



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

EFFECTOS DE LA VARIACIÓN MORFOLÓGICA DEL  
GRANO DE POLEN SOBRE LA TASA DE  
GERMINACIÓN Y EL CRECIMIENTO DEL TUBO  
POLÍNICO EN *Bouvardia ternifolia*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

**KARLA PATRICIA BILBATÚA NAVARRETE**



DIRECTOR DE TESIS:

DR. CÉSAR AUGUSTO DOMÍNGUEZ PÉREZ-  
TEJADA

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

<p>1. Datos del alumno          Bilbatúa          Navarrete          Karla Patricia          53 47 30 73          Universidad Nacional Autónoma de México          Facultad de Ciencias          Biología          300067532</p>
<p>2. Datos del tutor          Dr.          César Augusto          Domínguez          Pérez-Tejada</p>
<p>3. Datos del sinodal 1          Dra.          Guadalupe Judith          Márquez          Guzmán</p>
<p>4. Datos del sinodal 2          Dra.          María del Coro          Arizmendi          Arriaga</p>
<p>5. Datos del sinodal 3          Dr.          Juan Enrique          Fornoni          Agnelli</p>
<p>6. Datos del sinodal 4          M en C          Irene          Pisanty          Baruch</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito          Efectos de la variación morfológica del grano de polen sobre la tasa de germinación y el crecimiento del tubo polínico en <i>Bouvardia ternifolia</i>          51 p          2010</p>

*"Nada tiene sentido en Biología si no es a la luz de la evolución"*

Theodosius Dobzhansky

En memoria de:  
Alma Becerril,  
Char Cao-Romero y  
Sol Mar.

*"Como un mar, alrededor de la soleada isla de la vida, la muerte  
canta noche y día su canción sin fin."*

Rabindranath Tagore

## RECONOCIMIENTOS

Al programa de becas DGAPA-PAPIIT (IN-228907) por el apoyo otorgado para la realización de este proyecto.

A la dirección del Jardín Botánico de la UNAM por permitirme realizar colectas dentro de sus instalaciones.

Al laboratorio de Interacción Planta-Animal del Instituto de Ecología, UNAM donde realicé esta tesis y pasé momentos muy constructivos y agradables.

Al personal del laboratorio de Desarrollo en Plantas de la Facultad de Ciencias, UNAM, especialmente a la Dra. Judith Márquez, por todo su apoyo y enseñanzas y por permitirme hacer uso de su equipo de microscopía y sus instalaciones, también a Ricardo Wong por su asesoría en el uso del equipo.

A la Dra. María de los Ángeles Herrera Campos (Marusa) del laboratorio de Líquenes del Instituto de Biología, UNAM por su apoyo y su confianza.

A todos y cada uno de los miembros de mi jurado por sus valiosas aportaciones.

Una mención especial al Dr. César Domínguez, mi asesor, por todo; tu paciencia, tus enseñanzas y tu apoyo pero sobre todo por contribuir de manera tan profunda a mi formación, en verdad he aprendido mucho de ti.

A la UNAM, mi maravillosa universidad, por el orgullo de ser parte de esta importante institución, por todo lo que en ella aprendí y viví. ¡Viva la UNAM!

## AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, Norma A. Navarrete G. por todo lo que me has dado y hecho por mi, por tus enseñanzas y por darme momentos de profundas alegrías. Tú sabes que sin tu infinito apoyo y amor, ésto simplemente no habría sido posible. Te amo mami!!!

A mi arqui pepino (Arq. José Luis Jurado Becerril), sabes que eres parte importante de este logro y de mi vida, gracias por ser un motor que me impulsa día a día. Te amo.

A mis hermanos Liliana, Christian y Viridiana por tantos y tantos momentos, los quiero muchísimo.

A mis sobrinos adorados Ramón, Andrés y Luis que siempre ocupan mi corazón, son hermosos.

A mis súper amigotes de la Fac Sathya, Maye y Pancho por todos esos momentos increíbles, de estrés y felicidad que pasamos juntos. Gracias por su invaluable amistad.

A la familia Navarrete, mi familia, siempre están en mi corazón. He aprendido mucho de todos y cada uno de ustedes. Especialmente y esperando no generar susceptibilidades (jijijij); a mi abuelita, sabes que también eres parte de esto; a Fabi (hermosa) y Karim, bueno a todos los quiero y agradezco igual.

A mis suegrazos, los mejores suegros del mundo; Alma Becerril y José Jurado por sus enormes enseñanzas y todo su apoyo. Los adoro.

A la familia Becerril, mi otra familia, porque he aprendido mucho y he pasado momentos increíbles con ustedes. Especialmente a mis adorados Cristi y Juanpi.

A toda la banda del labo de Interacción Planta-Animal del IE-UNAM por todo su apoyo, enseñanzas y los buenos momentos: muy especialmente a Fer y Pau, (una persona increíble) mil gracias chicas; a Adris, Vio, Jessi, Lis, Lluvis y Tania, a las vecinas; Angie, Betsa, Marianita y Vero y los chicos de cubil *Max hostil*: Pale, Etsel, Diego, Carlitos y Santi, a todos por sus comentarios. Claro no podía faltar el buen Rubick, siempre apoyando. Tuve una muy linda experiencia estando en este laboratorio en compañía de todos ustedes. Gracias chicos.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	7
<b>Introducción</b> .....	8
<b>Antecedentes</b>	
Selección sexual .....	9
Biología del grano de polen y competencia polínica .....	12
<b>Sistema de estudio</b>	
<i>Bouvardia ternifolia</i> (Rubiaceae) .....	15
Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel .....	17
<b>Hipótesis</b> .....	18
<b>Objetivos</b> .....	19
<b>Método</b> .....	19
Morfología del grano de polen .....	19
Cargas polínicas .....	21
Tasa de germinación .....	21
Crecimiento del tubo polínico .....	22
Morfología floral .....	23
<b>Resultados</b>	
Morfología del grano de polen .....	24
Cargas polínicas .....	28
Tasa de germinación .....	31
Crecimiento del tubo polínico .....	32
Relación entre el grano de polen y la dinámica del crecimiento de los tubos polínicos .....	35
Morfología floral .....	37
<b>Discusión y conclusiones</b> .....	39
<b>Bibliografía</b> .....	44

## RESUMEN

La selección sexual consiste en el éxito reproductivo diferencial de los individuos debido a la variación de ciertos atributos. Las especies heterostílicas se caracterizan por la variación de atributos florales distintivos entre los morfos presentes en una misma población. Especies distílicas como *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae) suelen presentar un polimorfismo en el tamaño del grano de polen, ofreciendo la oportunidad de estudiar la relación entre dicha variación y el desempeño del polen, estimado como la probabilidad de germinar y la longitud que alcanzan los tubo polínicos. Encontramos que *B. ternifolia* presenta un polimorfismo del tamaño y la forma del grano de polen, que además influye en el desempeño del mismo únicamente en el morfo *Thrum*. El tamaño del grano de polen afecta positivamente su probabilidad de germinar y la forma de éste tiene un efecto en la longitud que alcanza el tubo polínico, presentando tubos más largos los granos de polen cuya forma se aproxima a una esfera. Por otro lado el estudio de campo de los estigmas muestra que el polen que podría conferir una ventaja para la competencia polínica no se deposita frecuentemente en los estigmas conoespecíficos. Lo cual sugiere que existen presiones de selección en oposición que afectan la morfología del grano de polen, en donde granos pequeños se ven favorecidos al poseer mayor movilidad mientras que los granos de polen grandes poseen mayor habilidad competitiva, lo cual podría conducir a un tamaño óptimo del grano de polen en este morfo. Realizamos un análisis de componentes principales en donde se encontró que el grano de polen es en apariencia un atributo que varía de modo independiente del resto de la morfología floral.

Palabras clave: distílica, *Bouvardia ternifolia*, morfología del grano de polen, germinación, longitud del tubo polínico.

## INTRODUCCIÓN

Se ha documentado (Arak 1983, Willson 1994, Mayr 2006, Trivers 2006) que en la mayoría de las especies de animales los machos compiten por tener acceso a las hembras y éstas tienden a ser selectivas. Los papeles que juegan los sexos son determinados por las diferencias en el costo que representa la reproducción para cada uno. Esta diferencia genera conflictos de interés entre los sexos y la evolución de diferentes estrategias reproductivas. Este proceso se conoce como selección sexual y

fue descrito originalmente por Darwin (1871) con la finalidad de explicar la existencia de atributos que aparentemente representan una desventaja para la supervivencia, pero permiten incrementar el éxito reproductivo de los individuos que los poseen.

La selección sexual que ocurre en los animales se hace patente a través de conductas como combates o rituales. Estas conductas nos resultan evidentes debido a las capacidades sensoriales y motoras casi distintivas de los animales, mismas que no se pueden encontrar en la mayoría de las plantas. Lo cual probablemente dificulta imaginar que un proceso como la selección sexual pudiera ocurrir en estos organismos. No obstante, tanto en plantas como en animales, la selección sexual comprende aquellas presiones selectivas que se relacionan con el acceso a parejas (Armbruster 1996) independientemente de los mecanismos.

Si bien los estudios sobre selección sexual en plantas van en aumento (Willson 1994), la mayoría de ellos se enfoca en los procesos selectivos que ocurren en la fase previa a la polinización, como el efecto del despliegue floral, la inversión en recompensa (néctar), o bien a procesos selectivos que tienen lugar después de la fecundación como el aborto selectivo, o las diferencias en la inversión de recursos entre cigotos. Sin embargo, existe un evento en donde la selección sexual puede resultar peculiarmente intensa: la competencia polínica que tiene lugar una vez que los granos de polen son depositados en el estigma y deben desarrollar tubos polínicos para alcanzar los óvulos (Willson 1994, Skogmyr y Lankinen 2002). Es por ello que en el presente estudio hemos explorado los posibles efectos de la variación morfológica y en el tamaño del polen sobre su desempeño. Con este fin medimos la tasa de germinación y la

longitud que alcanzan los tubos polínicos en *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltld. (Rubiaceae) en condiciones *in vitro* y determinamos si existen presiones de selección que operan sobre esta fase del ciclo de vida de estas plantas.

## ANTECEDENTES

### ▪ SELECCIÓN SEXUAL

Existe un evento de peculiar importancia en la historia de la sexualidad de los seres vivos que condujo a la diferenciación de los gametos y que eventualmente produjo la evolución del género sexual, la anisogamia. Se sabe que los gametos de gran tamaño tienden a almacenar suficientes nutrientes como para permitir que los cigotos resultantes tengan una alta probabilidad de desarrollarse y sobrevivir (Lovett-Doust y Lovett-Doust 1990). Sin embargo, los gametos de gran tamaño son poco móviles y por lo tanto la probabilidad de encontrarse con otros gametos es baja. Por otro lado, los gametos de menor tamaño son más móviles y tienen una mayor probabilidad de encuentro con otros gametos (aunque no son capaces de almacenar altos niveles de nutrientes). De este modo, en la mayoría de los organismos eucariotas existen dos gametos diferentes; un gameto sésil y grande, con mayor cantidad de recursos (gameto femenino); y por otro lado un gameto pequeño, móvil y numeroso (gameto masculino). Así, podemos considerar que la anisogamia representa un clásico ejemplo de selección disruptiva en donde dos presiones de selección actúan en oposición teniendo como solución evolutiva la “dimorfización” en el número y tamaño de los gametos (Lovett y Lovett 1990) (Figura 1).

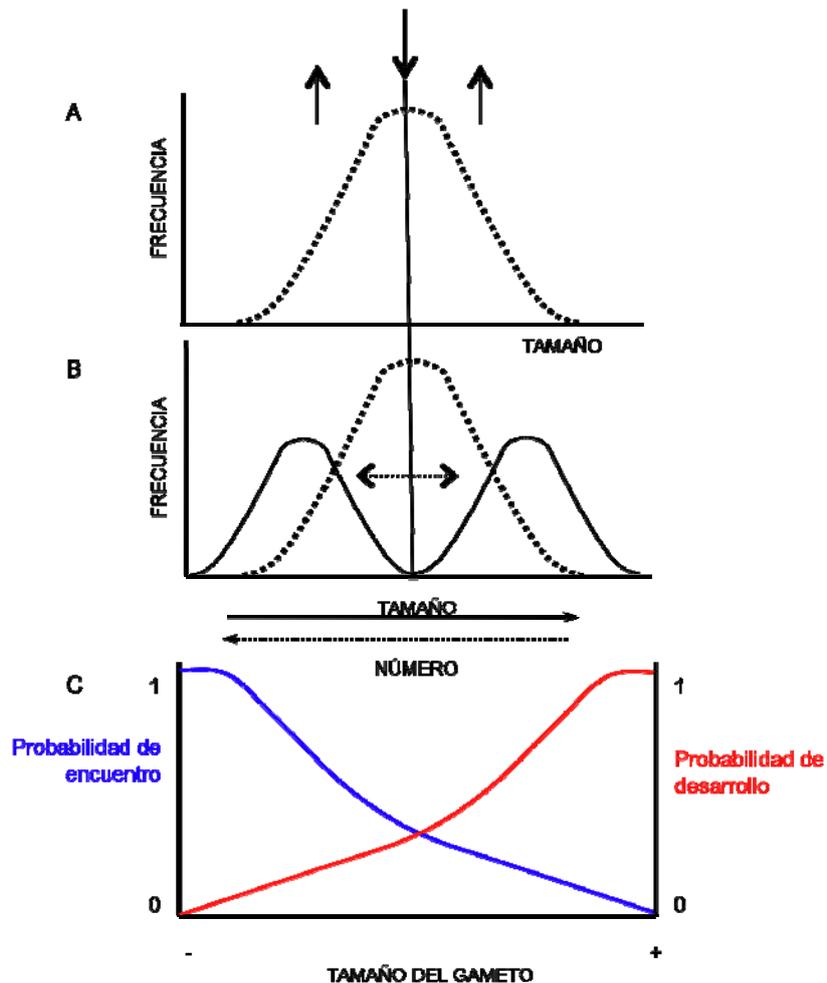


Figura 1. Proceso de evolución del dimorfismo de los gametos. A) escenario inicial de isogamia en donde los gametos se distribuyen de forma normal. B) Efecto de la selección sobre el tamaño de los gametos, como se puede observar se benefician e incrementan los tamaños extremos. C) Escenario por el cual se produjo el proceso de dimorfización de los gametos. Debido a que los gametos grandes acumulan más recursos, el tamaño se encuentra positivamente relacionado con la probabilidad de desarrollo del embrión. Sin embargo, el incremento en el tamaño se encuentra negativamente relacionado con la movilidad y por lo tanto con la probabilidad de encuentro. Por esta razón se seleccionan gametos pequeños que incrementan la posibilidad de encontrarse con otro gameto. De este modo la selección favorece valores extremos en el tamaño de los gametos, generando selección disruptiva. Es importante notar que un incremento en el tamaño representa una disminución en el número de gametos debido al costo que implica, por lo que una disminución en el tamaño de gametos implica un incremento en número.

El gameto de mayor tamaño (femenino) invierte una importante cantidad de recursos para garantizar el desarrollo del cigoto. Por lo tanto, la selección natural favorecerá una estrategia que maximice la calidad del apareamiento. En contraste, un organismo que produce gametos pequeños (masculino) será favorecido por la selección natural si maximiza el número de apareamientos. El gameto femenino debe ser selectivo mientras que el gameto masculino debe competir por ser seleccionado, debido a la diferencia en los costos de producir los dos tipos de gameto (Lovett-Doust y Lovett-Doust 1990).

De este modo Darwin distinguió entre la selección que se debe a competencia directa entre machos, y aquella que se origina debido a la elección por parte de las hembras (Maynard-Smith 1978). Ésta es la base del concepto de selección sexual que hace referencia a las presiones de selección que actúan sobre los atributos que tienen un efecto en la posibilidad de apareamiento.

La selección sexual tiene entonces dos componentes básicos: la competencia entre individuos del mismo sexo por tener acceso a los individuos del sexo opuesto, y la capacidad de este último para elegir individuos que poseen características que les permiten a los otros ganar la competencia intrasexual (Willson 1979, 1994).

Es importante destacar que la competencia entre machos está relacionada, en todos los casos, con el número de parejas femeninas disponibles. Cuando el número de gametos masculinos excede el número de gametos femeninos se puede afirmar que existe competencia masculina (Lovett-Doust y Lovett-Doust 1990). En el caso de las plantas, con frecuencia el número de granos de polen que son depositados en el estigma es mayor que el número de óvulos disponibles para ser fecundados, lo cual genera una competencia intensa entre los tubos polínicos en la que con frecuencia gana el más rápido (Curtis y Barnes 2001).

#### ▪ BIOLOGÍA DEL GRANO DE POLEN Y COMPETENCIA POLÍNICA

El grano de polen es una microspora haploide que se desarrolla a partir de la célula arquesporial. Posee una pared externa conocida como exina además de

una pared interna llamada intina compuesta principalmente de celulosa (Richards 1986, Shivanna 2003) (Figura 2). Estas características se presentan en todas las especies (Shivanna 2003). Sin embargo, existen atributos del grano de polen altamente variables como el tiempo de vida, que va desde los treinta minutos hasta un día dependiendo de la especie y las condiciones ambientales. Asimismo se ha encontrado que el tamaño del grano de polen es muy variable; de acuerdo con la especie, los tamaños promedio varían desde los 15 hasta los 50  $\mu\text{m}$  y en muchas especies es utilizado como un carácter diagnóstico (Richards 1997, Shivanna 2003).

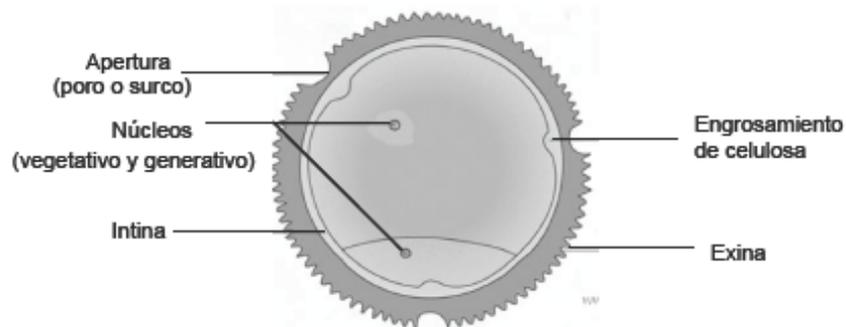


Figura 2. Esquema de un grano polen y sus partes fundamentales

Los granos de polen presentan diferentes aperturas a través de las cuales emerge el tubo polínico (Richards 1986). Tales aperturas se distinguen por su forma, número y posición. Las formas en las que se pueden presentar son en poros (granos porados), en forma de surco o colpo (granos colpadados) o ambos (granos colporados) (Shivanna 2003).

El grano de polen o gametofito masculino es el lugar donde se encuentran los gametos masculinos de las angiospermas. Se desarrolla en las anteras como resultado de divisiones reductivas y contiene dos tipos de células: una vegetativa (responsables de la formación del tubo polínico) y otra generativa (con capacidad de dividirse y originar dos gametos masculinos o células espermáticas).

El grano de polen se libera de la antera, cuando ha alcanzado la madurez. Durante la dehiscencia de la antera los granos de polen son expuestos y funcionan como unidades independientes hasta que son

transportados y depositados en estigmas donde germinan y desarrollan tubos polínicos que atraviesan el estilo. Una vez que esto ocurre, entran al óvulo y eventualmente al saco embrionario o gametofito femenino donde se descargan los dos gametos masculinos. Al proceso de conducir el gameto masculino a través del tubo polínico se le conoce como sifonogamia. Así una de las células espermáticas (o gametos masculinos) se fusiona con la ovocélula para formar el cigoto y la otra célula espermática se fusiona con los núcleos polares para formar el endospermo (debido a ello en las angiospermas existe la doble fecundación) (Shivanna 2003) (Figura 3).

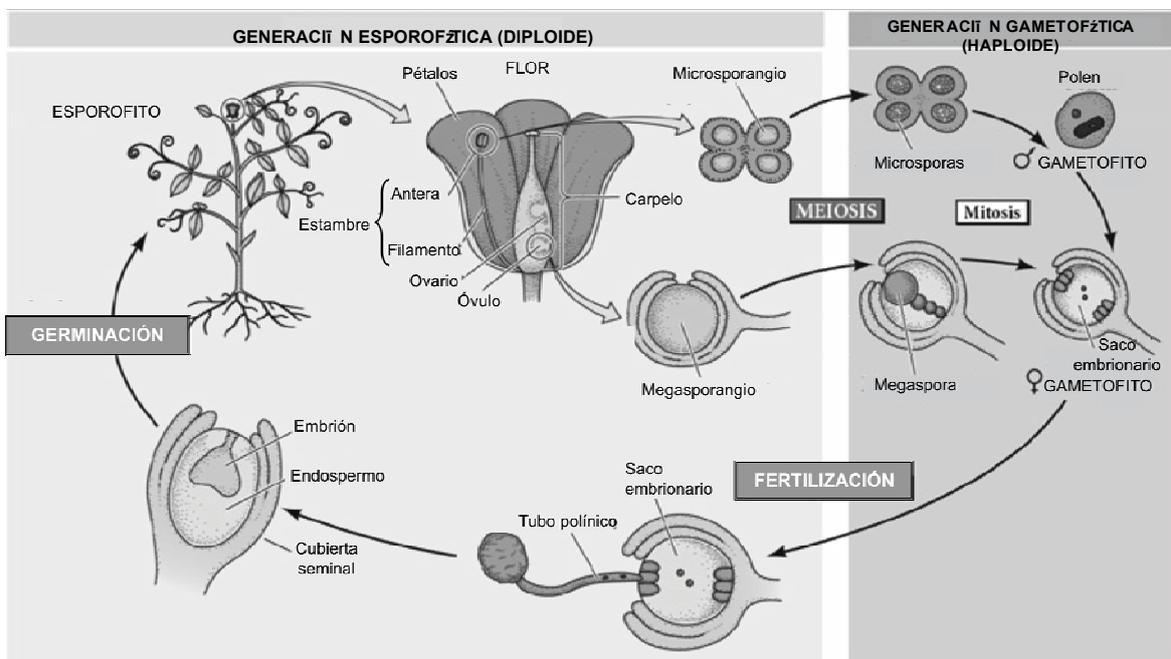


Figura 3. Proceso de fecundación en angiospermas.

Tomado y modificado de Gilbert F. S. 2006.

Para que un grano de polen germine y se mantenga el crecimiento del tubo polínico, los elementos fundamentales son el agua y el oxígeno. Desde que inicia la germinación, al tubo polínico le lleva entre 12 y 48 horas alcanzar el óvulo y lograr la fecundación. Se han reportado tasas de crecimiento que van desde los 1.75mm hasta los 35mm por hora (Richards 1986). Asimismo, los procesos de germinación y crecimiento del tubo polínico también están influidos por el tamaño y la naturaleza del contenido del grano de polen. Existe evidencia de que el tamaño del grano de polen está correlacionado

positivamente con la tasa de crecimiento del tubo polínico (Lord y Eckard 1984, Anderson y Barrett 1986, Bertin 1990, Manicacci y Barrett 1995, Torres 2000, Yang y Guo 2004), aunque se ha observado que en algunos casos los granos de polen chicos se hidratan y activan metabólicamente más rápido por lo que presentan una mayor probabilidad de germinación (Bertin 1990). Así, mientras algunos autores afirman que el tamaño del grano de polen no se encuentra relacionado ni siquiera con el crecimiento del tubo polínico (Richards 1986, Lamborn *et. al.* 2005), otros aseguran que el éxito del polen (entendido como la habilidad de alcanzar el óvulo) depende de dos atributos: composición y tamaño del grano (Bertin 1990). El principal argumento sobre la influencia del tamaño del grano de polen en su desempeño, se relaciona con la fase temprana o autótrofa de crecimiento del tubo polínico, en donde el grano de polen utiliza los nutrientes endógenos, es decir, que depende de los recursos almacenados en el propio polen. En contraste, la fase tardía o heterótrofa depende de las sustancias estilares (Bertin 1990, Shivanna 2003, Lubliner 2003).

Otro argumento a favor de la importancia del tamaño del grano de polen se encuentra en la biología de las especies heterostílicas (cuyas flores varían en la altura de los estilos). En estas especies se ha observado que el tamaño del grano de polen varía de acuerdo con el nivel de antera del cual proviene (Dulberger 1992). De este modo en especies distílicas (con dos morfos florales), se ha observado que el morfo *Thrum* (de anteras largas y estilos cortos) al poseer granos de polen de mayor tamaño, resulta más eficiente como donador (Wyatt 1983, Charlesworth 1985, Eguiarte *et. al.* 1999).

Asimismo se ha considerado que la correlación entre el tamaño del grano de polen y la longitud del estilo de la flor receptora, representa una evidencia a favor de la influencia del tamaño del grano de polen sobre la longitud del tubo polínico (Manicacci y Barrett 1995)

De esta manera, al representar un atributo de gran importancia para el éxito reproductivo, el grano de polen es un carácter que fácilmente podría estar sujeto a selección (Sarkissian y Harder 2001). Por tal razón, en este trabajo se eligió estudiar el grano de polen como posible blanco de la selección midiendo los efectos del tamaño y la forma sobre dos componentes de desempeño (germinación y crecimiento del tubo polínico) en *Bouvardia ternifolia*.

## ESPECIE DE ESTUDIO

*Bouvardia ternifolia* es una planta perenne, nativa del Pedregal de San Ángel, originaria de Mesoamérica. Es común en las zonas templadas y semiáridas desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de México, en donde se le ha encontrado en aproximadamente veinte estados de la República Mexicana. Se distribuye en bosques de pino-encino, pastizales y matorrales xerófilos (Villaseñor y Espinosa 1998). Habita preferentemente en lugares perturbados, a orillas de caminos y carreteras. En el Valle de México se le ha encontrado hasta los 3000 msnm. Florece de junio a septiembre aunque en ciertas condiciones florece también en la temporada seca (Vibrans 2005).

*B. ternifolia* es una planta distíllica que pertenece a la familia Rubiaceae (familia que presenta el mayor número de especies heterostílicas) (Eguiarte *et al.* 1999). La heterostilia es un polimorfismo genético de dos o tres morfos florales auto-incompatibles que difieren recíprocamente en la longitud de los estilos y las anteras (hercogamia recíproca) (Barrett 1992). Debido a los sistemas de incompatibilidad y a la hercogamia, la heterostilia es considerada como un mecanismo floral que promueve el entrecruzamiento (Barrett 1992).

En especies distílicas encontramos que los morfos florales presentan características distintivas; el morfo *Pin*, posee estilos largos y estambres cortos con polen pequeño; y el morfo *Thrum* posee estilos cortos, estambres largos y polen grande (Lovett-Doust y Lovett-Doust 1990, Barrett 1992, Dulberger 1992) (Figura 4).

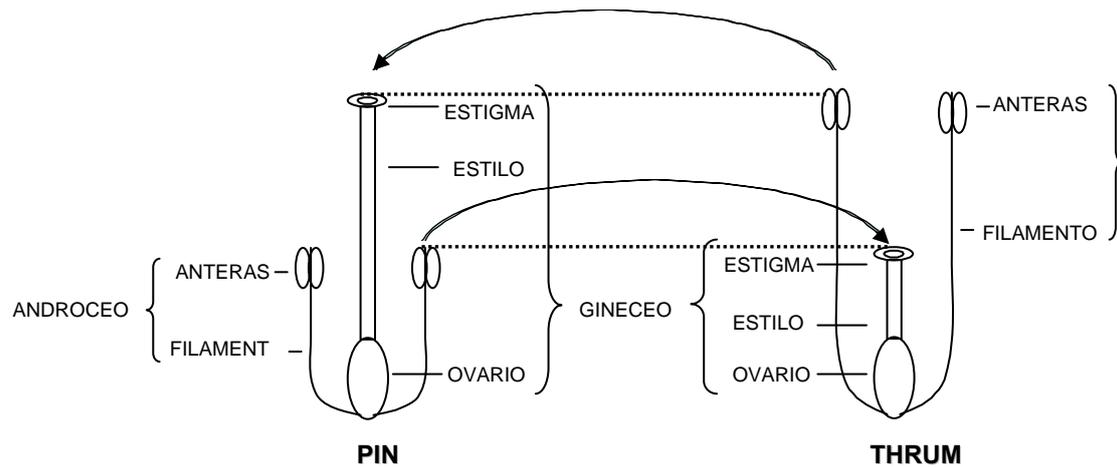


Figura 4. Disposición de los órganos florales en los morfos de las especies distílicas. Se muestra que la longitud del estilo en un morfo corresponde con la longitud de los estambres del morfo opuesto (hercogamia recíproca) con líneas punteadas.

Las flechas indican los patrones de flujo de polen.

Los granos de polen de *B. ternifolia* son tricolpados y reticulados. La exina presenta ornamentación verrugada en el tectum que varía entre morfos. El morfo *Thrum* presenta tres hileras densas de verrugas, mientras que el morfo *Pin* presenta una sola hilera poco densa (Figura 5) (López 2007).

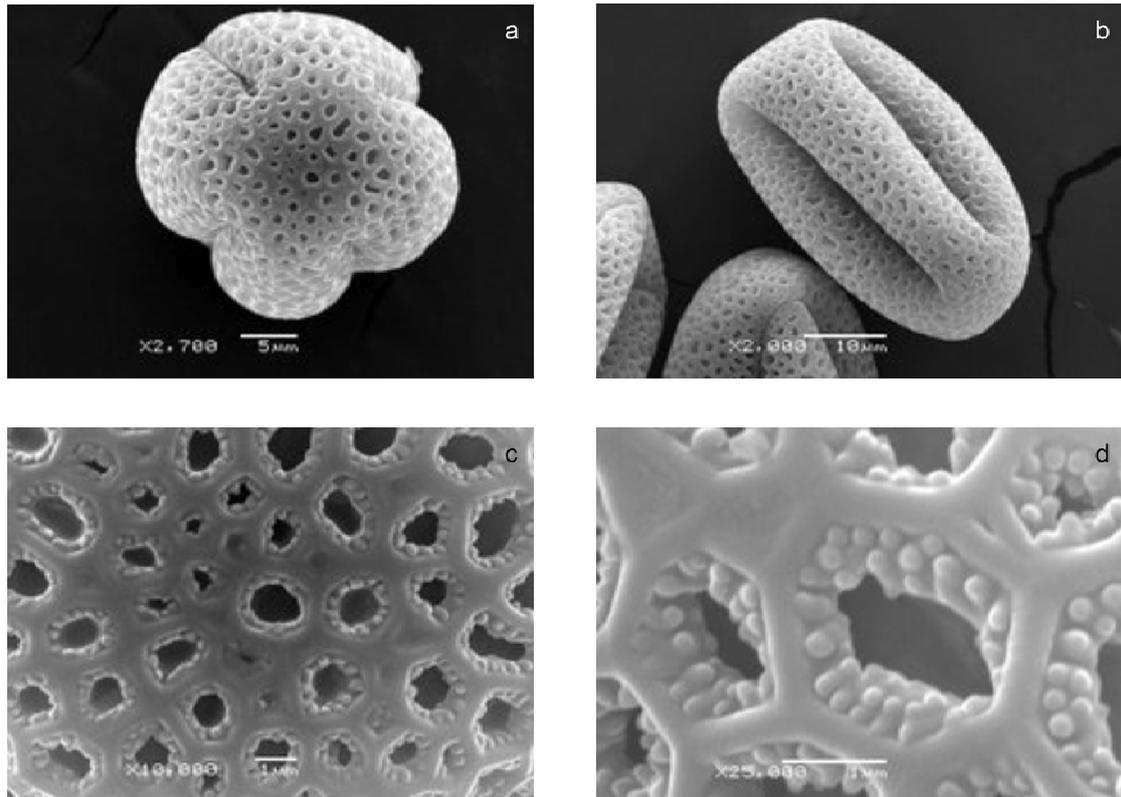


Figura 5. Granos de polen de *B. ternifolia*. Polen del morfo *Pin* y ornamentación de la exina (a y c). Polen del morfo *Thrum* y ornamentación de la exina (b y d).

Tomado de López A. (2007).

## SITIO DE ESTUDIO

El estudio se desarrolló en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) dentro de Ciudad Universitaria (19° 20' 33" N y 99° 08' 26" O; 2,290-2,310msnm), específicamente en el área de amortiguamiento que comprende el Jardín Botánico.

La Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel comprende un área de 237.3 ha y está constituida por matorral xerófilo que se desarrolla en un sustrato volcánico que procede de la actividad del volcán Xitle ubicado en la Sierra del Ajusco. Se pueden observar dos temporadas de floración en esta reserva: la seca que comprende de noviembre a mayo y la de lluvias que comprende de junio a octubre. El clima se clasifica 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 media de 6° C de diferencia entre el mes más caliente y el más frío. La precipitación media anual es de 700 a 900mm (Rzedowski 1954).

## HIPÓTESIS

Si las presiones de selección que operan sobre la movilidad del grano de polen favorecen tamaños de polen relativamente pequeños y las presiones de selección que operan sobre la habilidad competitiva favorecen tamaños de polen relativamente grandes, se esperaría encontrar un tamaño óptimo que balancee el conflicto entre ambas presiones de selección.

### **Supuestos:**

- Existe variación en el tamaño y la morfología del grano de polen que permite la acción de la selección natural.
- El tamaño y la forma del grano de polen tienen efectos en componentes de desempeño que se relacionan con la tasa de germinación y el crecimiento del tubo polínico.
- La longitud y la velocidad de crecimiento del tubo polínico están relacionadas con la longitud de los estilos de la flor que recibe el polen.

### **Predicciones:**

- Debido a la disponibilidad de recursos, el grano de polen de mayor tamaño germina y desarrolla su tubo polínico a mayor velocidad.
- Por cada nivel de antera deberá haber un tamaño y forma óptimos del grano de polen que maximice su eficiencia reproductiva.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar las presiones de selección que operan sobre la evolución del tamaño y la forma del grano de polen en una especie distíllica, *B. ternifolia*.

### **Objetivos particulares**

- Determinar si existe variación en el tamaño y la forma del grano de polen de *B. ternifolia*.

- Determinar si existen diferencias significativas entre los granos de polen depositados en los estigmas y los producidos por las plantas.
- Determinar si existe relación entre los atributos del grano de polen y las tasa de germinación del mismo.
- Determinar si existe relación entre los atributos del grano de polen y la longitud que alcanza el tubo polínico.
- Determinar si existe relación entre el grano de polen y el resto de la morfología floral con el fin de evaluar si el grano de polen representa un atributo que puede evolucionar de forma independiente o si existen restricciones impuestas por las correlaciones con otros atributos florales.

## MÉTODO

Para este estudio se seleccionaron y marcaron 30 individuos al azar de *B. ternifolia* de la población del Pedregal de San Ángel, 15 del morfo *Pin* y 15 *Thrum*.

### MORFOLOGÍA DEL GRANO DE POLEN

Con la finalidad de conocer la variación de la morfología y el tamaño del grano de polen entre y dentro de los morfos, así como determinar los efectos del mismo sobre su desempeño, se colocaron bolsas de tul en inflorescencias de botones maduros en preantesis (próximos a abrir) y se anudaron en la parte inferior. Al día siguiente se colectaron flores en anthesis recién abiertas de las inflorescencias previamente embolsadas. De las anteras dehiscentes se extrajo polen para su observación con la ayuda de un microscopio estereoscópico marca *Zeiss* modelo *Discovery V8 Stereo* con un objetivo 1.5X a un aumento de 8. El polen fue fotografiado con una cámara digital *Canon* modelo *Powershot A620* para ser posteriormente medido con el programa *Axiovision Release 4.6.1*. Se midieron 30 granos de polen de cada una de las 7 flores colectadas por individuo. En total se midieron aproximadamente 6,300 granos de polen.

Los granos de polen fueron medidos en dos ejes: polar (largo) y ecuatorial (ancho). Con la finalidad de caracterizar a los granos de polen en función de ambas variables (largo y ancho) se realizó un análisis de componentes principales (PCA, por sus siglas en inglés) que permitió determinar el tamaño y la forma del grano de polen de acuerdo con la forma en que interactúan dichas variables. El método de PCA produce una estimación del tamaño basada en un modelo aditivo que está ponderado por coeficientes que dependen de la varianza y del efecto potencial sobre el tamaño global que tiene cada una de las variables consideradas. Por esta razón se prefirió este método con respecto a otros.

Asimismo se realizó una prueba de Shapiro-Wilk con el fin de determinar si los datos obtenidos presentaban una distribución normal. Finalmente se

realizó un análisis de varianza de los atributos del grano de polen entre los morfos florales y entre las plantas dentro de un mismo morfo.

## CARGAS POLÍNICAS

Para evaluar si existe una relación entre el tamaño del grano de polen y su capacidad para llegar a estigmas conoespecíficos, se caracterizó el tamaño y la forma de los granos de polen que son depositados en los estigmas en condiciones naturales. Para ello se colectaron 3 flores al azar de 7 individuos diferentes de cada morfo seleccionados al azar. Se cortaron los estigmas de estas flores, se tiñeron con una preparación de verde de metilo y floxina al 1% en alcohol al 50% y se realizó un *squash* para posteriormente observar y fotografiar el polen depositado en el estigma (usando el mismo equipo que se utilizó para la parte de caracterización de la morfología del grano).

Los granos de polen fueron medidos en sus dos ejes (polar y ecuatorial). Se realizó el mismo PCA con la finalidad de comparar las distribuciones de los granos de polen producidos por las flores con las distribuciones de los granos de polen que son depositados en los estigmas.

Por otro lado, se realizó una prueba Shapiro-Wilk para determinar si los valores del PCA presentan una distribución normal. Con la finalidad de saber si las distribuciones de los granos de polen colectados directamente de las anteras y de los granos de polen encontrados en los estigmas difieren, y teniendo en cuenta que, de acuerdo con la prueba Shapiro-Wilk, no presentan un ajuste normal, se realizó una prueba no paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney.

## TASA DE GERMINACIÓN

Con el propósito de determinar si existen diferencias en las tasa de germinación entre los morfos así como su posible relación con los atributos del grano de polen, se embolsaron inflorescencias con botones en preantesis (maduros). Al día siguiente se colectaron las flores que habían abierto ese

mismo día. Se extrajo polen de las anteras dehiscentes y se sembró en medio de cultivo preparado con agua destilada, agar al 1%, sacarosa al 5% y 0.1% de almidón (modificado de Kearns e Inouye 1993). Para proporcionar la mayor humedad posible, la preparación fue colocada en una caja Petri con el fondo cubierto por papel filtro al que se le agregó una gota de agua destilada. La preparación fue rodeada de algodones húmedos y la caja petri fue cubierta con parafilm y colocada en un lugar iluminado con luz solar a temperatura ambiente (entre 19 y 22° C). Una hora después de haber sembrado los granos de polen, se fotografiaron diferentes cuadrantes al azar de la preparación con la ayuda de un microscopio óptico marca *Zeiss* modelo *Axiovision* a un aumento de 10X y con una cámara marca *Canon* modelo *Powershot A620*. Al observar en el microscopio, se tomaron 10 cuadrantes diferentes de cada individuo sin importar el número de granos de polen que se encontraban en el mismo. De este modo se obtuvo la probabilidad de germinación teniendo en cuenta el número de granos germinados y el número total de granos que se observaron en el cuadrante. Se realizó un análisis de varianza para determinar si existían diferencias en la probabilidad de germinación entre los morfos. Por otro lado, con el fin de determinar si existe relación entre los atributos del grano de polen y la probabilidad de germinación, se aplicó un análisis de regresión simple.

## CRECIMIENTO DEL TUBO POLÍNICO

Con el objetivo de determinar si existe una relación entre los atributos del grano de polen y el crecimiento del tubo polínico, se utilizaron los mismos cultivos de polen que fueron usados para evaluar la tasa de germinación.

Se fotografiaron 15 tubos polínicos de cada individuo cada hora durante 7 horas con el equipo antes mencionado. Con el fin de determinar la tasa de crecimiento de los tubos polínicos se dio seguimiento a los granos de polen con sus respectivos tubos polínicos (durante 7 horas) para posteriormente ser medidos con el programa *Axivision Release 4.6.1*. Se comparó la variación en la longitud final de los tubos polínicos entre los morfos y dentro de los morfos mediante un análisis de varianza.

Dado que se tenían múltiples valores de longitud de los tubos polínicos para cada planta en cada uno de los tiempos (medidas repetidas), se realizó un análisis de covarianza de las longitudes alcanzadas por los tubos polínicos a lo largo del tiempo entre ambos morfos, mediante el cual se determinaron las variables que tienen efecto en la longitud del tubo polínico a lo largo del tiempo.

Asimismo se realizaron dos análisis de regresión lineal simple entre cada uno de los atributos del grano de polen y la longitud final del tubo polínico, con la finalidad de determinar si existe alguna relación entre los atributos del grano de polen y la longitud que alcanzan los tubos polínicos. De igual modo se realizó un análisis de regresión múltiple en busca de un efecto conjunto de los atributos del grano de polen (forma y tamaño) y su interacción, en la longitud del tubo polínico.

## MORFOLOGÍA FLORAL

Los datos de la morfología floral se obtuvieron de las mismas flores de las cuales se extrajo polen. Estas flores fueron fotografiadas y medidas en el microscopio óptico marca *Zeiss* modelo *Discovery V8 Stereo* con un objetivo 0.3X a un aumento de 1.25, 1.6 ó 2 de acuerdo con el tamaño de la flor. A las flores se les midieron 8 atributos diferentes: 1) longitud del estilo, 2) longitud de los estambres, 3) longitud del estigma, 4) longitud de las anteras, 5) longitud de la corola, 6) ancho del cáliz, 7) longitud total de la flor y 8) hercogamia (distancia entre anteras y estigma). Una vez medidos estos atributos de la morfología floral, se realizó un análisis multivariado con el fin de determinar si existen diferencias significativas en la morfología global de las flores entre los morfos. Asimismo se realizaron análisis univariados (anovas) para cada uno de los atributos de la morfología floral, con el propósito de caracterizar la variación entre los morfos.

Con la finalidad de determinar si las características del polen son parte de un módulo fenotípico o varían de forma independiente, así como de conocer la estructura de covariación dentro de la flor, se realizó un análisis de

componentes principales (PCA) donde se incluyeron todos los atributos florales además de las medidas del polen.

Todos los datos obtenidos fueron analizados con el programa *JMP* versión 7.0.1. (*SAS Institute Inc* 2007).

## RESULTADOS

### MORFOLOGÍA DEL GRANO DE POLEN

Las distribuciones del tamaño del grano de polen se aproximan a una distribución normal en ambos morfos (Figura 6). Sin embargo, la prueba *Shapiro Wilk* ( $W$ ) mostró que en todos los casos difieren de una distribución normal ( $P < 0.0001$ ). Asimismo a pesar de que los coeficientes de variación no son muy grandes observamos que el eje ecuatorial es la medida que muestra mayor variación en ambos casos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Coeficiente de variación para las medidas de grano de polen en ambos morfos.

MORFO	CV EJE ECUATORIAL	CV EJE POLAR
<i>PIN</i>	11.45	7.035
<i>THRUM</i>	10.6	7.4

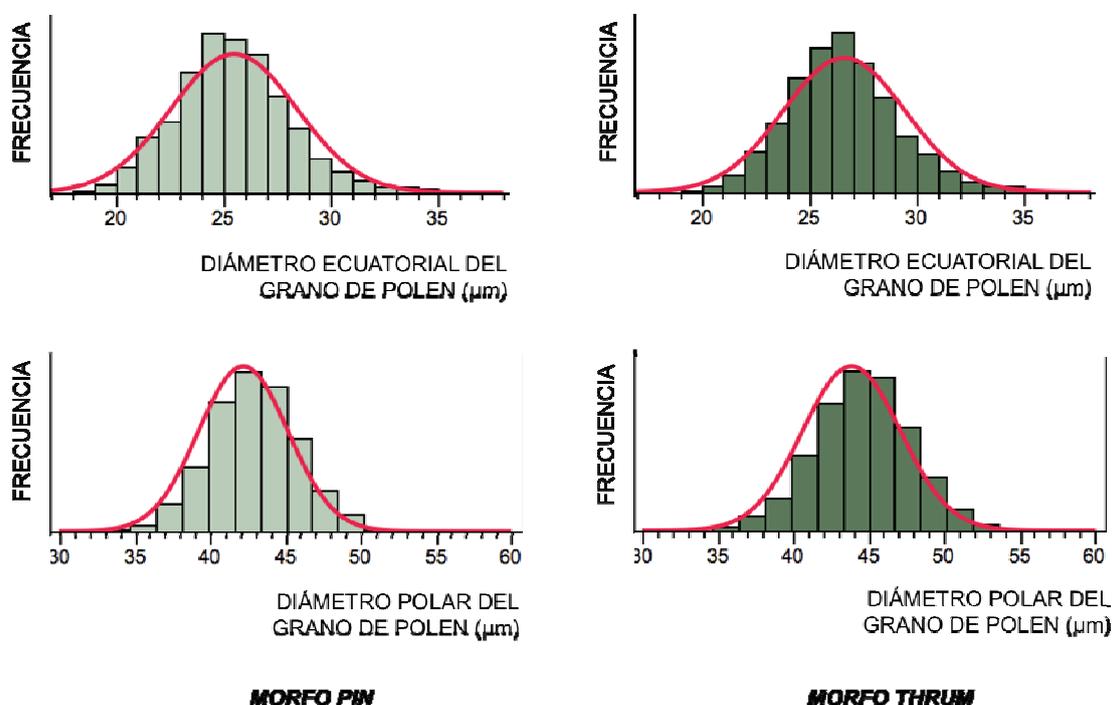


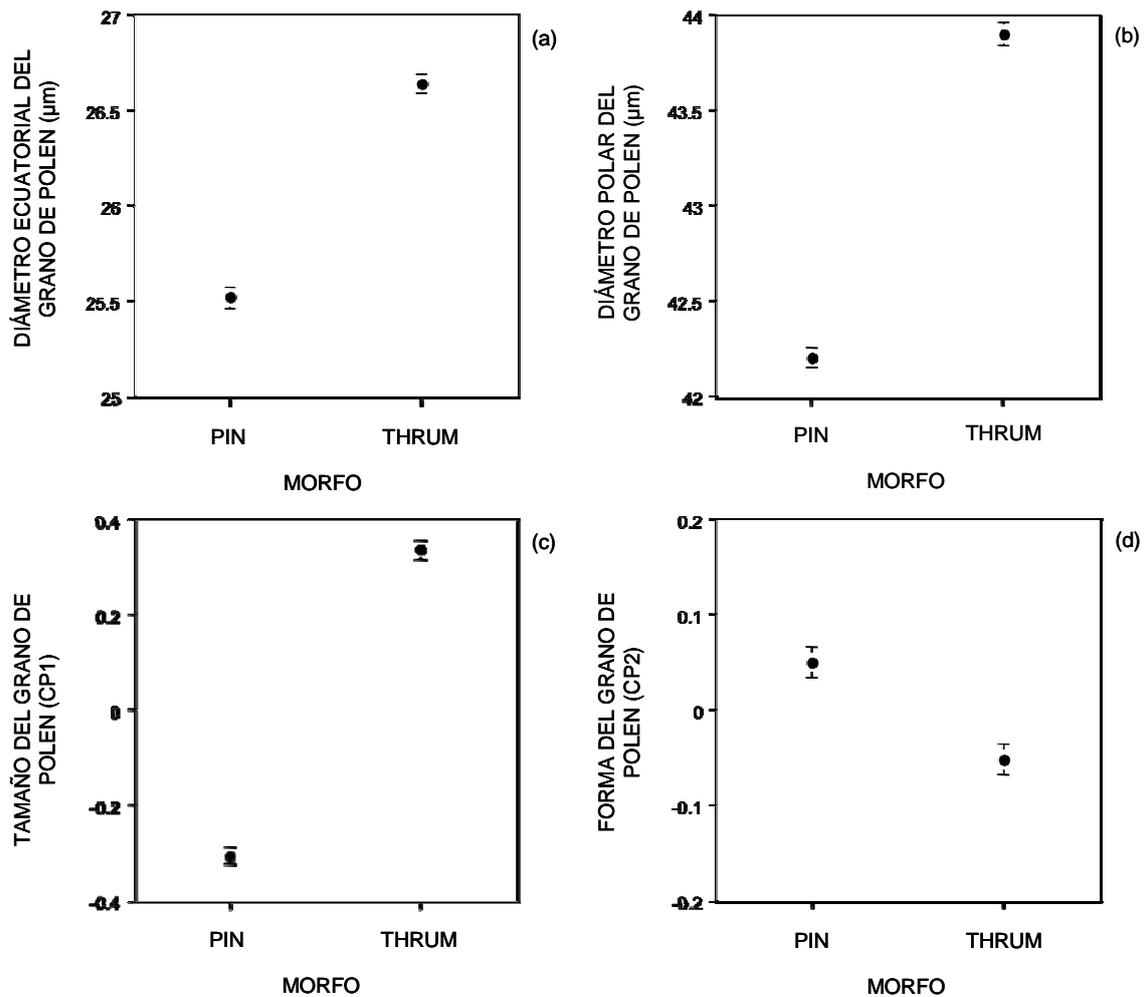
Figura 6. Distribución del tamaño del grano de polen en ambos morfos de *B. ternifolia*.

El PCA sobre los ejes polar y ecuatorial del grano de polen mostró que el componente principal 1 (CP1) es un componente que describe el tamaño del grano de polen ya que ambas cargas (*loadings*) fueron altas y positivas (Cuadro 2). En contraste, las cargas (*loadings*) en el CP2 son de signos opuestos, por lo que este componente describe la forma del grano de polen (Cuadro 2). De este modo fue posible analizar los efectos de los dos atributos (tamaño y forma) del grano de polen de manera independiente.

Cuadro 2. Correlaciones (cargas) de los componentes y las variables del grano de polen

<b>ATRIBUTO</b>	<b>CP1</b>	<b>CP2</b>
<i>EJE ECUATORIAL</i>	0.70711	-0.70711
<i>EJE POLAR</i>	0.70711	0.70711

El análisis de varianza muestra que, como era de esperarse al tratarse de una especie heterostílica, existen diferencias significativas en todos los atributos morfológicos del grano de polen entre los morfos (Figuras 7a-7d).



Figuras 7a-7d. Variación promedio de los atributos del grano de polen en los morfos florales de *B. ternifolia*.

Las diferencias ( $F_{1, 28} = 9, P = 0.0056$ ) entre los morfos en el eje ecuatorial explican el 24% de la variación (Fig. 7a), mientras que las diferencias en el eje polar ( $F_{1, 28} = 19.4, P = 0.0001$ ) explican el 41% de la variación (Fig. 7b). Por otro lado las diferencias entre los morfos para el componente principal 1 (CP1) también fueron significativas ( $F_{1, 28} = 22.5, P < 0.0001$ ) y explican el 44% de la variación (Fig. 7c) y las diferencias en el componente principal 2 (CP2) no fueron significativas ( $F_{1, 28} = 0.77, P = 0.39$ ) y explican poco menos del 3% de la variación (Fig. 7d). En términos generales las diferencias que se presentan en el grano de polen de ambos morfos se refieren básicamente al tamaño. El morfo *Thrum* tiene granos de polen de mayor tamaño.

Asimismo los análisis de varianza detectaron diferencias significativas en los atributos morfológicos del grano de polen dentro de cada morfo, es decir, entre individuos (Figuras. 8a y 8b).

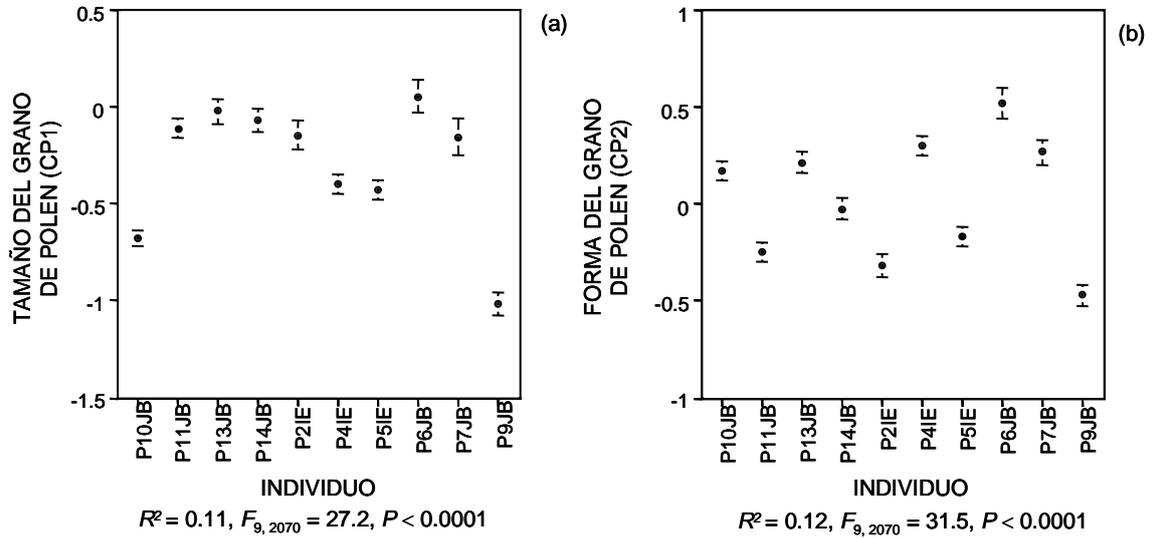


Figura 8a. Valores promedio de los atributos del grano de polen en plantas del morfo *Pin.*

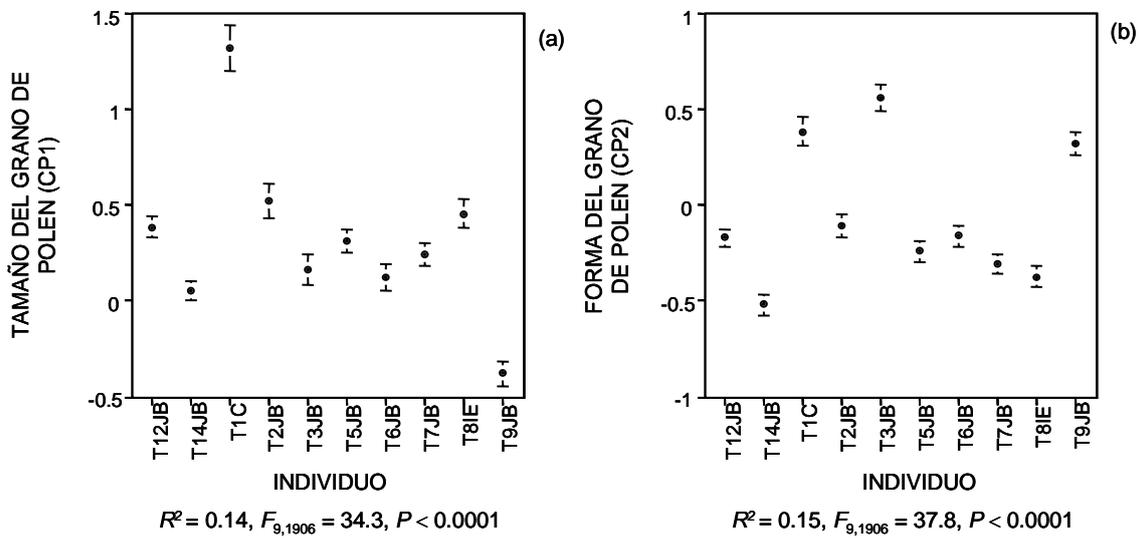


Figura 8b. Valores promedio de los atributos del grano de polen en plantas del morfo *Thrum.*

## CARGAS POLÍNICAS

Con el objeto de saber si existen diferencias entre los atributos (tamaño y forma) del grano de polen antes de dispersarse (granos de polen en la antera) y el polen que es depositado en los estigmas en condiciones naturales, se compararon ambas distribuciones. Debido a que *B. ternifolia* es una especie heterostilica se espera que los granos de polen encontrados en los estigmas de un morfo provengan del morfo opuesto, así es probable que los granos de polen encontrados en estigmas *Thrum* provengan del morfo *Pin* y viceversa. Cabe destacar que para este análisis se consideraron los valores (*scores*) obtenidos a partir del PCA como valores que describen la morfología del grano de polen.

Las pruebas de bondad de ajuste (Shapiro Wilk) mostraron que ninguna de las distribuciones presenta un ajuste normal con excepción de la distribución del tamaño de los granos de polen (CP1) depositados en los estigmas del morfo *Pin* ( $W = 0.99$ ,  $P = 0.32$ ). Debido a ello y con la finalidad de evaluar las diferencias entre las distribuciones, se realizó una prueba no paramétrica de Wilcoxon a través de la cual se pudo determinar que los granos de polen depositados en estigmas *Thrum* son significativamente ( $Z = 8.9$ ,  $g.l. = 1$ ,  $P < 0.001$ ) más grandes que los producidos por plantas *Pin* (granos de polen en estigmas *Thrum* = 0.19, granos de polen en plantas *Pin* = -0.31) mostrando una diferencia de 0.5 entre los valores promedio de los *scores* (Fig. 9a). Por el contrario se observa que los granos de polen de las plantas *Thrum* son significativamente ( $Z = -7.34$ ,  $g.l. = 1$ ,  $P < 0.001$ ) más grandes que los encontrados en estigmas *Pin* (granos de polen en plantas *Thrum* = 0.33, granos de polen en estigmas *Pin* = -0.19) con una diferencia de 0.52 (Fig. 9b). En cuanto a la forma, se observa que los granos de polen que producen las plantas *Pin* son más elongados (0.05) que los depositados en estigmas *Thrum* (-0.017) con una diferencia de 0.067, aunque es importante notar que esta diferencia no es significativa ( $Z = -0.46$ ,  $g.l. = 1$ ,  $P = 0.643$ ) (Fig. 9c). Asimismo encontramos que los granos de polen de anteras *Thrum* son significativamente más redondos que los depositados en estigmas *Pin* ( $Z = 2.33$ ,  $g.l. = 1$ ,  $P = 0.02$ ) (granos de polen en plantas *Thrum* = -0.053, granos de polen en estigmas *Pin* = 0.017) y muestran una diferencia de 0.07 entre los valores (Fig. 9d).

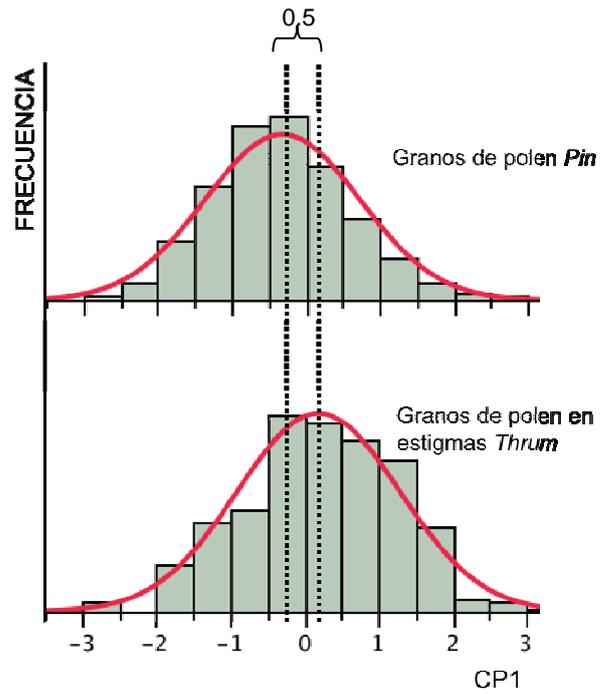


Figura 9a. Distribución del tamaño del grano de polen de anteras *Pin* (arriba). Distribución del tamaño del grano de polen depositado en estigmas *Thrum* (abajo).

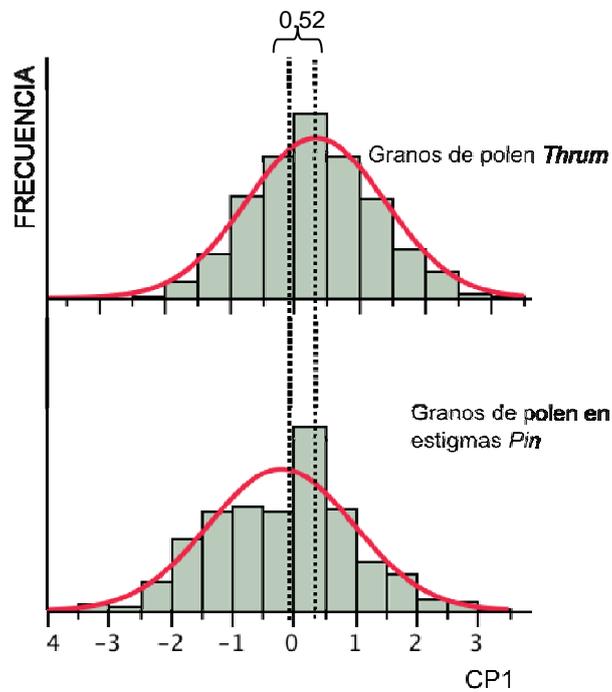


Figura 9b. Distribución del tamaño del grano de polen de anteras *Thrum* (arriba). Distribución del tamaño del grano de polen depositado en estigmas *Pin* (abajo).

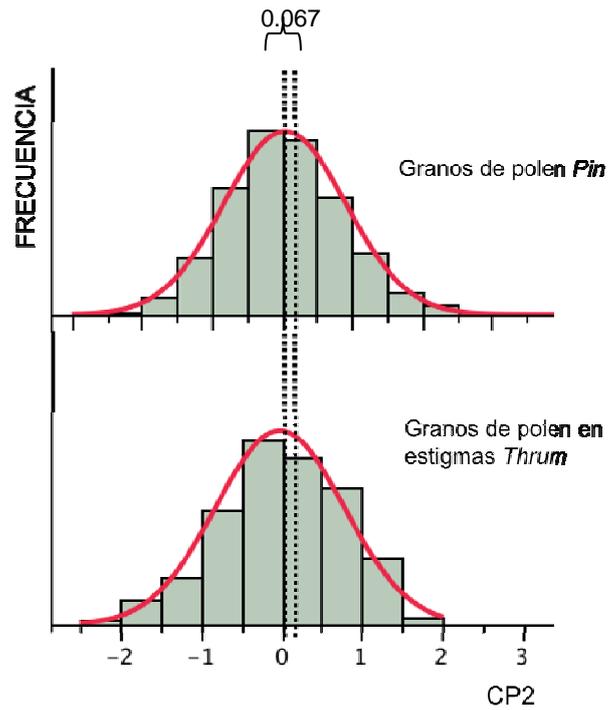


Figura 9c. Distribución de la forma del grano de polen de anteras *Pin* (arriba). Distribución de la forma del grano de polen depositado en estigmas *Thrum* (abajo).

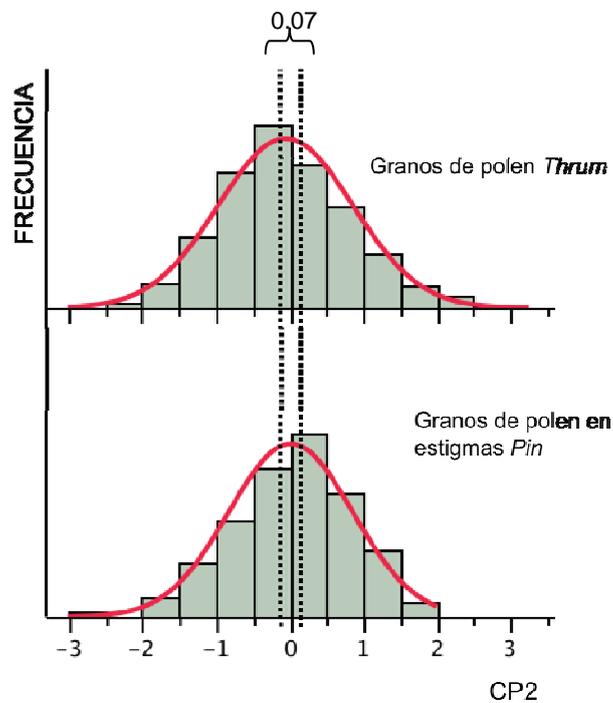


Figura 9d. Distribución de la forma del grano de polen de anteras *Thrum* (arriba). Distribución de la forma del grano de polen depositado en estigmas *Pin* (abajo).

## TASA DE GERMINACIÓN

La probabilidad de germinación no difiere entre los morfos ( $F_{1, 190} = 0.59$ ,  $P = 0.44$ ). El morfo *Pin* tuvo una probabilidad de germinación promedio de 0.47 y el morfo *Thrum* de 0.45.

La correlación entre la probabilidad de germinación del morfo *Thrum* y el tamaño del polen (CP1) fue significativa ( $F_{1, 8} = 8.76$ ,  $P = 0.018$ ) y explicó el 52% de la variación (Figura 10a). El CP2 no tuvo ninguna relación con la probabilidad de germinación. En el caso del morfo *Pin* no se encontró ninguna relación significativa.

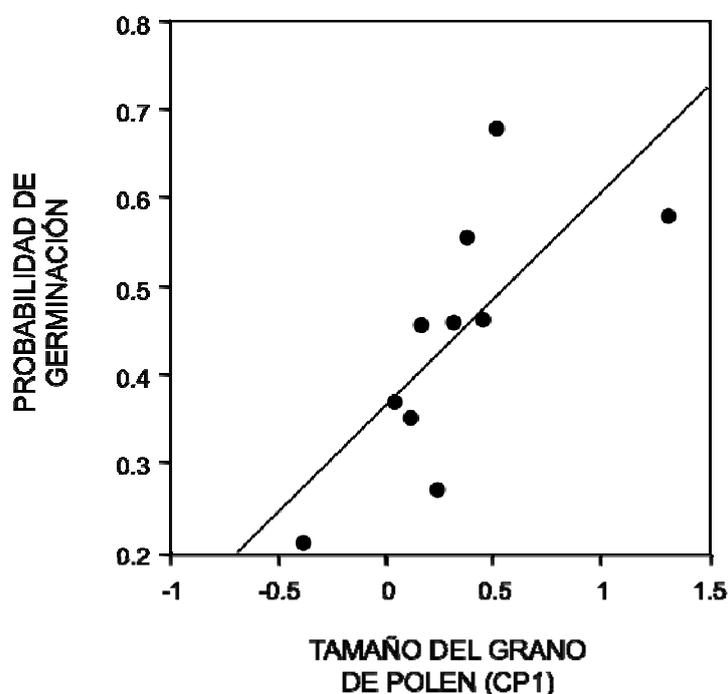


Figura 10. Correlación entre el tamaño del grano de polen (CP1) y la probabilidad de germinación encontrada en el morfo *Thrum*.

## CRECIMIENTO DE TUBOS POLÍNICOS

Un análisis del crecimiento *in vitro* de los tubos polínicos de ambos morfos mostró un efecto significativo del morfo sobre la longitud de los tubos polínicos (Cuadro 3). Además del efecto obvio del tiempo, el crecimiento de los tubos polínicos fue afectado, por la interacción (TIEMPO  $\times$  MORFO) y por el término cuadrático del tiempo.

Cuadro 3. Análisis de varianza del crecimiento de los tubos polínicos de ambos morfos de *B. ternifolia*.

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	F	P
TIEMPO	1	106967972	1103.409	<.0001 *
MORFO	1	820	0.0085	0.9267
TIEMPO*MORFO	1	476753	4.9179	0.0267 *
TIEMPO*TIEMPO	1	2944290	30.3713	<.0001 *

De este modo, la longitud alcanzada por los tubos polínicos a lo largo del tiempo, muestra que en las primeras horas después de la germinación ambos morfos presentan un comportamiento semejante. Sin embargo, tal como demuestra la significancia del término cuadrático, la tasa de crecimiento tiende a disminuir con el tiempo en el morfo *Pin* (interacción significativa TIEMPO × MORFO). Por lo tanto, hacia las últimas horas del cultivo las diferencias entre los morfos se hacen evidentes (Figura 11). Asimismo se observa que las pendientes que describen el crecimiento de los tubos polínicos, difieren entre los morfos, por lo que es posible afirmar que la velocidad de crecimiento, así como la longitud alcanzada por los tubos polínicos, es mayor en el morfo *Thrum*.

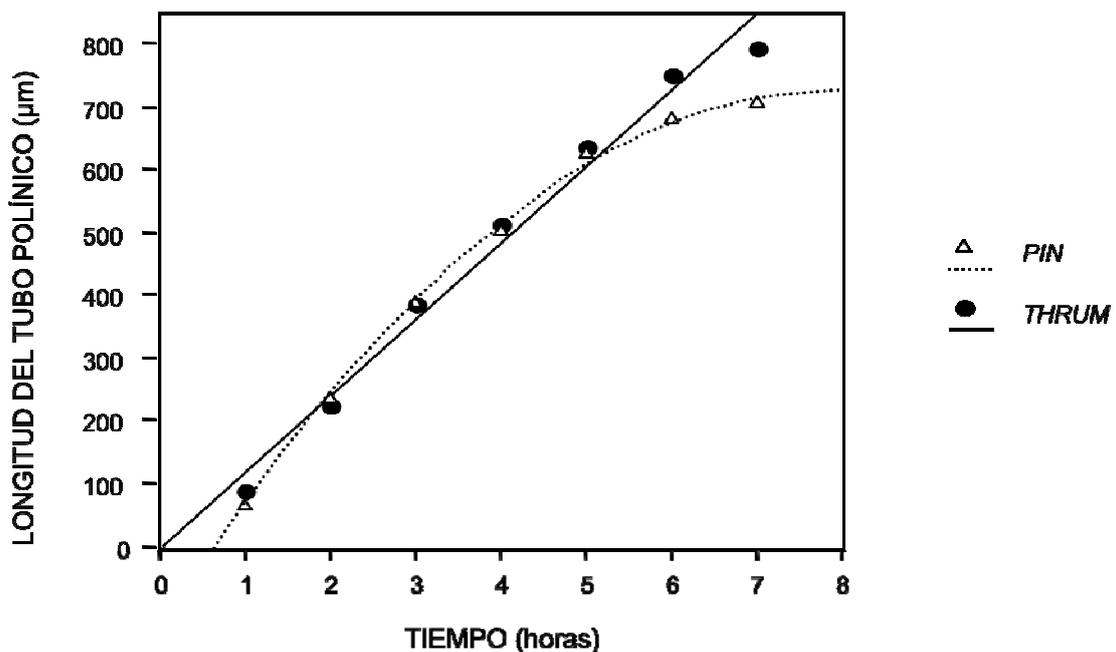


Figura 11. Crecimiento de los tubos polínicos de ambos morfos en condiciones *in vitro* a lo largo del tiempo.

A diferencia de lo observado en los granos de polen y en las tasas de crecimiento del tubo polínico, no se encontraron diferencias significativas en la longitud final de los tubos polínicos entre los morfos ( $F_{1, 288} = 2.91$ ,  $P = 0.09$ ), la longitud media del tubo polínico del morfo *Pin* fue de  $706.38\mu\text{m}$  y de  $794.5\mu\text{m}$  en el morfo *Thrum*. Como se puede observar en las figuras 12a y 12b, la longitud promedio de los tubos polínicos mostró diferencias significativas entre plantas del mismo morfo en ambos casos ( $R^2 = 0.025$ ,  $F_{9, 140} = 5.16$ ,  $P < 0.0001$  en el morfo *Pin* y  $R^2 = 0.03$ ,  $F_{9, 130} = 6.1$ ,  $P < 0.0001$  en el morfo *Thrum*).

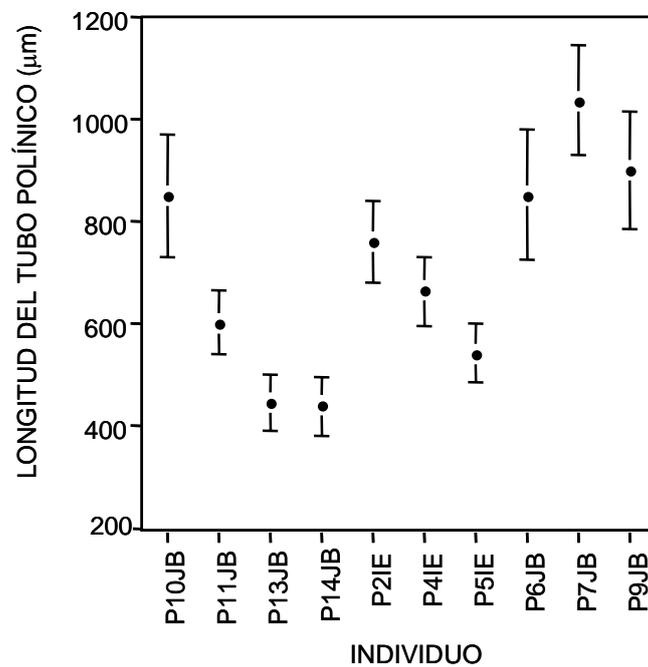


Figura 12a. Variación en la longitud final del tubo polínico entre plantas del morfo *Pin*

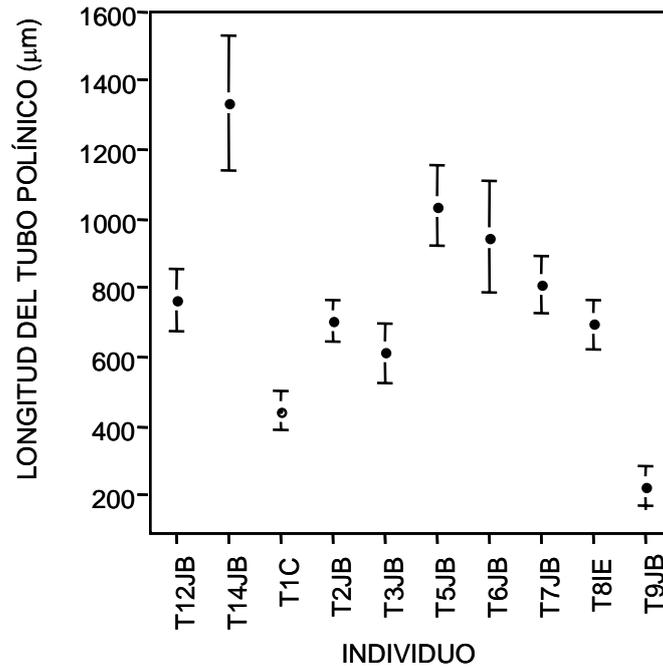


Figura 12b. Variación en la longitud final del tubo polínico entre plantas del morfo *Thrum*.

## RELACIÓN ENTRE EL GRANO DE POLEN Y LA DINÁMICA DEL CRECIMIENTO DE LOS TUBOS POLINICOS

Como ya se había mencionado, uno de los principales objetivos de este estudio es saber si existe una relación entre las características del grano de polen, representadas por el CP1 y CP2, y el crecimiento de los tubos polínicos. Las características tomadas en cuenta son el tamaño y la forma que están representadas por los componentes principales 1 y 2 (CP1 Y CP2, respectivamente).

El análisis de regresión simple, no detectó ninguna relación significativa entre el tamaño del grano de polen y la longitud final de los tubos polínicos en ninguno de los morfos ( $F_{1,8} = 1.1$ ,  $P = 0.33$  en el morfo *Pin*;  $F_{1,8} = 0.1$ ,  $P = 0.76$  para el morfo *Thrum*). Por otro se encontró una relación significativa entre la forma del grano de polen (CP2) y la longitud del tubo polínico del morfo *Thrum* ( $F_{1,8} = 11.02$ ,  $P = 0.011$ ) que explica el 58% de la variación (Figura 13). Este resultado sugiere que en este morfo mientras más esférico es el grano de

polen, mayor es la longitud que alcanza su tubo polínico. En el morfo *Pin*, al igual que con el tamaño, no se encontró relación significativa entre la forma y la longitud del tubo polínico ( $F_{1,8} = 0.12$ ,  $P = 0.74$ ).

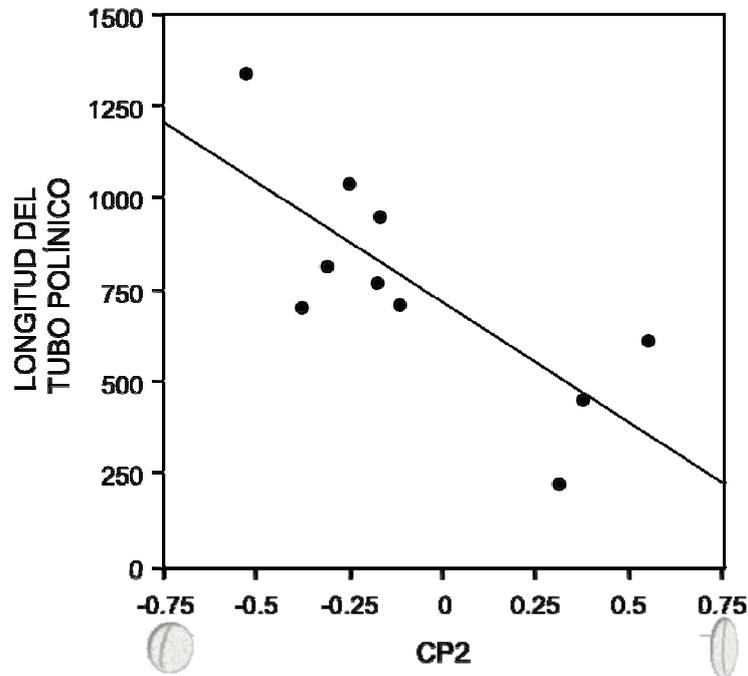


Figura 13. Correlación entre la forma del grano de polen (CP2) y la longitud del tubo polínico por planta en el morfo *Thrum*.

Ya que los componentes principales son independientes entre sí, se realizó un análisis de regresión múltiple que permitió determinar que no existe un efecto conjunto de los atributos del grano de polen (forma y tamaño) en la longitud que alcanza el tubo polínico. Sin embargo; como era de esperarse, de acuerdo con los resultados del análisis de regresión simple, se encontró que el efecto de la forma del grano de polen (CP2) sobre la longitud del tubo polínico, difiere significativamente entre los morfos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Análisis de varianza del efecto de la variables sobre el crecimiento de los tubos polínicos

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	F	P
MORFO	1	108113.42	2.4953	0.1402
CP1	1	128706.3	2.9705	0.1104
CP2	1	105090.25	2.4255	0.1453
MORFO*CP1	1	6322.32	0.1459	0.7091
MORFO*CP2	1	447820.88	10.3357	0.0074 *
CP1*CP2	1	120566.54	2.7827	0.1212
CP1*CP2*MORFO	1	35337.71	0.8156	0.3842

### MORFOLOGÍA FLORAL

El análisis de varianza multivariado (MANOVA) mostró que existen diferencias significativas entre las flores de ambos morfos ( $F_{7, 201} = 573.23$ ,  $P < 0.0001$ ). Los análisis univariados (ANOVA) por su parte, revelaron diferencias significativas en la longitud de las anteras (Fig. 14a.) ( $F_{1, 207} = 14.7$ ,  $P = 0.002$ ), longitud de la corola (Fig. 14b.) ( $F_{1, 207} = 84.6$ ,  $P < 0.0001$ ), en el nivel de hercogamia (Fig. 14c.) ( $F_{1, 207} = 8.3$ ,  $P = 0.0044$ ) y la longitud total de la flor (Fig. 14d.) ( $F_{1, 207} = 65.8$ ,  $P < 0.0001$ ), entre morfos. De lo anterior podemos concluir que el morfo *Thrum* posee atributos significativamente más grandes en la morfología floral que el morfo *Pin*.

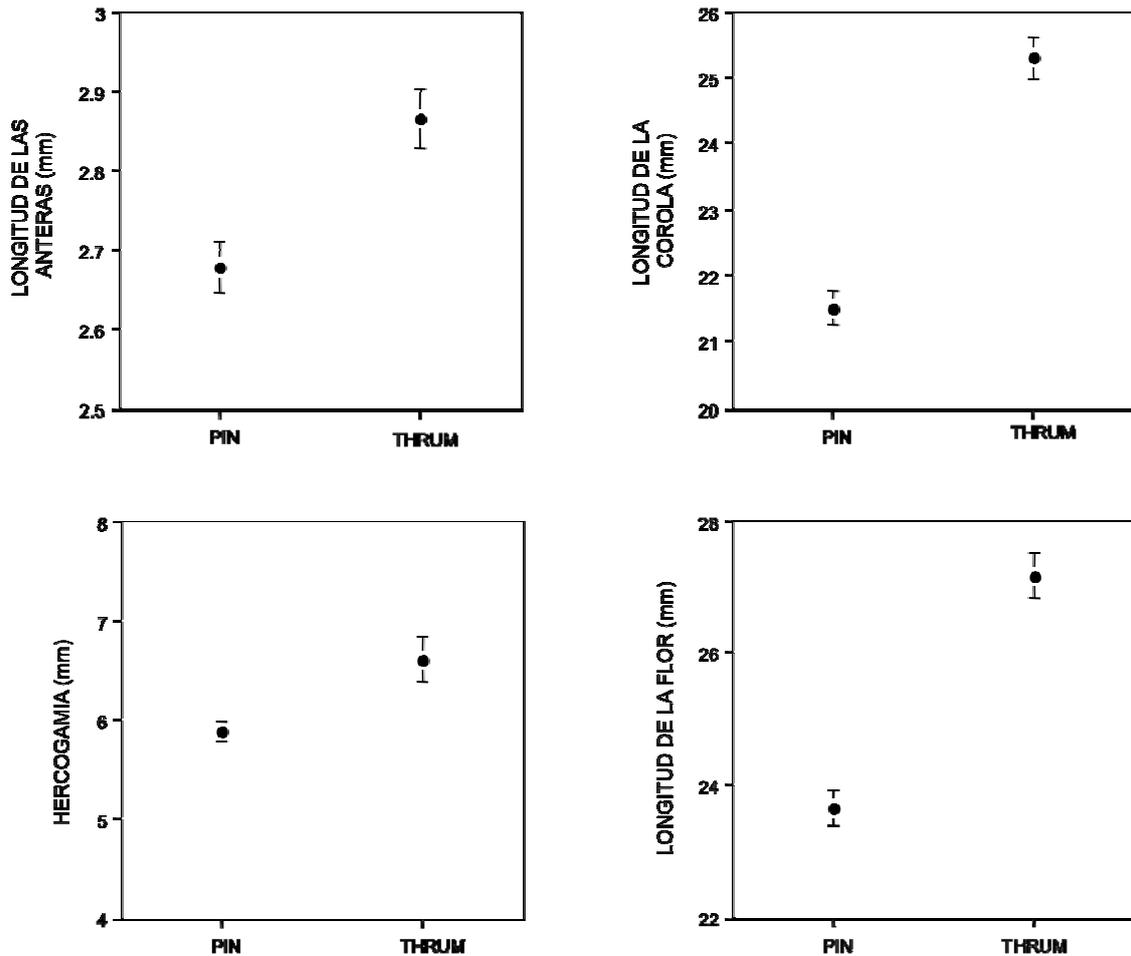


Figura 14. Variación en los caracteres de la morfología floral entre ambos morfos.

A partir del PCA realizado para conocer la estructura de covariación de la morfología floral, podemos afirmar que a pesar de que existen atributos que se encuentran altamente correlacionados (longitudes de estilo, estambres, corola y la flor) el grano de polen es un atributo que varía de forma relativamente independiente en ambos morfos. Como se puede observar, las variables que representan al grano de polen tienen un efecto positivo y alto sobre componentes (CP2 y CP4 en *Pin* y CP4 en *Thrum*) en las que otras variables tienen poco peso. Esto es patente particularmente en el CP4, que básicamente explica la variación en el eje polar de ambos morfos (Cuadros 5a y 5b).

Cuadro 5a. Análisis de componentes principales para la morfología floral y el grano de polen del morfo *Pin*. Se marcan con gris las variables que explican la mayor variación para cada componente.

<b>ATRIBUTO</b>	<b>CP1</b>	<b>CP2</b>	<b>CP3</b>	<b>CP4</b>	<b>CP5</b>
<i>LONGITUD ESTILO</i>	0.447	-0.06911	0.12658	0.01777	0.02812
<i>LONGITUD ESTAMBRES</i>	0.42393	0.17404	0.03068	0.20492	-0.28149
<i>LONGITUD ESTIGMA</i>	-0.07214	-0.2239	0.58465	-0.19835	-0.19898
<i>LONGITUD ANTERAS</i>	0.2605	0.36206	0.27063	-0.15983	0.41599
<i>LONGITUD COROLA</i>	0.45025	0.0656	0.10461	0.09676	-0.10623
<i>ANCHO CÁLIZ</i>	-0.14165	-0.31199	0.48415	0.06572	-0.44244
<i>LONGITUD FLOR</i>	0.44929	0.01856	0.14327	0.09732	-0.06008
<i>HERCOGAMIA</i>	0.12768	-0.46607	0.20264	-0.3453	0.58211
<i>EJE ECUATORIAL GP</i>	-0.14884	0.49981	0.23256	-0.35184	-0.07362
<i>EJE POLAR GP</i>	-0.20025	0.02103	0.32076	0.79128	0.3864

Cuadro 5b. Análisis de componentes principales para la morfología floral y el grano de polen del morfo *Thrum*. Se marcan con gris las variables que explican la mayor variación para cada componente.

<b>ATRIBUTO</b>	<b>CP1</b>	<b>CP2</b>	<b>CP3</b>	<b>CP4</b>	<b>CP5</b>
<i>LONGITUD ESTILO</i>	0.37342	0.01556	-0.35245	0.04974	-0.41225
<i>LONGITUD ESTAMBRES</i>	0.43651	0.1252	0.09146	-0.07731	-0.0805
<i>LONGITUD ESTIGMA</i>	0.03876	0.50945	-0.25846	-0.01303	-0.09656
<i>LONGITUD ANTERAS</i>	0.21276	-0.03973	-0.46204	0.42545	0.74012
<i>LONGITUD COROLA</i>	0.42511	0.14541	0.16577	0.02505	0.00984
<i>ANCHO CÁLIZ</i>	0.1035	0.55379	-0.15085	-0.09974	0.01709
<i>LONGITUD FLOR</i>	0.41921	0.16348	0.17513	0.01843	-0.02391
<i>HERCOGAMIA</i>	0.14107	0.16549	0.61778	-0.18324	0.44295
<i>EJE ECUATORIAL GP</i>	-0.31477	0.35097	-0.14947	-0.34311	0.14925
<i>EJE POLAR GP</i>	-0.16958	0.24541	0.31872	0.80013	-0.21362

## DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo indican que existe variación significativa en todos los atributos del polen medidos. No sólo se encontraron diferencias entre los morfos florales, sino que también hubo diferencias marcadas entre los individuos de cada morfo. Asimismo, los experimentos de germinación y de crecimiento de tubos polínicos *in vitro*, mostraron que esta variación podría tener consecuencias importantes sobre el desempeño del polen aunque este efecto difiere entre los morfos florales. La variación en el tamaño y la forma de los granos de polen de las plantas *Thrum* estuvo relacionada con la probabilidad de germinación y la longitud del tubo polínico. Los granos de polen más grandes y cuya forma se aproxima más a una esfera tuvieron mayores probabilidades de germinación y produjeron tubos polínicos más largos. En contraste, aunque el desempeño de los granos de polen de las plantas *Pin* fue muy variable, esta variación fue independiente de su morfología. Este resultado indica que las presiones de selección que operan sobre la biología del polen de *Bouvardia ternifolia* difieren entre los morfos florales. En conjunto, los resultados de este trabajo sugieren que la morfología del polen es un blanco de la selección natural, particularmente la del morfo *Thrum*. Asimismo, la diferencia entre los morfos podría interpretarse como parte del proceso de evolución divergente que conduce al reforzamiento del polimorfismo floral (Faivre 2001), o bien como un proceso de especialización sexual que podría finalizar con la disolución evolutiva de la heterostilia (Beach y Bawa, 1980, Eguiarte *et. al.* 1999, Faivre 2001). A continuación se expresan los argumentos a favor y en contra de estas alternativas.

La heterostilia se caracteriza por ser un sistema reproductivo que tiene una enorme labilidad evolutiva (Lloyd y Webb 1992, Domínguez *et. al.* 1997). Se ha demostrado que la heterostilia puede ser evolutivamente estable (Barrett 1992), evolucionar hacia la homostilia (Berry 1991), o hacia la especialización sexual y el dioicismo (Beach y Bawa 1980, Eguiarte *et. al.* 1999). En aquellos casos en los que la heterostilia ha evolucionado al dioicismo se ha encontrado que en lo general el morfo *Thrum* se especializa en la función masculina y el *Pin* en la femenina (Beach y Bawa 1980). En el caso particular de *Bouvardia ternifolia*

existe evidencia de que el morfo *Thrum* posee atributos que podrían ser ventajosos para la función masculina como flores más grandes que son más atractivas para los polinizadores (Faivre 2001, Lara 2002, López 2007), anteras expuestas que favorecen la liberación de polen (Manicacci y Barrett 1995) y granos de polen más grandes que supuestamente son más competitivos (Mulcahy 1979, Lord y Eckard 1984, Anderson y Barrett 1986, Bertin 1990, Manicacci y Barrett 1995, Torres 2000, Yang y Guo 2004). Además de las ventajas asociadas con la función masculina, el sistema de incompatibilidad de las plantas *Thrum* de *B. ternifolia* genera desventajas para este morfo desde el punto de vista femenino. El sistema de incompatibilidad de los individuos *Thrum* es más laxo que el de las plantas *Pin* ya que permite cruza ilegítimas (Faivre 2002) que podrían aumentar los niveles de endogamia de la progenie. Obviamente, esto podría resultar en una disminución de la calidad de las semillas que producen las plantas *Thrum* (Charlesworth y Charlesworth 1987). A pesar de que esta evidencia sugiere que *B. ternifolia* podría estar inmersa en un proceso de especialización funcional, otros estudios muestran que las diferencias reproductivas entre los dos morfos de esta especie no se reflejan en una producción diferencial de semillas (Lara 2007) o frutos (Hernández 2006). Aunque a la fecha no hay estudios que evalúen el desempeño de las semillas, si la progenie de ambos morfos se desempeña de manera similar, entonces existe una probabilidad muy baja de que esta especie se encuentre en un proceso de especialización funcional. No obstante, si las diferencias en el funcionamiento del sistema de incompatibilidad entre las plantas *Pin* y *Thrum* tienen un efecto sobre la calidad de las semillas, entonces sería posible que uno de los morfos funcionara mejor como hembra (*Pin*) y otro como macho (*Thrum*) (Beach y Bawa 1980). Esta posibilidad solo podrá ser evaluada mediante experimentos que comparen los niveles de endogamia, las tasas de germinación de semillas, el establecimiento de las plántulas, y el crecimiento de las plantas derivadas de cada morfo. Sin embargo los resultados que muestran los trabajos de Hernández (2006) y Lara (2007) sugieren que es poco probable que la población estudiada se encuentre bajo un proceso de especialización ya que las diferencias reproductivas entre los morfos parecen no tener efectos sobre el éxito reproductivo.

Por otro lado es probable que las diferencias encontradas entre los morfos

florales sean parte de los procesos selectivos que operan para reforzar el polimorfismo floral de una especie heterostílica como *Bouvardia ternifolia* (Barrett 1992, Dulberger 1992). Es posible que los granos de polen del morfo *Thrum* estén sujetos a una dinámica selectiva que favorecerá la evolución de granos de polen más grandes y esféricos. Si los granos de polen grandes tienen mayores tasas de germinación y crecimiento de tubos polínicos (como se observó en este estudio), y estos atributos se traducen en una mayor probabilidad de fecundar un óvulo (Mulcahy 1979, Lubliner *et. al.* 2005), entonces es posible que estemos atestigüando un proceso, aún inacabado, de selección direccional sobre la morfología de los granos de polen *Thrum*. En este escenario esperaríamos que la selección optimizara el tamaño de grano de polen en función de lograr la máxima habilidad competitiva sin disminuir la probabilidad de arribo a un estigma conespecífico. Los resultados de este trabajo sugieren que este proceso está ocurriendo en el morfo *Thrum*. Sin embargo, dado que los experimentos de germinación y crecimiento de tubos polínicos se realizaron *in vitro*, queda abierta la posibilidad de que esta interpretación sea incorrecta, ya que no consideran el componente de dispersión del polen. De hecho, la diferencia encontrada entre la distribución del polen obtenido de anteras *Thrum* con la del polen de los estigmas *Pin*, sugiere que a pesar de que los granos de polen grandes y esféricos tendrían ventajas competitivas *una vez que aterrizan* en los estigmas *Pin*, estos tienen una probabilidad muy baja de llegar a su objetivo. En otras palabras, los resultados de este estudio sugieren que los granos de polen *Thrum* están sujetos a un *trade-off* en el cual los granos de polen grandes tienen ventajas competitivas que son balanceadas por una baja probabilidad de transferencia a los estigmas conespecíficos (Sarkissian y Harder 2001).

Finalmente, el análisis de la morfología de la flor y del polen (Cuadros 5a y 5b) indicó que las variables de la longitud de la corola, el tamaño de la flor en general y los órganos reproductivos se agruparon juntos en los primeros dos componentes principales, mientras que variables del polen tendieron a agruparse en otros componentes. Este resultado sugiere que existe una independencia relativa del polen con el resto de la flor, y por lo tanto sugiere que la estructura de covariación de la flor no restringiría la evolución (relativamente independiente) del polen (Lamborn *et. al.* 2005). Obviamente,

esta hipótesis deberá ser evaluada por medio de un diseño que permita evaluar el componente genético de la estructura de covariación de los atributos de la flor y del polen.

Así, es posible concluir que probablemente el grano de polen del morfo *Thrum* de *B. ternifolia* se encuentre ante un proceso selectivo que opera tanto sobre la habilidad competitiva como sobre la probabilidad de dispersión. De este modo y de acuerdo con la hipótesis planteada, se espera que la selección conduzca a una morfología óptima del grano de polen en este morfo, lo cual a su vez ayuda a reforzar el polimorfismo en esta especie distíllica.

## BIBLIOGRAFÍA

Anderson J., S. Barrett. 1986. Pollen tube growth in tristylous in *Pontederia cordata* (Pontederiaceae). *Can. J. Bot.* 64:2602-2607.

Arak A. 1983. Sexual selection by male-male competition in natterjack toads choruses. *Nature.* 306: 261-262.

Armbruster, W. 1996. Evolution of floral morphology and function: an integrative approach to adaptation, constraint and compromise in *Dalechampia* (Euphorbiaceae). en Lloyd, D.; S., Barrett (eds.). Floral Biology. Chapman & Hall. USA. pp 241-272.

Berry P., H. Tobe, J. A. Gómez. 1991. Agamospermy and the loss of distyly in *Erythroxylum undulatum* (Erythroxylaceae) from northern Venezuela. *American Journal of Botany.* 78(5): 595-600.

Barrett, S. 1992. Evolution and function of heterostyly. Springer-verlag. Alemania. 279pp.

Barrett, S. 1996. Styler polymorphisms and the evolution of heterostyly in *Narcissus* (Amaryllidaceae). en Lloyd, D.; S., Barrett (eds.). Floral Biology. Chapman & Hall. USA. pp 339-376.

Beach J. H., Bawa K. S. 1980. Role of pollinators in the evolution of dioecy from distyly. *Evolution.* 34(6): 1138-1142.

Bertin R. 1990. Paternity in plants. en Lovett-Doust, J.L.; L., Lovett-Doust (eds.). Plant reproductive ecology. Oxford University Press. USA. pp 30-59.

Charlesworth D., B. Charlesworth. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18: 237-268.

Curtis, H.; S., Barnes. 2001. Biología. Ed. Médica Panamericana. 6ª ed. España. 1491 pp.

de Graaf B. H. J., J.W.M. Derksen. C. Mariani. 2001. Pollen and pistil in the progamic phase. *Sex. Plant Reprod.* 14:41-55.

Delph L., Ashman T.-L. Trait selection in flowering plants: how does sexual selection contribute? *Int. Comp. Biol* 46:465–472.

Domínguez C. A., G. Ávila-Sakar, S. Vázquez-Santana, J. Márquez-Guzmán. 1997. Morph biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany*. 84(5): 626-632.

Dulberger, R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. en Barrett, S. (ed.). Evolution and function of heterostyly. Springer-verlag. Alemania. pp 41-84.

Eguiarte, L.; J., Núñez; C., Domínguez; C., Cordero. 1999. Biología evolutiva de la reproducción en plantas. en Núñez, J.; L., Eguiarte (comps.). La evolución biológica. CONABIO-UNAM. México. pp 117-151.

Faivre A. 2000. Ontogenetic differences in heterostylous plants and implications for development from a herkogamous ancestor. *Evolution*. 54(3): 847-858.

Faivre A., L. McDade. 2001. Population-level variation in the expression of heterostyly in three species of Rubiaceae: does reciprocal placement of anthers

and stigmas characterize heterostyly?. *American Journal of Botany*. 88(5): 841-853

Faivre, A. 2002. Variation in pollen tube inhibition sites within and among three heterostylous species of rubiaceae. *International Journal of Plant Sciences*. 163(5): 783-794.

Galen C., M.L. Stanton. 1989. Bumble bee pollination and floral morphology: factors influencing pollen dispersal in the alpine sky pilot, *Polemonium viscosum* (Polenomiaceae). *American Journal of Botany*. 76:419-426.

Gilbert F. S. 2006. Developmental biology. Sinauer Associates. 8ª ed. EUA . 751 pp.

Hernández A. 2006. Colibríes y la especialización sexual en el arbusto distílico *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae). Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ciencias. 45 pp.

Kearns A. K., D. W. Inouye. 1993. Techniques for pollination biologists. University press of Colorado. EUA. 583 pp.

Lamborn E., J. Cresswell, M. Macnair. 2005. The potential for adaptive evolution of pollen grain size in *Mimulus guttatus*. *New Phytologist*. 167: 289-296.

Lara C., J.F. Ornelas. 2002. Flower mites and nectar production in six hummingbirds-pollinated plants with contrasting flower longevities. *Canadian journal of botany*. 80: 1216-1229.

Lara C. 2006. Temporal dynamics of flower use by hummingbirds in a highland temperate forest in México. *Ecoscience*. 13(1): 23-29.

Lara C. 2008. Antagonists and the risk-sensitivity in hummingbirds: experimental tests. *Ornitología neotropical*. 19(Suppl.): 485-490.

Lau T-C., Stephenson A.G. 1993. Effects of soil nitrogen on pollen production, pollen grain size, and pollen performance in *Curcubita pepo* (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany*. 80(7): 763-768.

Lee, T. 1990. Patterns of fruit and seed production. en Lovett, J.; L., Lovett (eds.) Plant reproductive ecology. Oxford University Press. USA. pp 179-202.

López, A. 2007. Evolución del sistema reproductivo de *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología. 94pp.

Lord y Eckard. 1984 .Incompatibility between the dimorphic flowers of *Collomia grandiflora*, a *cleistogamus* sp. *Science*. 223: 695-696.

Lovett-Doust, J.L.; L., Lovett-Doust. 1990. Plant reproductive ecology. Oxford University Press. USA. 344 pp.

Lubliner N., D. Singh-Cundy, A. Singh-Cundy. 2003. Characterization of the pollen growth transition in self-incompatible *Petunia inflata*. *Sex Plant Reprod*. 15:243-253.

Manicacci D., S. Barrett. 1995. Stamen elongation, pollen size, and siring ability in tristylous *Eichhornia paniculada* (Pontederiaceae). *American Journal of botany*. 82(11): 1381-1389.

Maynard Smith J. 1978. The evolution of sex. Cambridge University Press. UK. 222 pp.

Mayr E. Sexual selection and natural selection. en Campbell B. (ed.). *Sexual selection and the descent of man*. Aldine pub. 2ª ed. E.U.A. pp 87-104.

Mulcahy, D.L. 1979. The rise of the angiosperms: A genecological factor. *Science*. 206: 20-23.

Página del Instituto Nacional de Ecología: [www.ine.gob.mx](http://www.ine.gob.mx)

Página de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel: [www.repsa.unam.mx](http://www.repsa.unam.mx)

Quinn, G., M., Keough. Experimental desing and data analysis for biologists. Cambridge UP. UK. pp 443-472.

Richards, A. 1986. Plant breeding systems. George Allen & Unwin. UK. 529 pp.

Richards, A. 1997. Plant breeding systems. 2ª ed. Chapman & Hall. UK. 529 pp.

Rzedowski, J. 1954. Vegetación del Pedregal de San Ángel (D.F., México). *Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas*. 8: 855-870.

Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski y colaboradores, 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México.

Sarkissian T., L. Harder. 2001. Direct and indirect responses to selection on pollen size in *Brassica rapa* L. *J. Evol. Biol.* 14:456-468.

SAS Institute Inc. 2007. *JMP version 7.0.1*. Cary, NC, EUA: SAS Publishing.

Shivanna, K.R., J. Heslop-Harrison, Y. Heslop-Harrison. 1981. Heterostyly in *Primula*. 2. Sites of pollen inhibition, and effects of pistil constituents on compatible and incompatible pollen tube growth. *Protoplasma*. 107:319-337.

Shivanna, K.R. 2003. Pollen biology and biotechnology. Science Publishers inc. India. 301pp.

Skogsmyr, I., A. Lankinen. 2002. Sexual selection: an evolutionary force in plants? *Biol. Rev.* 77:537-562.

Sokal, R., J. Rohlf. 2003. Biometry. Ed. Freeman and company. 3a. ed. EUA. Pp. 476-486.

Stephenson A., S. Travers, J. Mena-Ali, J. Winsor. 2003. Pollen performance before and during the autotrophic-heterotrophic transition of pollen tube growth. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 358:1009-1018.

Torres, C. 2000. Pollen size evolution: correlation between pollen volume and pistil length in *Asteraceae*. *Sexual plant reproduction*. 12: 365-370.

Torres I., C. Lara, C. Castillo-Guevara. 2008. Antagonists and their effects in a hummingbird-plant interaction: field experiments. *Ecoscience*. 15(1): 65-72.

Trivers R. 2006. Parental investment and sexual selection. en Campbell B. (ed.). *Sexual selection and the descent of man*. Aldine pub. 2<sup>a</sup> ed. E.U.A. pp 136-179.

URL, Heike Vibrans (ed.), 2005, Malezas de México, 2008.

Villaseñor Ríos, J. L. y F. J. Espinosa García, 1998. Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México, D.F.

Walsh N., D. Charlesworth. 1992. Evolutionary interpretations of differences in pollen tube growth rates. *The Quarterly Review of Biology*. 67(1):19-37.

Willson, M. 1979. Sexual selection in plants. *The American Naturalist*. 113 (6): 777-790

Willson, M. 1994. Sexual selection in plants: perspectiva and overview. *The American Naturalist*. 144: S13-S39.

Yang C., Y. Guo. 2004. Pollen size-number trade-off and pollen-pistil relationships in *Pedicularis* (Orbanchaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 247: 177-185.