 840. Las amplificaciones se realizaron en dos termocicladores: Thermo (Electro Corporation) PxE 0.2 thermal cyler y Techne TC-512 bajo las siguientes condiciones: una etapa de activación a 94°C durante 4 minutos, seguido una etapa de de 32 ciclos de 30'' de desnaturalización a 94°C; 45'' a la temperatura de alineación apropiada para cada uno de los primers (52°C para el primer 810, 55°C para el primer 809 y 53°C para el primer 840 y 841), y 45'' de extensión a 72°C. Finalmente, una etapa de extensión final a 72°C durante 7 minutos. Los productos de amplificación se mantuvieron a -20°C antes de la separación por electroforesis en geles de poliacrilamida con buffer TBE 1x (apéndice 2), corridos a un voltaje constante de 500V durante 3 horas y 15 minutos. El procedimiento completo desde la preparación de los vidrios hasta el cargado de las muestras se puede consultar en el apéndice 3. Se utilizó ladder de 100 pb (Invitrogen) para determinar el tamaño de las bandas amplificadas y controles negativos sin ADN y con agua bidestilada ultra pura en el PCR para detectar contaminación. Los geles se fijaron en ácido acético al 10%, se tiñeron con nitrato de plata y se revelaron con carbonato de calcio como lo indica el apéndice 4.

**Tabla 2.** Primers de ISSRs probados en *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae). Los primers seleccionados para este estudio se presentan en negritas. Las abreviaciones R y Y en la tabla corresponden a una mezcla de las bases A (adenina), G (guanina), C (citosina), T. (timina). R= A, G; Y= C, T. La nomenclatura de los primers está dada por la Universidad de British Columbia, Vancouver, Canadá.

PRIMER	SECUENCIA
807	(AG) <sub>8</sub> T
808	(AG) <sub>8</sub> C
<b>809</b>	(AG) <sub>8</sub> G
<b>810</b>	(GA) <sub>8</sub> T
811	(GA) <sub>8</sub> C
<b>840</b>	(GA) <sub>8</sub> YT
<b>841</b>	(GA) <sub>8</sub> YC
842	(GA) <sub>8</sub> YG
846	(CA) <sub>8</sub> RT
850	(GT) <sub>8</sub> YC
853	(TC) <sub>8</sub> RT
856	(AC) <sub>8</sub> YA
857	(AC) <sub>8</sub> YG

### 8.6. Lectura de los geles y estimación de la tasa de entrecruzamiento.

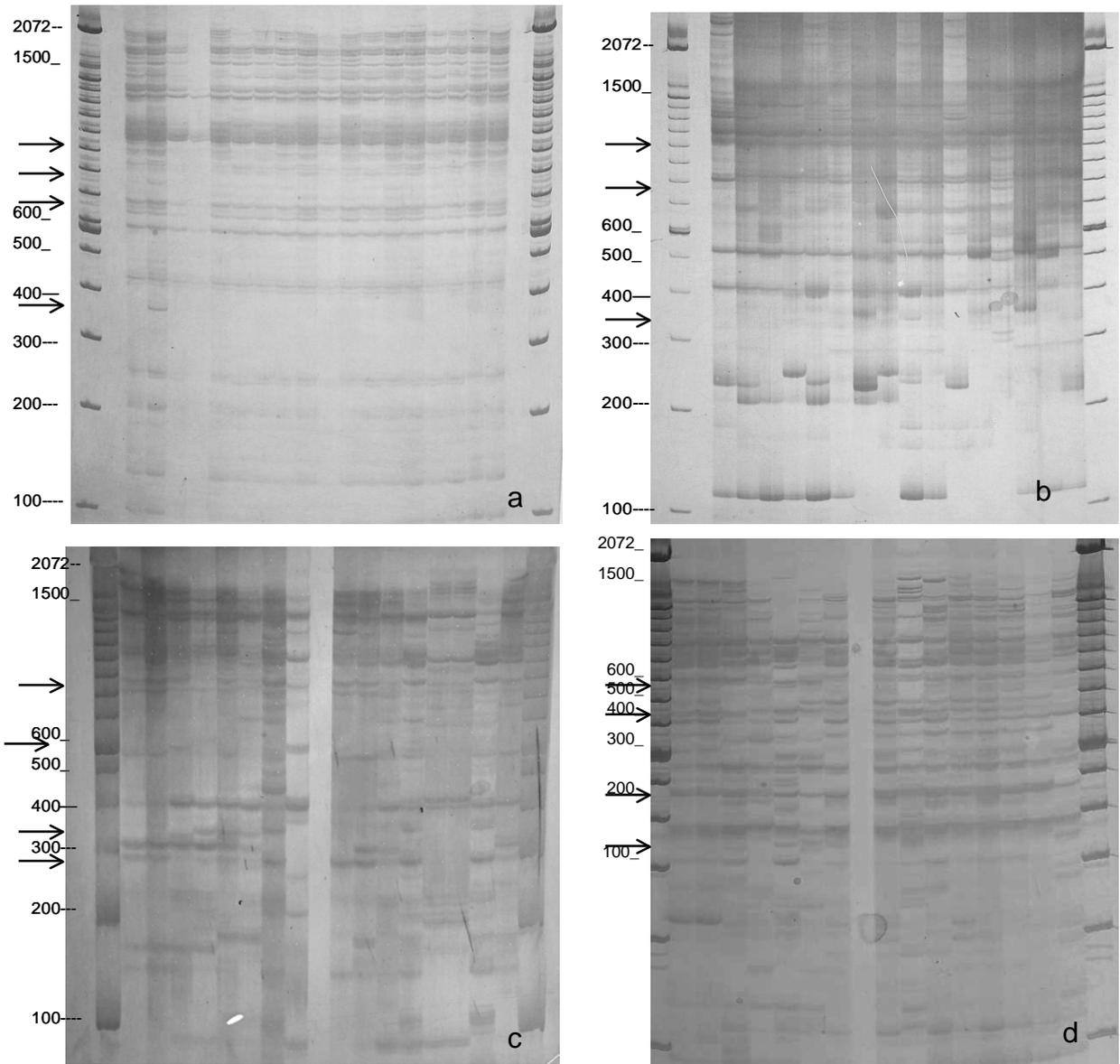
Se tomaron fotografías de todos los geles con una cámara digital LEICA digilux 1 y la lectura de las bandas se realizó con el software de imágenes LabWorks 4.5. Los loci que se utilizaron para la lectura de los geles van desde los 1,500 pares de bases hasta 300 pares de bases. Todos los primers amplificaron bandas fijas y bandas polimórficas en todos los individuos (Fig. 4). Las bandas fijas se utilizaron en cada uno de los patrones de bandeo de los cuatro primers para identificar el número de loci polimórficos entre geles y entre muestras. Una vez identificados

los loci más repetibles de cada primer, las bandas fijas con su respectivo peso molecular, me sirvieron de referencia para alinear todos los loci polimórficos entre las muestras y asegurar que cada uno de los loci correspondiera entre geles. Con la lectura de cada primer se organizó una base de datos en una hoja de cálculo de EXCEL con el peso molecular de las bandas y posteriormente se transformo a una matriz de presencia ausencia (uno, cuando estaba presente el locus, dos, cuando no estaba y cero, cuando no se sabía con certeza la identidad del locus), tal como lo establece el formato del programa MLTR (versión 3.0). La presencia de una banda representa un genotipo dominante o un heterócigo, y la ausencia de banda representa el homócigo recesivo (Fig. 6).

La tasa de entrecruzamiento (y otros parámetros que a continuación se indican), así como el coeficiente de endogamia de la población parental (F) fueron estimados usando el programa de Máxima Verosimilitud de Kermit Ritland (1990) MLTR versión 3.0. Las estimaciones de este programa están basadas en iteraciones de Newton-Raphson, con errores estándar calculados como desviaciones estándar derivadas de 1000 bootstraps. Las frecuencias génicas del polen se consideran igual a las frecuencias de óvulos. En 19 familias se utilizó el genotipo materno y sólo en un caso se infirió a partir de los genotipos de la progenie (con el MLTR). Este programa calcula los siguientes parámetros del sistema reproductivo: la tasa multilocus de entrecruzamiento y la tasa de entrecruzamiento de un solo locus ( $t_m$  y  $t_s$  respectivamente; Ritland & Jain, 1981), el resultado de  $t_m - t_s$  indica la fracción de la progenie que se produce por cruza entre parientes (endogamia biparental), la correlación de autofertilización dentro de familias y la correlación de paternidad ( $r_s$  y  $r_p$  respectivamente; Ritland, 1988; 2002). La correlación de paternidad ( $r_p$ ) hace referencia a la fracción de progenie que se produce de la fertilización cruzada y que comparte el mismo genotipo paterno. Por lo tanto, si el polen de una sola planta fertiliza la mayoría de los óvulos de la planta madre,

el valor de  $r_p$  será alto (Ritland, 2002). Aquellas estimaciones en donde dos veces el error estándar mas el valor promedio de  $t_m$ ,  $t_s$  o  $r_p$  sean menores a 1 son significativamente diferentes de 1, mientras que aquellas en donde el valor promedio de  $t_m$ ,  $t_s$  o  $r_p$  menos dos veces el error estándar sean mayores a cero son estadísticamente diferentes de cero. Esto considerando una aproximación a un intervalo de confianza del 95% (Weller & Sakai, 2005).

Se hicieron varias estimaciones de la tasa de fertilización cruzada. Primero se calculó la tasa de fertilización cruzada para toda la población, posteriormente se separó por morfos florales, y finalmente se hizo una estimación agrupando a las plantas por hercogamia alta y baja. Para la asignación de individuos a cada uno de los dos grupos se considero el valor de la mediana (5.45 mm) como umbral y los intervalos de confianza de cada grupo para su validación estadística. El grupo de hercogamia baja estuvo compuesto de 10 plantas con valores de hercogamia absoluta menor o igual a 5.45 mm (media 4.62, intervalos de confianza al 95% 4.16-5.08) y el grupo de hercogamia alta de 10 plantas con valores de hercogamia mayor a 5.45 mm (media 8.19, intervalos de confianza al 95% 6.70-9.68).



**Figura 6.** Polimorfismos en geles de poliacrilamida. a) primer #809, b) #810, c) #840 y d) #841. Los numeros a la izquierda corresponden al marcador de los pesos moleculares. Las fleches indican loci pilimórficos.

## 9. RESULTADOS

### 9.1. Morfología floral.

En este trabajo caractericé la morfología floral de *B. ternifolia* en el Pedregal de San Ángel en una muestra de 114 plantas (53 del morfo Pin y 61 Thrum). La proporción de los morfos florales en esta población no difiere de 1:1 ( $X^2 = 0.56$ ,  $P = 0.453$ , g.l.=1), por lo que la población parece encontrarse en un equilibrio isoplético. El análisis multivariado de la varianza mostró que la morfología floral difiere de manera general entre los morfos ( $F_{6, 95} = 132.64$ ,  $P < 0.0001$ ). Los análisis univariados indicaron que con excepción de la longitud de los estigmas, todos los atributos analizados difieren significativamente entre los morfos (Tabla 3). De acuerdo con mis expectativas, se encontró un patrón de distribución bimodal (compuesto por los dos morfos florales) en la longitud de la corola, los estilos, y de los estambres. Sin embargo, en todos los casos hay un intervalo en donde ambos morfos se sobrelapan (Fig. 7), indicando una distribución prácticamente continua y gran cantidad de variación en la morfología floral de cada morfo.

Un gran porcentaje de la variación de los estilos y de los estambres está explicada por los morfos florales (62% y 63% respectivamente,  $F_{1, 113} = 181.2$ ,  $P < 0.0001$ ;  $F_{1, 113} = 190.62$ ,  $P < 0.0001$ ). Comparativamente, el morfo explicó el 32% de la variación en la corola ( $F_{1, 113} = 51.79$ ,  $P < 0.0001$ ). Para ambos morfos la hercogamia es el atributo floral que presentó mayor variación, le siguen los estilos, y la corola (Tabla 3). El morfo Thrum presentó mayor variación en longitud de la corola y de los estilos y el morfo Pin presentó mas variación en la longitud de los estambres (Tabla 3, Fig.7). Los granos de polen no muestran diferencias entre los morfos, ya que en ambos casos miden aproximadamente

**Tabla 3.** Valores promedio de los atributos florales  $\pm$  ES y el coeficiente de variación (CV) de los morfos Pin y Thrum de *Bouvardia ternifolia*. Se presentan los valores de las pruebas univariadas ( $R^2$ ,  $P$  y  $F$ ).

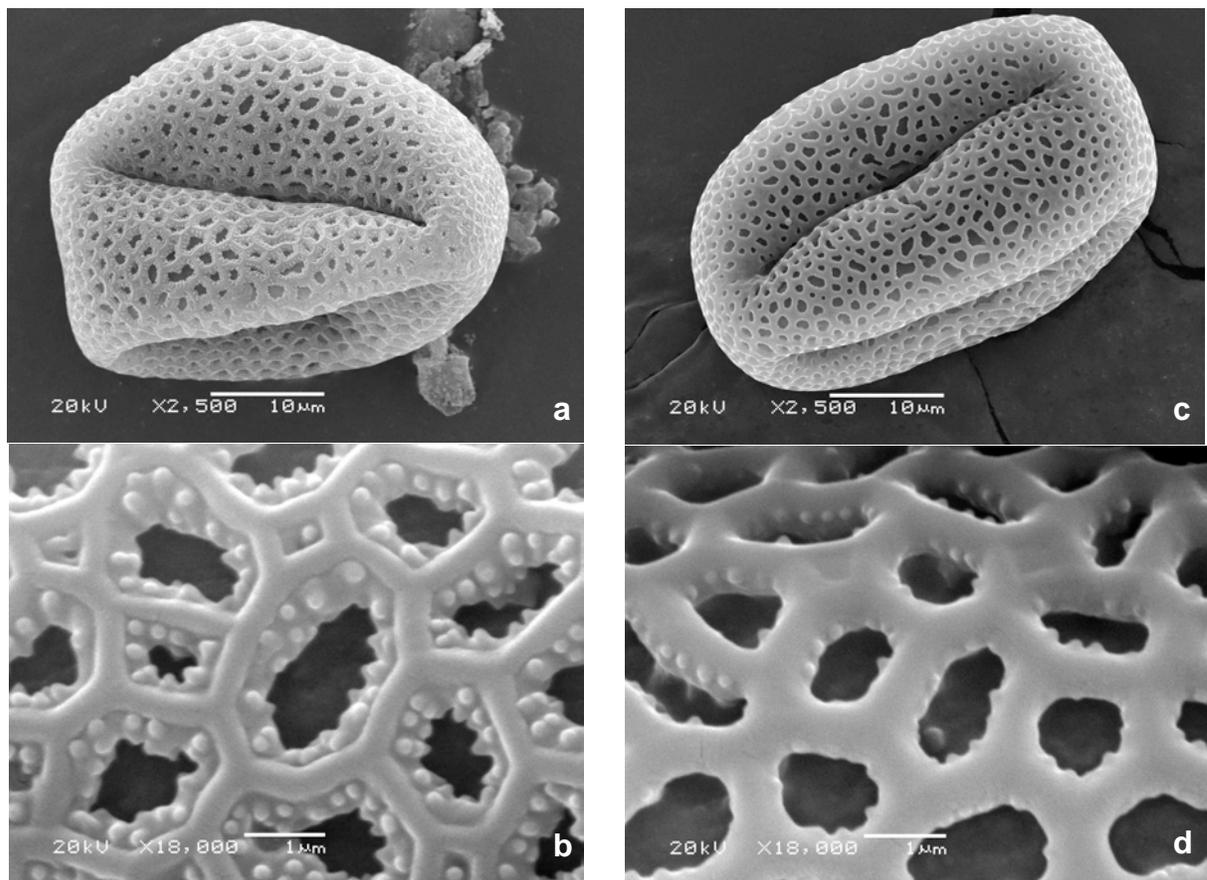
Variables	Pin	CV	Thrum	CV	$R^2$	$P$	$F$	ámbito Pin (mm)	ámbito Thrum (mm)
Largo de Corola	23.1 $\pm$ 0.28	8.99	26.3 $\pm$ 0.33	9.896	0.31	<0.0001	51.7961	17.89 - 26.49	20.88 - 35.61
Longitud del Estilo	24.15 $\pm$ 0.33	9.89	18.02 $\pm$ 0.31	13.64	0.614	<0.0001	181.24	17.51 - 27.92	13.38 - 24.64
Longitud de Estambres	19.21 $\pm$ 0.3	11.19	25.16 $\pm$ 0.31	9.61	0.626	<0.0001	190.73	14.15 - 22.88	19.71 - 32.88
Largo de antera	2.84 $\pm$ 0.03	8.22	3 $\pm$ 0.03	7.71	0.11	0.0006	12.47	2.36 - 3.2	2.50 - 3.55
Largo de estigma	2.56 $\pm$ 0.06	15.35	2.65 $\pm$ 0.052	14.48	0.01	0.2433	1.377	1.75 - 3.69	2.01 - 3.43
Hercogamia	4.92 $\pm$ 0.23	33.59	7.06 $\pm$ 0.34	34.67	0.88	<0.0001	898.28	1.15 - 8.59	2.4 - 13.34

**Figura 7.** Distribución de la longitud de a) la corola, b) estilos y c) estambres de las plantas de *Bouvardia ternifolia* en la población del pedregal de San Ángel.

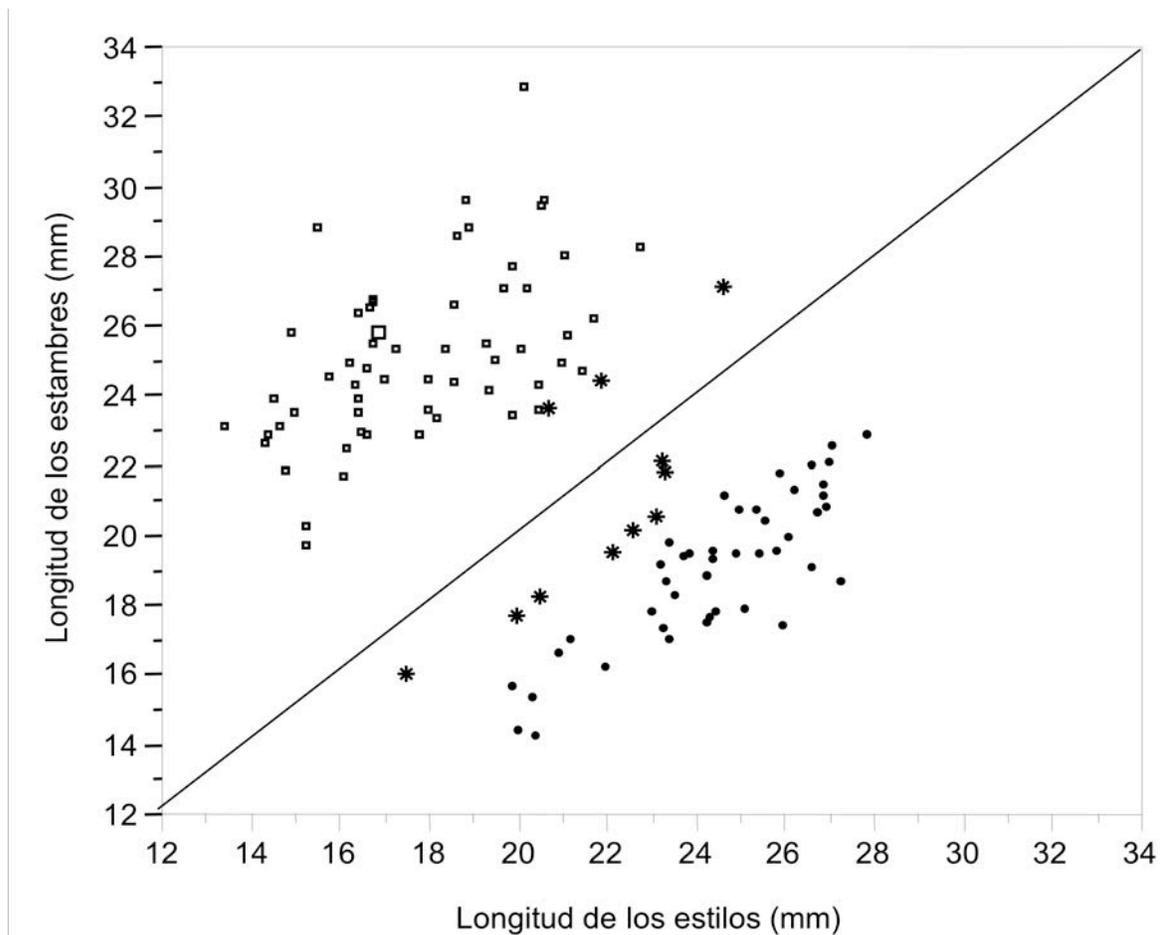
miden entre 28 y 35  $\mu\text{m}$  (Fig. 8a y b). Los granos de polen son tricolpados, reticulados y la exina presenta coberturas con ornamentación verrugada en el tectum. La ornamentación de la exina es diferente entre los morfos. Ambos son supraberrugados, pero el morfo Thrum presenta tres hileras de verrugas con mayor densidad de verrugas por hilera, mientras que el morfo Pin sólo presenta una hilera con menor número de verrugas. El ancho de las luminas es mayor en el morfo Thrum, mientras que el ancho del muro es mayor en el morfo Pin (Fig. 8c y d). Con respecto a la forma y el tamaño de las papilas estigmáticas no encontramos diferencias entre los morfo.

La característica distintiva de la distilia es la posición recíproca de las anteras y los estigmas en dos morfos florales, por lo que se esperaría que la longitud promedio de los estilos de un morfo no fuera diferente de la longitud promedio de los estambres del morfo opuesto. Para la población del Pedregal de San Ángel encontré que sí existe una diferencia significativa entre la longitud promedio de los estilos Pin y los estambres Thrum ( $t = 2.233$ ; g.l. = 112;  $P = 0.028$ ), así como entre la longitud promedio de los estilos Thrum y los estambres Pin ( $t = 2.732$ ; g.l. = 112;  $P = 0.007$ ). No obstante existe una relación positiva entre la longitud de los estambre y la longitud de los estilos que separa a los individuos de la población en dos morfos florales (Fig. 9). (Pin,  $R^2 = 0.543$ ,  $F_{51, 52} = 60.72$ ,  $P < 0.0001$  y Thrum,  $R^2 = 0.2339$ ,  $F_{59, 60} = 18.02$ ,  $P < 0.0001$ ). En teoría, la hercogamia recíproca determina que el flujo de polen entre los morfos florales sea muy eficiente y disminuye la interferencia entre las funciones sexuales (Darwin, 1876; Barrett, 2002<sub>a</sub>). Por esta razón, en una situación ideal se esperaría que la

herkogamia de un morfo fuera igual a la del otro. Sin embargo, dado que en muchas especies distílicas los estambres están unidos a la corola, las longitudes de los pétalos y de los estambres no son independientes. Consecuentemente, la asociación entre estas dos estructuras florales podría restringir la evolución de la



**Figura 8.** Microscopía electrónica de barrido de los granos de polen y de la ornamentación de la exina de los morfos florales Thrum (a y b) y Pin (c y d) de *B. ternifolia*.



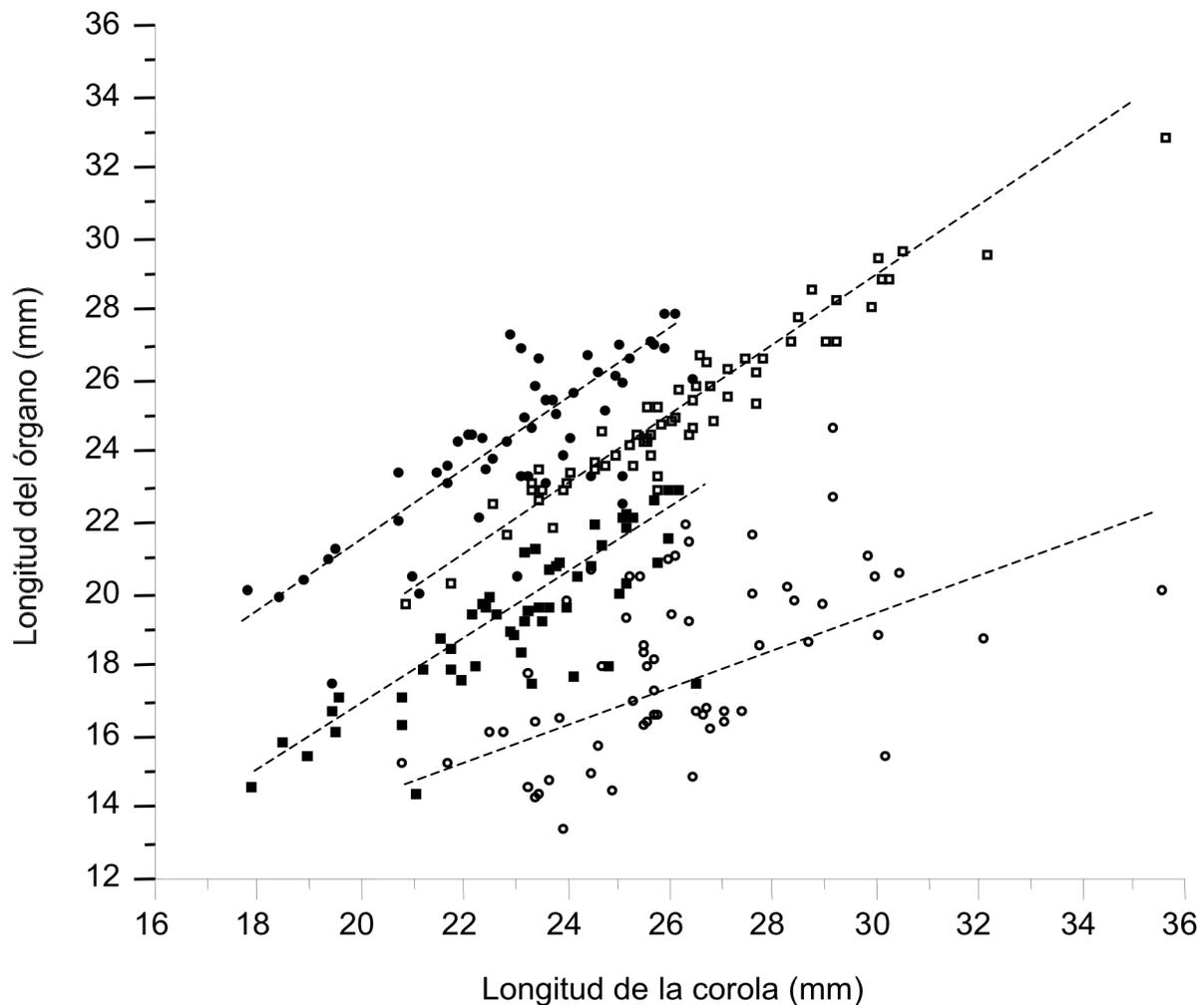
**Figura 9.** Relación entre la longitud de los estambres y de los estilos de las plantas de *B. ternifolia* en el Pedregal de San Ángel. Los puntos por encima de la diagonal representan flores del morfo Thrum (cuadros abiertos) y los puntos por debajo de la diagonal flores del morfo Pin (círculos cerrados). Los asteriscos cerca de la diagonal son individuos homostílicos con distancias estigma-antenas menores o iguales a 3mm.

hercogamia recíproca, ya que la presencia de estambres largos requiere de corolas igualmente largas, y por lo tanto la evolución de la hercogamia recíproca tendría consecuencias en otros atributos florales que no se consideran parte del síndrome heterostílico.

La propuesta anterior descansa en el supuesto de que las longitudes de los pétalos y de los estambres no son independientes. Por esta razón primero se evaluó la validez de este

supuesto, y de ser cierto, se determinó si se cumple que la pendiente de esta relación es mayor en el morfo Thrum que en el Pin. Con este fin se realizó un análisis de covarianza en el que se evaluaron las relaciones alométricas entre la longitud de la corola y los órganos reproductivos de los dos morfos florales. Los resultados muestran diferencias morfo-específicas. El modelo ajustado explicó el 86% de la variación en la longitud de los órganos reproductivos ( $F_{7, 220} = 195.83, P < 0.0001$ ). Claramente estos resultados indican que el supuesto de no independencia entre la corola y los estambres (y los estilos) es válido. Asimismo, los ajustes indican que las ordenadas al origen de estilos y estambres de ambos morfos difieren significativamente ( $F_{3, 220} = 329.45, P < 0.0001$ ), mientras que solo la pendientes de los estilos del morfo Thrum fue diferente de todas las demás ( $F_{1, 220} = 6.64, P = 0.0003$ ). La figura 10 resume los resultados de este análisis. En primer lugar, es obvio que existen marcadas diferencias en el tamaño de la corola entre los morfos florales, las plantas Thrum tienen corolas más grandes que las Pin. Dado que la pendiente que relaciona la longitud de la corola con el largo del estilo de las plantas Thrum es significativamente más baja que todas las demás, las plantas Thrum necesitan de corolas muy grandes para producir estilos cuya longitud coincida con los estambres más largos de las plantas Pin. El ajuste de los estilos Thrum resulta en un desacople de sus anteras, ya que estas últimas son demasiado grandes cuando se les compara con los estilos Pin. Estos resultados indican que la hercogamia de *Bouvardia ternifolia* está lejos de ser recíproca debido a que existen diferencias en las relaciones alométricas entre los morfos florales. Además, sugieren que la transferencia de polen de esta especie debería ser muy ineficiente, ya que las longitudes recíprocas de los órganos reproductivos complementarios siempre ocurren en plantas que tienen flores (corolas) de diferente tamaño. Obviamente, esta diferencia está mucho más acentuada entre las anteras del morfo Pin y los estigmas del Thrum.

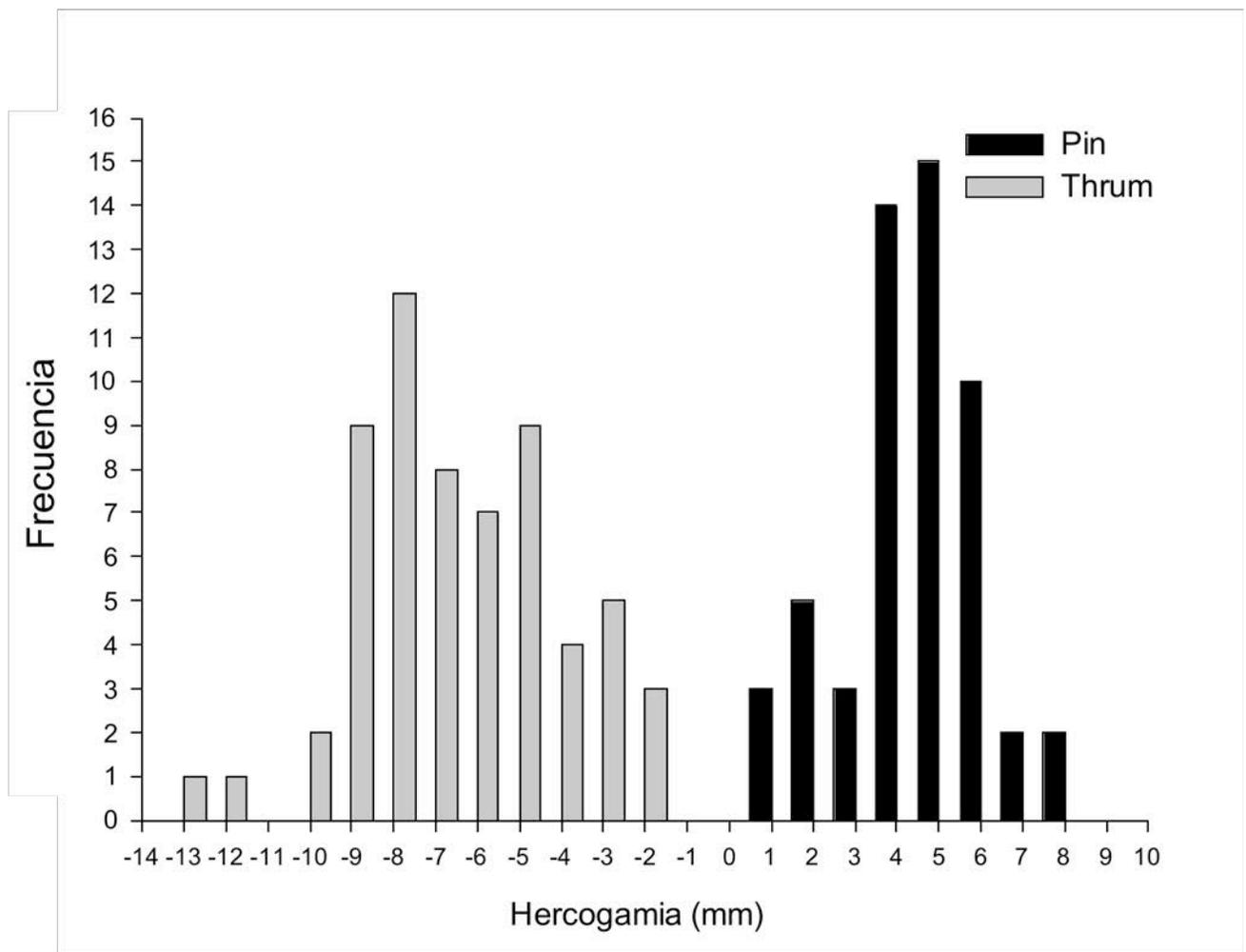
El extremo ocurre en las anteras del morfo Thrum, las cuales simplemente no tienen estigmas Pin localizados a su misma altura (Fig. 10).



**Figura 10.** Relación entre la corola, los estilos y los estambres de los morfos florales de *Bouvardia ternifolia*. Los círculos cerrados y los círculos abiertos representan los valores observados para la longitud del estilo de las plantas del morfo Pin y Thrum respectivamente. Los cuadros vacíos corresponden a los valores para la longitud de los estambres de las plantas del morfo Thrum y los cuadros cerrados los estambres del morfo Pin.

Con el propósito de mostrar de manera gráfica la variación en la hercogamia de la población del Pedregal de San Ángel de *B ternifolia*, se graficó la distribución de frecuencias

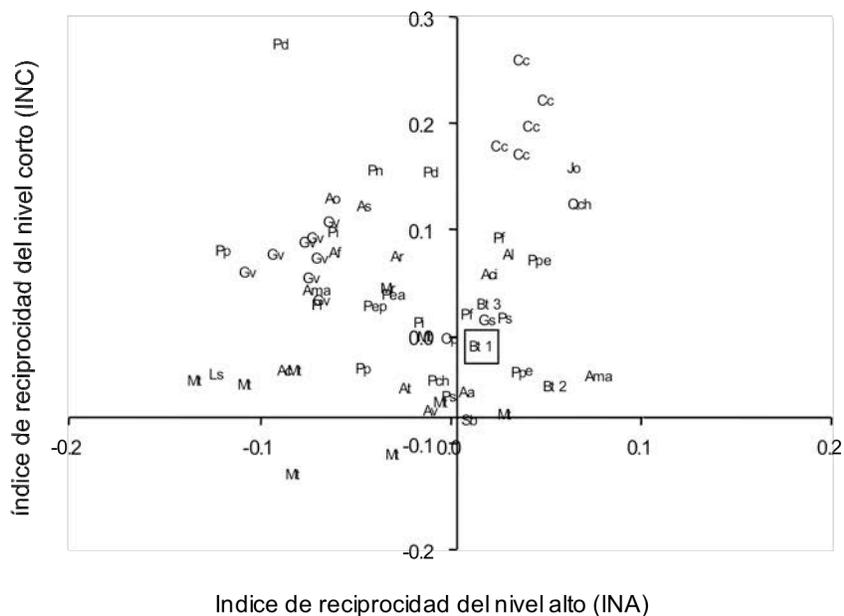
de estos valores para los dos morfos (Fig. 11). Se puede observar que en ambos morfos existe una gran dispersión con respecto a la media, aunque en el morfo Thrum el ámbito es mayor (Tabla 3). Asimismo, la figura 11 muestra que algunas plantas tienen valores de hercogamia muy bajos, lo que indica la presencia de homostíla (ver también Fig. 9). Distancias estigma-antenas menores a 3 mm y -3mm fueron consideradas como plantas homostílicas, (tal como se indica en la sección 9.2 de análisis de datos), de las cuales 9 se identificaron como



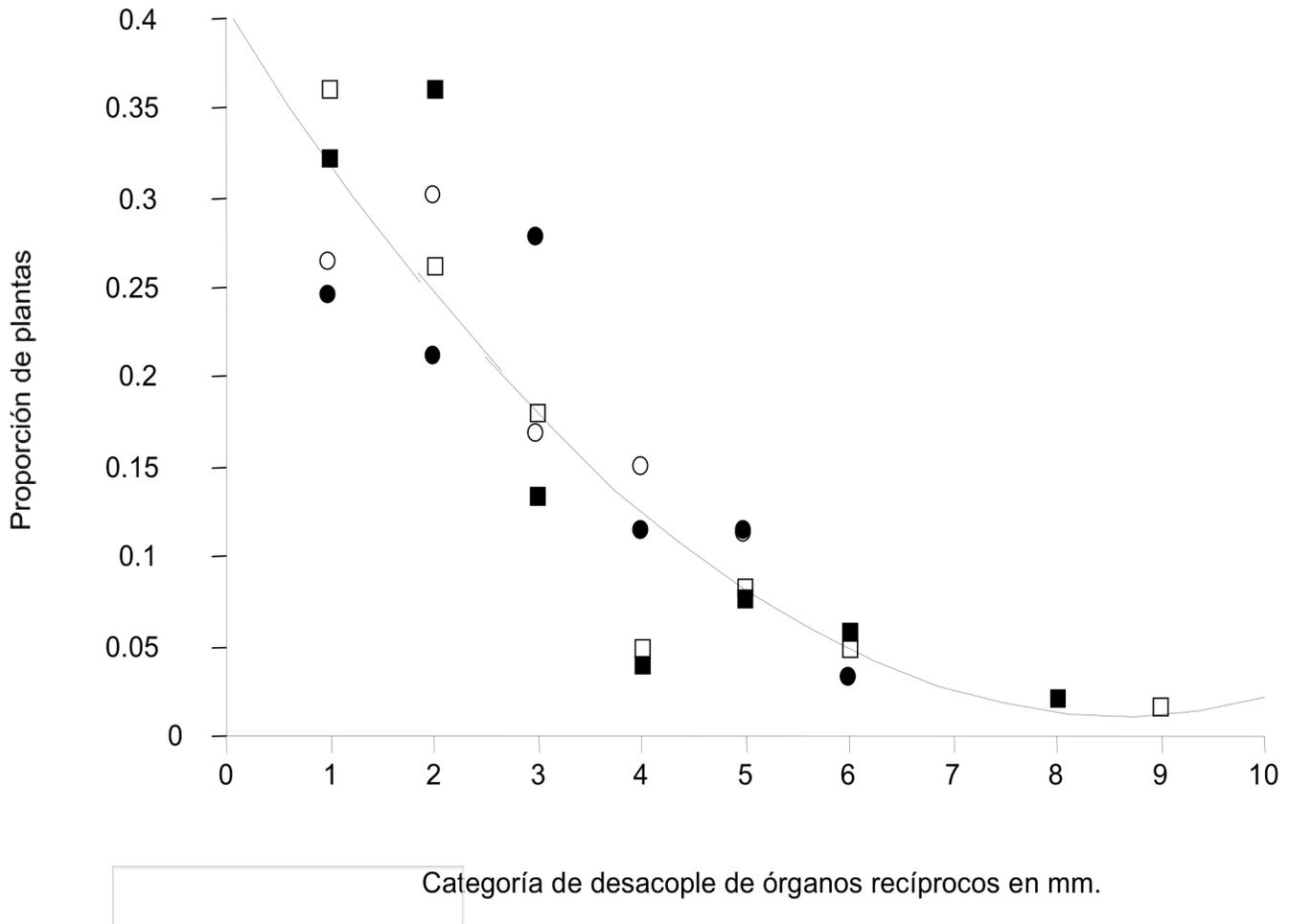
homostílicos largos y tres como homostílicos cortos (ver Fig 4 y 9).

**Figura 11.** Distribución de la distancia estigma-antenas en las plantas de *B. ternifolia* en el pedregal de San Ángel. Las barras negras representan las plantas del morfo Thrum y las grises las plantas del morfo Pin

Finalmente, se calculó el índice de reciprocidad de otras especies distílicas y se compararon gráficamente con el de *B. ternifolia*. La reciprocidad de *B. ternifolia* se ubica dentro del ámbito de variación encontrado para las especies distílicas estudiadas (Fig. 12). De hecho, a pesar de que la gran variación en la hercogamia de las plantas de la población podría sugerir un desajuste en la reciprocidad entre estilos y estambres, su índice de reciprocidad es cercano al máximo valor esperado (cercano a cero) para especies recíprocas. No obstante, al analizar la frecuencia de individuos en la población que encuentran su órgano complementario al mismo nivel, se encontró que existe una mayor proporción de individuos que presentan (estilos o estambres) niveles de reciprocidad elevados (pares de plantas con separación entre órganos complementarios menores a 2mm de) y una abrupta caída en la frecuencia de plantas con separaciones mayores (explicada por el termino cuadrático)  $r^2 = 0.793$ ,  $F= 46.99$ ,  $P<0.001$  (Fig 13).



**Figura 12.** Índice de reciprocidad entre los niveles alto y corto de los órganos reproductivos de 33 especies distilicas. Las iniciales en la grafica corresponden a las especies. (Ao) *Anchusa officinalis*, (Bt) *Bouvardia ternifolia*, (Cc) *Chassalia corailloides*, (Gv) *Gaertnera vaginata*, (Gs) *Guettarda scabra*, (Mr) *Mitchella repens*, (Op) *Ophiorrhiza napoensis*, (Pf) *Palicourea fendleri*, (Pd) *Palicourea padifolia*, (Ppe) *Palicourea petiolaris*, (Pea) *Pentanisia angustifolia*, (Pep) *Pentanisia prunelloides*, (Pch) *Psychotria chiappensis*, (Pi) *Psychotria ipecacuanha*, (Pn) *Psychotria nuda*, (Pp) *Psychotria poeppigiana*, (At) *Arcytophyllum thymipolium*, (Ac) *Arcytophyllum capitatum*, (Af) *Arcytophyllum filiforme*, (Aci) *Arcytophyllum ciliolatum*, (Ar) *Arcytophyllum rivetii*, (Aa) *Arcytophyllum aristatum*, (Al) *Arcytophyllum larvarum*, (As) *Arcytophyllum setosum*, (Amc) *Arcytophyllum macbridei*, (Av) *Arcytophyllum vernicosum*, (Jo) *Jasminum odoratissimum*, (Qch) *Quinchamalium chilense*, (Sb) *Salvia brandegeei*, (Ps) *Primula sieboldii*, (Ls) *Linum suffruticosum*, (Mt) *Menyanthes trifoliata*. Los números 1,2 y 3 al lado de la inicial Bt de *B. ternifolia* representan las poblaciones 1 es la población del Pedregal de San Ángel), 2 es SCM y 3 es SRM de ( Faivre & McDade, 2001)



**Figura 13.** Proporción de plantas Pin y Thrum de *B. ternifolia* en la población del Pedregal de San Ángel que presentan diferencias con su órgano recíproco. Cada categoría corresponde a la diferencia en mm en la posición de estigmas y anteras recíprocos. Los símbolos de cada tipo representan los órganos recíprocos. Los círculos abiertos representan plantas con estambres cortos (Pin), los círculos cerrados plantas de estilos cortos (Thrum), los cuadros abiertos plantas con estambres largos (Thrum) y los cuadros cerrados plantas con estilos largos (Pin). Cada categoría solo puede tener un máximo de cuatro símbolos.

## 9.2. Estimación de la tasa de entrecruzamiento

Los cuatro primers empleados en este estudio generaron un total de 96 bandas reproducibles de las cuales 67 fueron bandas polimórficas. Con los primers #809 y #841 se detectaron 27 bandas repetibles de las cuales 19 fueron polimórficas y 8 fueron bandas fijas en todos los individuos. Con los primer #810 y # 840 se detectaron 21 loci repetibles, 16 loci polimórficos y 5 loci no polimórficos conel primer #810 y 13 loci polimórficos y 8 bandas fijas con el primer #840. Las frecuencias alélicas de todos los loci para cada morfo floral (sólo los genotipos maternos), así como la diferenciación genética entre los dos morfos fue calculada utilizando el programa *TFPGA* (apéndice 5). Con una prueba exacta de Fisher (1954) se compararon las frecuencias alélicas de todos los loci en los dos morfos florales y se encontró que de los 67 loci utilizados, sólo 3 fueron estadísticamente diferentes. El nivel de diferenciación global entre los morfos no difiere estadísticamente de cero ( $\theta = -0.0116$ , L.S.= 0.0059 – L.I.= -0.0259). El estimador del valor promedio de  $\theta$  (es equivalente a la  $F_{st}$ ) y se calculó con un intervalo de confianza del 95% (1000 iteraiones).

A pesar de que el sistema de incompatibilidad de *B. ternifolia* permite las fecundaciones intramorfo y las autopolinizaciones, en este trabajo se encontró que la tasa de fecundación cruzada de la población en el año 2003, fue muy alta ( $t = 0.955$ , e.e. = 0.016). No obstante, al ser este valor diferente de 1 el 4.5% restante de la progenie es resultado de cruza endogámicas. El coeficiente de endogamia para los genotipos parentales de *B. ternifolia* muestra que el nivel de heterocigosis es alto ( $F = -0.200$ , e.e. = 0.003). La tasa multilocus de entrecruzamiento de los morfos Pin y Thrum también es muy alta, pero no se encontraron diferencias significativas entre ellos (Tabla 4). Así mismo no hubo diferencias en este

parámetro al separar a las plantas en hercogamia alta y baja. En todos los casos la tasa de entrecruzamiento de un solo locus es menor que la tasa de entrecruzamiento multilocus, indicando que hay endogamia biparental. En todas las estimaciones este valor fue significativo menos en el caso de la estimación del morfo Thrum (Tabla 4). Los valores de  $t_m$ - $t_s$  indican que tanto para toda la población como para las plantas del morfo Pin aproximadamente el 10% de la progenie proviene de cruza entre parientes. La endogamia biparental fue distinta entre los niveles de hercogamia. En las plantas con menos de 5mm de separación estigma-antenas el 14% de la progenie proviene de cruza entre parientes, mientras que en las plantas que presentan hercogamias de más de 5 mm, solo el 9 % de la progenie es producto de endogamia biparental. Aproximadamente el 8% de las semillas que produce una planta provienen de un solo genotipo paterno, es decir una sola planta donadora de polen contribuye con 8% de los hijos de una planta. La correlación de paternidad no fue significativa en las plantas del morfo Thrum. En las plantas con hercogamia alta este valor es de  $r_p = 0.105$  e.e = 0.041, mientras que las plantas con hercogamia baja presentan una  $r_p = 0.068$  e.e. 0.030.

**Tabla 4.** Estimación de la tasa de entrecruzamiento de *B. ternifolia* en el Pedregal de San Ángel. Entre paréntesis se encuentra el valor de la desviación estándar. Los asteriscos indican valores estadísticamente diferentes de 1 y 0.

Parámetro	General	Morfo floral		Hercogamia	
	Población	Pin	Thrum	Baja	Alta
$t_m$	0.955 (0.016)*	0.948 (0.020)*	0.966 (0.086)ns	0.959 (0.033)ns	0.960 (0.042)ns
$t_s$	0.853 (0.022)*	0.847 (0.036)*	0.865 (0.043)*	0.823 (0.045)*	0.871 (0.031)*
$t_m-t_s$	0.102 (0.015)*	0.101 (0.028)*	0.101 (0.081)ns	0.135 (0.041)*	0.089 (0.041)*
$r_p$	0.088 (0.016)*	0.077 (0.022)*	0.078 (0.060)ns	0.068 (0.030)*	0.105 (0.041)*
N madres	19	10	9	10	9
$\bar{N}$ progenie	287	166	121	137	150
$\bar{X}$ hijos x familia	14.4	13.75	15.37	15.1	14.7
Ámbito de variación	(9-23)	(9-23)	(10-23)	(9-23)	(10-23)

Para ver si los valores de  $t_m, t_s, t_m-t_s, r_p$  eran significativamente diferente de 1 y 0 se calculó  $2(\bar{d.e}) + \bar{X} - 2$  (d.e) respectivamente.

\* Indica valores diferentes de 1 y 0.

## 10. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo demuestran que *Bouvardia ternifolia* es una especie distíllica que presenta gran variación en los atributos florales entre plantas del mismo morfo. Esta situación evidentemente repercute en la hercogamia de los individuos de la población. Dado que la hercogamia recíproca favorece el flujo de polen (mediado por polinizadores) entre individuos de diferentes morfos (“dissasortative mating”) y contribuye a incrementar la probabilidad de fertilización cruzada, este mecanismo es considerado el más importante en la estabilidad de las poblaciones distílicas aún en ausencia de un sistema de incompatibilidad (Darwin, 1877; Lloyd & Webb, 1992; Barrett, 1990). Si bien, los resultados muestran que la mayoría de las plantas en la población del Pedregal de San Ángel presentan órganos complementarios recíprocos, existen plantas cuya distancia entre órganos complementarios alcanza hasta 9mm. Si la transferencia de polen (mediada por polinizadores) ocurre entre anteras y estigmas del mismo nivel, entonces las plantas que se salen del promedio de la población deberán tener una transferencia de polen poco eficiente. Asimismo se esperaría que dado que la especie es parcialmente autocompatible, las plantas con hercogamias bajas tuvieran una tasa de fertilización cruzada menor. Sin embargo no se encontraron diferencias en la estimación de la tasa de entrecruzamiento de las plantas con hercogamias bajas y altas probablemente debido a que el tamaño de muestra no fue suficiente para hacer esta comparación, en ambos casos el valor es muy alto ( $t_m = 0.959$  y  $t_m = 0.960$ ). Este resultado en conjunto con la estimación de la población y de cada uno de los morfos revela que en el Pedregal de San Ángel *B. ternifolia* se reproduce principalmente por alogamia ( $t_{m\text{ pob}} = 0.955$ ,  $t_{m\text{ Pin}} = 0.948$ ,  $t_{m\text{ Thrum}} = 0.966$ ). A pesar de esto, la  $t_m$  poblacional difiere de 1 y por lo tanto el 4.5% de la progenie proviene de cruces endogámicas. No obstante el coeficiente de endogamia

( $F = -0.200$ , S.D. = 0.003) indica ausencia de endogamia en la población parental y un nivel alto de heterocigosis. Esto sugiere que a pesar de la falta de reciprocidad entre niveles de órganos en algunas plantas, la hercogamia que presentan los individuos de la población parece ser suficiente para promover la transferencia de polen entre morfos provocando los apareamientos entre individuos diferentes (dissortative mating).

### **10.1. Variación en la morfología floral.**

Dado que las especies distílicas tienen dos morfos florales, es de esperarse que las distribuciones de frecuencias en las longitudes de estilos y estambres sean bimodales y con poco solapamiento entre morfos. Este patrón es común en especies distílicas donde hay reciprocidad estricta entre niveles de órganos (Darwin, 1877; Ganders, 1979; Murray, 1990; Richards & Koptur, 1993; Barrett *et al.*, 2000<sub>b</sub>; Contreras & Ornelas, 2005; Rossi *et al.*, 2005). Sin embargo estudios como éste, que incluyen datos de la variación entre los individuos de una población, han documentado un rango importante de solapamiento en las distribuciones de frecuencias en la longitud de los estilos y estambres de los morfos de especies distílicas (Richards & Koptur, 1993; Eckert & Barrett, 1994; Pailler & Thompson, 1997; Nishihira *et al.*, 2000; Faivre & McDade, 2001; Castro & Araujo, 2004; Massinga *et al.*, 2005; Lopes & Buzato, 2005). Algunos trabajos han documentado que esta variación en la posición de estigmas y anteras dentro de un mismo morfo influye en la reciprocidad entre niveles de órganos (estigmas y anteras altos y cortos) y/o en la hercogamia de las flores; tal es el caso de varias especies de *Erythroxylum* (Ganders, 1979; Pailler *et al.*, 1998) y *Primula* (Al Wadi & Richards, 1993; Tremayne & Richards, 1993), así como en *Linum pubescens* (Dulberger, 1973), *Guettarda scabra* (Richards & Koptur, 1993), *Turnera ulmifolia* (Martin,

1965) y *Jasminum fruticans* (Thompson & Dommée, 2000). Este patrón de variación continua en las longitudes de estilos y estambres de plantas Pin y Thrum en el Pedregal de San Ángel es similar al reportado en otras poblaciones de *B. ternifolia* (Faivre & McDade, 2001). Sin embargo este es el único trabajo con *B. ternifolia* que demuestra que a pesar de esta variación la tasa de fertilización cruzada es muy alta.

En *B. ternifolia* las diferencias en la morfología floral entre morfos florales son consistentes en las cinco poblaciones descritas hasta el momento (Faivre & McDade, 2001; Hernández, 2006 y la población analizada en este estudio). En todos los atributos florales analizados, el morfo Thrum presentó la mayor variación, y en todos los casos, a excepción del estilo y de los estigmas (donde no encontré diferencias significativas), este morfo es el que presenta los órganos florales más grandes. Ganders (1979) menciona que el dimorfismo en el tamaño de la corola es raro entre taxa heterostílicos y que cuando ocurre, el morfo Thrum presenta corolas mas grandes que el morfo Pin. Este es el caso de varias especies de Rubiaceae como *Rudgea jasminoides* (Baker, 1956), *Palicourea fendleri* y *Palicourea petiolaris* (Sobrevilla *et al.*, 1983), *Luculia grantissima* (Murray, 1990), *Guettarda scabra* (Richards & Koptur, 1993), *Manettia luteo-rubra* (Passos & Sazima, 1995), *Hediotys salzamannii* (Riveros *et al.*, 1995), *Gaertnera vaginata* (Pailler & Thompson, 1997), *Palicourea padifolia* (Ree, 1997), *Sabicea cinerea* (Teixeira & Machado, 2004) y *Psychotria ipecacuanha* (Rossi, *et al.*, 2005). Entre las Rubiaceas estudiadas sólo en *Psychotria surrensis* (Stone, 1995) las flores de Pin son más grandes que las de Thrum, mientras que en *Psychotria jasminoides*, *Psychotria birotula*, *Psychotria pubigera* (Castro & Oliveira, 2002), *Psychotria barbiflora* (Monteiro *et al.*, 1991) y *Psychotria suterella* (Lopes & Buzato, 2005) la longitud de la corola no difiere entre morfos.

Las diferencias en el tamaño de la corola entre los morfos Pin y Thrum de *Bouvardia ternifolia* están dadas por distintos patrones en la velocidad de crecimiento de los botones florales por encima y por debajo del punto de unión del filamento de la antera con la corola. En el morfo Thrum la sección del botón que crece más rápido es de mayor tamaño que en el morfo Pin; esto determina que las flores de este morfo alcancen longitudes de corola más grandes (Faivre, 2000). La diferencia en la posición de las anteras entre morfos está dada por el tiempo de desarrollo de los estambres y el tamaño del botón antes de la antesis. En el morfo Pin los estambres alcanzan su longitud final previo a la antesis en botones de menor tamaño (aprox. 3.1 mm), mientras que en el morfo Thrum los estambres siguen creciendo hasta que la flor abre y el botón mide aproximadamente 3.5 mm (Faivre, 2000). Al analizar la correlación entre la longitud de la corola y los estilos en *B. ternifolia*, vemos que ésta es positiva, pero con diferentes pendientes entre los morfos. Para alcanzar la reciprocidad en la posición de estigmas y anteras entre los morfos, el estilo no sólo debe cambiar en relación a la longitud de los estambres conforme varía el tamaño de la corola entre los individuos; sino que estos cambios deberían mantener la distancia entre estigmas y anteras dentro de las flores. Es decir, sin importar el tamaño de la flor, la hercogamia de las flores debería mantenerse. De ser así, el valor de la pendiente de la relación corola-estilo, debería ser la misma que la relación entre la corola y los estambres. Para *B. ternifolia*, esto sólo sucede en las plantas del morfo Pin, mientras que en las del morfo Thrum, conforme aumenta el tamaño de la flor, también se incrementa la distancia estigma-antenas (Faivre, 2000). Por lo tanto, no importa que tan grande sea el tamaño de la corola, de los estilos o estambres en las flores Pin, la hercogamia promedio se mantiene constante (= 5 mm), mientras que en las plantas Thrum las flores mayores a 23 mm presentan distancia estigma-antenas que incrementan de 5 a 8 mm, perdiendo la reciprocidad con el morfo Pin. Aunque este es el patrón general, cabe señalar que en la

población se encontraron plantas del morfo Thrum que presentan mucha variación en relación al tamaño de la corola y del estilo. Es decir, no siempre las flores más largas presentan los estigmas más altos. Los valores máximo y mínimo de los órganos recíprocos (estambres Pin con estilos Thrum) del nivel bajo coinciden entre los morfos florales, pero el tamaño de las flores es diferente entre morfos. Las flores Thrum son entre 2 y 4 mm más grandes. En el nivel de órganos largos las flores de ambos morfos no presentan una correspondencia en el valor máximo para la longitud de los órganos. Es decir, se encontraron flores Thrum con estambres de hasta 33 mm (estas flores son las que presentan las corolas más largas), pero no se encontraron flores Pin con estilos de ese tamaño. En estas últimas el valor máximo en la longitud de los estilos es de 28 mm, por lo que la reciprocidad en este nivel de órganos se da entre los 20 y 28 mm de longitud de estilos Pin y estambres Thrum. También en este caso las flores Pin son más pequeñas que las Thrum por una diferencia entre 4 y 5 mm.

Dado que las plantas Thrum de corolas muy grandes presentan anteras en posición que no es recíproca con ningún estigma del morfo opuesto, es probable que éstas sean susceptibles al desperdicio de polen ó presenten menor adecuación por la vía masculina. Quizá el bajo número de plantas Thrum con flores muy grandes (hercogamias y estambres extremas) se deba a que estos individuos no logran compensar la pérdida de polen por la vía femenina. Puesto que estas plantas son las responsables de la pérdida de la reciprocidad entre órganos altos en la población, y dado que la hercogamia recíproca es considerada la fuerza más importante para el mantenimiento de la distilia (Darwin, 1877; Lloyd & Webb, 1992<sub>b</sub>), es probable que el bajo número de plantas Thrum con estambres y hercogamia extremos que se observan en la población reflejen selección natural a favor de la hercogamia recíproca.

La hercogamia recíproca es un componente esencial en los modelos de evolución y mantenimiento de la distilia, basados en la promoción de la fertilización cruzada (Darwin

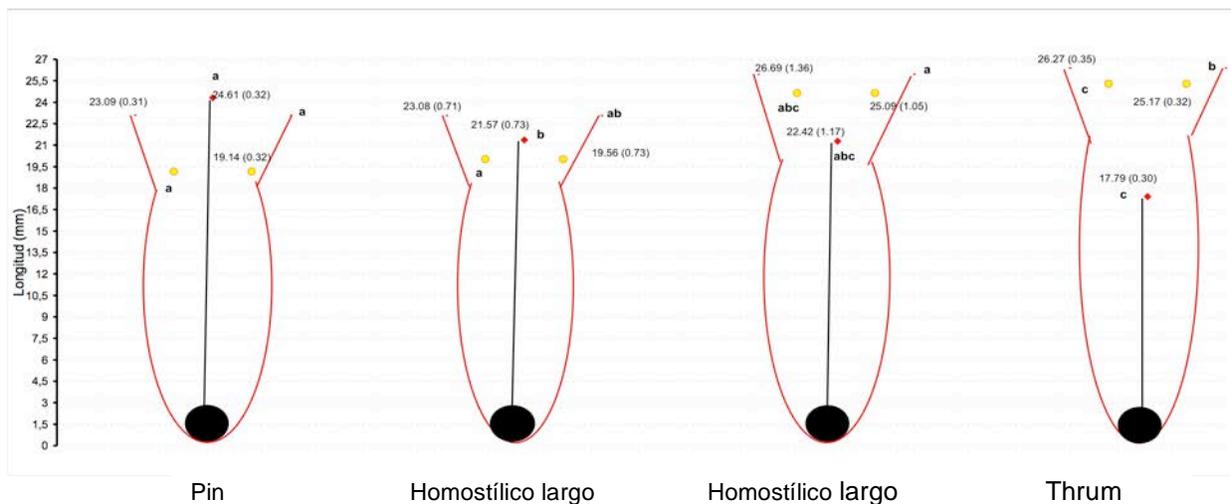
1877, Loyd & Webb, 1992<sub>b</sub>). Considerando que los polinizadores visitan las flores de los dos morfos florales de la misma manera, la reciprocidad entre estigmas y anteras de los dos morfos, aseguraría el depósito de polen del nivel alto en una parte del cuerpo del polinizador diferente a la del nivel bajo; de manera que los estigmas coincidan con el polen del morfo opuesto (Darwin 1877, Loyd & Webb, 1992<sub>b</sub>). Los valores promedio de los órganos reproductivos de los dos morfos sugieren que hay una baja reciprocidad en *B. ternifolia*. No obstante, el índice que evalúa la reciprocidad entre niveles de órganos (Richards & Koptur, 1993) muestra que la población está en el rango de las especies más recíprocas. Es importante señalar que este método no resulta útil para entender la variación intrapoblacional y las consecuencias evolutivas de esta variación en los individuos de una población. Al utilizar los promedios de los niveles de órganos, la fórmula propuesta para éste índice resume la variación poblacional en promedios por morfo y no permite ver el porcentaje de las plantas que presentan estilos y/o estambres de longitud recíproca con otros individuos y que proporción no. En cambio, en este trabajo propongo un nuevo índice que analiza el grado de desacople en la posición recíproca de los estigmas y anteras de un individuo, en relación al valor promedio de la población. Esta nueva medida permite ver que proporción de las plantas de una población son las que más contribuyen a la variación en la hercogamia y probablemente aquellas propensas a diferencias en el flujo de polen, la adecuación y la tasa de fertilización cruzada o endogamia.

La mayor variación en la hercogamia se encontró asociada a las plantas del morfo Thrum de *B. ternifolia*. Esto es común en numerosas especies distílicas, por ejemplo, *Cordia spp.*, (Opler *et al.*, 1975, citado en Thompson & Dommée, 2000), *Guettarda scabra* (Richards & Koptur, 1993) y *Jasminum fructicans* (Thompson & Dommée, 2000). No obstante, se han reportado casos donde el morfo largo presenta mayor variación (*Gaethnera vaginata* Paillet &

Thompson, 1997). En promedio la separación estigma-antenas del morfo Pin de *B. ternifolia* es significativamente menor que en las plantas del morfo Thrum, esto debido a que un mayor número de plantas Pin presentaron hercogamias cercanas a cero (plantas homostílicas), y a que algunas plantas Thrum tienen estambres muy largos. La gran variación que podemos observar en la posición de estigmas y antenas en los individuos de *B. ternifolia* de la población del Pedregal de San Ángel es comparable a la de otras especies distílicas (Shore & Barrett, 1990; Richards & Koptru, 1993; Faivre & McDade, 2001). Sin embargo en esta población resulta interesante la presencia de individuos con estigmas y antenas al mismo nivel, comúnmente conocidos como homostílicos.

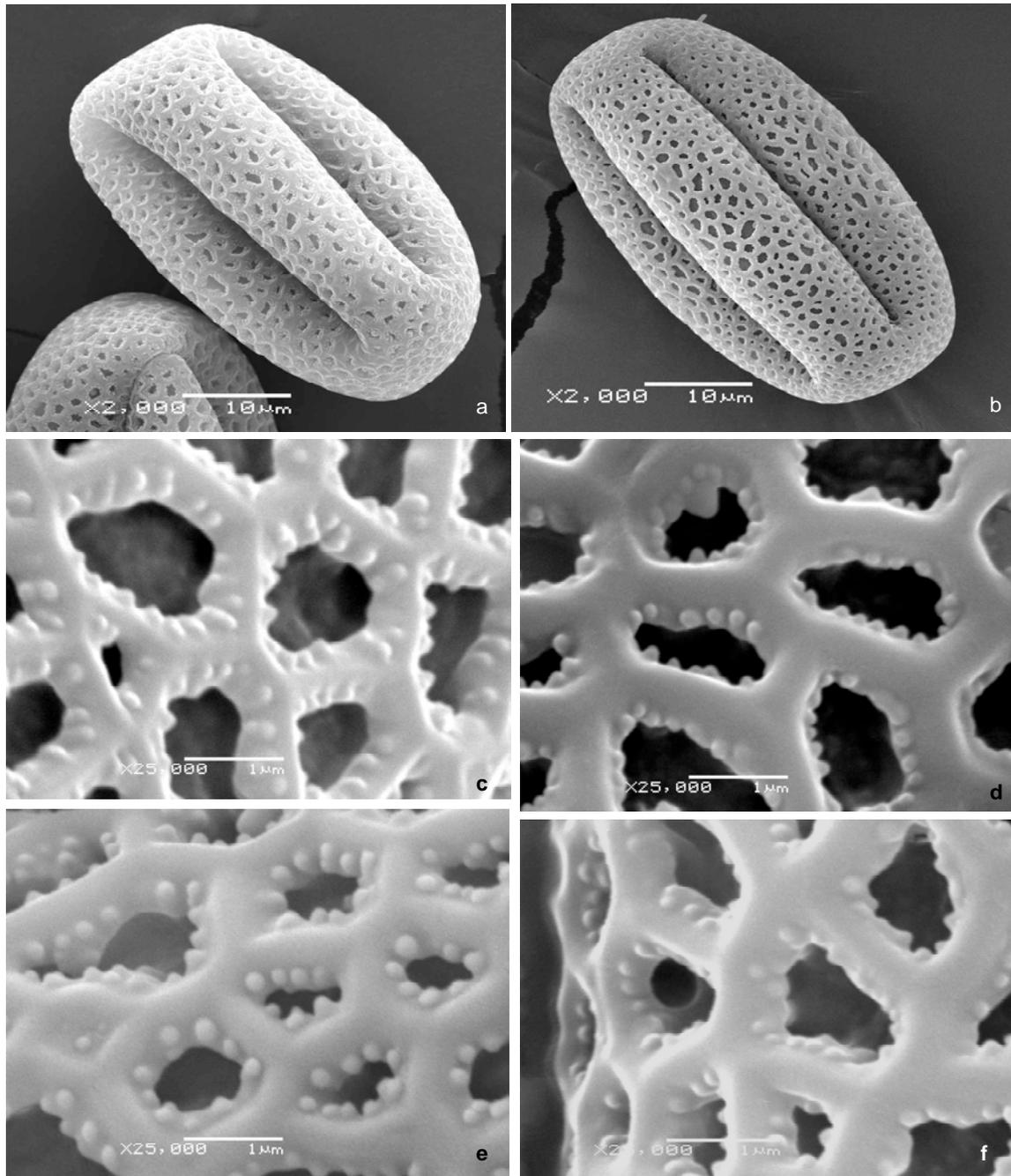
Existen dos maneras de explicar la presencia de plantas con flores homostílicas en poblaciones heterostílicas. Una es por medio de un evento de recombinación del supergene y la otra por la presencia de genes modificadores de la longitud de estilos y/o estambres que producen plantas fenotípicamente homostílicas. En *B. ternifolia* la producción de frutos en las cruces intramorfo y las autopolinizaciones (Coello *et al.*, 1984) sugería la posibilidad un evento de recombinación. Asimismo la proporción de los morfos homostílicos en la población del Pedregal de San Ángel (9 homostílicos largos y 3 homostílicos cortos) parecía ser consistente con la mayoría de las especies donde se ha reportado la presencia homostílica producto de recombinación (Lewis 1975; Charlesworth & Charlesworth, 1979; Wedderburn & Richards, 1992; Richards, 1997). No obstante al analizar el promedio en la longitud de los órganos reproductivos (estilos, estambres y corola) de los homostílicos largos y de los homostílicos cortos se puede ver que el la longitud de la corola y los estambres de ambos homostílicos coinciden con la longitud promedio de la corola y de los estambres de los morfos Pin y Thrum respectivamente (Fig. 14). Sin embargo el estilo es el órgano que presenta mayor variación, sugiriendo que el gen que controla la longitud del estilo podría ser el responsable de

la presencia de plantas homostílicas en la población del Pedregal de San Ángel de *B. ternifolia* (Fig. 14). En algunas especies heterostílicas se ha reportado que genes modificadores de la longitud de estilos y/o estambres son los responsables de la presencia de plantas homostílicas en poblaciones naturales. Se han identificado al menos tres ejemplos de la acción de estos genes en diferentes taxa heterostílicos. En *Primula sinensis* la acción de estos genes influye en la hercogamia ya sea acortando la longitud del estilo, o alargando la longitud de las anteras (Mather & de Winton, 1941; Mather, 1950). En *Eichhornia paniculata* (Pontederaceae) algunas plantas del morfo medio expresan genes recesivos que causan la elongación de los estambres provocando que éstos queden a la misma altura de los estigmas (Barrett, 1985). Estos genes exclusivos del morfo intermedio no causan cambios mayores en las características del polen ni en el sistema de incompatibilidad, lo cual sugiere que la homostílica en este morfo es producida por genes modificadores y no por recombinación dentro del supergene de la distílica (Fenster & Barrett, 1994; Manicacci & Barrett, 1995). Las plantas homostílicas de *Jasminum fructificans* presentan la forma del polen Thrum, pero sólo producen semillas con flores del morfo Pin. Razón por la cual los autores sugieren que la presencia de estos homostílicos se debe a la acción de genes modificadores, y no a un evento de recombinación (Thompson & Dommée, 2000). Aunque en este trabajo no se detectó que el tamaño de los granos de polen de los morfos fuera diferente, la ornamentación de la exina de éstos presentó una diferencia notable. Sin embargo en los individuos homostílicos largos y cortos, el polen mostró la ornamentación de la exina parecida a la de las plantas Pin y Thrum respectivamente (Fig. 15). Dado que no se sabe como es la reacción de compatibilidad/incompatibilidad de los individuos homostílicos con ellos mismos y con las plantas de los morfos Pin y Thrum, La evidencia presentada hasta el momento apoya la posibilidad de que la acción de genes



**Figura 14.** Promedio  $\pm$  error estándar de los órganos florales de cada uno de los cuatro morfos florales de *B. ternifolia* (Pin, Thrum, homostílicos cortos y largos). Los promedios de cada órgano floral que no comparte la misma letra son significativamente diferentes, los promedios que comparten letras no difieren entre ellos.

modificadores pueden influir en el desarrollo de los estilos y en longitud final de éstos provocando la presencia de plantas homostíficas en el Pedregal de San Ángel.



**Figura 15.** Microscopía electrónica de barrido de los granos de polen y de la ornamentación de la exina de los morfos homotípico corto a, c, d y homostípico largo b, d, f de *B. ternifolia*.

## 10.2. Estimación de la tasa de entrecruzamiento

Los resultados de la estimación de la tasa de entrecruzamiento con marcadores moleculares ISSRs y el método de máxima verosimilitud de Ritland revelaron que *B. ternifolia* es una especie que se reproduce principalmente por fertilización cruzada. A pesar de que *B. ternifolia* en el Pedregal de San Ángel no presenta un sistema de incompatibilidad clásico de especies distílicas, la población del Pedregal de San Ángel mostró una tasa de entrecruzamiento alta ( $t_m = 0.955$ ). Sin embargo al ser diferente de 1 el 4.5% de progenie resulta de cruza endogámicas. El índice de Fijación  $F_e$  en la progenie fue menor de lo esperado basado en el valor de la  $t_m$ . Es decir, utilizando el valor  $t_{m\text{ pob}} = 0.955$ , el índice de fijación esperado [ $F_e = (1-t)/(1+t) = 0.023$ ; Hedrick 1985], mientras que la  $F$  estimada con el MLTR) fue  $F = -0.200 \pm 0.003$ . Un valor de  $F_e$  más bajo de lo esperado sugiere que hay un exceso de heterocigos y menos endogamia de la esperada en la progenie de la población analizada. Valores de  $F$  iguales o muy parecidos indican que la población se encuentra en equilibrio de endogamia y que no hay depresión por endogamia y valores de  $F$  mayores indican mayor endogamia de la esperada en la progenie de la población (Hedrick, 1985). Algunos estudios con isoenzimas que han mostrado este último patrón utilizaron embriones o cotiledones de semillas antes o justo después del momento de la germinación (Peters *et al.*, 1990; House & Bell, 1994). En este trabajo se utilizó progenie de plántulas germinadas en invernadero de más de tres meses de edad. Por lo tanto hubo oportunidad de que aquellas semillas endogámicas de bajo vigor no germinaran, germinaran pobremente o murieran al poco tiempo. Esto sugiere que puede existir algún nivel de selección en contra de los homocigos y esto se haya reflejado a la hora de obtener el tejido de la progenie. Es probable que el coeficiente de endogamia de la población parental refleje que un porcentaje de plantas

que se producen por autofertilización no alcancen a llegar a la edad reproductiva. Quizá estas plantas sean competitivamente inferiores a las plantas que se producen por fertilización cruzada y no logren establecerse como adultos en la población. Estimaciones realizadas en poblaciones de especies heterostilicas autoincompatibles han reportado valores similares al de *B. ternifolia*, tal es el caso de *Primula vulgaris*  $t_m = 1.00_{pob}$  (Cahala & Gliddon, 1984), *Psychotria faxluscens*  $t_m = 0.995_{pin}$  y  $t_m = 1.01_{Thrum}$  (Pérez-Nasser, *et al.*, 1993), *Turnera ulmifolia*  $t_m = 1.00_{pob}$  (Barrett & Shore, 1987), *Amsinkia furcata*  $t_m = 0.99_{pob}$  (Schoen *et al.*, 1997) y *Eichhornia paniculata*  $t_m = 1.00_{pob}$  (Barrett & Shore, 1989). Incluso en algunas poblaciones de *Eichhornia paniculata* (Kohn & Barrett, 1994) y *Narcissus triandrus* (Barrett *et al.*, 1997) donde el sistema de incompatibilidad es parcial (curren cruza intramorfo) o lábil, la tasa de entrecruzamiento se mantiene cercana a 1.0. Sin embargo se ha observado que cuando la heterostilia evoluciona a la homostilia (Schoen *et al.*, 1997) o bien, cuando las especies distílicas o tristílicas pierden el sistema de incompatibilidad, el valor de la  $t_m$  se reduce notablemente (Barrett & Shore, 1989; Barrett & Husband, 1990; Husband & Barrett, 1991; Schoen *et al.*, 1997; Belaousoff & Shore, 1995). Al revisar las estimaciones de la tasa de entrecruzamiento en especies que presentan hercogamia sin un sistema de autoincompatibilidad (*Clarkia tembloriensis* Holtsford & Ellstrand, 1992; *Aquilegia caerulea* Brunet & Eckert, 1998; *Aquilegia canadensis* (Herlihy & Eckert, 2004; *Aquilegia coerulea* Brunet & Sweet, 2006; *Mimulus ringens* Karron *et al.*, 1997; *Intsia palenbanica* Lee *et al.*, 2002; *Silene virginica* Dudash & Fenster, 2001; *Chamaecrista Fasciculata* Fenster, 1995) se puede observar que la mayoría de éstas presentan valores que corresponden a sistemas mixtos ( $t_m$  entre 0.4 y 0.65). Solo algunas presentan valores que indican fertilización cruzada estricta ( $t_m$  entre 0.77 y 0.89), y muy pocas de autofertilización ( $t_m$  entre 0.0 y 0.3). Aquellas especies hermafroditas autocompatibles que no presentan dicogamia, hercogamia, o algún dimorfismo

sexual son las que presentan los valores más bajos en la tasa de fertilización cruzada. En resumen, aquellas especies que poseen una combinación de dimorfismo sexual con hercogamia, dicogamia y/o sistema de incompatibilidad son las que presentan las tasas de fertilización cruzada más altas. Es decir, las barreras fisiológicas (Sistemas de incompatibilidad.) evitan la endogamia uniparental y los mecanismos de separación espacial y/o temporal de las funciones sexuales ayudan a promover el flujo de polen entre individuos diferentes incrementando la proporción de progenie de fertilización cruzada. No obstante ni los sistemas de incompatibilidad, ni las barreras de separación espacio/temporal eliminan del todo la endogamia de una población.

Algunos trabajos que han intentado analizar el significado funcional de la hercogamia a nivel intrapoblacional han observado que existe una correlación positiva entre la hercogamia y la tasa de entrecruzamiento a nivel intrapoblacional. Por ejemplo en *Nicotiana rustica* (Breese, 1959), *Licopersicon pimpinellifolium* (Rick *et al.*, 1978), *Aquilegia caerulea* (Brunet & Eckert, 1998), *Mimulus Ringens* (Karron *et al.*, 1997), *Datura stramonium* (Motten & Stone, 2000), *Gilia achiellifolia* (Takebayashi *et al.*, 2006), y entre poblaciones de *Clarkia temblorensis* (Holtsford & Ellstrand, 1992) y *Turnera ulmifolia*, (Belaoussoff & Shore, 1995). Si bien estos resultados sugieren que la hercogamia funciona evitando la autofertilización, también existe una gran variación en los valores de la tasa de entrecruzamiento entre distintas poblaciones de una misma especie y entre años de una misma población (Takebayashi & Delph, 2000; Takebayashi *et al.*, 2006). Esta variación en la tasa de fertilización cruzada en especies autocompatibles sugiere que la hercogamia de los individuos de una población puede funcionar de distintas maneras dependiendo de la interacción con otros factores. Se ha identificado que estos factores ya sean ambientales o ecológicos están relacionados principalmente con la presencia y actividad de los polinizadores. Por ejemplo en *Narcissus*

*longispathus* no se encontró una correlación significativa entre la hercogamia y la tasa de entrecruzamiento (Medrano *et al.*, 2005). En este trabajo las plantas con valores intermedios de hercogamia presentan ventaja de entrecruzamiento con respecto a las clases más altas y más bajas de hercogamia. Este patrón está explicado por dos factores: una correlación inversa entre la distancia del estigma al borde de la flor con la hercogamia, y el comportamiento de los polinizadores (Medrano *et al.*, 2005). Este tipo de resultados resaltan la importancia de la interacción planta-polinizador para seleccionar el diseño óptimo que maximiza la adecuación de los individuos.

Se conocen varios tipos de hercogamia (Lloyd & Webb, 1986) y los diferentes diseños varían en abundancia en la naturaleza, lo cual sugiere que la secuencia en la que se presentan los estigmas y las anteras en una flor influyen de diferente manera en los patrones de apareamiento (Barrett, 2003). Se ha demostrado que las plantas con hercogamia de aproximación experimentan una tasa de fertilización cruzada más alta que aquellas con hercogamia reversa (Barrett, 2003). En este trabajo no se encontró una diferencia en la  $t_m$  entre morfos, lo cual probablemente refleja que el polen legítimo de fertilización cruzada presenta ventajas sobre el polen propio y el polen intramorfo (en ambos morfos) para fecundar mayor número de óvulos. Así mismo el polen legítimo de fertilización cruzada que llega a los estigmas de ambos morfos debe ser suficiente para fecundar una gran cantidad de óvulos. No obstante, los morfos de *B. ternifolia* podrían experimentar diferencias en las cargas de polen, el éxito reproductivo femenino y el éxito reproductivo masculino, debido simplemente a la manera en la que se presentan los estigmas y las anteras en las flores. Generalmente las flores con hercogamia de aproximación son más susceptibles a flujo de polen ilegítimo, pero evitan mejor la autopolinización, mientras que las flores con hercogamia reversa son más susceptibles a la autopolinización intrafloral pero reciben más polen legítimo. Los mecanismos

florales que previenen la autofertilización incrementan la adecuación de la vía materna a través de la producción de progenie de alta calidad, mientras que aquellos que reducen la interferencia sexual promueven un incremento en la adecuación masculina. Por lo tanto a pesar de que en ambos morfos la tasa de fecundación cruzada es muy alta, la interferencia sexual podría jugar un papel importante con consecuencias contrastantes en la adecuación de las funciones sexuales en ambos morfos.

En especies heterostilicas con modificaciones en el sistema de incompatibilidad, se ha observado que gran variación en la hercogamia, producto de genes modificadores es la causante de variación en la tasa de fertilización cruzada (Khon & Barrett, 1994). Dada la gran variación en la hercogamia de las plantas de *B. ternifolia*, se esperaba encontrar variación en la tasa de fertilización cruzada entre individuos con diferentes niveles de hercogamia. No obstante esto no fue así, la  $t_m$  en *B. ternifolia* no estuvo correlacionada con el nivel de hercogamia, es decir en ambas categorías de hercogamia (alta y baja) la  $t_m$  es muy alta y no difiere de 1. Este sugiere que, siempre y cuando haya flujo de polen legítimo entre morfos, el nivel de hercogamia no afectará a la  $t_m$  y a la heterocigosis de los individuos en la población. Este resultado podría ser la respuesta al mantenimiento de tanta variación en la hercogamia en la población del Pedregal de San Ángel. Una división más fina de las categorías de hercogamia podría servir para detectar diferencias significativas en otros parámetros del sistema reproductivo tal como la endogamia biparental, la correlación de paternidad y la correlación de autofertilización. El hecho de que haya separado a las categorías en  $\pm 5$  mm de hercogamia fue por el bajo número de progenie (por familia materna) que obtuve para la estimación en el 2003. Esta situación fue debido a que no se contó con instalaciones apropiadas para el mantenimiento de la progenie. Muchas plantas murieron a causa de las altas temperaturas que dentro de los invernaderos del Instituto de Ecología. Debido a esto no se

contó con un número suficiente de plantas para representar la amplia variación en la hercogamia de todos los individuos de la población.

En las especies heterostilicas que poseen un sistema de incompatibilidad la endogamia uniparental está prácticamente ausente. No obstante este mecanismo no evita toda de la endogamia potencial de una población. La presencia de endogamia biparental en especies con sistema de incompatibilidad es una consecuencia directa de la estructura de los individuos en población, en donde los apareamientos al azar ocurren entre los mismos individuos reproductivos (demes) y entre individuos cercanamente emparentados (Ritland, 1985; 1988), así como de la interacción con procesos ecológicos. En este trabajo se encontró que el valor de la tasa de entrecruzamiento de un solo locus es menor que el de la tasa multilocus. Esto indica que existe endogamia biparental en la población. El porcentaje de la progenie producto de cruces entre parientes en la población, así como en los dos morfos florales fue del 10%. Este valor es de los más altos reportado hasta el momento para especies heterostilicas (Belaoussoff & Shore, 1995). Incluso en otras especies hermafroditas autoincompatibles (Sun *et al.*, 1988; Norman *et al.*, 1997; Sun & Ritland, 1998; James *et al.*, 1998; Young & Brown, 1999; Kalisz, 1999), o que presentan algún mecanismo de separación espacial o temporal (Takebayashi *et al.*, 2006; Eckert & Sweet, 2006), o dimorfismo sexual (James *et al.*, 1998; Ishida & Hiura, 2002; Medrano *et al.*, 2005), la endogamia biparental no alcanza el 6%. El porcentaje de endogamia biparental de *B. ternifolia*, es comparable con *Caryocar brasilense* (Caryocaraceae) (Collevatti *et al.*, 2001) y con dos especies heterostilicas: *N. triandus* que presenta cerca del 8% (Barrett *et al.*, 1997) y *Erithroylum havanense* del 10% (Abarca y Domínguez, datos no publicados). Las estimaciones de esta magnitud se han obtenido al utilizar marcadores moleculares hipervariables. Sin embargo, dado que el uso de enzimas todavía domina la mayoría de los trabajos donde se estiman parámetros del sistema reproductivo, es

probable que en muchos casos la endogamia biparental esté subestimada. La causa de este resultado en la población de *B. ternifolia* puede deberse a una interacción entre la estructura espacial de los individuos en la población, el proceso de polinización y el mecanismo de dispersión. En el Pedregal de San Ángel he observado que las plantas de esta especie, se encuentran distribuidas en parches de diferentes tamaños (área) y densidad de individuos (con un máximo de hasta 30 individuos) compuestos por ambos morfos florales. La ecología de la dispersión de esta especie no está documentada en la literatura científica. No obstante, se sabe que las plantas de *B. ternifolia* producen cápsulas locuicidas que se abren una vez que éstas se secan. Dado que los frutos no presentan vellosidades, ni espinas que pudieran sugerir algún síndrome de dispersión zoocora, es probable que sólo el movimiento de las ramas (quizá provocado por el paso de algún animal o por el viento) provoque que tanto los frutos como las semillas caigan al suelo y puedan germinar. Probablemente el viento juegue un papel importante en la dispersión, puesto que las semillas son ligeramente aladas, pero es muy probable que los parches que se observan en la población, estén compuestos de individuos emparentados. En este trabajo no estudié la biología de polinización de *B. ternifolia*, pero en otros trabajos se ha reportado que es polinizada por especies de colibríes territoriales (Arizmendi *et al.*, 1994; Hernández, 2006). Esto podría traducirse en flujo de polen restringido al ámbito del movimiento del pájaro. Por lo tanto, la distribución de las plantas en parches familiares, aunado a la polinización por colibríes territoriales puede explicar el alto porcentaje de cruza entre parientes

La progenie de fertilización cruzada de plantas con frutos multisesillas pueden compartir el mismo padre si el polen proviene de un sólo donador y de un sólo evento de polinización, en lugar de provenir de una muestra al azar de la población entera (Brown *et al.*, 1985). La correlación de paternidad múltiple se puede atribuir a uno o varios de estos factores:

limitación en la transferencia de polen (Ritland, 1989), cuando el número de donadores de polen (potenciales) en una población es bajo o cuando los apareamientos ocurren entre vecinos (Surlles *et al.*, 1990), cuando un solo polinizador deposita una o más cargas de polen de diferentes padres (Marshall & Ellestrand, 1985; Epperson & Clegg, 1987), por visitas consecutivas de diferentes polinizadores cada uno llevando polen de una sola fuente, que los polinizadores lleven cargas de polen mixtas (Dudash & Ritland, 1991) o por asincronía en la temporada de floración (que no haya muchas flores al mismo tiempo) (Sampson, 1998). La correlación de paternidad encontrada en este trabajo (8 y 9%) es baja comparada con la de otras especies que también son polinizadas por aves o insectos como *Glicine argyrea* 85% (Brown, 1989), *Mimulus guttatus* 37-44% (Ritland, 1989), 32% de *Eichornia paniculata* que es una especie tristílica (Morgan & Barrett, 1990) y 26% del árbol *Eucalyptus rameliana* (Sampson, 1998).

Este valor tan bajo puede deberse a uno o varios de estos factores. Por ejemplo se ha observado que cuando se utilizan semillas de diferentes frutos, el valor de la correlación de paternidad es menor que cuando se estima dentro de frutos (Ritland 1989; Sampson 1998). Asumiendo que algún porcentaje de la correlación dentro de frutos resulta de visitas múltiples, se puede esperar que un porcentaje de correlación de paternidad se de entre frutos si estos fueron polinizados en la misma temporada de floración (Sampson 1995; 1998) En este trabajo se utilizaron semillas de diferentes frutos (por planta) colectados a lo largo de toda la temporada de floración del 2003. En los meses de mayo a principios de julio se da el pico de floración y fructificación en la población. Es probable que en estos meses muchas plantas de ambos morfos contribuyan a la poza de polen en la población y esto aunado a una gran producción de frutos, contribuya significativamente a la paternidad múltiple que se observa en la población del Pedregal de San Ángel. Sin embargo el porcentaje de hermanos completos

que se encontró en este trabajo, puede provenir de frutos colectados en los meses de agosto, septiembre y octubre, que es cuando sólo algunas plantas dentro y entre parches florecen de manera asincrónica. Esto aunado a una alta incidencia de daño por herbívoros y hongos patógenos en las flores y en los frutos de *B. ternifolia*, pueda provocar que sólo muy pocas plantas produzca frutos con semillas viables (de uno o pocos padres). Así mismo, a pesar de que algunos de los colibríes que polinizan a *B. ternifolia* son territoriales y se esperaría un mayor porcentaje de hermanos completos, las plantas se encuentran distribuidas en parches muy cercanos entre si y es probable que el área de forrajeo de un polinizador abarque un número suficiente de plantas de ambos morfos que justifiquen la paternidad múltiple. Por otra parte se ha observado que el movimiento de los polinizadores entre plantas varía dependiendo el despliegue floral resultando en una mayor dispersión de polen de entrecruza en plantas con pocas flores que en plantas con muchas flores. Este estudio es un ejemplo de la complejidad en la interpretación de la evolución y mantenimiento de los sistemas reproductivos, dadas las múltiples interacciones entre condiciones ecológicas, fisiológicas, ambientales y patrones de apareamiento.

La mayoría de los estudios que han estimado parámetros del sistema reproductivo en plantas, se han basado en el uso de marcadores codominantes, especialmente las enzimas y más recientemente los microsatélites. Existen pocos estudios en los cuales la tasa de fecundación cruzada, ha sido estimada mediante marcadores moleculares dominantes. Todos estos trabajos coinciden en resaltar la ventaja del uso de este tipo de marcadores en ausencia de suficiente polimorfismo con alo-isoenzimas. (Fristch & Riseberg, 1992; Giaotto *et al*; 1997; Ge & Sun, 1999; Silvertown, 2002). Por ejemplo, Fristch y Riseberg (1992) estimaron la tasa de fecundación cruzada en dos poblaciones de *Datisca glomerata* (12 y 7 familias con 9 -31 y 9 -11 individuos de progenie respectivamente) para poner a prueba modelos de mantenimiento

de la androdicea. Con marcadores dominantes (RAPD) ellos estimaron la  $t_m = 0.65$  para una población y  $t_m = 0.92$  para la otra demostrando que esta estimación es lo suficientemente alta para satisfacer el modelo teórico de mantenimiento de la androdicea. Estos autores sugieren tratar el producto amplificado de los RAPD con endonucleasas de restricción a fin de obtener loci codominantes, debido a que la naturaleza dominante de estos marcadores moleculares provee poca información (Fristch & Riseberg, 1992). Giaotto y colaboradores (1997) estimaron la tasa multilocus y de un solo locus en una población silvestre de *Eucalyptus urophylla* (Myrtaceae) con RAPDs y AFLPs. Con ambos métodos estimaron que la  $t_m$  y la  $t_s$  no difirieron significativamente entre ellas (ambas estimaciones  $t_m$  y  $t_s$  alrededor del 90%), concluyendo que la población se reproduce principalmente por fertilización cruzada y no experimenta endogamia biparental. Al comparar estos valores con los que presentó una población silvestre de *E. citriodora* utilizando tres loci de isoenzimas ( $t_m = 0.853$ ), las estimaciones obtenidas con marcadores dominantes fueron muy similares a las obtenidas mediante marcadores codominantes (Giotto *et al.*, 1997). Comparando ambos métodos (RAPD y AFLP), las estimaciones con RAPD fueron ligeramente mayores a las obtenidas con AFLPs. Sin embargo estos autores mencionan que la diferencia es muy pequeña (4%) y que en términos prácticos no cambia la conclusión principal del trabajo (la población de esta especie se reproduce principalmente por fertilización cruzada). No obstante mencionan que en la selección de los loci RAPD se necesita ser mucho más cuidadoso y estricto para evitar errores de lectura con bandas que co-migran y con las bandas fantasma, en contraste con los datos de AFLPs que son mucho más robustos (dada la longitud de los primers y las altas temperaturas de alineación). Este estudio demuestra que el uso de marcadores dominantes AFLP y RAPD es útil en estudios del sistema reproductivo. Ge y Sun (1999) estimaron los patrones de variación genética y la tasa de fecundación cruzada de *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae)

y como encontraron un porcentaje bajo de polimorfismo con las enzimas (4.76%), utilizaron ISSRs (16.18%) para estimar la tasa de entrecruzamiento y ambos marcadores moleculares (enzimas codominantes y ISSRs dominantes) para estimar los patrones de variación genética. Con 4 primers de ISSR detectaron 18 loci dominantes (geles de agarosa) que utilizaron para la estimación de la  $t_m$  de 15 familias maternas (20 individuos de progenie). Estimaron la  $t_m = 0.653$  y  $t_s = 0.628$  y endogamia biparental ( $t_m - t_s = 0.025$ ) eso concuerda con una  $f = 0.045$ . Estos autores mencionan que el análisis de la estructura genética que revelaron los ISSR concuerda con el patrón presentado por las alo-isoenzimas. Silvertown y colaboradores (2001) utilizaron ISSRs en algunas especies que no presentaron variación con alo-isoenzimas y encuentran una relación positiva entre la tasa de fecundación cruzada y la diversidad genética en loci de ISSR. En este estudio concluyen que general el sistema de apareamiento es el mecanismo más importante que influye en la diversidad genética de especies de plantas. En el presente estudio al igual que en los anteriores, el uso de marcadores dominantes ISSRs fue de gran utilidad para estimar parámetros del sistema reproductivo de *B. ternifolia*. Las estimaciones de la tasa de fertilización cruzada fueron comparables con otras estimadas mediante marcadores co-dominantes en especies distílicas (Barrett & Shore, 1987; Barrett & Shore, 1989; Pérez-Nasser, *et al.*, 1993; Kohn & Barrett, 1994; Schoen *et al.*, 1997; Barrett *et al.*, 1997). Comparado con marcadores codominantes, la desventaja de los ISSRs se centra en el hecho de que no es posible distinguir el genotipo heterócigo. Sin embargo, esta puede ser compensada por el uso de un mayor número de loci polimórficos y por el muestreo de un mayor número de progenie por familia. A diferencia de los estudios descritos anteriormente (Fristch & Riseberg, 1992; Giaotto *et al.*; 1997; Ge & Sun, 1999; Silvertown, 2002) en los que utilizaron entre 12 y 18 loci polimórficos para obtener una estimación de la tasa de fertilización cruzada, en este trabajo los ISSRs amplificados en geles de poli(acrilamida

revelaron un mayor número de loci polimórficos (67 loci polimórficos) únicamente con cuatro primers. Los geles de acrilamida tienen mayor resolución que los de agarosa por lo que es posible detectar un mayor número de bandas. No obstante es importante mencionar que la lectura de las bandas en geles de poliacrilamida puede ser mucho más difícil y requiere de mayor tiempo de análisis y precisión para asegurar que los loci utilizados sean los más repetibles y confiables. Asimismo la interpretación de los resultados debe de hacerse con cuidado para evitar errores de sobrestimación. A raíz de este trabajo también se puede concluir que una vez estandarizadas las mejores condiciones para cada uno de los primers de ISSRs, esta es una técnica rápida de montar y de bajo costo con un alto potencial para estudios del sistema reproductivo en plantas.

## 11. CONCLUSIÓN

A raíz de este trabajo se puede concluir que a pesar de que existe mucha variación en la hercogamia de las plantas de *Bouvardia ternifolia*, ésta es suficiente para promover el flujo de polen entre individuos diferentes y mantener una tasa de fertilización cruzada alta. Esto indica que a pesar de que el sistema de incompatibilidad no es muy eficiente, la principal estrategia reproductiva de *B. ternifolia* es la fertilización cruzada. No obstante, los diferentes niveles de hercogamia entre morfos podrían jugar un papel muy importante en el éxito reproductivo de los individuos. Es decir, el éxito reproductivo de cada individuo podría estar influenciado por diversos factores relacionados con la interacción entre el diseño floral (hercogamia o posición de los órganos sexuales) y el comportamiento de forrajeo de los polinizadores. Obviamente la variación en la posición de los órganos reproductivos de las flores de *B. ternifolia* podría traducirse en interferencia sexual con consecuencias reproductivas contrastantes para cada una de las funciones sexuales.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, W. R. 1973. A morphological hypothesis for the origin on heterostyly in the Rubiaceae. *Taxon* 22 (5/6): 537-542
- Al Wadi, H. y A. J. Richards. 1993. Primary homostyly in *Primula* L. Subgenus *Sphondylia* (Duby) Rupr. and the evolution of distyly in *Primula*. *New Phytologist* 124: 329-338.
- Arizmendi, M. C., A. Espinosa de los Monteros, J. F. Ornelas, A. Morales, I. Acosta, J. Moreno y L. Pérez. 1994. Las plantas polinizadas por Colibríes en el Pedregal de San Angel. En Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel: Ecología, historia natural y manejo. Compilador Ariel Rojo, UNAM.
- Arroyo, J. 2002. *Narcissus* (Amaryllidaceae), la evolución de los polimorfismos florales y la conservación más allá de las "listas rojas". *Revista chilena de historia natural* 75(1): 39-55.
- Baker, H. G. 1956. Pollen dimorphism in the Rubiaceae. *Evolution* 10: 23-31.
- Baker, H. G. 1966. The Evolution, Functioning and Breakdown of Heteromorphic Incompatibility Systems. I. The Plumbaginaceae. *Evolution* 20(3): 349-368.
- Baker, A. M., J. D. Thompson y S. C. H. Barrett. 2000<sub>a</sub>. Evolution and maintenance of stigma-height dimorphism in *Narcissus*. I. Floral variation and style-morph ratios. *Heredity* 84: 502–513.
- Baker, A. M., J. D. Thompson, y S. C. H. Barrett. 2000<sub>b</sub>. Evolution and maintenance of stigma height dimorphism in *Narcissus*. II. Fitness comparisons between style morphs. *Heredity* 84: 514–524.
- Barrett, S. C. H. 1978. Heterostyly in a tropical weed: the reproductive biology of the *Turnera ulmifolia* complex (Turneraceae). *Canadian Journal of Botany* 56: 1713-1725.
- Barrett, S. C. H. 1985. Floral trimorphism and monomorphism in continental and island populations of *Eichhornia paniculata* (Spreng.) Solms. (Pontederiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 25: 41-60.
- Barrett, S. C. H. y J. S. Shore. 1987. Variation and Evolution of Breeding Systems in the *Turnera ulmifolia* L. Complex (Turneraceae). *Evolution* 41(2): 340-354.
- Barrett, S. C. H. y J. S. Shore. 1989. Isozyme variation in colonizing plants. En: D. y P. Soltis (eds.), *Isozymes in Plant Biology*. pp. 106-126. Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- Barrett, S. C. H. 1990. The evolution and adaptive significance of heterostyly. *Trends in Ecology and Evolution* 5: 144-148.

- Barrett, S. C. H. y B. C. Husband. 1990. Variation in outcrossing rate in *Eichhornia paniculata* : the role of demographic and reproductive factors. *Plant Species Biology* 5: 41-56.
- Barrett, S. C. H. 1992<sub>a</sub>. Editor. Evolution and Function of Heterostyly. Springer-Verlag, Berlin
- Barrett, S. C. H. 1992<sub>b</sub>. Heterostylous genetic polymorphisms: Model systems for evolutionary analysis. En: S. C. H. Barrett (ed.), *Evolution and Function of Heterostyly* pp. 1-29. Springer-Verlag, Berlin.
- Barrett, S. C. H. 1993. The evolutionary biology of tristylous. En: D. Futuyma y J. Antonovics (eds.), *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* 9: 283-326. Oxford University Press, Oxford, U. K.
- Barrett, S. C. H. y L. D. Harder. 1996. Ecology and evolution of plant mating. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 73-79.
- Barrett, S. C. H., L. D. Harder y A. C. Worley. 1996. The comparative biology of pollination and mating in flowering plants. *Philosophical Transactions: Biological Sciences. Royal Society of London Series B* 351(1354): 1271-1280.
- Barrett, S. C. H., W. W. Cole, J. Arroyo, M. B. Cruzan, y D. G. Lloyd. 1997. Sexual polymorphisms in *Narcissus triandrus*: is this species tristylous? *Heredity* 78: 135-145.
- Barrett, S. C. H. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in Plant Science* 3: 335-341.
- Barrett, S. C. H., L. K. Jesson y A. M. Baker. 2000<sub>a</sub>. The evolution and Function of Stylar Polymorphisms in Flowering Plants. *Annals of Botany* 85 (suplement A): 253-265.
- Barrett, S. C. H., D. H. Wilken, y W. W. Cole. 2000<sub>b</sub>. Heterostyly in the Lamiaceae: the case of *Salvia brandegeei*. *Plant Systematics and Evolution* 223: 211-219
- Barrett, S. C. H. 2000. Advanced Plant Sexual Review of Gender & Sexual Dimorphism in Flowering Plants. En: M. A. Geber, T. E. Dawson y L. F. Delph. *Trends in Ecology & Evolution*
- Barrett, S. C. H. 2002<sub>a</sub>. Sexual interference of the floral kind. *Heredity* 88: 154-159.
- Barrett, S. C. H. 2002<sub>b</sub>. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics* 3: 274-284.
- Barrett, S. C. H. 2003. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philosophical Transactions of the Royal Society Series B* 358: 991-1004.
- Bawa, K. S. 1982. Outcrossing and the incidence of dioecism in island floras. *American naturalist* 119: 866-871.

- Bertin, R. I. y C. M. Newman. 1993. Dichogamy in angiosperms. *Botanical Review* 59: 112–152.
- Belaoussoff, S. y J. S. Shore. 1995. Floral correlated and fitness consequences of mating system variation in *Turnera ulmifolia*. *Evolution* 49: 545-556.
- Bodmer, W. F. 1958. Natural crossing between homostyly plant in *Primula vulgaris*. *Heredity* 12: 363-370
- Bodmer, W. F. 1960. The genetics of homostyly in populations of *Primula vulgaris*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 242(696): 517-549.
- Bornet, M. y M. Branchard. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209–215.
- Boyd, M., J. Silvertown y C. Tucker. 1990. Population Ecology of Heterostyle and Homostyle *Primula Vulgaris*: Growth, Survival and Reproduction in Field Populations. *The Journal of Ecology* 78(3): 799-813.
- Brown, A. H. D., S. C. H. Barrett y G. F. Moran. 1985. Mating system estimation in forest trees: models, methods and meanings. En: Gregorious, H. R. (ed.), *Population Genetics of Forestry*. Lecture Notes in Biomathematics 60: 32-49. Springer-Verlag, Berlin.
- Brown, A. H. D. 1989. Genetic characterization of plant mating systems. En: Brown, A. H. D., M. T. Clegg, A. L. Kahler y B. S. Weir (eds.), *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*, pp. 145-162. Sinauer Sunderland, MA.
- Brunet, J. y C. G. Eckert. 1998. Effect of floral morphology and display on outcrossing in blue columbine, *Aquilegia caerulea* (Ranunculaceae). *Functional Ecology* 12: 596-606.
- Brunet, J. y H. R. Sweet. 2006. Impact of insect pollinator group and floral display size on outcrossing rate. *Evolution* 60(2): 234–246.
- Castro, C. C. y A. C. Araujo. 2004. Distyly and sequential pollinators of *Psychotria nuda* (Rubiaceae) in the Atlantic rain forest, Brazil. *Plant Systematic and Evolution* 244: 131-139.
- Castro, C. C. y P. E. Oliveira. 2002. Pollination biology of distylous Rubiaceae in the Atlantic Rain Forest, SE Brazil. *Plant Biology* 5: 640-646.
- 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*. Princeton University Press.

- Contreras, P., 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
- Covallati, G. R., D. Grattapaglia y J. D. Hay. 2001. High resolution microsatellite based analysis of the mating system allows the detection of significant biparental inbreeding in *Caryocar brasiliense*, an endangered tropical tree species. *Heredity* 86: 60-67.
- Crosby, J. 1949. Selection of an unfavourable gene complex. *Evolution* 3: 212-230.
- Coello-Coutiño G., M. M. Martínez Servin, P. A. Meléndez Veancio y B. Pazos Rodríguez. 1984. Incompatibilidad sexual y distilia en *Bouvardia ternifolia*. Simposio en sistemas Biológicos de la Facultad de Ciencias II : 247-260.
- Culley, T. M. y A. Wolfe. 2001. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity* 86: 545-556.
- Darwin, C. 1876. The effects of cross and self fertilization in the vegetable kingdom. Murray, London, United Kingdom. 352 pp.
- Darwin C .1877. The different forms of flowers on plants of the same species. Murray, London, United Kingdom. 352 pp.
- Dellaporta, S. L. y A. Calderon-Urrea, 1993. Sex determination in flowering plants. *The plant Cell* 5: 1241-1251.
- Dowrick, V. P. J. 1956. Heterostyly and homostyly in *Primula obconica*. *Heredity* 10: 219-236.
- Dudash, M. R. y C. B. Fenster. 2001. The role of breeding system and inbreeding depression in the maintenance of an outcrossing mating strategy in *Silene virginica* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* 88: 1953-1959.
- Dudash, M. R. y K. Ritland. 1991. Multiple paternity and self-fertilization in relation to floral age in *Mimulus guttatus* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany* 78: 1746-1753.
- Dulberger, R. 1973. Distyly in *Linum pubescens* and *Linum mucronatum*. *Botanical journal of the Linnean Society* 66: 117-126.
- Dulberger, R. 1974. Structural dimorphism of stigmatic papillae in distylous *Linum* Species. *American Journal of Botany* 61(3): 238-243.
- Eckert, C. G. y S. C. H. Barrett. 1994. Tristyly, self-compatibility and floral variation in *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 53: 1-30

- Esselman, E. J., L. Jianqiang, D. J. Crawford, J. L. Windus, and A. D. Wolfe. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis proteri* spp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and RAPD and ISSR markers. *Mol Ecol* In press:
- Epperson, B. K. y M. T. Clegg. 1987. First-pollination primacy and pollen selection in the morning glory, *Ipomoea purpurea*. *Heredity* 58: 5-14
- Ernst, A. 1936. Weitere Untersuchungen zur Pnanalyse, zum Fertilitats-problem and zur Genetic heterostyler Primeln. I. *Primula hortensis*. *Archiv der Julius Klaus-Stiftung für Vererbungsforschung, Sozialanthropologie und Rassenhygiene* 11: 1–280.
- Ernst, A. 1955. Self-fertility in monomorphic Primulas. *Genetica* 27: 91-148.
- Faivre, A. E. 2000. Ontogenetic differences in heterostylous plants and implications for development from a herkogamous ancestor. *Evolution* 54: 847–858.
- 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 stigma characterize heterostyly? *American Journal of Botany* 88(5): 841-853.
- Fang, D. Q. y M. L. Roose. 1997. Identification of closed related citrus cultivar with inter simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 408-417.
- Fenster, C. B. y S. C. H. Barrett. 1994. Inheritance of mating-system modifier genes in *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Heredity* 72: 433-445
- Fetscher, A. E. 2001. Resolution of male-female conflict in an hermaphrodite flower. *Proceedings of the Royal Society of London B* 268: 525–529.
- Fritsch, P. y L. H. Rieseberg. 1992. High outcrossing rates maintain male and hermaphrodite individuals in populations of the *Datisca glomerata* *Nature* 359: 633-636.
- Gaiotto, F. A., M. Bramucci y D. Grattapaglia. 1997. Estimation of outcrossing rate in a breeding populations of *Eucalyptus urophilla* with dominant RAPD and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 842-849.
- Ganders, F. R. 1976. Pollen flow in distylous population of *Amsinckia* (Boraginaceae). *Canadian Journal of Botany* 54: 2530–2535.
- 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: 607-35.
- Ge, X. J. y M. Sun. 1999. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and inter simple sequence repeat (ISSR) analysis. *Molecular Ecology* 8(12): 2061–2069.

- Ge, X.J., Y. Yu, Y. M. Yuan, H. W. Huang y Yan C. Genetic diversity and geographic differentiation in endangered *Ammopiptanthus* (Leguminosae) populations in desert regions of Northwest China as revealed by ISSR analysis. *Annals of Botany* 95(5): 843-851.
- Givnish, T. J. 1982. Outcrossing versus ecological constraints in the evolution of dioecy. *American naturalist* 119: 849-865.
- Gupta, M., Y-S. Chyi, J. Romero-Severson y J. L. Own. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 998–1006.
- Harder, L. D. y W. G. Wilson. 1998. A clarification of pollen discounting and its joint effect with inbreeding depression on mating-system evolution. *American Naturalist* 152: 684-695.
- Herlihy, C. R. y C.G. Eckert. 2004. Experimental dissection of inbreeding and its adaptive significance in a flowering plant, *Aquilegia canadensis* (Ranunculaceae). *Evolution* 58: 2693-2703.
- Hernández, A. 2006. Colibríes y la especialización sexual en el arbusto distílico *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae). Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias-UNAM.
- Hollingsworth, P. M., M. Tebbitt, K. J. Watson, y R. J. Gornall. 1998. Conservation genetics of an arctic species, *Saxifraga rivularis* L., in Britain. *Botanical Journal of the Linnean Society* 128:1-14.
- Holtsford, T. P. y N. C. Ellstrand. 1992. Genetic and environmental variation in floral traits affecting outcrossing rate in *Clarkia tembloriensis* (Onagraceae). *Evolution* 46: 216–225.
- Husband, B. C. y S. C. H. Barrett. 1991. Colonization history and population genetic structure of *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae) in Jamaica. *Heredity* 66:287-296.
- James, T., S. Vege, P. Aldrich y J. L. Hamrick. 1998. Mating systems of three tropical dry forest tree species. *Biotropica* 30: 587-594.
- Karron, J. D., R. T. Jackson, N. N. Thumser y S. L. Schlicht. 1997. Outcrossing rates of individual *Mimulus ringens* genets are correlated with anther–stigma separation. *Heredity* 79: 365–370.
- Kohn, J. R. y S. C. H. Barrett. 1994. Pollen discounting and the spread of a selfing variant in tristylous *Eichhornia paniculata*, evidence from experimental populations. *Evolution* 48: 1576-1594

- Kojima, T., T. Nagaoka, K. Noda, and Y. Ogihara. 1998. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 96:37-45.
- Kurian, V. y A. J. Richards. 1997. A new recombinant in the heteromorphy "S" supergene in *Primula*. *Heredity* 78: 383-390.
- 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(11): 1216-1229.
- Lewis, D. 1975. Heteromorphic incompatibility system under disruptive selection. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences* 188(1092): 247-256.
- Lewis, D. y D. A. Jones. 1992. Genetics of heterostyly. En: Barrett, S. C. H. (ed.) *Evolution and Function of Heterostyly*. Pp 129-150 Springer, Berlin.
- Lloyd, D. G. 1982. Selection of combined versus separate sexes in seed plants. *American naturalist* 120: 571-585.
- Lloyd, D. G. y J. M. A. Yates. 1982. Intrasexual Selection and the Segregation of Pollen and Stigmas in Hermaphrodite Plants, Exemplified by *Wahlenbergia albomarginata* (Campanulaceae). *Evolution* 36(5): 903-913.
- Lloyd, D. G. y C. J. Webb. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. I. Dichogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24: 135-162.
- Lloyd, D. G. y C. J. Webb. 1992<sub>a</sub>. The evolution of heterostyly. En: Barrett S. C. H., ed. *Evolution and function of heterostyly*. Berlin: Springer Verlag, 151-178.
- Lloyd, D. G. y C. J. Webb 1992<sub>b</sub>. The selection of heterostyly. En: Barrett S.C.H. (ed.) *Evolution and function of hetero.stylv*. Berlin: Springer Verlag, 179-208.
- Lopes, L. E. y S. Buzato. 2005. Reproductive biology of *Psychotria suterella* (Rubiaceae) and the approach of ecological scales for flowering and fruiting phenology. *Revista Brasileira de Botanica* 28(4): 785-795.
- Manfield, I. W., V. K. Pavlov, J. Li, H. E. Cook, F. Hummel y M. G. Philip. 2005. Molecular characterization of DNA sequences from the *Primula vulgaris* S-locus *Journal of Experimental Botany* 56(414): 1177-1188.
- Martin, F. W. 1965. Distyly and incompatibility in *Turnera ulmifolia*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 92: 185-192.

- Manicacci, D. y S. C. H. Barrett. 1995. Stamen elongation, pollen size and siring ability in tristylous *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *American Journal of Botany* 82: 1381-1389.
- Marshall, D. L. y N. C. Ellstrand. 1985. Proximal causes of multiple paternity in wild radish, *Raphanus sativus*. *American Naturalist* 127: 596-605.
- Massinga P. H., S. D. Johnson y L. D. Harder. 2005. Heteromorphic incompatibility and efficiency of pollination in two distylous *Pentanisia* species (Rubiaceae). *Annals of Botany* 95: 389-399.
- Mather, K. y D. de Winton 1941. Adaptation and counter-adaptation of the breeding system in *Primula*. *Annals of Botany* 5: 297-311.
- Mather, K. 1950. The genetical architecture of heterostyly in *Primula sinensis*. *Evolution* 4(4): 340-352.
- Medrano, M., C. M. Herrera y Barrett S. C. H. 2005. Herkogamy and mating patterns in the self-compatible daffodil *Narcissus longispathus*. *Annals of Botany* 95: 1105-1111.
- Morgan M. T. y S. C. H. Barrett. 1990. Outcrossing rates and correlated mating within a population of *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Heredity* 64: 271-280.
- Monteiro, R., J. N. Nakajima, J. L. S. Ribeiro y J. C. Toledo. 1991. Morfologia e distribuição espacial das formas heterostílicas de *Psychotria barbiflora* (Rubiaceae). *Naturalia* 16: 137-146.
- Motten, A. F. y J. L. Stone. 2000. Heritability of stigma position and the effect of stigma-anther separation on outcrossing in a predominantly self-fertilizing weed, *Datura stramonium* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 87: 339-347.
- Murray, B. G. 1990. Heterostyly and pollen-tube interactions in *Luculia gratissima* (Rubiaceae). *Annals of Botany* 65: 691-698.
- Nagaoka, T. y Y. Ogihara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94(5): 597-602.
- Nishihiro, J., I. Washitani, J. D. Thomson y Thomson B. A. 2000. Patterns and consequences of stigma height variation in natural population of distylous plant *Primula sieboldii*. *Functional Ecology* 14: 502-512.
- Norman, J. K., S. G. Weller y A. K. Sakai. 1997. Pollination biology and outcrossing rates in hermaphroditic *Schiedea lydgatei* (caryophyllaceae). *American Journal of Botany* 84(5): 641-648.

- Ornduff, R. 1988. Distyly and monomorphism in *Villarsia* (Menyanthaceae): some evolutionary considerations. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 761-767.
- Ornduff, R. y S. G. Weller. 1975. Pattern diversity of Incompatibility groups in *Jepsonia heterandra* (Saxifragaceae). *Evolution* 29(2): 373-375.
- Pailler, T. y J. D. Thompson. 1997. Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in *Gaertnera vaginata* (Rubiaceae) endemic to La Reunion Island. *American Journal of Botany* 84(3): 315-327.
- Pailler T., L. Humeau, J. Figier y J. D. Thompson. 1998. Reproductive trait variation in the functionally dioecious and morphological heterostylous island endemic *Chassalia corallioides* (Rubiaceae). *Biological Journal of Linnean Society* 64: 297-313.
- Passos, L. y M. Sazima. 1995. Reproductive biology of the distylous *Manetia luteo-rubra* (Rubiaceae). *Acta Botánica* 108: 309-313.
- Parsons, B. J., Newbury, H. J., Jackson, M. T. y B.V. Ford-Lloyd. 1997. Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oryza sativa* L.) using different marker types. *Molecular Breeding* 3: 115-125.
- Piper, J. G., B. Charlesworth y D. Charlesworth. 1984. A high rate of self-fertilization and increased self-fertility of homostyle primroses. *Nature* 3(10): 50-51.
- Pérez-Nasser, N., Eguiarte, E. y D. Piñero. 1993. Mating system and genetic structure of the distylous tropical tree *Psychotria flaxlucens* (Rubiaceae). *American journal of Botany* 80(1): 45-52
- Reddy, M. P., M. Sarla y E. A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9-17.
- Ree, R. H. 1997. Pollen flow, fecundity, and the adaptive significance of heterostyly in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *Biotropica* 29: 298-308.
- Richards, J. H. y S. Koptur. 1993. Floral variation and distyly in *Guetarda scabra* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 80: 31-40.
- Richards, A. J. 1997. Plants breeding systems. Segunda edición. Chapman & Hall, London, United Kingdom.
- Richards A. J. 1998. Lethal linkage and its role in the evolution of plant breeding systems. En: Owens S. J. y P. J. Rudall (eds.), *Reproductive biology*. Pp: 71-83. Royal Botanic Gardens, Kew, United Kingdom.
- Ritland, K., y S. K. Jain. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using *n* independent loci. *Heredity* 47: 35-52.

- Ritland, K. 1985. The genetic mating structure of subdivided populations. I. Open-mating model. *Theoretical Population Biology* 27: 51-74.
- Ritland, K. 1988. The genetic-mating structure of subdivided populations. II. Correlated mating models. *Theoretical Population Biology* 34: 320-346.
- Ritland, K. 1989. Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*. *Evolution* 43: 848-859.
- Ritland, K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using  $n$  independent loci. *Heredity* 88: 221-228.
- Riveros, G. M., O. R. Barria y A. Humaña. 1995. Self-compatibility in distylous *Hedyotis salzmännii* (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 194: 1-8.
- Robinson, W. A., A. Liston, P. S. Doescher y T. Svejcar. 1997. Using ISSR markers to quantify clonal vs. sexual reproduction in *Festuca idahoensis* (Poaceae). *American Journal of Botany* 84 (supplement 6): 689.
- Royo A. y J. Rodríguez. 2002. La flora de la reserva del Pedregal de San Ángel. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. (INE-SEMARNAT).
- Rossi, A. A. B., L. O. Oliveira y M. F. Vieira. 2005. Distyly and variation in floral traits in natural populations of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botânica* 28(2): 285-294.
- Rzedowski, J. 1954. Vegetación del Pedregal de San Ángel (D. F., México). *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas* 8: 59-129.
- Sage, T. L., F. Strumas, W.W. Cole y S. C. H. Barrett. 1999. Differential ovule development following self- and cross-pollination: the basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* 86: 855-870.
- Sakai, S. y Y. Toquenaga. 2004. Heterostyly: speciation within a species. *Population Ecology* 46(3): 253-262.
- Sampson, J. F., Hopper, S. D. y James S. H. 1995. The mating system and genetic diversity of the Australian arid zone mallee, *Eucalyptus rameliana*. *Australian Journal of Botany* 43: 461-474.
- Sampson, J. F. 1998. Multiple paternity in *Eucalyptus rameliana* (Myrtaceae). *Heredity* 8: 349-355.
- Schoen, D. J., M. O. Johnston, A. M. L'Heureux y J. V. Marsolais. 1997. Evolutionary history of the mating system in *Amsinckia* (Boraginaceae). *Evolution* 51: 1090-1099.

- Shore J. S., y S.C.H. Barrett. 1985. The genetics of distyly and homostyly in *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae). *Heredity* 55: 167-174.
- Silvertown, J., J. K. McConway, Z. Hughes, P. Biss, M. McNair y P. Lutman. 2002. Ecological and genetic correlates of long-term population trends in the park grass experiment. *American Naturalist* 160: 410-419.
- Sobrevila C., N. Ramirez y X. N. Enrech. 1983. Reproductive biology of *Palicourea fendleri* y *Palicourea petiolaris* (Rubiaceae), heterostylous shrubs of Tropical Cloud forest in Venezuela. *Biotropica* 15(3): 161-169.
- Stone, J. L. 1995. Pollen donation patterns in a tropical distylous shrub *Psychotria suerrensii* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82: 1390-1398.
- Staub, J. E., F. C. Serquen, y M. Gupta. 1996. Genetic markers, map are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Sun, M. y K. Ritland. 1998. Mating system of yellow starthistle (*Centaurea solstitialis*), a successful colonizer in North America. *Heredity* 80 (2): 225-232.
- Surles, S. E., J. Arnold, A. Schnabe, J. L. Hamrick y B. C. Bongarte. 1990. Genetic relatedness in open-pollinated families of two leguminous tree species, *Robinia pseudoacacia* L. and *Gleditsia triacanthos*. L. *Theoretical and Applied Genetics* 80(1): 49-56.
- Takebayashi, N. y L. F. Delph. 2000. An association between a floral trait and inbreeding depression. *Evolution* 54: 840-846.
- Takebayashi, N., D. E. Wolf y L. F. Delph. 2006. Effect of variation in herkogamy on outcrossing within a population of *Gilia achilleifolia*. *Heredity* 96: 159-165.
- Teixeira, L. A. G. y I. C. Machado. 2004. *Sabicea cinerea* Aubl. (Rubiaceae), distilia e polinização em um fragmento de Floresta Atlântica em Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 27(1): 193-204.
- Thomson, J. D. y S. C. H. Barrett. 1981. Selection for outcrossing, sexual selection and the evolution of dioecy in plants. *American Naturalist* 118: 443-449.
- Thompson, J. D. y B. Dommée. 2000. Morph-specific patterns of variation in stigma height in natural populations of distylous *Jasminum fruticans*. *New phytologist* 148: 303-314.
- Tremayne, M. y A. J. Richards. 1993. Homostyly and herkogamous variation in *Primula* L. section *Muscarioides* Balf. f. *Evolutionary Trends in Plants* 7: 67-72.
- Tsumura, Y., K. Ohba y S. H. Strauss. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics* 92: 40-45.

- Urban, I. 1883. Monographie der Familie der Turneraceen. Gebruder Borntraeger, Berlin, W. Ger.
- Valiente-Banuet, A. y De Luna García, A. 1994. Una lista florística actualizada para la reserva del Pedregal de San Angel. En: Rojo, A. (compilador). Reserva Ecológica del Pedregal de San Angel. Ed. UNAM. pp: 67-83.
- Van der Pijl, L. 1978: Reproductive integration and sexual disharmony in floral functions. En: A. J. Richards (ed.) *The pollination of flowers by insects*. Linnean Society Snpo.siuml Series Number 6. London, Academic Press. Pp: 79-88.
- Vuilleumier, B. S. 1967. The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. *Evolution* 21(2): 210-226.
- Washitani, I., R. Osawa, H. Namai y M. Niwa. 1994. Patterns of female fertility in heterostylous *Primula sieboldii* under severe pollinator limitation. *Journal of Ecology* 82: 571-579.
- Webb, C. J. y D. G. Lloyd. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. II. Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24: 163-178.
- Weller, S. G. y A. K. Sakai. 2005. Selfing and resource allocation in *Schiedea salicaria* (Caryophyllaceae), a gynodioecious species. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 301-308.
- Wedderburn, F. 1988. *A compavison of heteromorphic incompatibilities in Primula*. Ph.D. Thesis, University of Newcastleupon-Tyne.
- Wedderburn, F. M. y A. J. Richards. 1992. Secondary homostyly in *Primula L.*: evidence for the model of "S" supergene. *New Phytologist* 121: 649-655.
- Wolff, A. D., Q-Y. Xiang y S. R. Kephart. 1998. Diploid hybrid speciation in *Penstemon* (Scrophulariaceae). *Proceedings of the Natural Academy of Science USA* 95: 5112-5115.
- Yang, W., A. C De Oliveira, I. Godwin, K. Schertz y J. L. Bennetzen. 1996. Comparisons of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. *Crop Science* 36: 1669-1676.
- Yeo, P. F. 1975. Some aspects of heterostyly. *New phytologist* 75: 147-153.
- Young A. G. y A. H. D. Brown. 1999. Paternal bottlenecks in fragmented populations of the grassland daisy *Rutidosia leptorrhynchoides*. *Genetic Research* 73: 111-117.

## 15. APENDICES

### APENDICE 1. MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN

#### Protocolo de extracción de DNA de plantas mini-prep modificado por Aldo varela para *Bouvardia ternifolia*

- 1.- En un mortero cortar en cuadros pequeños dos hojitas de tejido. Con nitrógeno líquido moler hasta obtener un polvo fino y eliminar el máximo de fibras; de ser posible moler de un solo evento y no remoler la muestra excesivamente.
- 2.- Agregar al mortero 500 µl de buffer de extracción CTAB y 500µl de STE. Mezclar y eliminar grumos grandes. Recuperar en un tubo eppendorf de 1.5 ml. (Es importante conservar las proporciones de buffer. Sin embargo las cantidades pueden variar dependiendo de la textura y consistencia de la muestra tratando de obtener un jarabe). Se pueden colocar las pipetas de 1000µl en 250µl e ir poniendo el buffer por partes.
- 3.- centrifugar a 10,000 rpm (revoluciones por minuto) o 9,000 gr durante 8 minutos y eliminar el sobrenadante. Si el sobrenadante resulta de un color intenso recomiendo repetir el paso 2-3.
- 4.- Resuspender con 500µl de CTAB 2X y 500µl de STE.
- 5.- Centrifugar a 10,000 rpm (9,000gr) durante 8 min.
- 6.- Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600µl CTAB 2X
- 7.- Agregar 7µl de RNAsa. (50-100 u 7000u/ml).
- 8.- Agregar 15µl de proteinaza K e incubar a 70°C por 20 minutos. Durante la incubación es conveniente invertir los tubos 2 o 3 veces. Poner en hielo 5 minutos (por reacción de proteinaza K entre 20 y 40 u).
- 9.- Agregar a cada tubo 600µl de cloroformo:octanol 24:1, agitar con vortex hasta homogeneizar (no exceder la agitación).
- 10.- Centrifugar a 9,500 rpm (8,000gr) durante 12 minutos (hasta que el sobrenadante quede transparente, o bien repetir el paso de cloroformo:octanol con el sobrenadante resultante del primer centrifugado).
- 11.- Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo. Este paso es fundamental, para obtener un DNA limpio, se debe evitar recuperar el material de la difase, recupere con una pipeta de 200µl solo el 70% del sobrenadante, tendrá menos DNA pero mas limpio.
- 12.- Precipitar el DNA con isopropanol frío a 20°C. El volumen es 2/3 del volumen del sobrenadante en el paso anterior (aprox 600µl).
- 13.- Dejar reposar 2 horas a – 20°C. No se recomienda dejar precipitando muchas horas pues el producto resultará más sucio.

**14.-** Centrifugar a 9000 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante. Se observará un pequeño botón al final del tubo, este debe ser de color blanco translucido. Si este es muy blanco y muy grande es posible que este sucio, muestras de este tipo es conveniente eliminarlas o volverlas a limpiar con alcohol.

**15.-** Limpiar el DNA agregando 1ml de etanol al 70% frío a -20°C, mezclar hasta observar que el botón se desprende. Dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 10,000 rpm durante 5 minutos.

**16.-** Eliminar el sobrenadante sin perder de vista el botón. Si lo considera necesario se puede repetir el lavado con alcohol al 80% y centrifugar a 10,000 rpm durante 5 min.

**17.-** Rehidratar el DNA con agua ultra pura. El volumen de agua dependerá del tamaño del botón y puede ir de 15 a 150µl.

### **Buffers de extracción.**

#### **Buffer de extracción CTAB 2X**

Tris-HCL 100mM pH 8

NaCl 1.4 M

EDTA 20mM pH8

CTAB 2%

b-mercaptoetanol 0.3% (agregar hasta el momento)

#### **Buffer de extracción CTAB**

Tris-HCL 100mM pH 8

NaCl 1.5 M

EDTA 20mM pH8

CTAB 4%

PVP40 4%

Ac. Ascórbico 0.1%

DIECA 0.1%

b-mercaptoetanol 0.3% (agregar hasta el momento)

#### **Buffer de extracción STE**

Tris-HCL 100mM pH 8

EDTA 50mM pH8

NaCl 100mM

b-mercaptoetanol 0.3% (agregar hasta el momento)

## **APENDICE 2. PREPARACION DE ACRILAMIDA Y BUFFERS**

### **Buffer TAE 5x (1L)**

Tris 45 gr.  
Ácido bórico 27.5 gr.  
EDTA 20 ml  
Agua para aforar a 1000ml

En un vaso de precipitado de 1000ml con una mosca y sobre el agitador magnético se coloca el Tris y el ácido bórico, se le agregan 500ml de agua destilada y se dejan mezclando durante unos 5 o 7 minutos aproximadamente. Después se agregan los 20ml de EDTA y se deja agitar la mezcla un par de minutos más. Posteriormente se afora con agua destilada hasta un volumen final de 1000 ml.

### **Para preparar 250ml de Acrilamida**

105 gr. urea  
37.5ml de acrilamida stock  
50ml de buffer TAE 5x  
Aforar con agua destilada

Se coloca la urea en un vaso de precipitado de vidrio con una mosca sobre el agitador magnético, se agrega la acrilamida directamente del stock, el buffer y un poco de agua destilada. Se dejan agitando con un poco de calor y se afora a 250ml. Se deja enfriar y se coloca en un recipiente de vidrio ámbar o forrado de papel aluminio etiquetado con la fecha y la indicación de tóxico.

### **APENDICE 3. PROCEDIMIENTO PARA LA ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA**

#### **MATERIALES**

- Producto de PCR
- Cámara de electroforesis vertical y accesorios
- Micropipetas de 1 a 10 $\mu$ , de 100 $\mu$  y de 100 $\mu$  a 1,000
- Puntas (para las micropipetas de 10, 100 y 1000 $\mu$  ) y tubos ependorff estériles
- Juego de vidrios, separadores y peines
- Buffer TBE 5X (ver apéndice) y diluirlo al 1x
- Poliacrilamida 30% stock
- Alcohol etílico puro
- Ácido Acético
- Bin silene
- Persulfato de amonio al 10%
- TEMED

#### **Preparación de los vidrios y ensamblaje de la cámara**

Las cantidades están calculadas para 2 geles

- Antiempañante para vidrios
- 666 $\mu$ l alcohol
- 166 $\mu$ l Ácido acético
- 2.5 $\mu$ l de Bin silene

Todos los vidrios se colocan sobre unas bases de plástico y se limpian con etanol al 70%. Se pone los dos vidrios a los que se les va a adherir la acrilamida y por otro lado los dos que sirven de soporte. A estos últimos se les coloca una o dos gotas de anti-empañante, el cual se debe distribuir con una sanita de manera homogénea en todo el vidrio hasta que seque completamente. En un tubo ependorff de 1.5 ml se agregan 33.3 $\mu$ l alcohol, 83 $\mu$ l de Ácido acético y 1.5  $\mu$ l de Bin silene. Se agita vigorosamente el tubo varias veces hasta mezclarlo bien y se pone la mitad en cada uno de los vidrios de pestañas (donde se va adherir el gel de acrilamida). Al igual que el anti-empañante, esta mezcla, se tiene que distribuir de manera homogénea con una sanita en todo el vidrio hasta que esta seque. Posteriormente a estos vidrios (los que llevan el del gel) se les colocan los separadores verticalmente justo en ambos extremos donde están las pestañas. Se coloca encima el otro vidrio con la cara que tiene el anti-empañante hacia abajo de manera que ambos queden encontrados. Se alinean y emparejan los dos vidrios y se les ponen las pinzas para ajustarlos. Cada juego de vidrios debe tener su peine listo para que, inmediatamente después del vaciado de la acrilamida se coloquen (con los picos hacia arriba) en la ranura entre los dos vidrios sin permitir que entre aire y se formen burbujas.

#### **Preparación de la acrilamida y vaciado en los vidrios**

- 30ml de acrilamida preparada (apéndice 2)
- 90 $\mu$ l de persulfato de amonio al 10%
- 25 $\mu$ l de TEMED

Se ponen cada uno de los reactivos en el recipiente que sirve para aplicar la acrilamida en los vidrios. Se coloca en horizontal y se gira suavemente hasta que se mezcle bien, sin dejar que se formen burbujas. Se inclinan ligeramente los vidrios y se va sirviendo la acrilamida de izquierda a derecha dejando una película para evitar que se formen burbujas. Es importante que se ejerza una ligera presión sobre el bote de la acrilamida a la hora del vaciado, sin embargo esta debe ser constante y siempre dejando una película de acrilamida por afuera de los vidrios.

Una vez que empieza la película de acrilamida ha recorrido la mitad de los vidrios, estos se dejan horizontalmente encima de la base de plástico. Es importante que quede parejo y que no se formen burbujas en el gel. Si se forman burbujas de aire es posible sacarlas con un peine largo (mas largo que los separadores) de dos picos, y agregando más acrilamida. Una vez que se ha completado el vaciado, se coloca el peine con los picos hacia arriba, tratando de que quede completamente horizontal y parejo. No es necesario sumirlo tanto. Tiene que quedar en la base de los agujeros. Se le coloca una pinza que haga presión y se toma tiempo de 20 minutos para que polimerize.

### **Muestras y cargado de geles.**

- Producto de PCR
- Buffer de carga
- Ladder de 100pb

Una vez polimerizados los geles se retiran los peines y se limpian perfectamente justo en la ranura entre el vidrio y el gel para evitar que queden partículas de acrilamida. Se montan sobre la cámara de electroforesis, se ajustan con pinzas y se agrega el buffer TBE 1x.

**\* El buffer se debe hacer para una misma acrilamida. No es conveniente mezclar con buffer viejo.**

Se arman las cámaras de electroforesis y se montan en ellas los vidrios ya preparados. Se les agrega el buffer y se ponen a correr a 500 volts para verificar que el amperaje se el óptimo. Este nos indique la calidad del buffer o bien de la acrilamida. Si el amperaje esta entre 18 y 25 ma (una cámara dos geles) entonces el buffer y la acrilamida están bien preparados y el gel podrá correr sin calentarse.

Al producto de PCR (reacción de 15µl) se le agregan 6µl de buffer de carga y justo antes de cargarse en el gel se meten al termociclador a desnaturar durante 5 min. Una vez transcurrido este tiempo se sacan las muestras e inmediatamente se colocan en hielo.

Es necesario limpiar todos los carriles del gel antes de cargar y posteriormente cada uno antes de colocar la muestra. Esto se puede hacer con una pipeta de 20 o 40µl, resuspendiendo el buffer en cada pozo para que salga la urea y la muestra pueda precipitarse al fondo del pozo.

## APENDICE 4. PROCEDIMIENTO PARA LA TINCIÓN DE LOS GELES DE ACRILAMIDA

### Materiales (para dos geles)

- 3 o 4 litros de agua bien fría
- Ácido acético al 70% (cubrir dos charolas de pirex)
- 400ml de agua fría
- 0.6 gr. Nitrato de plata
- 600  $\mu$ l de formaldehído
- 400 ml de agua fría
- 12gr. de carbonato de sodio
- 600  $\mu$ l de formaldehído
- 400  $\mu$ l de tiosulfato
- Ac. Acético al 70% para fijar la reacción de carbonato

Una vez que los geles corren las 3 horas 15 minutos aprox. se apaga la corriente y se desconectan los cables. Se desmontan los vidrios de la cámara y con mucho cuidado se quita el peine y se despegan los vidrios soporte (los que tienen el antiempañante). El vidrio que tiene pegado el gel se coloca en ácido acético al 70% durante al menos 30 minutos. Se puede dejar toda la noche pero es preferible hacerlo pronto (no mas de 2hrs porque el producto se empieza a difuminar). Una vez que salen del acético se le dan tres lavados con agua fría por 1 minuto y un último de 2 minutos. Mientras tanto se prepara la plata.

En un vaso de precipitado se agregan 400ml de agua fría, se pone una mosca y se coloca en el agitador magnético. Ahí se vacían 0.6gr. de plata y se deja disolver antes de agregar los 300 $\mu$ l de formaldehído. Una vez terminado el último lavado de dos minutos, se escurre el agua y se agrega la mitad de la preparación de plata a cada una de las charolas. Se coloca en el agitador orbital durante 20 minutos a velocidad moderada.

Mientras tanto se coloca otra mosca en un vaso de precipitado y se agregan 400ml de agua fría y 12gr. de carbonato de sodio. Se deja a que se disuelva completamente y posteriormente se agregan los 600 $\mu$ l de formaldehído. Dos minutos después los 400 $\mu$ l de tiosulfato y se deja agitar.

Una vez transcurridos los 20 minutos con la preparación de plata, esta se tira y se enjuagan los vidrios con agua fría. Se recomienda lavar bien las misma charolas con agua y jabón o bien, colocar los vidrios en charolas limpias antes de agregar la preparación de carbonato. Una vez que empiece a teñir lo suficiente (entre 7 y 10 min) sin que se ponga amarillo o negro es necesario quitar la preparación de carbonato de sodio y parar la reacción con ácido acético al 70% (hasta que cubra los vidrios y solo por 2 o 3 minutos). Se enjuagan los geles con agua destilada y se ponen a secar para después tomar la foto.

## APENCIDE 5. TABLA DE FRECUENCIAS ALÉLICAS DE LOS MORFOS FLORALES PIN Y THRUM.

Frecuencias alélicas por locus de los genotipos maternos de las plantas Pin y Thrum de *Bouvardia ternifolia* P < 0.05

LOCI	Thrum		Pin		P de Fisher <0.05
	p	q	p	q	
1	0.2817	0.7183	0.2854	0.7146	1.000
2	0.3713	0.6287	0.2854	0.7146	0.733
3	0.3713	0.6287	0.2854	0.7146	0.733
4	0.3713	0.6287	0.3449	0.6551	1.000
5	0.2019	0.7981	0.2854	0.7146	0.711
6	0.2817	0.7183	0.2854	0.7146	1.000
7	0.3713	0.6287	0.2854	0.7146	0.733
8	0.3713	0.6287	0.3449	0.6551	1.000
9	0.3713	0.6287	0.2854	0.7146	0.733
10	0.3713	0.6287	0.2854	0.7146	0.733
11	0.3713	0.6287	0.3449	0.6551	1.000
12	0.3713	0.6287	0.3449	0.6551	1.000
13	0.2019	0.7981	0.2305	0.7695	0.7171
14	0.2817	0.7183	0.3449	0.6551	1.000
15	0.3713	0.6287	0.2305	0.7695	0.4898
16	0.3713	0.6287	0.2854	0.7146	0.733
17	0.2817	0.7183	0.3449	0.6551	1.000
18	0.3713	0.6287	0.2854	0.7146	0.733
19	0.2817	0.7183	0.1792	0.8208	0.4414
20	0.3713	0.6287	0.2305	0.7695	0.4898
21	0.3713	0.6287	0.2854	0.7146	0.711
22	0.2019	0.7981	0.2854	0.7146	0.711
23	0.2817	0.7183	0.2305	0.7695	0.7275
24	0.2817	0.7183	0.3449	0.6551	1.000
25	0.2019	0.7981	0.3449	0.6551	0.4732
26	0.3713	0.6287	0.3449	0.6551	1.000
27	0.2817	0.7183	0.2854	0.7146	1.000
28	0.4754	0.5246	0.2305	0.7695	0.1757
29	0.4754	0.5246	0.2305	0.7695	0.1757
30	0.2817	0.7183	0.131	0.869	0.229
31	0.2019	0.7981	0.2305	0.7695	0.7171
32	0.3713	0.6287	0.2305	0.7695	0.4898
33	0.4754	0.5246	0.1792	0.8208	0.0367*
34	0.2817	0.7183	0.2854	0.7146	1.000
35	0.2817	0.7183	0.1792	0.8208	0.4414
36	0.2817	0.7183	0.2305	0.7695	0.7275
37	0.2817	0.7183	0.1792	0.8208	0.4414
38	0	1	0.131	0.869	0.2215
39	0.4754	0.5246	0.2854	0.7146	0.2046
40	0.1294	0.8706	0.2305	0.7695	0.439
41	0	1	0.1792	0.8208	0.1163
42	0.4754	0.5246	0.2854	0.7146	0.2046
43	0.0625	0.9375	0.285	0.7146	0.114
44	0.1294	0.8706	0.0852	0.9148	1.000
45	0.2817	0.7183	0.2305	0.7695	0.7275
46	0.2019	0.7981	0.1792	0.8208	1.000
47	0.603	0.397	0.5693	0.4307	0.528
48	0.4754	0.5246	0.5693	0.4307	0.7481
49	0.603	0.397	0.3449	0.6551	0.1064
50	0.603	0.397	0.2854	0.7146	0.0315*
51	0.603	0.397	0.5693	0.4307	1.000
52	0.4754	0.5246	0.2305	0.7695	0.1757
53	0.603	0.397	0.2305	0.7695	0.0245 *
54	0.4754	0.5246	0.5693	0.4307	0.7481
55	0.603	0.397	0.4839	0.5161	0.5255
56	0.4754	0.5246	0.2854	0.7146	0.2056
57	0.3713	0.6287	0.4104	0.5896	1.000
58	0.2817	0.7183	0.3449	0.6551	1.000
59	0.4754	0.5246	0.4839	0.5161	1.000
60	0.4754	0.5246	0.2854	0.7146	0.2046
61	0.2817	0.7183	0.2854	0.7146	1.000
62	0.4754	0.5246	0.5693	0.4307	0.7481
63	0.2817	0.7183	0.2854	0.7146	1.000
64	0.2817	0.7183	0.3449	0.6551	1.000
65	0.062	0.9375	0.1792	0.8208	0.6309
66	0.2817	0.7183	0.1792	0.8208	0.4414
67	0.2019	0.7981	0.1792	0.8208	1.000