



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

INSTITUTO DE ECOLOGÍA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**EVOLUCIÓN DE LA MORFOLOGÍA FLORAL EN LA  
ESPECIE TRISTÍLICA *OXALIS ALPINA* EN LA REGIÓN  
DE LAS SKY ISLANDS DEL NOROESTE DE MÉXICO Y  
SUROESTE DE E.U.A.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS  
P R E S E N T A :

**PAULA SOSENSKI CORREA**

DIRECTOR DE TESIS:

DR. CÉSAR A. DOMÍNGUEZ PÉREZ-TEJADA

**2011**



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.

**A la memoria de mis padres**

**A la UNAM**

## Agradecimientos

Al Dr. César Domínguez, mi asesor, un profundo reconocimiento por la formación académica, el apoyo, la confianza y el afecto que me brindó durante estos años. Por enseñarme siempre a buscar, de una manera crítica, la esencia y los patrones importantes detrás de cada fenómeno o proceso que estudiamos. Al Dr. Juan Fornoni por su asesoría y disposición durante todo el desarrollo de la investigación. A los Drs. Francisco Molina y Gerardo Pérez, miembros de mi comité tutorial, por sus útiles aportaciones al proyecto.

A los Drs. Karina Boege, Francisco Molina-Freaner, Juan Núñez, Mark Olson y Víctor Parra-Tabla, miembros del jurado, cuyos comentarios y sugerencias me permitieron mejorar sustancialmente esta tesis. A los Drs. Diane Campbell y Luis Eguiarte por la lectura del manuscrito que ahora corresponde al segundo capítulo de esta tesis. A Mariano Ordano por enseñarme las aproximaciones estadísticas para estudiar la integración fenotípica.

A los Drs. Ann Sakai y Stephen G. Weller por otorgarme las facilidades necesarias para desarrollar parte de mi investigación en el Laboratorio de Biología Evolutiva y el invernadero de la Universidad de Irvine, California, Estados Unidos.

A César Domínguez, Juan Fornoni, Francisco Molina-Freaner, Rubén Pérez, Stephen Weller, Fernanda Baena, Lluvia Flores, Mariano Ordano, Adriana López y Jessica Pérez por su ayuda durante las temporadas de campo en las Sky Islands, que las recuerdo como períodos muy divertidos de convivencia y aprendizaje.

Al Mtro. Rubén Pérez por su apoyo técnico durante el desarrollo de la investigación. Al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la UNAM por la formación académica otorgada durante el doctorado y al Instituto de Ecología de la UNAM por albergarme como alumna. A CONACYT, DGEP y UC-MEXUS por el financiamiento.

A todos los compañeros del Laboratorio de Interacción Planta-Animal. En especial a: Fernanda Baena, Karla Bilbatúa, Lluvia Flores, Oscar Jiménez, Adriana López, Violeta Méndez, Mariano Ordano, Jessica Pérez, Rubén Pérez, Fernando Rosas, Betsabé Ruiz, Lislíe Solís y Nora Villamil por el intercambio académico que tuvimos, por su amistad, su solidaridad y por todos los buenos momentos que pasamos en ese espacio.

A Adriana, Betsa, Elsa, Enrique, Esther, Hernán, Lislíe, Lluvia y Nadia por todo lo que compartimos y por estar siempre tan cerquita. A mi abuela, mis tíos y toda mi familia uruguaya, los quiero. A Ana y Carlos por acogerme tan calurosamente en su familia. A Susi y Sebas porque siempre han estado ahí, estimulándome a finalizar este proyecto y a empezar otros nuevos. A Nico y María por la alegría infinita que trajeron a mi vida. A Jonás, mi motor, por su amor incondicional, por hacerme tan feliz y por su apoyo constante. A la memoria de mis padres, que siempre me acompañan y estarían muy contentos de verme concluir este ciclo.

## CONTENIDO

Introducción general.....	5
Capítulo 1. Sobre la tristilia, su disolución y la evolución de otros sistemas reproductivos.....	14
Capítulo 2. Cambios en la reciprocidad de los órganos sexuales y la integración fenotípica floral durante la transición tristilia-distilia en <i>Oxalis alpina</i> .....	44
Capítulo 3. Efecto de los atributos florales, de la densidad y de la frecuencia de los morfos sobre el éxito reproductivo de las plantas en tres poblaciones de <i>Oxalis alpina</i> que representan el gradiente tristilia-distilia.....	62
Discusión general.....	88
Apéndice .....	98

## Resumen general

El objetivo principal de esta investigación fue analizar la dinámica evolutiva que se establece durante la transición de la tristilia a la distilia. Al evaluar el patrón de variación en las frecuencias de los morfos florales en las poblaciones tristílicas y distílicas de varias especies, el capítulo 1 comprobó que la pérdida de la isopletería, así como de un morfo en las poblaciones es más común de lo que se pensaba. Los resultados mostraron, por ejemplo, que la disolución de la tristilia en *Oxalis alpina* en la sección *Ionoxalis* se caracteriza por un sesgo hacia el morfo largo en las poblaciones anisopléticas, y la pérdida del morfo intermedio en las poblaciones distílicas. La presencia de un patrón recurrente a favor o en contra del mismo morfo en las poblaciones, sugiere que la selección natural ha jugado un papel muy importante en la evolución de la distilia en esta especie. El capítulo 2 comprobó la hipótesis de que la pérdida del morfo intermedio en las poblaciones distílicas de *O. alpina* favorece un cambio en la posición de los órganos sexuales del morfo largo y corto que incrementa la eficiencia en la transferencia de polen en la nueva condición distílica. Este ajuste se relaciona con una reducción en el tamaño de la flor que podría ser el resultado de las restricciones impuestas por la matriz de varianza-covarianza fenotípica de la flor. Aunque el cambio en el fenotipo floral no afectó la magnitud de la integración floral, sí alteró el patrón de la integración, lo que sugiere que las relaciones alométricas, funcionales y pleiotrópicas entre los atributos florales se modificaron durante la transición tristilia-distilia. Por último, el capítulo 3 reveló un efecto de la selección fenotípica sobre los dos módulos florales (la posición de los órganos sexuales y el tamaño de la flor) de *O. alpina* en dos de las tres poblaciones naturales que representan la transición tristilia-distilia. La falta de un efecto significativo de la selección sobre los atributos florales en la población distílica sugiere que ésta podría estar ya muy cerca del pico adaptativo distílico. En contra de lo esperado, no hubo un efecto de la frecuencia ni de la densidad sobre el éxito reproductivo en ninguna de las tres poblaciones. Este resultado sugiere una revisión del diseño experimental para evaluar la relación entre ambas variables y el éxito reproductivo de las plantas en poblaciones naturales.

## Abstract

The aim of this study was to analyze the evolutionary dynamics established during the evolutionary transition from tristylous to distylous. In assessing the pattern of variation in the frequencies of floral morphs in tristylous and distylous populations of several species, Chapter 1 found that the loss of isoplethy as well as a morph in populations is more common than thought. The results showed, for example, that the breakdown of tristylous in *Oxalis alpina* in section *Ionoxalis* is characterized by a bias towards the long morph in anisoplethic populations and the loss of the mid morph in distylous populations. The presence of a consistent pattern in favor or against the same morph in populations, suggests that natural selection has played an important role in the evolution of distylous in this species. Chapter 2 tested the hypothesis that the loss of the mid morph in populations of *O. alpina* should promote a change in the position of sexual organs of long and short morphs that increases the efficiency of pollen transfer in new distylous condition. This adjustment is linked to a reduction in flower size that could be the result of restrictions imposed by the floral phenotypic variance-covariance matrix. Although the change in the floral phenotype did not affect the magnitude of floral integration, it altered the pattern of integration, suggesting that allometric, functional and pleiotropic relationships between floral attributes were modified during tristylous-distylous transition. Finally, Chapter 3 revealed an effect of phenotypic selection on two floral modules (the relative position of sexual organs and the size of the flower) in two out of three populations representing this evolutionary transition. The lack of a significant effect of selection on floral attributes in distylous population suggests that it is very close to the distylous adaptive peak. Contrary to expectations, there was no effect of frequency and density on reproductive success in any of the three populations. This result suggests a revision of appropriate experimental design to evaluate both variables in natural populations.

## Introducción general

Las plantas con flores presentan una amplia diversidad de sistemas reproductivos que involucran la expresión de un conjunto de caracteres morfológicos y fisiológicos que determinan el éxito reproductivo y los patrones de flujo génico dentro de las poblaciones (Barrett, 2010). Uno de los problemas que más ha preocupado a los biólogos evolucionistas ha sido tratar de entender el origen y mantenimiento de esta diversidad, que probablemente surgió como una solución a las dificultades que enfrentan las plantas para reproducirse exitosamente en distintos escenarios ecológicos (Barrett, 2010). Un ejemplo son los polimorfismos florales que ocurren cuando distintos tipos de flores (morfos) coexisten dentro de una población. Uno de los polimorfismos que más ha llamado la atención es la heterostilia, caracterizada por la presencia de dos (distilia) o tres morfos florales (tristilia) que difieren en la altura a la que se encuentran las anteras y los estilos (Lloyd y Webb, 1992). Este sistema reproductivo promueve el entrecruzamiento entre individuos a través de un sistema de incompatibilidad heteromórfico (presente en la mayoría de las especies heterostílicas) que sólo permite la producción de semillas a partir de las cruzas que ocurren entre los órganos sexuales del mismo nivel entre plantas de morfos distintos (*legítimas* según Darwin, 1877; un ejemplo de este tipo de cruzas en una población tristilica sería aquélla que ocurre entre las anteras intermedias de un morfo largo y el estilo de un morfo intermedio; Lloyd y Webb, 1992).

Los modelos teóricos han propuesto que las frecuencias de los tres morfos en las poblaciones tristílicas deberían ser iguales entre sí (a lo que se conoce como *isopletía*) si los flujos de polen son legítimos, el sistema de incompatibilidad funciona eficientemente y no existen diferencias en adecuación entre los morfos (Spieth, 1971; Charlesworth y Charlesworth, 1979; Heuch, 1979). Bajo este escenario podría considerarse a la tristilia como un *equilibrio evolutivamente estable*, el cual está regulado por selección dependiente de las frecuencias. Sin embargo, se ha demostrado que las frecuencias de los morfos en las poblaciones tristílicas de varias especies difieren de lo que se esperaría (pérdida de la isopletía) e incluso algunas



poblaciones han perdido uno (poblaciones distílicas) o dos morfos florales (poblaciones monostílicas). Aunque diversos estudios han evaluado las causas y los mecanismos evolutivos involucrados en la disolución de la tristilia a otros sistemas reproductivos (Morgan y Barrett, 1988; Eckert y Barrett, 1992; Eckert y Barrett, 1995; Eckert *et al.* 1996; Weller *et al.* 2007); son pocos los que han logrado integrar la información de distintas especies (que además es muy escasa) en un trabajo que permita una comprensión global de los patrones generales detrás de esta transición. El sesgo hacia un morfo en las poblaciones anisopléticas (donde las frecuencias de los morfos son desiguales) o la desaparición de un morfo en las poblaciones distílicas podrían explicarse como un efecto de la selección natural si de manera consistente el mismo morfo es seleccionado a favor o en contra en las poblaciones. En contraste, cuando no existe un patrón aparente en el morfo que se pierde o que se encuentra en mayor o menor frecuencia, entonces dicha variación podría interpretarse como el resultado de la deriva génica.

A partir de una revisión bibliográfica, el capítulo busca evaluar los siguientes objetivos: 1) describir las características de la tristilia, así como las condiciones que mantienen o rompen el equilibrio isoplético (i.e. condición en la cual la frecuencia de los tres morfos florales en una población es la misma); 2) Analizar el patrón de variación en las frecuencias de los morfos en poblaciones tristílicas y distílicas de diversas especies para determinar qué tan común es la pérdida de la isopletía o la evolución de la distilia por la pérdida de un morfo y; 3) Evaluar si el sesgo hacia un morfo particular en las poblaciones anisopléticas (tristílicas y distílicas) o la pérdida de un morfo en las poblaciones distílicas es el resultado de la selección natural o de la deriva génica. El análisis de esta información podría ayudar a entender los procesos evolutivos implicados en la disolución de la tristilia.

El éxito en el apareamiento de las especies tristílicas depende de la interacción entre los tres morfos florales. Por lo tanto, se esperaría que un escenario de transición de un sistema reproductivo a otro, como lo es la evolución de la tristilia a la distilia a través de la pérdida de un morfo, debería involucrar un cambio en las presiones selectivas que operan sobre el fenotipo

floral. En ese sentido, la alta labilidad evolutiva (i.e., poca estabilidad) de la tristilia la convierte en un buen modelo para evaluar hipótesis adaptativas sobre los caracteres florales. Durante mucho tiempo, la mayoría de los estudios sobre la evolución de la morfología floral, no sólo en especies con polimorfismos florales sino en las angiospermas en general, se centró principalmente en la descripción de los patrones de variación en los caracteres florales. Esta visión supone que la selección actúa de manera independiente sobre cada uno de los atributos de la flor (*selección univariada*). Sin embargo, aunque no se puede negar la importancia de este enfoque para abordar un gran número de preguntas, resulta difícil pensar en un organismo cuyos atributos no se encuentren asociados entre sí (Steppan *et al.* 2002; Armbruster *et al.* 2004). En ese sentido, la evidencia demuestra que la selección fenotípica también opera sobre caracteres correlacionados (*selección multivariada*, Lande y Arnold, 1983; Roff, 1997; Conner, 2002; Conner, 2009).

Las flores, por ejemplo, son estructuras compuestas por varios atributos que se asocian entre sí para llevar a cabo una función: la reproducción de la planta. Por lo tanto, la selección debería favorecer la evolución de aquellas combinaciones de atributos que maximicen la eficiencia en la atracción de los polinizadores y en la transferencia de polen. Esto significa que la evolución del fenotipo floral no sólo depende del cambio en el valor fenotípico promedio de caracteres particulares, sino también del efecto de las correlaciones entre ellos (Conner y Via, 1993; Armbruster y Schwaegerle, 1996; Conner, 2002). De hecho, en las últimas décadas ha surgido una preocupación importante por estudiar el papel de la *magnitud* y el *patrón* de las correlaciones entre los atributos de la flor (*integración fenotípica floral*) sobre la trayectoria evolutiva del fenotipo floral (Herrera, 2001; Herrera *et al.* 2002; Armbruster *et al.* 2004; Anderson y Busch, 2006; Ordano *et al.* 2008; Sosenski *et al.* 2010). Dependiendo de su magnitud, la integración fenotípica de las flores podría facilitar o restringir la evolución por selección natural, según la respuesta del fenotipo floral a los cambios en las presiones selectivas

ejercidas por los polinizadores u otros vectores de polen (el viento y el agua), así como por otros interactores bióticos (e.g. antagonistas, Strauss y Whittall, 2006; Ashman y Penet, 2007).

Uno de los principales aportes del presente trabajo es que analiza a través de una perspectiva multivariada la evolución del fenotipo floral de *Oxalis alpina* (Oxalidaceae), una especie tristílica con una amplia variación en las frecuencias de los tres morfos en las poblaciones que van desde la condición ancestral tristílica hasta la distílica. Las poblaciones de *O. alpina* que crecían en el noroeste de México y suroeste de Estados Unidos tenían una distribución continua que se fragmentó como consecuencia de los cambios climáticos ocurridos al final del Pleistoceno, provocando su aislamiento y probable evolución independiente hace aproximadamente 10,000 años. Actualmente, las poblaciones se encuentran restringidas a las partes altas de las montañas, las cuales están separadas por desiertos de baja elevación (a lo que se conoce como Sky Islands). Las características de *O. alpina* en esta zona la convierten en un modelo de estudio único para desarrollar un experimento natural enfocado en entender los procesos involucrados en la transición de la tristilia a la distilia.

Aunque no se cuenta con mucha información sobre la evolución de la tristilia en la familia Oxalidaceae, se sabe que la tristilia y la distilia están representadas en tres géneros: *Averrhoa*, *Biophytum* y *Oxalis* que el más grande de la familia con alrededor de 500 especies distribuidas entre el Viejo y el Nuevo Mundo (Weller, 1992). Probablemente, las especies más estudiadas de este género en un contexto evolutivo son las que se encuentran en la sección *Ionoxalis* que va desde Panamá y las Antillas hasta la parte este de Estados Unidos. La evidencia citogeográfica indica que las especies tristílicas de esta zona son diploides mientras que las distílicas son poliploides y muy variables, lo cual apoya la hipótesis de que la distilia es la condición derivada (Weller y Denton, 1976). El número cromosómico de *O. alpina* varía geográficamente, pero en la región de las Sky Islands, las poblaciones que han sido muestreadas son tetraploides lo que sugiere que son monofiléticas (Pérez-Alquicira *et al.* 2010).

Estudios previos demostraron que la evolución de la distilia en *O. alpina* está asociada con la pérdida del morfo intermedio y la modificación en el sistema de incompatibilidad (Weller *et al.* 2007). Por lo tanto, si la tristilia es un sistema reproductivo cuya eficiencia depende del apareamiento entre los tres morfos florales, entonces la pérdida del morfo intermedio y con éste, del estigma receptor del polen de los estambres intermedios de los morfos largo y corto, debería favorecer un reajuste en la posición de los órganos sexuales de estos morfos que incrementara la transferencia recíproca de polen entre ambos. En otras palabras, se esperaría que durante la evolución de la distilia, la selección natural modificara el fenotipo floral optimizando la donación y recepción de polen en la nueva condición dimórfica. De cumplirse esta predicción, y considerando que los caracteres florales se encuentran correlacionados entre sí, es probable que el ajuste en la morfología floral como consecuencia de la modificación en la incompatibilidad no sólo involucre a los órganos sexuales, sino también a otros atributos de la flor. Esto sugiere que las presiones de selección que incrementan la reciprocidad entre los dos morfos, deberían actuar sobre la estructura de varianza-covarianza que subyace a la morfología floral. En otras palabras, se esperaría encontrar un cambio en la magnitud y el patrón de integración floral durante la evolución de la distilia. Considerando la predicción anterior, los objetivos del capítulo 2 son: 1) Describir la variación en la morfología floral entre los morfos y las poblaciones que representan la transición tristilia-distilia; 2) Evaluar si la variación en la morfología floral se ajusta con la predicción de un incremento en la reciprocidad entre las plantas del morfo largo y corto asociado con cambios en la posición de los órganos sexuales y; por último, 3) Analizar cómo estos cambios afectan la magnitud y el patrón de integración floral durante la transición tristilia-distilia.

En las especies que presentan polimorfismos, como son las heterostílicas, el éxito reproductivo de las plantas no sólo es el resultado de las presiones ejercidas por los polinizadores sobre la morfología floral, sino también de cómo la densidad de individuos y las frecuencias de los morfos influyen sobre los patrones de apareamiento (Bennington y Stratton, 1998; Castillo *et al.* 2002; Stehlik *et al.* 2006; Gunton y Kunin, 2009). Por lo tanto, la variación

en estos parámetros podría alterar el mantenimiento del polimorfismo. Esto supone que la evolución de la distilia a partir de la tristilia en *O. alpina* debería generar presiones selectivas diferenciales entre las poblaciones que representan esta transición. Por un lado, se esperaría que el efecto de la selección natural sobre los atributos florales fuera más intensa en las poblaciones que representan los puntos intermedios de la transición tristilia-distilia, pues el fenotipo floral de las poblaciones que se encuentran en los extremos, como sería una tristílica isoplética sin modificaciones en la incompatibilidad o una distílica completamente modificada, debería presentar un ajuste muy preciso entre los órganos sexuales de los tres o dos morfos florales que incrementa la eficiencia en la transferencia de polen.

Se ha demostrado que una alta densidad de plantas y flores puede funcionar como un facilitador que incrementa la atracción de un parche y con ello, la frecuencia de visitas (Klinkhamer y de Jong, 1990; Knight, 2003; Hodgins y Barrett, 2008). Sin embargo, este escenario también podría favorecer la competencia por polinizadores. Esto sugiere que la selección debería favorecer un valor de densidad óptimo que incremente la atracción de los polinizadores y al mismo tiempo, reduzca la competencia por éstos. En otras palabras, se esperaría encontrar un efecto balanceador de la selección natural sobre la densidad (O'Neil, 1997). Otra de las predicciones es que si la tristilia es un polimorfismo que promueve el entrecruzamiento entre plantas de distinto morfo, se esperaría detectar un efecto de la selección negativa dependiente de la frecuencia (Thompson *et al.* 2003; Barrett *et al.* 2004; Hodgins y Barrett, 2008). Es decir, el éxito reproductivo de las plantas de un morfo particular debería ser alto cuando su frecuencia es baja, pues eso incrementaría su probabilidad de conseguir parejas de un morfo distinto al suyo.

A través de un análisis de selección, el capítulo 3 tiene como objetivo general evaluar el régimen selectivo que se establece en tres poblaciones naturales de esta especie que representan el gradiente tristilia-distilia (caracterizado por la pérdida del morfo intermedio y la modificación del sistema de incompatibilidad). Para ello se plantearon dos objetivos particulares: 1) Evaluar el

efecto de la morfología floral sobre el éxito reproductivo y; 2) Evaluar el efecto de la densidad y la frecuencia sobre el éxito reproductivo de las plantas. En este sentido, uno de los aportes más novedosos de esta investigación es que constituye el primer esfuerzo que se ha llevado a cabo por analizar el efecto conjunto de la morfología floral, la densidad y la frecuencia sobre el éxito reproductivo de los individuos en una especie tristílica que se encuentra en transición evolutiva a la distilia.

En la parte final del trabajo se incluye un apéndice de un estudio experimental que evalúa la mediación femenina y masculina de las modificaciones en la incompatibilidad durante la transición tristilia-distilia en *O. alpina*.

#### Literatura citada

- Anderson I.A. y Busch J.W. 2008. Relaxed pollinator-mediated selection weakens floral integration in self-compatible taxa of *Leavenworthia* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **93**: 860-867.
- Armbruster W.S. y Schwaegerle K.E. 1996. Causes of covariation of phenotypic traits among populations. *Journal of Evolutionary Biology* **9**: 261-276.
- Armbruster W.S., Pélabon C., Hansen T.F. y Mulder C.P.H. 2004. Floral integration, modularity, and accuracy: Distinguishing complex adaptations from genetic constraints. En: Pigliucci M. y Preston K. Eds. *Phenotypic integration. Studying the ecology and evolution of complex phenotypes*, pp. 23-49. Oxford University Press, Oxford.
- Ashman T-L. y Penet L 2007. Direct and indirect effects of a sex-biased antagonist on male and female fertility: consequences for reproductive trait evolution in a gender dimorphic plant. *The American Naturalist* **169**:595-608.
- Barrett S.C.H. 2010. Understanding plant sexual diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 2010 **365**, 99-109.

- Bennington C.C. y Stratton D.A. 1998. Field tests of density- and frequency-dependent selection in *Erigeron annuus* (Compositae). *American Journal of Botany* **85**: 540-545.
- Castillo 2002. Castillo R.A., Cordero C. y Domínguez C.A. 2002. Are reward polymorphisms subject to frequency- and density-dependent selection? Evidence from a monoecious species pollinated by deceit. *Journal of Evolutionary Biology* **15**: 544-552.
- Charlesworth B. y Charlesworth D. 1979. The maintenance and breakdown of distyly. *American Naturalist* **114**: 499-513.
- Conner J.K. y Via S. 1993 Patterns of phenotypic and genetic correlations among morphological and life-history traits in wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Evolution* **47**: 704-711.
- Conner J.K. 2002. Genetic mechanisms of floral trait correlations in a natural population. *Nature* **420**: 407-410.
- Conner J.K. 2009. Ecological genetics of floral evolution. En: Harder L.D. y Barrett S.C.H. Eds. *Ecology and evolution of flowers*, pp. 260-277. Oxford University Press, Oxford.
- Darwin C. 1877. *The different forms of flowers on plants of the same species*. John Murray. London.
- Eckert C.E. y Barrett S.C.H. 1992. Stochastic loss of style morphs from populations of tristylous *Lythrum salicaria* and *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Evolution* **46**: 1014-1029.
- Eckert C.E. y Barrett S.C.H. 1995. Style morph ratios in tristylous *Decodon verticillatus* (Lythraceae): selection versus historical contingency. *Ecology* **76**: 1051-1066.
- Eckert C.E., Manicacci D. y Barrett S.C.H. 1996. Genetic drift and founder effect in native versus introduced populations of an invading plant, *Lythrum salicaria* (Lythraceae). *Evolution* **50**: 1523-1530.
- Gunton R.M. y Kunin W.E. 2009. Density-dependence at multiple scales in experimental and natural plant populations. *Journal of Ecology* **97**: 567-580.
- Herrera C.M. 2001. Deconstructing a floral phenotype: do pollinators select for corolla integration in *Lavandula latifolia*? *Journal of Evolutionary Biology* **14**: 574-584.

- Herrera C.M., Cerdá X., García M.B. Guitián J., Medrano M., Rey P.J., y Sánchez-Lafuente A.M. 2002. Floral integration, phenotypic covariance structure and pollinator variation in bumblebee-pollinated *Helleborus foetidus*. *Journal of Evolutionary Biology* **15**: 108-121.
- Heuch I. 1979. The effect of partial self-fertilization on type frequencies in heterostylous plants. *Annals of Botany* **44**: 611-616.
- Klinkhamer P.G.L. y de Jong T.J. 1990. Effects of plant size, plant density and sex differential nectar reward on pollinator visitation in the protandrous *Echium vulgare* (Boraginaceae). *Oikos* **57**: 399-405.
- Knight T.M. 2003. Floral density, pollen limitation, and reproductive success in *Trillium grandiflorum*. *Oecologia* **442**: 557-563.
- Lande R. y Arnold S.J. 1983. The measurement of selection on correlated characters. *Evolution* **37**: 1210-1226.
- Lloyd D.G. y Webb C.J. 1992. The evolution of heterostyly. En: Barrett S.C.H. Ed. *Evolution and Function of heterostyly*, pp. 151-178. Springer-Verlag, Berlín.
- Morgan M.T. y Barrett S.C.H. 1988. Historical factors and anisoplethic population structure in tristylous *Pontederia cordata*: a reassessment. *Evolution* **42**: 496-504.
- O'Neil P. 1997. Natural selection on genetically correlated phenological characters in *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae). *Evolution* **51**: 267-274.
- Ordano M., Fornoni J., Boege K. y Domínguez C.A. 2008. The adaptive value of phenotypic floral integration. *New Phytologist* **179**: 1183-1192.
- Pérez-Alquicira J., Molina-Freaner F.E., Piñero D., Weller S.G., Martínez-Meyer E., Rozas J. y Domínguez C.A. 2010. The role of historical factors and natural selection in the evolution of breeding systems of *Oxalis alpina* in the Sonoran desert "Sky Islands". *Journal of Evolutionary Biology* **23**: 2163-2175.
- Roff D. 1997. *Evolutionary quantitative genetics*. Chapman and Hall, New York.



- Spieth P.T. 1971. A necessary condition for equilibrium in systems exhibiting self-incompatibility mating. *Theoretical Population Biology* **2**: 404-418.
- Stehlik I., Caspersen J.P. y Barrett S.C.H. 2006. Spatial ecology of mating success in a sexually polymorphic plant. *Proceedings of the Royal Society B* **273**: 387-394.
- Steppan S.J., Phillips P.C. y Houle, D. 2002. Comparative quantitative genetics: Evolution of the G-matrix. *Trends in Ecology and Evolution* **17**: 320-327.
- Strauss S. y Whithall J.B. 2006. Non-pollinator agents of selection on floral traits. En: Harder L.D. y Barrett S.C.H. Eds. *The Ecology and Evolution of Flowers*, pp. 120-138, Oxford University Press.
- Thompson J.D., Barrett S.C.H. y Baker A.M. 2003. Frequency-dependent variation in reproductive success in *Narcissus*: implications for the maintenance of stigma-height dimorphism. *Proceedings of the Royal Society of London B* **270**: 949-953.
- Weller S. G. y Denton M.F. 1976. Cytogeographic evidence for the evolution of distyly from tristily in the north American species of *Oxalis* section *Ionoxalis*. *American Journal of Botany* **63**: 120-125.
- Weller S.G. 1992. Evolutionary modifications of tristylous breeding systems. En: Barrett S.C.H. Ed. *Evolution and Function of heterostyly*, pp. 247-270, Springer-Verlag. Berlín.
- Weller S.G., Domínguez C.A., Molina-Freaner F.E., Fornoni J. y LeBuhn G. 2007. The evolution of distyly from tristily in populations of *Oxalis alpina* (Oxalidaceae) in the Sky Islands of the Sonoran Desert. *American Journal of Botany* **94**: 972-985.

## **Capítulo 1**

### **Sobre la tristilia, su disolución y la evolución de otros sistemas reproductivos**

## Resumen

La tristilia es un polimorfismo floral, reportado sólo en seis familias de angiospermas, caracterizado por presentar tres morfos que difieren en la altura de los órganos sexuales. El mantenimiento del equilibrio en las frecuencias de los tres morfos en las poblaciones tristílicas es regulado por la selección dependiente de las frecuencias que opera a través de los flujos de polen legítimos, del sistema de incompatibilidad y de la ausencia de diferencias en adecuación entre los morfos. Aunque teóricamente se ha considerado a la tristilia como un polimorfismo evolutivamente estable, en repetidas ocasiones se ha demostrado que su disolución a otros sistemas reproductivos es muy común. La evidencia aportada por diversos estudios demuestra la presencia de poblaciones distílicas y monostílicas en especies tristílicas. A partir de una extensa revisión bibliográfica, este trabajo describe las principales características de la tristilia, así como las causas que favorecen o limitan su mantenimiento en las poblaciones. Además, analiza y discute el patrón de variación en las frecuencias de los morfos en las poblaciones de varias especies tristílicas, que en términos generales parece involucrar la pérdida de la isopletería. La disolución de la tristilia en *Narcissus triandrus* y *Oxalis alpina* está asociada con un sesgo hacia el morfo largo en las poblaciones anisopléticas y la pérdida del morfo intermedio en las poblaciones distílicas. Aunque las poblaciones anisopléticas de *L. salicaria* también presentan un exceso de plantas del morfo largo, el que se pierde comúnmente es el corto. En *P. cordata*, en cambio, las poblaciones anisopléticas muestran un sesgo hacia el morfo corto y un déficit de individuos del morfo largo. Estos resultados sugieren que la selección natural ha jugado un papel muy importante en la disolución de la tristilia en estas especies. En contraste, la falta de un patrón determinado en la variación de las frecuencias de los morfos en las poblaciones de *D. verticillatus* señala a la deriva génica como el mecanismo que podría explicar la variación encontrada. Sin embargo, ambas conclusiones quedan a reserva de muestrear las frecuencias de los morfos en un mayor número de poblaciones y especies.

## Capítulo 1

### **Sobre la tristilia, su disolución y la evolución de otros sistemas reproductivos.**

Debido a su complejidad, la tristilia es uno de los polimorfismos florales que más ha llamado la atención de los biólogos evolucionistas (Darwin, 1877; Vuilleumier, 1965). La precisa organización de los órganos sexuales en las flores de las especies tristílicas, así como su estrecha interacción con los polinizadores, las han convertido en un modelo ideal para evaluar hipótesis adaptativas y ecológicas sobre la función de los caracteres florales. Este polimorfismo presenta, además, una gran labilidad evolutiva que ha servido de base para estudiar tanto los cambios fenotípicos de las plantas en las poblaciones, como los mecanismos y patrones implicados en la transición de un sistema reproductivo a otro(s) (Ganders, 1979; Barrett, 1992, 1993; Richards, 1997; Leach y Mayo, 2005; Sosenski *et al.* 2010).

La tristilia es un sistema reproductivo caracterizado por la presencia de tres morfos que difieren recíprocamente en la altura a la que se encuentran las anteras y el estigma dentro de la flor (*hercogamia recíproca*; Lloyd y Webb, 1992). El morfo corto (*S*) presenta el estilo por debajo de dos niveles de estambres, intermedios (*mS*) y largos (*lS*). El morfo intermedio (*M*) tiene el estilo entre un nivel de estambres cortos (*sM*) y otros largos (*lM*), mientras que el estilo del morfo largo (*L*) se encuentra por encima de un nivel de estambres cortos (*sL*) y otros intermedios (*mL*) (Fig. 1). La mayoría de las especies tristílicas cuentan con un sistema de incompatibilidad heteromórfico esporofítico (Glover y Barrett, 1983) que sólo permite la producción de semillas a partir de las cruzas que ocurren entre el polen de los estambres y los estilos del mismo nivel, entre morfos distintos (*legítimas* según Darwin, 1877; por ejemplo la que ocurre entre el polen de las anteras largas del morfo corto y el estigma del morfo largo,  $lS \times L$ , Fig. 1). Además de la hercogamia recíproca y del sistema de incompatibilidad, la tristilia involucra la expresión de características morfológicas que difieren entre morfos y refuerzan el mantenimiento del polimorfismo en las poblaciones. Entre ellas se encuentran el número,

tamaño y ornamentación de los granos de polen, así como el tamaño de las papilas estigmáticas y de las células que las conforman (Dulberger, 1992).

### *Genética de la tristilia*

Aunque se desconocen los mecanismos moleculares que regulan la expresión de este polimorfismo floral, se ha especulado que en la mayoría de las especies los patrones de segregación se ajustan a un modelo de dos loci, *S* y *M*, cada uno con dos alelos, *S*, *s* y *M*, *m*, donde *S* es dominante sobre *s* y epistático sobre *M* (Weller, 1976; Morgan y Barrett, 1988; Barrett, 1993). Se ha propuesto que ambos loci se comportan como un *supergen*, es decir, un grupo de genes que se ubican juntos en una región del cromosoma con poca probabilidad de recombinación y por lo tanto, se heredan como una unidad (Charlesworth, 1979; Lewis y Jones, 1992; Richards y Barrett, 1992). En algunas especies tristílicas como *Lythrum salicaria*, *Eichornia crassipes* y *Eichornia paniculata* se ha reportado la presencia de individuos semihomostílicos (con un cambio en la posición de un solo nivel de estambres) que podrían ser el resultado de una mutación en los loci *S* y *M* (Barrett y Shore, 2008). Alternativamente a la hipótesis del supergen, Charlesworth (1979) propuso un efecto pleiotrópico de los loci *S* y *M* sobre la expresión de algunos caracteres involucrados en el polimorfismo, aunque no ha sido probado.

El modelo del control genético de la tristilia más aceptado fue propuesto inicialmente por von Ubisch (1921, en Lewis y Jones, 1992) y Barlow (1923), y ha sido probado en las siguientes especies: *Decodon verticillatus*, *L. salicaria*, *Oxalis alpina*, *Oxalis articulata*, *Oxalis boweii*, *Oxalis compressa*, *Oxalis hirta*, *Oxalis physocalyx*, *Oxalis priceae*, *Oxalis roseae*, *Oxalis tragapoda*, *Oxalis tuberosa*, *Oxalis valdiviensis*, *E. crassipes*, *E. paniculata* y *Pontederia cordata* (Barlow, 1923; von Ubisch, 1926 en Lewis y Jones, 1992; Fisher y Mather, 1943; Fyfe 1950, 1956 en Lewis y Jones, 1992; Mulcahy, 1964; Weller, 1976; Leach, 1983; Barrett *et al.* 1989; Pacheco y Coleman, 1989; Eckert y Barrett, 1993; Trognitz y Hermann, 2001; Ren *et al.*

2005; Gettys y Wofford, 2008). Esto ha sido posible debido al empleo de cruzas controladas que permiten identificar el patrón de segregación. En la mayoría de las especies, las plantas del morfo corto presentan el alelo dominante *S* y tienen tres genotipos posibles: *SsMM*, *SsMm*, *Ssmm*; mientras que las del morfo intermedio son homocígas recesivas para el locus *S*, portan el alelo *M* y tienen dos genotipos: *ssMM* y *ssMm*. Los individuos del morfo largo, por su parte, expresan un sólo genotipo recesivo para ambos loci: *ssmm* (Lewis y Jones, 1992; Barrett, 1993; Richards, 1997; Leach y Mayo, 2005). En el caso particular de *O. articulata* y *O. rosea* se reportó que el morfo corto era recesivo (Fyfe, 1956 en Lewis y Jones, 1992; von Ubisch, 1926 en Lewis y Jones, 1992). Una modificación en las reacciones de incompatibilidad podría generar la aparición de un nuevo genotipo del morfo corto, lo que explicaría la presencia, en raras ocasiones, de tres genotipos adicionales (inviabiles) que son homocígos dominantes para el locus *S*, *SSMM*, *SSMm*, *SSmm*.

Como se explicó en la sección anterior, el modelo de dos loci dialélicos ha permitido explicar la herencia de la tristilia en muchas especies, sin embargo, existen excepciones. Por ejemplo, en *L. salicaria* la herencia es tetrasómica, es decir, está determinada por los loci *S* y *M*, pero con cuatro alelos cada uno. El morfo largo es doble homocígo recesivo *ssssmmmm* (*s<sub>4</sub>m<sub>4</sub>*), mientras que el morfo intermedio tiene al menos un alelo *M* y expresa los genotipos: *s<sub>4</sub>Mm<sub>3</sub>*, *s<sub>4</sub>M<sub>2</sub>m<sub>2</sub>*, *s<sub>4</sub>M<sub>3</sub>m* o *s<sub>4</sub>M<sub>4</sub>*. Para el caso del morfo corto existen 10 posibles genotipos (Heuch, 1980). El tipo de segregación en esta especie es un claro ejemplo de poliploidía con doble reducción, donde los dos genes de un locus dado en el gameto diploide pueden ser copias del mismo gen en un padre tetraploide (Heuch, 1980; Heuch y Lie, 1985; Barrett, 1993; Leach y Mayo, 2005). Varias especies tristílicas de *Oxalis* también son poliploides (Weller, 1976; Heuch y Lie, 1985). En el caso de *O. rosea* se propuso un modelo de tres loci dialélicos (*S*, *M*, *A*) que explica la segregación de 27 posibles genotipos, 7 para el morfo largo, 14 para el morfo intermedio y 6 para el morfo corto (Bennett *et al.* 1986; Barrett, 1993). El modelo que explica la herencia de *O. compressa* considera los loci *S* y *M*, pero en este caso el *S* es trialélico y se incorpora la acción de

un gen modificador (Leach, 1983). Otra excepción es que en *D. verticillatus*, *L. salicaria* (del género *Lythrum*) (Eckert y Barrett, 1993) y algunas especies de *Oxalis*, los genes *S* y *M* no están ligados (Leach, 1983; Richards, 1997).

### *Distribución y origen de la tristilia*

La tristilia es un polimorfismo floral poco común en la naturaleza. Originalmente y durante mucho tiempo se consideró como tristílicas solamente a tres familias de angiospermas, dos dicotiledóneas: Lythraceae (géneros *Decodon*, *Lythrum* y *Nesaea*) y Oxalidaceae (*Oxalis*, *Biophytum*, *Averrhoa*); y una monocotiledónea: Pontederiaceae (*Eichhornia* y *Pontederia*) (Ganders, 1979). La inclusión de estas familias dentro de la tristilia se basó en la presencia de dos características: la hercogamia recíproca y el sistema de incompatibilidad heteromórfico. Posteriormente, después de una gran controversia sobre si las especies autocompatibles con un polimorfismo en los estilos y los estambres (condición que no implica hercogamia recíproca) debían ser consideradas como tristílicas, se incluyó en esta categoría a las familias: Amaryllidaceae (*Narcissus*) (Lloyd *et al.* 1990; Barrett *et al.* 1997; Arroyo, 2002), Connaraceae (*Agelaea*) y Linaceae (*Hugonia*) (Lloyd *et al.* 1990; Thompson *et al.* 1996).

Debido a que las cinco familias mencionadas anteriormente no se encuentran relacionadas filogenéticamente, se piensa que el origen de la tristilia es polifilético (Ganders, 1979; Weller, 1992; Barrett, 1993). Sin embargo, hasta el momento se desconoce cuál pudo ser la condición ancestral de las especies tristílicas y si es la misma para todas (Barrett, 1993). De hecho, la única hipótesis que se ha planteado sobre las características del supuesto ancestro considera que éste debió ser autocompatible con un estilo largo por encima de un nivel de estambres cortos y otros intermedios, es decir, similar al morfo largo de las poblaciones tristílicas actuales (Charlesworth, 1979). Esta propuesta supone que la tristilia evolucionó de un ancestro monostílico a través de una condición distílica intermedia con sólo dos morfos, largo y corto, donde el morfo intermedio fue el último en establecerse. Existen dos argumentos que

apoyan esta idea. Por un lado, entre las angiospermas es más común encontrar flores con los estilos por encima de las anteras que la condición inversa, y por otro lado, es casi imposible hallar un fenotipo parecido al morfo intermedio que no esté relacionado con la tristilia (Charlesworth, 1979; Barrett, 1993). Aunque ambas explicaciones parecen convincentes, una lectura cuidadosa de la hipótesis de Charlesworth no hace más que exponer la ausencia de un modelo que incorpore los mecanismos involucrados en el origen y evolución de los tres morfos florales.

Otro de los grandes retos en torno al estudio de la evolución de la tristilia ha sido tratar de determinar su ruta evolutiva. El hallazgo de poblaciones distílicas y monostílicas en varias especies tristílicas de los géneros *Lythrum*, *Narcissus*, *Oxalis* y *Pontederia* sugiere que éstas se originaron de la tristilia por la pérdida de uno o dos morfos florales (Ornduff, 1972; Barrett, 1992; Weller, 1992; Barrett, 1993). Se han planteado dos explicaciones al respecto. Una de las características morfológicas de las flores en las poblaciones tristílicas es que poseen dos niveles de estambres, los cuales están implicados en las cruces legítimas entre los tres morfos. La presencia del mismo carácter en las poblaciones distílicas haría suponer que estas provienen de un ancestro tristílico (Yeo, 1975). Por otro lado, al analizar el número cromosómico en 18 especies de *Oxalis* de la sección *Ionoxalis*, Weller y Denton (1976) encontraron que la mayoría de las especies tristílicas eran diploides y las distílicas, poliploides. Esto sugiere que en dicho género la distilia evolucionó a partir de la tristilia bajo la premisa de que la poliploidía es una condición propia de los estados derivados (Stebbins, 1980). Aunque ambos argumentos sostienen que las poblaciones distílicas y monostílicas se originaron a partir de las tristílicas, todavía no se cuenta con suficiente evidencia empírica de estudios comparativos que permita determinar con precisión la ruta evolutiva de este polimorfismo. Sin embargo, se considera poco parsimonioso que la tristilia se hubiera originado *de novo* a partir de una condición distílica o monostílica (Omland, 1999; Graham y Barrett, 2004).



### *El mantenimiento y la disolución de la tristilia*

La explicación más aceptada sobre el significado adaptativo y funcional de la tristilia es que promueve el entrecruzamiento entre individuos de distintos morfos (Darwin, 1877; Kohn y Barrett, 1992). Esto requiere de un ajuste muy preciso entre la morfología de la flor y la de los polinizadores. Así, las cruas legítimas ocurren cuando el polen de los distintos niveles de estambres de una flor se pega a partes específicas del cuerpo del insecto, las mismas que luego contactan el estigma legítimo de la nueva flor a la que el polinizador transfiere el polen (Darwin, 1877; Wolfe y Barrett, 1987).

El entrecruzamiento que ocurre entre los morfos florales en las poblaciones tristílicas opera a través del sistema de incompatibilidad y del flujo legítimo de polen, lo que genera la ausencia de diferencias en adecuación entre los morfos y mantiene sus frecuencias en el equilibrio (Spieth, 1971; Charlesworth y Charlesworth, 1979; Heuch, 1979). Bajo este escenario, la tristilia es un polimorfismo evolutivamente estable. Sin embargo, varios estudios han reportado que las frecuencias de los morfos en las poblaciones de varias especies tristílicas difieren significativamente de lo que se esperaría, es decir, se desvían de la isopletía (i.e. cuando las frecuencias de los morfos en una población son iguales; Morgan y Barrett, 1988; Eckert y Barrett, 1992, 1995; Ågren, 1996; Eckert *et al.* 1996). Esto puede significar una representación desigual de los morfos en las poblaciones (i.e. anisopléticas) o en muchos casos, la pérdida de uno o dos morfos como ocurre en las poblaciones distílicas y monostílicas (Ornduff, 1972; Weller, 1992).

La variación en la frecuencia de los morfos en las poblaciones de especies tristílicas puede deberse a diversas causas. Algunos estudios señalan que los eventos históricos como el efecto fundador (Morgan y Barrett, 1988) y los procesos estocásticos como los cuellos de botella y la deriva génica podrían determinar de manera importante la estructura de la población (Eckert y Barrett, 1992; Husband y Barrett, 1992; Eckert y Barrett, 1995; Eckert *et al.* 1996; Pérez-Alquicira *et al.* 2010). Se piensa que el efecto fundador desempeñó un papel fundamental

durante los eventos de colonización que, asociados a la propagación clonal o la autofecundación determinaron la fijación de ciertos alelos y morfos en las poblaciones de algunas especies tristílicas (Ornduff, 1993; Hodgins y Barrett, 2008). Por su parte, los cuellos de botella ocurridos durante la invasión de nuevos ambientes, así como los cambios en el tamaño poblacional podrían explicar la pérdida de determinados alelos por deriva génica (Eckert y Barrett, 1992).

La falta de evidencia que apoye las hipótesis basadas en procesos estocásticos supone que la selección natural podría tener un efecto muy importante (Eckert y Barrett, 1995). Por ejemplo, si los polinizadores discriminan entre morfos, la selección favorecería a las plantas del morfo más visitado. Por otro lado, si las plantas de un morfo produjeran semillas a partir de la autopolinización, como consecuencia de la modificación o la pérdida de la incompatibilidad, su progenie podría padecer los efectos negativos de la depresión endogámica. Esta condición podría romper el equilibrio isoplético si hubiera una reducción en la frecuencia del morfo que se autopoliniza (Weller, 1981; Price y Barrett, 1982; Morgan y Barrett, 1988; Anderson, 1994; Weller *et al.* 2007).

La presencia de anisopletería o la pérdida de un morfo también podría ser el resultado de una alteración en los patrones de flujo de polen. Si la transferencia de polen no es simétrica, uno de los morfos podría presentar limitación por polen y producir menos semillas que los otros (Eckert y Barrett, 1995). Esto podría estar relacionado con un cambio en el tipo y/o abundancia de los polinizadores, en su comportamiento de forrajeo, o bien, ser un efecto del patrón de cofloración que afecta diferencialmente el éxito reproductivo (Bell *et al.* 2005; Mitchell *et al.* 2009; Liao *et al.* 2011). En este contexto, la modificación en el sistema de incompatibilidad asociada a flujos de polen parcialmente preferenciales podría afectar la propagación de uno de los alelos que determinan la expresión de un morfo, lo cual explicaría su desaparición (Weller *et al.* 2007). Alternativamente, la modificación en los flujos simétricos de polen podría ser una consecuencia de cambios en la posición de los órganos sexuales (Barrett, 1985; Barrett y Hodgins, 2006; Barrett y Shore, 2008) o de la extinción de un polinizador.

A través del análisis de la variación en las frecuencias de los morfos reportadas en las poblaciones tristílicas de varias especies, este capítulo tiene como objetivos: 1) revisar la frecuencia de poblaciones tristílicas, distílicas y monostílicas en cada especie; 2) determinar la frecuencia de poblaciones isopléticas y anisopléticas y; 3) poner a prueba las siguientes hipótesis: si las poblaciones tristílicas anisopléticas de una especie están sesgadas hacia el mismo morfo y las poblaciones distílicas presentan un patrón recurrente en el morfo que se pierde, entonces la variación en las frecuencias de los morfos podría explicarse como el resultado de la *selección natural*, pero si el sesgo hacia un morfo en las poblaciones anisopléticas o la pérdida de un morfo en las poblaciones distílicas no responden a un patrón determinado, entonces podrían ser explicados por *deriva génica*.

## Materiales y métodos

### *Recopilación de la información*

Se realizó una revisión bibliográfica para obtener las frecuencias de los morfos florales reportadas en poblaciones tristílicas, distílicas y monostílicas de especies tristílicas. A partir de la información recopilada ( $n = 10$  artículos) se elaboró una base de datos que incluye las frecuencias de los morfos en 567 poblaciones (418 tristílicas, 98 distílicas y 51 monostílicas) de 10 especies: *D. verticillatus*, *Eichhornia azurea*, *E. paniculata*, *L. salicaria*, *Narcissus triandrus*, *O. alpina*, *O. suksdorfii*, *P. cordata*, *P. rotundifolia*, *P. sagittata* (Ornduff, 1964; Barrett, 1977; Barrett, 1978; Glover y Barrett, 1983; Glover y Barrett, 1986b; Morgan y Barrett, 1988;; Eckert y Barrett, 1992, 1995; Ågren y Ericson, 1996; Barrett *et al.* 2004; Weller *et al.* 2007). Algunas de las especies mencionadas no fueron incluidas en los análisis debido al reducido número de poblaciones reportado (por debajo de ocho, tal es el caso de *E. azurea*, *E. paniculata*, *O. suksdorfii*, *P. rotundifolia* y *P. sagittata*). Cabe mencionar que aunque varios estudios han publicado el número de poblaciones tristílicas, distílicas y monostílicas, no

presentan los datos relativos a la frecuencia de cada morfo o al número total de individuos en las poblaciones, lo cual impidió que esta información fuera incorporada a la base de datos.

### *Análisis estadísticos*

Para determinar si las frecuencias de los morfos florales observadas en las poblaciones tristílicas y distílicas difieren de lo esperado según la *hipótesis de isopletía* (las proporciones de los morfos en una población deben ser iguales entre sí,  $1:1:1$  en tristílicas;  $1:1$  en distílicas), se calculó una prueba de  $X^2$  por población. Este análisis permitió determinar el número de poblaciones isopléticas y anisopléticas en cada especie. A partir de los resultados obtenidos en las pruebas de  $X^2$  se categorizó el tipo de variación en las poblaciones anisopléticas como: *sesgo* cuando un morfo predomina sobre los otros dos, e.g.  $L > S = M$ ; *déficit* cuando un morfo se encuentra en la menor frecuencia, e.g.  $L > M > S$ ; o *pérdida*, cuando uno de los morfos no está presente en las poblaciones distílicas, e.g.  $L = M$ .

Con el fin de evaluar si el tipo de variación en las frecuencias de los morfos (*sesgo* o *déficit*) en las poblaciones tristílicas anisopléticas de cada especie se explica por procesos aleatorios o se debe al efecto de la selección natural se realizaron pruebas de bondad de ajuste. Lo mismo se hizo para las poblaciones distílicas, pero en vez de evaluar el *déficit* de un morfo, se analizó si la *pérdida de un morfo* es el resultado de procesos como la deriva génica o la selección natural. Por último, se registró la proporción de poblaciones monostílicas en cada especie. Todos los análisis se realizaron en el programa estadístico JMP versión 5 (SAS Institute, 2005).

### Resultados

El conteo del número de poblaciones tristílicas, distílicas y monostílicas reportadas para cada especie reveló que en todos los casos predominan las poblaciones tristílicas, en menor proporción las distílicas, y solamente tres de las cinco especies analizadas presentan poblaciones monostílicas (Fig. 2). Al evaluar la hipótesis de isopletía se encontró que menos de la mitad de

las poblaciones tristílicas (del 1 al 37.5%, Fig. 3 y Tabla 1), y cerca de la mitad de las distílicas son isopléticas (del 25.9 al 54.5%, Fig. 4 y Tabla 1). Cabe mencionar que no se encontró ninguna población distílica isoplética en *N. triandrus* ni en *P. cordata*. Estos resultados demuestran que la desviación de la isopletía en poblaciones tristílicas y distílicas es una condición común entre las especies analizadas.

Los resultados de las pruebas de  $X^2$  mostraron que muchas de las poblaciones tristílicas anisopléticas presentan un sesgo hacia algún morfo (entre el 35.5% y el 87%; Fig. 5). En la mayoría de las poblaciones sesgadas de *L. salicaria*, *N. triandrus* y *O. alpina*, el morfo largo es el más frecuente (en 68.4%, 98.8% y 100% de las poblaciones, respectivamente,  $X^2_{(2)} = 22.60$ ;  $P < 0.0001$ ;  $X^2_{(2)} = 178.06$ ;  $P < 0.0001$ ;  $X^2_{(2)} = 15.38$ ;  $P = 0.0005$ ). En cambio, no se detectaron diferencias significativas en la proporción de poblaciones sesgadas hacia un morfo en *D. verticillatus* ( $X^2_{(2)} = 0.29$ ;  $P = 0.86$ ), mientras que el morfo más común en 63% de las poblaciones de *P. cordata* es el corto ( $X^2_{(2)} = 11.51$ ;  $P = 0.0032$ ). Además, se encontró que el morfo menos frecuente en las poblaciones tristílicas de *D. verticillatus*, *O. alpina*, *L. salicaria* y *N. triandrus* es el intermedio, sin embargo, esta tendencia sólo fue significativa en las dos últimas ( $X^2_{(2)} = 23.72$ ;  $P < 0.0001$ ;  $X^2_{(2)} = 48.92$ ;  $P < 0.0001$ ; Fig. 6). Las poblaciones de *P. cordata*, por su parte, se caracterizan por presentar una baja frecuencia del morfo largo ( $X^2_{(2)} = 27.08$ ;  $P < 0.0001$ ).

Los resultados revelaron que la mayoría de las poblaciones distílicas anisopléticas están sesgadas hacia algún morfo (entre el 45.5% y el 100%). Por ejemplo, 100% y 80% de las poblaciones de *N. triandrus* y *O. alpina*, respectivamente, presentan un sesgo significativo hacia el morfo largo ( $X^2_{(2)} = 52.73$ ;  $P < 0.0001$ ;  $X^2_{(2)} = 5.98$ ;  $P = 0.05$ ; Fig. 7) que podría atribuirse a la selección natural. En contraste, las poblaciones de *D. verticillatus* y *L. salicaria* no presentan sesgo hacia ningún morfo ( $X^2_{(2)} = 0.86$ ;  $P = 0.65$ ;  $X^2_{(2)} = 0.72$ ;  $P = 0.69$ ). Los análisis mostraron, por otra parte, que el morfo que se pierde con mayor frecuencia en las poblaciones distílicas de *N. triandrus* y *O. alpina* es el intermedio ( $X^2_{(2)} = 44.41$ ;  $P < 0.0001$ ;  $X^2_{(2)} = 24.16$ ;  $P < 0.0001$ ;

Fig. 8). Aunque esta tendencia es similar en *D. verticillatus*, no fue estadísticamente significativa ( $X^2_{(2)} = 2.03$ ;  $P = 0.36$ ). En *L. salicaria*, en cambio, el morfo que se pierde más comúnmente es el corto ( $X^2_{(2)} = 16.77$ ;  $P = 0.0002$ ), mientras que una de las dos poblaciones distílicas de *P. cordata* carece del morfo intermedio y la otra, del morfo corto. Sin embargo, el escaso número de poblaciones distílicas en esta especie no permitió evaluarlo en términos estadísticos. La pérdida recurrente del mismo morfo en las poblaciones distílicas de *L. salicaria*, *O. alpina* y *N. triandrus* podría ser el resultado de la selección, mientras la ausencia de un patrón en *D. verticillatus* sugiere que la evolución de la distilia se debe a procesos aleatorios.

Al cuantificar el número de poblaciones monostílicas por especie, sólo se detectó su presencia en *D. verticillatus*, *L. salicaria* y *P. cordata*. De las 42 poblaciones reportadas en la primera, 18 presentan plantas del morfo largo, 17 del corto y 7 del intermedio. En el caso de *L. salicaria*, las únicas 3 poblaciones monostílicas reportadas tienen plantas del morfo largo, al igual que una de las dos poblaciones de *P. cordata*, pues en la otra se fijó el morfo corto. Estos datos indican que la evolución de la tristilia a la monostilia es un fenómeno poco común entre las especies analizadas.

## Discusión

Los resultados de esta revisión apuntan a que la pérdida de la isopletería, así como de un morfo floral son fenómenos que caracterizan la disolución de la tristilia en las especies analizadas. La evolución de la distilia y en raras ocasiones, de la monostilia a partir de la tristilia podría ser el resultado de mecanismos evolutivos como la deriva génica, si la variación en las frecuencias de los morfos es aleatoria, o la selección natural si existe un patrón en la representación de los morfos en las poblaciones de una especie.

El sesgo hacia el morfo largo encontrado en la mayoría de las poblaciones tristílicas de *L. salicaria*, *N. triandrus* y *O. alpina*, y distílicas de las dos últimas, es consistente con lo que planteó Heuch (1980) en relación a que éste es el morfo más común en la naturaleza. En

contraste, sólo *P. cordata* presenta poblaciones en las que la frecuencia del morfo largo es menor que la de los otros dos morfos. Tales resultados sugieren que este morfo está siendo favorecido por selección, a lo cual podrían atribuirse dos explicaciones. Por un lado, la determinación genética del morfo largo, que en la mayoría de las especies es recesivo para los dos loci (*ssmm*) representa una ventaja sobre los otros dos morfos. La razón es que mientras los tres morfos producen los gametos *sm* que se requieren para la expresión de un genotipo recesivo (como el del morfo largo), sólo el morfo corto y el intermedio pueden segregar los gametos *sM* para formar el genotipo del morfo intermedio. En contraste, el morfo corto es el único que expresa el alelo *S* dominante en sus tres genotipos, lo cual incrementa su probabilidad de desaparecer (Barrett, 1993; Heuch, 1980). Esto explicaría la desaparición de plantas del morfo corto en las poblaciones analizadas de *L. salicaria* (Barrett *et al.* 1989).

Por otra parte, en lo relativo a su ventaja ecológica, se ha propuesto que el morfo largo funciona mejor como receptor de polen al tener el estigma más expuesto a los polinizadores que los otros dos morfos (Dulberger, 1992; Eckert y Barrett, 1995). En cambio, se considera al morfo corto como el peor receptor debido a las barreras físicas que enfrentan los polinizadores hasta llegar a los estigmas cortos (Harder y Barrett, 1993; Eckert y Barrett, 1995). En *P. cordata* y *P. sagittata*, por ejemplo, se reportó que el morfo largo recibe más polen que el morfo corto, aunque ambos reciben menor cantidad de polen que el morfo intermedio (Glover y Barrett, 1983; 1986a; Wolfe y Barrett, 1989). Sin embargo, cuando se trata de polen compatible, el morfo largo es el mejor receptor, mientras que el morfo corto funciona mejor como donador por presentar las anteras más expuestas. Esto podría explicar el sesgo hacia el morfo corto en las poblaciones revisadas de *P. cordata*. En la especie *L. salicaria* también se encontró que las plantas del morfo corto son mejores como donadoras y los individuos del morfo largo e intermedio, como receptores (O'Neil, 1992). Aunque estos datos sugieren que la determinación genética de cada morfo podría influir sobre su frecuencia en las poblaciones, las diferencias funcionales entre los morfos largo y corto también sugieren que la variación en las frecuencias de

los morfos podría ser el resultado de la especialización sexual donde la limitación por polen tiene un papel fundamental.

Hasta el momento se han desarrollado dos modelos que intentan explicar el sesgo hacia el morfo largo en función de los patrones de transferencia de polen, los cuales dependen por un lado, del diseño floral, y por otro, del sistema de incompatibilidad (Barrett *et al.* 1997, 2004; Barrett y Hodgins, 2006; Hodgins y Barrett, 2006; Fornoni *et al. en preparación*). En *N. triandrus*, por ejemplo, se propuso que la alta fertilidad del morfo largo se debe a que su estigma recibe polen de dos vías: de los estambres largos de los morfos intermedio y corto. En contraste, el morfo intermedio sólo recibe polen de los estambres intermedios del morfo corto porque los del morfo largo se encuentran en otra posición (Barrett y Hodgins, 2006a; Hodgins y Barrett, 2008). Aunque aparentemente la posición de los órganos sexuales en esta especie ha generado un sesgo hacia el morfo largo y una baja frecuencia del morfo intermedio, este cambio no tuvo consecuencias sobre la frecuencia del morfo corto. Por otro lado, se propuso que el sesgo hacia el morfo largo en las poblaciones tristílicas de *O. alpina* podría explicarse como el resultado de las cruzas entre plantas del morfo largo (*cruzas intramorfo* que producen semillas a partir de una modificación en el sistema de incompatibilidad), lo cual incrementó su frecuencia en las poblaciones (Fornoni *et al. en preparación*).

Los resultados de esta revisión sugieren que la baja frecuencia del morfo intermedio en las poblaciones tristílicas anisopléticas de *L. salicaria* y *N. triandrus*, así como su desaparición en las poblaciones distílicas de *O. alpina* y *N. triandrus* se deben al efecto de la selección natural. Aunque no se conoce con certeza las causas de este patrón, se han planteado diversas explicaciones al respecto. Charlesworth (1979) propuso que el morfo intermedio tiene una mayor probabilidad de autofecundarse debido a que la suma total de la distancia que separa al estilo intermedio de los estambres cortos y largos es mucho menor que aquella entre el estilo y los dos niveles de estambres en los otros dos morfos. Weller *et al.* (2007) lograron probar esta hipótesis al mostrar que la tasa de autogamia de este morfo (obtenida en condiciones controladas) en las



poblaciones tristílicas de *O. alpina* es superior a la de los morfos largo y corto. Datos preliminares de un estudio en curso reportan que cuatro de cinco poblaciones de esta especie presentan depresión endogámica, sin embargo, la diferencia entre morfos es baja (Stephen Weller, comentarios personales). Aunque en las poblaciones de *N. triandrus* también se encontró evidencia de depresión endogámica, no se detectaron diferencias en la tasa de entrecruzamiento entre morfos (Hodgins y Barrett, 2006). Esto sugiere que las causas que promueven la pérdida de un morfo podrían estar determinadas localmente, si es que la tasa de autogamia difiere entre poblaciones. Cabe la posibilidad, como mencionan Hodgins y Barrett (2006) de que la pérdida del morfo intermedio pudiera estar asociada no sólo con la depresión endogámica, sino con otros efectos negativos de la autogamia como el arresto de los óvulos en desarrollo en el ovario como resultado del sistema de incompatibilidad que opera en *N. triandrus*. La baja frecuencia del morfo intermedio en las poblaciones de *O. suksdorfii* se asocia con que las plantas del morfo intermedio producen poco polen y son estériles (Ornduff, 1964). Además, en varias especies se ha detectado que la alta tasa de autofecundación que caracteriza al morfo intermedio está asociada con una modificación en la incompatibilidad. En *O. alpina*, por ejemplo, la frecuencia de dicho morfo está relacionada de manera negativa con la modificación en la incompatibilidad de dos cruces que involucran a los estambres intermedios del morfo largo y corto (Weller 1976, 1980). En el caso de *E. azurea*, *P. cordata* y *P. rotundifolia*, el nivel de incompatibilidad del morfo intermedio es menor que el de los otros dos morfos (Barrett, 1977; Barrett y Anderson, 1985; Glover y Barrett, 1986b; Bianchi *et al.* 2000). En *E. paniculata*, por ejemplo, la autofecundación de este morfo podría haber facilitado la fijación de los genes modificadores (Barrett *et al.* 1989). Por otra parte, la morfología atípica del morfo largo en *N. triandrus*, cuyos estambres intermedios se encuentran en un nivel más alto que los estilos del morfo intermedio, ha generado una desventaja sobre el morfo intermedio que recibe menos polen (Barrett y Hodgins, 2006).

Aunque los argumentos de la sección anterior sugieren un efecto de la selección en contra del morfo intermedio, algunos estudios que han evaluado la producción de semillas en especies tristílicas como *L. salicaria*, *P. cordata*, *P. rotundifolia*, *E. paniculata* y *O. alpina* no han detectado variación entre los morfos (Barrett, 1977; Price y Barrett, 1982; Barrett *et al.* 1989; Weller, 1981, 1986), aunque otro sí (*D. verticillatus*: Eckert y Barrett, 1995; *L. salicaria*: Ågren, 1996; Ågren y Ericson, 1996; y *N. triandrus*: Hodgins y Barrett, 2006). Tampoco se han encontrado diferencias en la tasa de visita ni el tipo de polinizadores que visitan a los morfos en las poblaciones de *O. alpina* (Baena *et al. enviado*). Por lo tanto, si los morfos no difieren en su adecuación y los polinizadores los visitan por igual, entonces ¿a qué se debe la desviación de la isopletería hasta la eventual pérdida de uno de los morfos en las poblaciones? Una de las pistas a esta interrogante podría vincularse con el nivel al que opera la selección. En *O. alpina*, por ejemplo, se propuso que la modificación en la incompatibilidad ha generado presiones de selección en contra del alelo M, pero no del morfo intermedio. Esto explicaría por qué la pérdida de un alelo afecta la frecuencia del morfo intermedio, pero no su adecuación (Weller, 1976).

La evidencia también sugiere que la frecuencia de los morfos podría estar determinada por factores proximales. Barrett *et al.* (2004), por ejemplo, encontraron que la frecuencia del morfo intermedio responde a un gradiente geográfico, que a su vez influye sobre la composición de los polinizadores, la morfología floral y los patrones de apareamiento en las poblaciones de *N. triandrus* de la Península Ibérica. De manera similar, la evolución de la distilia en *O. alpina* parece estar asociada con un patrón geográfico en la distribución de las poblaciones distílicas (al norte) y tristílicas (al sur) en la región de las Sky Islands. Sin embargo, en ninguno de los dos casos se conoce con certeza la forma en que estos factores afectan las frecuencias de los morfos.

Los resultados de este capítulo apuntan a que la pérdida de la isopletería en *O. alpina* y *N. triandrus* se caracteriza, en términos generales, por un sesgo hacia el morfo largo y la baja frecuencia o la pérdida del morfo intermedio en las poblaciones. Aunque las poblaciones tristílicas de *L. salicaria* también presentan un exceso de plantas del morfo largo, el morfo que

se pierde comúnmente es el corto, mientras que el patrón es completamente distinto en *P. cordata*, cuyas poblaciones tristílicas presentan un sesgo hacia los individuos del morfo corto y un déficit de plantas del morfo largo. Lo anterior sugiere que la selección natural ha jugado un papel muy importante en la evolución de la tristilia a otros sistemas reproductivos. No obstante, la variación en las frecuencias de los morfos (sesgo, déficit y pérdida) en las poblaciones de *D. verticillatus* no parece seguir un patrón, lo cual indicaría que es el resultado de la deriva génica. Sin embargo, para lograr una mejor comprensión de los mecanismos evolutivos involucrados en la disolución de la tristilia será necesario recabar información sobre las frecuencias de los morfos en las poblaciones en un mayor número de especies, así como incorporar herramientas moleculares que permitan entender las causas de la variación interpoblacional. Por otro lado, resultará de suma importancia analizar cuál es el efecto de los factores proximales y/o ecológicos (como el patrón de la fenología floral) sobre las frecuencias de los morfos.

#### Literatura citada

- Ågren J. 1996. Population size, pollinator limitation, and seed set in the self-incompatible herb *Lythrum salicaria*. *Ecology* **77**: 1779-1790.
- Ågren J. y Ericson L. 1996. Population structure and morph-specific fitness differences in tristylous *Lythrum salicaria*. *Evolution* **50**: 126-139.
- Anderson S. 1994. Unequal morph frequencies in populations of tristylous *Lythrum salicaria* (Lythraceae) from southern Sweden. *Heredity* **72**: 81-85.
- 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**: 39-55.
- Barlow N. 1923. Inheritance of the three forms in trimorphic species. *Journal of Genetics* **13**: 133-146.

- Barrett S.C.H. 1977. The breeding system of *Pontederia rotundifolia* L., a tristylous species. *New Phytologist* **78**: 209-220.
- Barrett S.C.H. 1978. Floral biology of *Eichhornia azurea* (Swartz) Kunth (Pontederiaceae). *Aquatic Botany* **5**: 217-228.
- Barrett S.C.H. 1985. Ecological genetics of breakdown in tristily. En: Haeck I. y Woldendorp J.W. Eds. *Structure and functioning of plant populations. 2. Phenotypic and genetic variation in plant populations*, pp. 267-275. North-Holland Publ. Co. Amsterdam.
- Barrett S.C.H. 1988. The evolution, maintenance, and loss of self-incompatibility systems. En: Lovett Doust J.L. *Plant reproductive ecology patterns and strategies*, pp. 98-124. Oxford University Press, Oxford.
- Barrett S.C.H. 1992. *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag, Berlin.
- Barrett S.C.H. 1993. The evolutionary biology of tristily. En: Futuyma D. y Antonovics J. Eds. *Oxford surveys in evolutionary biology*, vol. 9, pp. 283-326, Oxford University Press, Oxford.
- Barrett S.C.H. y Anderson J.M. 1985. Variation in the expression of trimorphic incompatibility in *Pontederia cordata* L. (Pontederiaceae). *Theoretical and Applied Genetics* **70**: 355-362.
- Barrett S.C.H., Morgan M.T. y Husband B.C. 1989. The dissolution of a complex genetic polymorphism: the evolution of self-fertilization in tristylous *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Evolution* **43**: 1398-1416.
- Barrett S.C.H., Cole W.W., Arroyo J., Cruzan M.B. y Lloyd D.G. 1997. Sexual polymorphisms in *Narcissus triandrus*: Is this species tristylous? *Heredity* **78**: 135-145.
- Barrett S.C.H., Harder L.D. y Cole W.W. 2004. Correlated evolution of floral morphology and mating-type frequencies in a sexually polymorphic plant. *Evolution* **58**: 964-975.

- Barrett S.C.H. y Hodgins K.A. 2006. Floral design and the evolution of asymmetrical mating systems. En: Harder L.D. y Barrett S.C.H. Eds. *Ecology and evolution of flowers*, pp. 239-255. Oxford University Press. Oxford.
- Barrett S.C.H. y Shore J.S. 2008. New insights on heterostyly: comparative biology, ecology and genetics. En: Franklin-Tong V. Ed. *Self-incompatibility in flowering plants—evolution, diversity, and mechanism*, pp. 3-32. Springer-Verlag, Berlín.
- Bell J.M., Karron J.D. y Mitchell R.J. 2005. Interspecific competition for pollination lowers seed production and outcrossing in *Mimulus ringens*. *Ecology* **86**: 762-771.
- Bennett J.H., Leach C.R. y Goodwins I.R. 1986. The inheritance of style length in *Oxalis rosea*. *Heredity* **56**: 393-396.
- Bianchi M., Vesprini J. y Barrett S.C.H. 2000. Trimorphic incompatibility in *Eichornia azurea* (Pontederiaceae). *Sexual Plant Reproduction* **12**: 203-208.
- Charlesworth D. 1979. The evolution and breakdown of tristily. *Evolution* **33**: 486-498.
- Charlesworth B. y Charlesworth D. 1979. The maintenance and breakdown of distily. *American Naturalist* **114**: 499-513.
- Darwin C. 1877. The different forms of flowers on plants of the same species. Murray. London.
- Dulberger R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. En: Barrett S.C.H. Ed. *Evolution and Function of heterostyly*, pp. 41-84. Springer-Verlag. Berlín.
- Eckert C.E. y Barrett S.C.H. 1992. Stochastic loss of style morphs from populations of tristylous *Lythrum salicaria* and *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Evolution* **46**: 1014-1029.
- Eckert C.E. y Barrett S.C.H. 1993. The inheritance of tristily in *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Heredity* **71**: 473-480.
- Eckert C.E. y Barrett S.C.H. 1995. Style morph ratios in tristylous *Decodon verticillatus* (Lythraceae): selection versus historical contingency. *Ecology* **76**: 1051-1066.

- Eckert C.E., Manicacci D. y Barrett S.C.H. 1996b. Genetic drift and founder effect in native versus introduced populations of an invading plant, *Lythrum salicaria* (Lythraceae). *Evolution* **50**: 1523-1530.
- Fisher R.A. y Mather K. 1943. The inheritance of style length in *Lythrum salicaria*. *Annals of Eugenics* **12**: 1-11.
- Ganders F.R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* **17**: 607-635.
- Gettys L.A. y Wofford D.S. 2008. Genetic control of floral morph in tristylous pickerelweed (*Pontederia cordata* L.). *Journal of Heredity* **99**: 558-563.
- Glover D.E. y Barrett S.C.H. 1983. Trimorphic incompatibility in Mexican populations of *Pontederia sagittata* Presl. (Pontederiaceae). *New Phytologist* **95**: 439-455.
- Glover D.E. y Barrett S.C.H. 1986a. Stigmatic pollen loads in populations of *Pontederia cordata* from the southern U.S. *American Journal of Botany* **73**: 1607-1612.
- Glover D.E. y Barrett S.C.H. 1986b. Variation in the mating system of *Eichornia paniculata* (Spreng.) Solms. (Pontederiaceae). *Evolution* **40**: 1122-1131.
- Graham S.W. y Barrett S.C.H. 2004. Phylogenetic reconstruction of the evolution of stylar polymorphisms in *Narcissus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* **91**: 1007-1021.
- Harder L.D. y Barrett S.C.H. 1993. Pollen removal from tristylous *Pontederia cordata*: effects of anther position and pollinator specialization. *Ecology* **74**: 1059-1072.
- Heuch I. 1979. The effect of partial self-fertilization on type frequencies in heterostylous plants. *Annals of Botany* **44**: 611-616.
- Heuch I. 1980. Loss of incompatibility types in finite populations of the heterostylous plant *Lythrum salicaria*. *Hereditas* **92**: 53-57.
- Heuch I. y Lie R.T. 1985. Genotype frequencies associated with incompatibility systems in tristylous plants. *Theoretical Population Biology* **27**: 318-336.

- Hodgins K.A. y Barrett, S.C.H. 2006. Female reproductive success and the evolution of mating-type frequencies in tristylous populations. *New Phytologist* **171**: 569-580.
- Hodgins K.A. y Barrett S.C.H. 2008. Asymmetrical mating patterns and the evolution of biased style-morph ratios in a tristylous daffodil. *Genetical Research* **90**: 3-15.
- Husband B.C. y Barrett S.C.H. 1992. Genetic drift and the maintenance of style length polymorphism in tristylous populations of *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Heredity* **69**: 440-449.
- Kohn J.R. y Barrett S.C.H. 1992. Experimental studies on the functional significance of heterostyly. *Evolution* **46**: 43-55.
- Leach C. 1983. Fluctuations in heteromorphic self-incompatibility systems. *Theoretical and Applied Genetics* **66**: 307-312.
- Leach C. y Mayo O. 2005. *Outbreeding mechanisms in flowering plants*. J. Cramer. Berlín.
- Lewis D. y Jones D.A. 1992. The genetics of heterostyly. En: Barrett S.C.H. Ed. *Evolution and Function of heterostyly*, pp. 129-150, Springer-Verlag. Berlín.
- Liao K., Gituru R.W., Guo Y-H. y Wang Q-F. 2011. The presence of co-flowering species facilitates reproductive success of *Pedicularis mombeigiana* (Orobanchaceae) through variation in bumble-bee foraging behaviour. *Annals of Botany* **108**: 877-884.
- Lloyd D.G., Webb C.J. y Dulberger R. 1990. Heterostyly in species of *Narcissus* (Amaryllidaceae) and *Hugonia* (Linaceae) and other disputed cases. *Plant Systematics and Evolution* **172**: 215-227.
- Lloyd D.G. y Webb C.J. 1992. The evolution of heterostyly. En: Barrett S.C.H. Ed. *Evolution and Function of heterostyly*, pp. 151-178. Springer-Verlag. Berlín.
- Mitchell R.J., Flanagan R.J., Brown B.J., Waser N.M., Karron J.D. 2009. New frontiers in competition for pollination. *Annals of Botany* **103**: 1403-1413.
- Morgan M.T. y Barrett S.C.H. 1988. Historical factors and anisoplethic population structure in tristylous *Pontederia cordata*: a reassessment. *Evolution* **42**: 496-504.

- Mulcahy D.L. 1964. The reproductive biology of *Oxalis priceae*. *American Journal of Botany* **51**: 1045-1050.
- O'Neil P. 1992. Variation in male and female reproductive success among floral morphs in the tristylous plant *Lythrum salicaria* (Lythraceae). *American Journal of Botany* **79**: 1024-1030.
- Omland K.E. 1999. The assumption of challenges of ancestral state reconstructions. *Systematic Biology* **48**: 604-611.
- Ornduff R. 1964. The breeding system of *Oxalis suksdorfii*. *American Journal of Botany* **51**: 307-314.
- Ornduff R. 1972. The breakdown of trimorphic incompatibility in *Oxalis* section *Corniculatae*. *Evolution* **26**: 52-65.
- Ornduff R. 1993. Intramorph and intermorph compatibility in tristylous populations of *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* **120**: 19-22.
- Pacheco R.P.B.P. y Coleman J.R. 1989. Reproductive morphology, genetic control and incompatibility relations in tristylous *Oxalis physocalyx* (Oxalidaceae). *Brazilian Journal of Genetics* **12**: 343-359.
- Pérez-Alquicira J., Molina-Freaner F.E., Piñero D., Weller S.G., Martínez-Meyer E., Rozas J. y Domínguez C.A. 2010. The role of historical factors and natural selection in the evolution of breeding systems of *Oxalis alpina* in the Sonoran desert "Sky Islands". *Journal of Evolutionary Biology* **23**: 2163-2175.
- Price S.D. y Barrett S.C.H. 1982. Tristyly in *Pontederia cordata*. *Canadian Journal of Botany* **60**: 897-905.
- Ren M.X., Zhang Q.G. y Zhang D.Y. 2005. Random amplified polymorphic DNA markers reveal low genetic variation and a single dominant genotype in *Eichhornia crassipes* populations throughout China. *Weed Research* **45**: 236-244.
- Richards A.J. 1997. *Plant breeding systems*. Chapman & Hall. Gran Bretaña.



- Richards A.J. y Barrett S.C.H. 1992. The development of heterostyly. En: Barrett S.C.H. Ed. *Evolution and Function of heterostyly*, pp. 85-128. Springer-Verlag. Berlin.
- SAS Institute Inc. 2005. JMP Version 5. Cary, NC, USA.
- Sosenski P., Fornoni J., Molina-Freaner F.E., Weller S.G. y Domínguez C.A. 2010. Changes in sexual organ reciprocity and phenotypic floral integration during the tristylly-distylly transition in *Oxalis alpina*. *New Phytologist* **185**: 829-840.
- Spieth P.T. 1971. A necessary condition for equilibrium in systems exhibiting self-incompatibility mating. *Theoretical Population Biology* **2**: 404-418.
- Stebbins G.L. 1980. Polyploidy in plants: Unsolved problems and prospects. En: Lewis W.H. Ed. *Polyploidy-biological relevance*, pp. 495-520. Plenum Press. Nueva York.
- Thompson J.D., Pailler T., Strasberg D. y Manicacci D. 1996. Tristylly in the endangered Mascarene Island endemic *Hugonia serrata* (Linaceae). *American Journal of Botany* **83**: 1160-1167.
- Trognitz B.R. y Hermann M. 2001. Inheritance of tristylly in *Oxalis tuberosa* (Oxalidaceae). *Heredity* **86**: 564-573.
- Vuilleumier B.S. 1965. The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. *Evolution* **21**: 210-226.
- Weller S.G. 1976. The genetic control of tristylly in *Oxalis* section *Ionoxalis*. *Heredity* **37**: 387-393.
- Weller S.G. 1980. The incompatibility relationships of tristylous species of *Oxalis* section *Ionoxalis* of southern Mexico. *Canadian Journal of Botany* **58**: 1908-1911.
- Weller S.G. 1981. Pollination biology of heteromorphic populations of *Oxalis alpina* (Rose) Knuth (Oxalidaceae) in southeastern Arizona. *Botanical Journal of the Linnean Society* **83**: 189-198.
- Weller S.G. 1986. Factors influencing frequency of the mid-styled morph in tristylous populations of *Oxalis alpina*. *Evolution* **40**: 279-289.

- Weller S.G. 1992. Evolutionary modifications of tristylous breeding systems. En: Barrett S.C.H. Ed. *Evolution and Function of heterostyly*, pp. 247-272. Springer-Verlag. Berlín.
- Weller S.G. y Denton M.F. 1976. Cytogeographic evidence for the evolution of distyly from tristyly in the North American species of *Oxalis* section *Ionoxalis*. *American Journal of Botany* **63**: 120-125.
- Weller S.G., Domínguez C.A., Molina-Freaner F.E., Fornoni J. y LeBuhn G. 2007. The evolution of distyly from tristyly in populations of *Oxalis alpina* (Oxalidaceae) in the Sky Islands of the Sonoran Desert. *American Journal of Botany* **94**: 972-985.
- Wolfe L.M. y Barrett S.C.H. 1987. Pollinator foraging behavior and pollen collection on the floral morphs of tristylous *Pontederia cordata* L. *Oecologia* **74**: 347-351.
- Wolfe L.M. y Barrett S.C.H. 1989. Patterns of pollen removal and deposition in tristylous *Pontederia cordata* L. (Pontederiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* **36**: 317-329.
- Yeo P.F. 1975. Some aspects of heterostyly. *New Phytologist* **75**: 147-153.

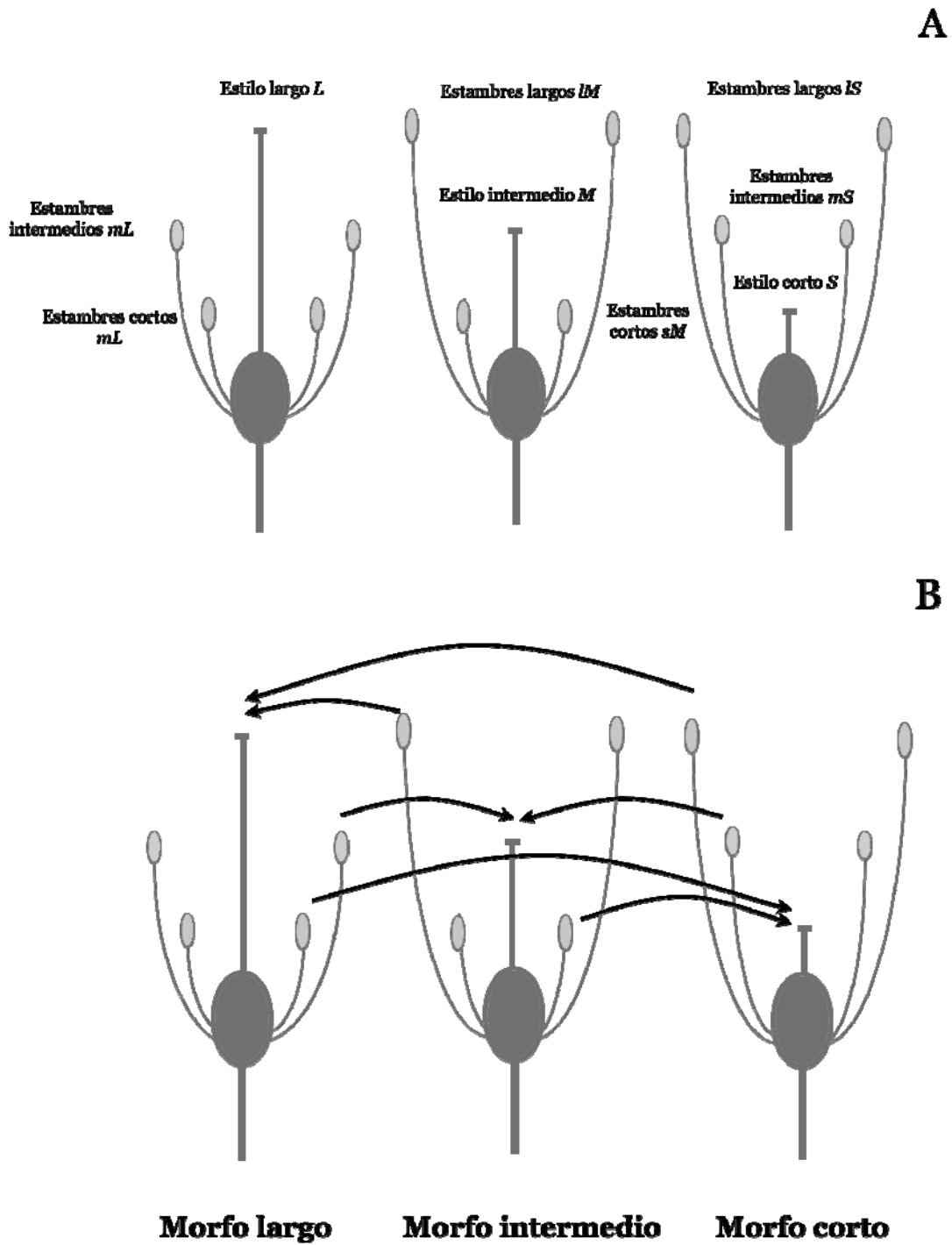


Figura 1. A) Posición de los órganos sexuales en los morfos largo, intermedio y corto de *O. alpina*. B) Cruzas legítimas posibles (que ocurren entre los órganos sexuales del mismo nivel) entre morfos distintos.

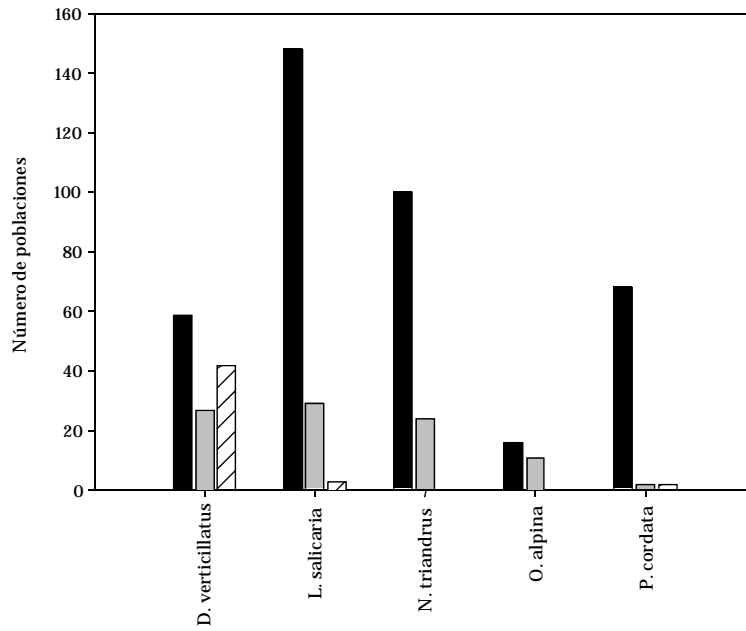


Figura 2. Número de poblaciones tristílicas (barras negras), distílicas (barras grises) y monostílicas (barras rayadas) en 5 especies tristílicas.

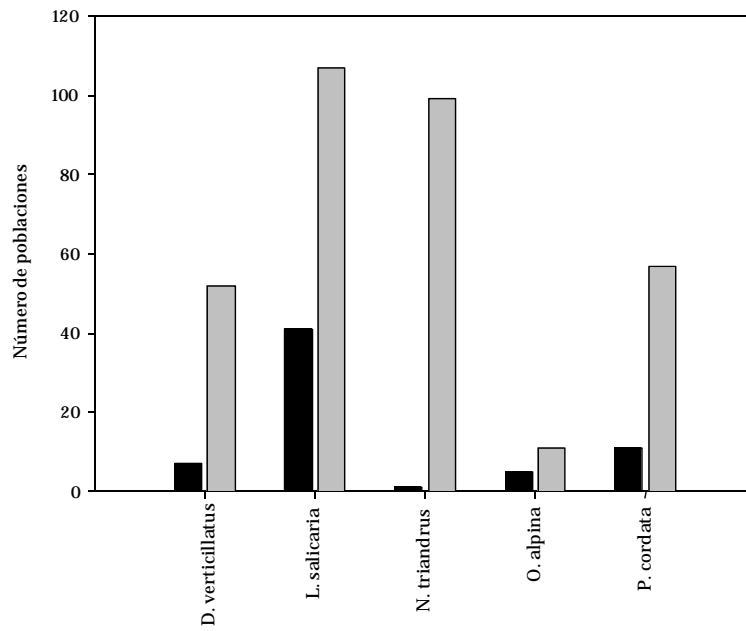


Figura 3. Número de poblaciones tristílicas isopléticas (barras negras) y anisopléticas (barras grises).

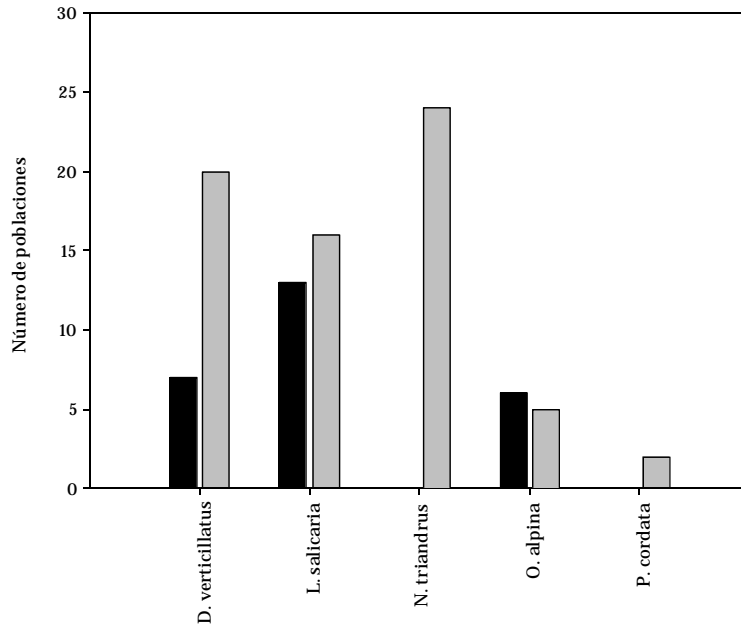


Figura 4. Número de poblaciones distílicas isopléticas (barras negras) y anisopléticas (barras grises).

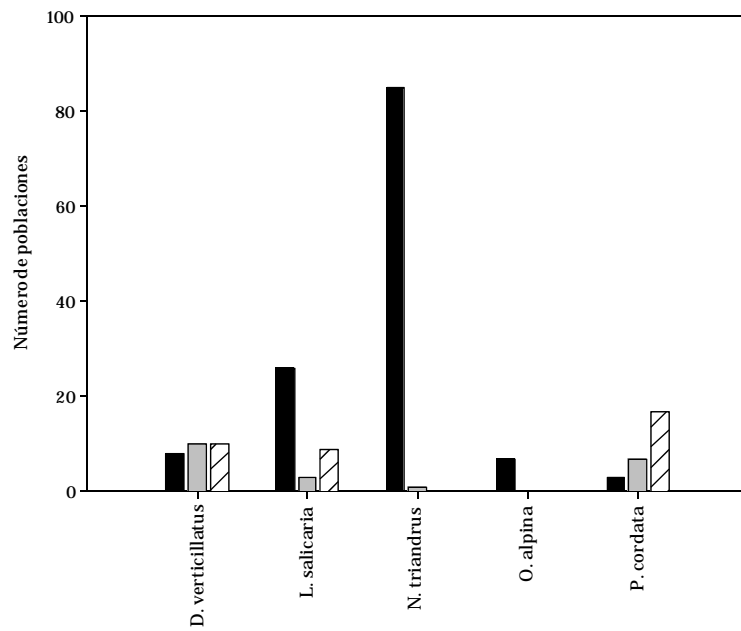


Figura 5. Número de poblaciones tristílicas anisopléticas sesgadas hacia el morfo largo (barras negras), intermedio (barras grises) y corto (barras rayadas).

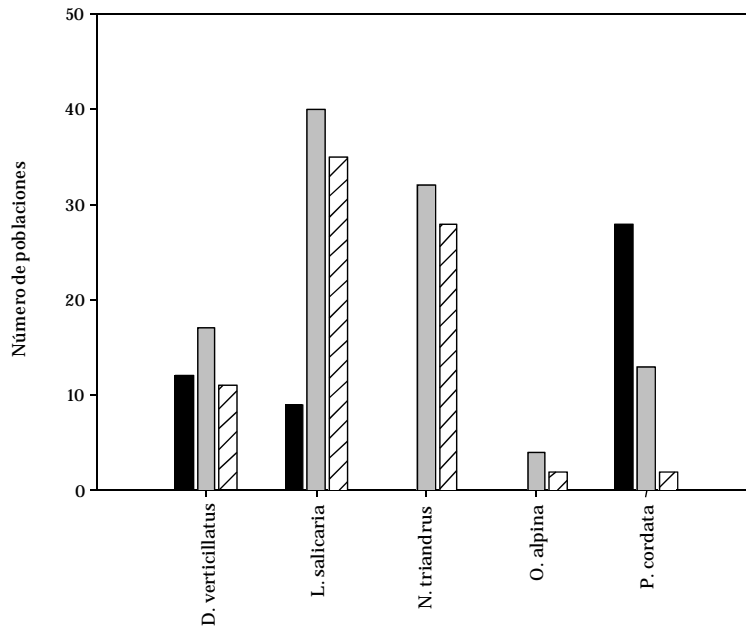


Figura 6. Número de poblaciones tristílicas con déficit del morfo largo (barras negras), intermedio (barras grises) y corto (barras rayadas).

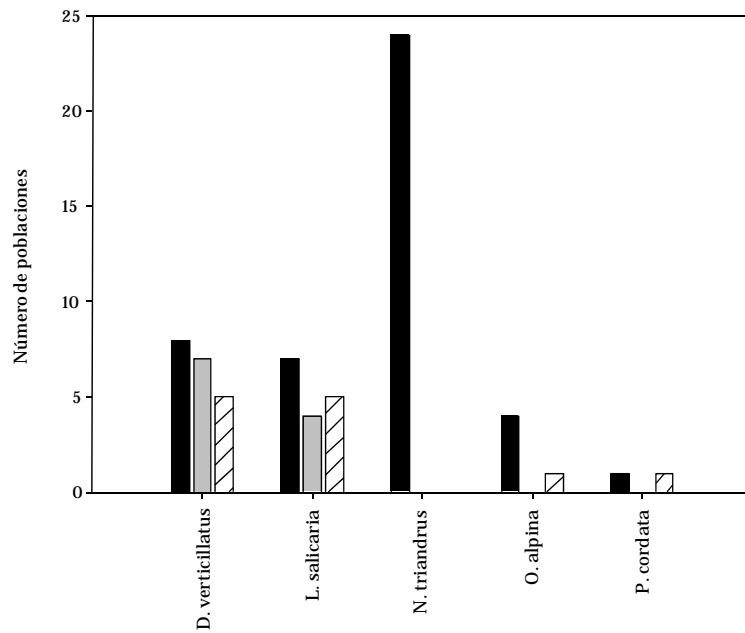


Figura 7. Número de poblaciones distílicas anisopléticas sesgadas hacia el morfo largo (barras negras), intermedio (barras grises) y corto (barras rayadas).

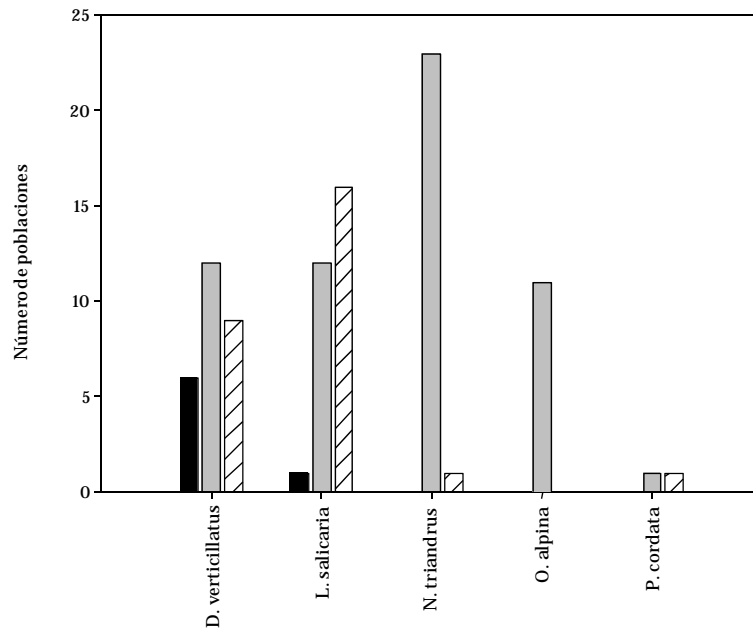


Figura 8. Número de poblaciones distílicas anisopléticas que han perdido el morfo largo (barras negras), intermedio (barras grises) y corto (barras rayadas).

Tabla 1. Número de poblaciones tristílicas (isopléticas y anisopléticas), distílicas (isopléticas y anisopléticas) y monostílicas en las cinco especies analizadas en las que se han reportado un mayor número de poblaciones.

Especie	Poblaciones tristílicas		Poblaciones distílicas		Poblaciones monostílicas
	I	A	I	A	
<i>Decodon verticillatus</i>	7	52	7	20	42
<i>Lythrum salicaria</i>	41	107	13	16	3
<i>Narcissus triandrus</i>	1	99	0	24	0
<i>Oxalis alpina</i>	5	11	6	5	0
<i>Pontederia cordata</i>	11	57	0	2	2

I= isoplética, A= anisoplética.



## **Capítulo 2**

### **Cambios en la reciprocidad de los órganos sexuales y la integración fenotípica floral durante la transición tristilia – distilia en *Oxalis alpina***

# Changes in sexual organ reciprocity and phenotypic floral integration during the tristylly–distylly transition in *Oxalis alpina*

Paula Sosenski<sup>1</sup>, Juan Fornoni<sup>1</sup>, Francisco E. Molina-Freaner<sup>2</sup>, Stephen G. Weller<sup>3</sup> and César A. Domínguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, CP 04510, México Distrito Federal, México; <sup>2</sup>Departamento de Ecología de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 1354, CP 83000, Hermosillo, Sonora, México; <sup>3</sup>Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California, Irvine, CA 92697, USA

## Summary

Author for correspondence:

César A. Domínguez

Tel: +52 55 5622 9039

Email: tejada@servidor.unam.mx

Received: 25 June 2009

Accepted: 1 October 2009

*New Phytologist* (2010) **185**: 829–840  
doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03105.x

**Key words:** constraints, distylly, floral integration, flower morphology, heterostylly, phenotypic evolution, phenotypic matrix, tristylly.

- Although the magnitude and pattern of correlation among floral traits (phenotypic integration) is usually conceived as an adaptation for successful pollination and reproduction, studies on the evolution of plant reproductive systems have generally focused on one or a few characters. If evolutionary transitions between reproductive systems involve morphological floral adjustments, changes in the magnitude and pattern of phenotypic integration of floral traits may be expected.
- In this study, we focused on the evolutionary dynamics of a complex adaptive trait, the extent of reciprocity (reciprocal placement) among sexual organs in a heterostylous species, and explored the associated changes in phenotypic floral integration during the transition from tristylly to distylly. The extent of reciprocity and both the magnitude and pattern of floral integration were characterized in 12 populations of *Oxalis alpina* representing the tristylly–distylly gradient.
- Although the extent of reciprocity increased along the tristylly–distylly transition, the flower size diminished. These adjustments did not affect the magnitude, but did affect the pattern, of floral integration.
- Changes in the pattern of floral integration suggested that allometric, functional and pleiotropic relationships among floral traits were affected during this evolutionary transition.

## Introduction

Flower diversification in animal-pollinated species is thought to result from the selective pressures exerted by pollinators (Herrera *et al.*, 2006; Johnson, 2006). Flowers are thus envisioned as mechanical devices optimized through the action of natural selection to maximize pollen transfer between potential mates (Darwin, 1877; Stebbins, 1970). In the long term, this selective process is expected to result in a precise relationship between the flowers of animal-pollinated species and pollinator morphology. Because flowers are modular entities composed of several relatively independent organs (perianth, androecium and gynoecium), the reciprocal adjustment between flowers and pollinators should involve the evolution of particular allometric relationships among floral organs, that is, the combination of trait values maximizing the rates of pollen delivery and

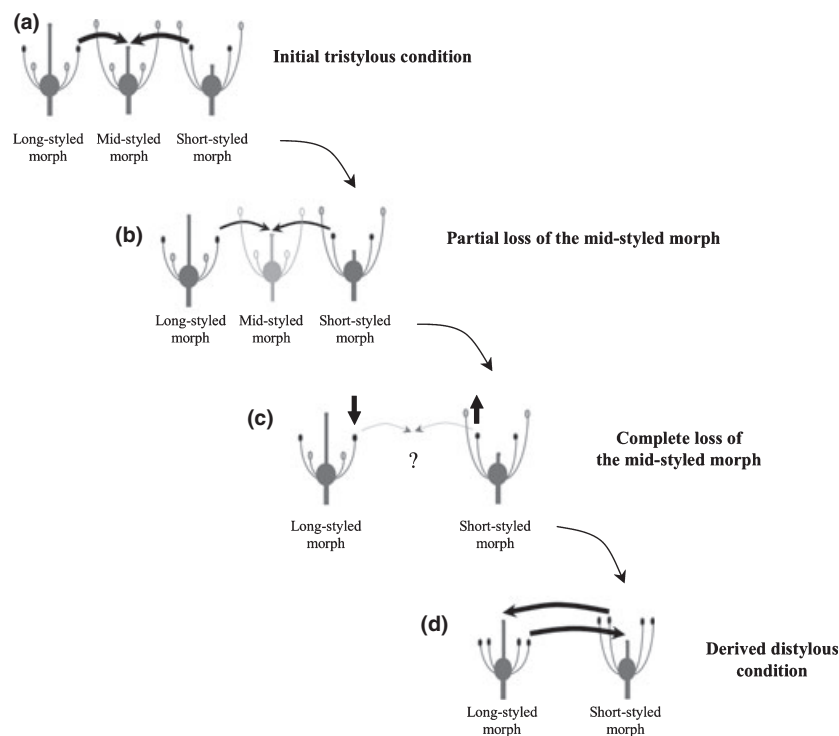
receipt (Nilsson, 1988; Alexandersson & Johnson, 2002). Natural selection is expected to favour the evolution of floral integration, in other words, high phenotypic covariances among traits associated with pollinator attraction and reward, pollen delivery and pollen receipt (Berg, 1960; Stebbins, 1970; Conner & Via, 1993; Armbruster *et al.*, 1999; Herrera, 2001; Herrera *et al.*, 2002; Armbruster *et al.*, 2004; Badyaev, 2004; Anderson & Busch, 2006; but see Ordano *et al.*, 2008).

The floral phenotype can be represented as a square matrix of phenotypic variances and covariances (Chernoff & Magwene, 1999; Steppan *et al.*, 2002; Smith & Rausher, 2008). This matrix allows the calculation of both the magnitude and pattern of floral integration, the first describing the strength with which floral traits correlate with each other, and the second referring to the overall structure of the phenotypic correlations among traits (Ordano *et al.*,

2008). Depending on its magnitude and pattern, floral integration may favour or constrain the response to the selective pressures exerted by pollinators or other agents (Campbell, 2009). Evolutionary changes in the floral phenotype may be constrained if the trajectory favoured by natural selection differs from the direction of the axis of maximum variation of the flower (i.e. when the direction of the eigenvector associated with the largest eigenvalue of the variance–covariance matrix of the flower differs from the direction of the vector of selection gradients) (Kirkpatrick & Lofsvold, 1992; Schluter, 1996; Merilä & Björklund, 2004). The higher the discrepancy between these two axes, the stronger the restrictions on adaptive evolution (Arnold, 1992; Schlichting & Pigliucci, 1998). Evolutionary transitions between reproductive systems involving adaptive changes in the functioning and morphology of flowers offer an ideal opportunity to examine the evolution of phenotypic integration.

The remarkable evolutionary lability exhibited by heterostylous reproductive systems (Ornduff, 1972; Weller, 1992; Domínguez *et al.* 1997) makes them interesting study sub-

jects for addressing the evolution of floral integration. Literature on heterostyly shows several examples describing evolutionary transitions from a polymorphism with three floral morphs (tristyly) to one with only two floral morphs (distyly) (Ornduff, 1972; Charlesworth, 1979; Weller, 1986, 1992; Eckert & Barrett, 1994; Barrett *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2007). Heterostyly is characterized by the reciprocal positioning of anthers and stigmas between floral morphs (Lloyd & Webb, 1992; see Fig. 1a,d), and by the presence, in many species, of a heteromorphic incompatibility system preventing seed production after self- and same-morph pollinations. Theoretically, efficient pollen transfer in heterostylous species requires a precise relationship between flower and pollinator morphology, because pollen from different stamen levels adheres to specific parts of the pollinator's body (Ganders, 1979; Barrett & Glover, 1985). Therefore, the precise location of sexual organs (anthers and stigmas) within and between flowers (i.e. the reciprocal placement of anthers and stigmas from different floral morphs; hereafter reciprocity) is the primary mechanism



**Fig. 1** Hypothetical changes in the reciprocal placement of sexual organs among floral morphs during the evolution of distyly from tristily in *Oxalis alpina*. Horizontal arrows indicate legitimate pollen transfer between mid-level anthers and mid stigmas in a hypothetical ancestral tristylous population (a). During the evolutionary transition towards distyly, modifications of incompatibility in short- and long-styled morphs result in a reduction in the frequency of the mid-styled morph. This, in turn, reduces the availability of mid styles and, consequently, the probability of legitimate pollen transfer from mid-level anthers (b, c). The arrow thickness represents the probability of successful pollen transfer from mid anthers to target stigmas. Although the shift from tristily to distyly involves the loss of the mid-styled morph and, consequently, mid styles in the population, both short- and long-styled plants retain mid-level stamens. Thus, natural selection should increase the efficiency of pollen transfer between the mid-level stamens of the short- and long-styled morphs through changes in the length of the mid-level stamens, such that they match the positions of short and long stigmas. See vertical arrows above mid level anthers in (c). Consequently, the two stamen whorls of the short or long floral morph should converge to the length of the style in its reciprocal morph (d). A new phenotype in which each floral morph has all its stamens at a single level is expected to evolve, thus making pollen transfer more efficient.

maintaining the evolutionary stability of heterostylous systems (Charlesworth, 1979). Such a mechanism is reinforced by a tubular or closed funnel-shaped perianth that constrains the way in which pollinators enter the flower (Ganders, 1979), thus increasing the likelihood of pollen transfer between same-level sexual organs (legitimate crosses, *sensu* Darwin, 1877). Hence, selection for features promoting legitimate pollen flow should produce high covariances among floral traits, and therefore relatively high levels of floral integration.

Altered patterns of pollen transfer and incompatibility modifications have been shown to account for the breakdown of tristylous through the loss of one floral morph (Charlesworth, 1979; Weller, 1986; Weller *et al.*, 2007). This evolutionary transition is expected to shift the adaptive peak of a tristylous floral phenotype towards a new adaptive peak in which only two floral morphs coexist (distyly; see Fig. 1 for details). Given that the breakdown of tristylous generally involves the loss of the mid-styled morph (Ornduff, 1972; Charlesworth, 1979; Weller, 1986, 1992; Eckert & Barrett, 1994; Barrett *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2007), its gradual loss would reduce the availability of target stigmas for pollen from the mid anthers of short- and long-styled plants (Fig. 1b,c). Thus, natural selection should favour any modification of the floral phenotype of the short- and long-styled morphs that increases the rates of pollen transfer from their mid stamens towards their new target styles (Mulcahy, 1964; Lewis & Rao, 1971; Weller, 1992; Eckert & Mavraganis, 1996). Such modifications should produce a derived dimorphism in which both anther whorls of short- and long-styled plants would have the same length as the style of their complementary morph (long and short styles, respectively; see Fig. 1d). In other words, increased reciprocal placement between sexual organs of the short- and long-styled floral morphs is expected during the evolution of distyly from tristylous (i.e. during the loss of the mid-styled morph).

If flowers constitute integrated modules with correlated floral traits, mid stamens as well as other floral traits (e.g. other sexual organs or perianth traits) should respond to the selective pressures that promote an increased reciprocity between the long- and short-styled morphs. At some point during the evolution of a new distylous floral morphology, correlations among floral traits may constrain further evolutionary changes (Merilä & Björklund, 2004; Campbell, 2009). Thus, natural selection is expected to reduce temporarily the magnitude and modify the pattern of floral integration during the transition from tristylous to distyly. Although some studies have shown that the breakdown of tristylous generally involves modifications in the length of the mid stamens of both short- and long-styled morphs (Mulcahy, 1964; Ornduff, 1964; Lewis & Rao, 1971; Lewis, 1975; Weller, 1979), no studies have examined whether such changes involve an increase in the extent of reciprocity

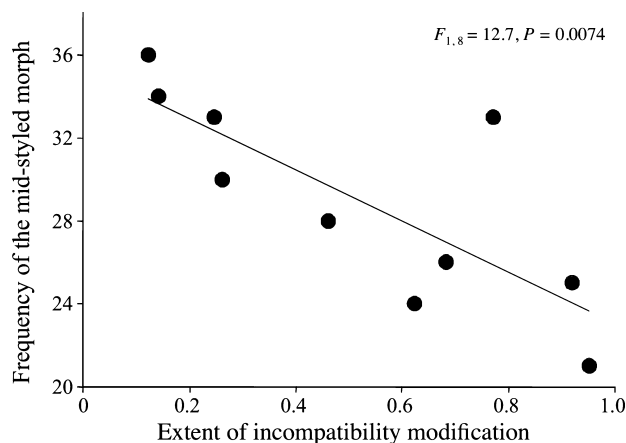


Fig. 2 Relationship between the frequency of the mid-styled morph and the extent of incompatibility modification in 10 populations of *Oxalis alpina* (modified from Weller *et al.*, 2007).

between formerly illegitimate sexual organs during the transition from tristylous to distyly, whether other floral traits are involved in this process, and how these modifications affect the magnitude and pattern of floral integration.

Within the Sonoran Desert Sky Islands (Arizona, New Mexico, USA; and Sonora, Mexico), the heterostylous species *Oxalis alpina* shows a marked variation in the frequency of floral morphs, ranging from isoplethous tristylous (equal frequency of the three morphs) to distylous populations in which the mid-styled morph is absent (Weller *et al.*, 2007). The loss of the mid-styled morph in this species results from incompatibility modifications (defined as the relative loss of incompatibility between illegitimate crosses) in the short- and long-styled morphs (see details in Fig. 2; Weller *et al.*, 2007). Accordingly, the presence of populations representing different steps in the evolutionary transition from tristylous to distyly offers a unique opportunity to explore changes in flower morphology associated with this evolutionary shift.

In this study, we first describe the floral variation among morphs and populations of *O. alpina* representing the evolutionary transition from tristylous to distyly. Second, we test whether the variation in flower morphology among these populations fits the hypothesized pattern of increased reciprocity between short- and long-styled plants associated with changes in the position of sexual organs within the flower. Third, we assess how these changes affect the magnitude and pattern of floral integration during this evolutionary transition.

## Materials and Methods

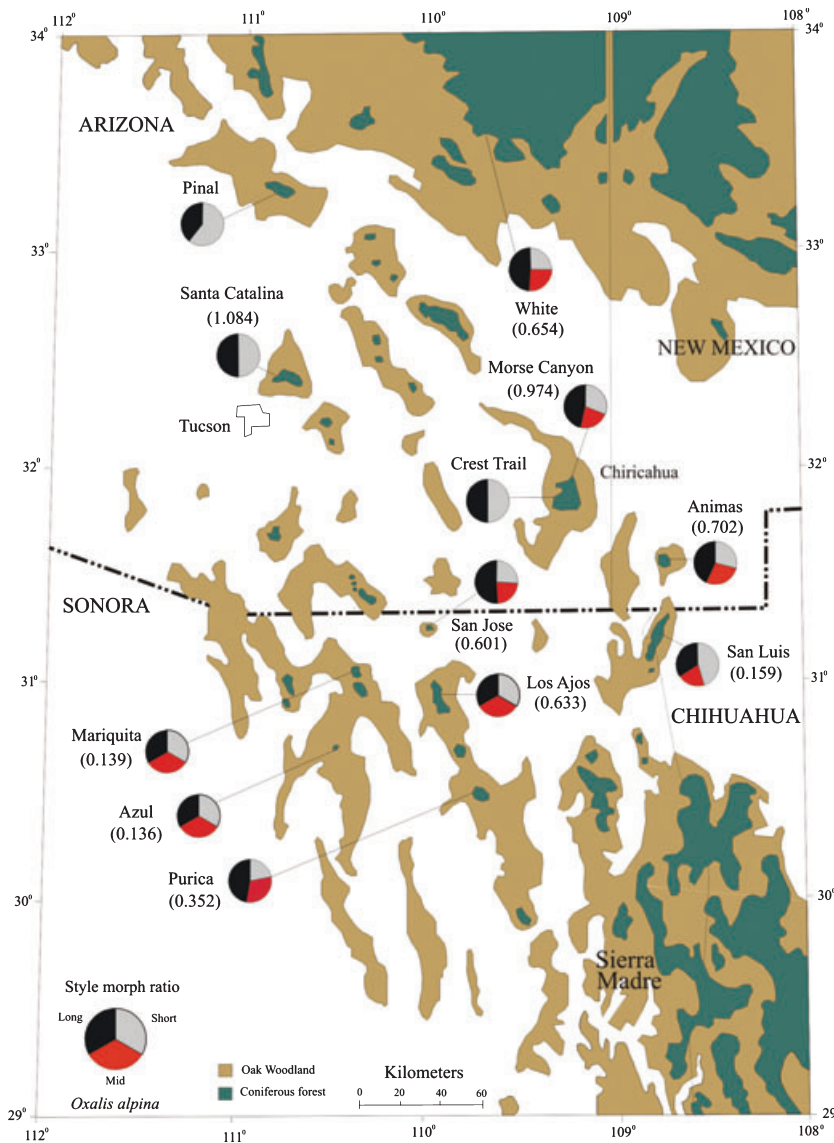
### Species and study populations

*Oxalis alpina* (Rose) Knuth (section *Ionoxalis*) is a widespread perennial species ranging from Guatemala to the

southwest USA (Denton, 1973) that blooms during the rainy season (July–September) producing bright-pink, funnel-shaped flowers with radial symmetry. Two species of bees *Heterosaurus bakeri* and *H. neomexicanus* (Andrenidae) (Weller, 1981), account for 94.5–100% of the floral visits among populations (F. Baena *et al.*, unpublished).

Twelve populations (three distylous and nine tristylous) from the Sky Islands region, representing the evolutionary gradient from tristily to distily, were selected (Fig. 3; see also Weller *et al.*, 2007). In this region, incompatibility modifications of short- and long-styled morphs are strongly correlated with the frequency of the mid-styled morph (Fig. 2; Weller *et al.*, 2007). For the populations included in our study, we used modifications of incompatibility to describe the evolutionary gradient between tristily and distily, because the frequency of the mid morph may be

influenced by other factors (i.e. founder effects; Eckert & Barrett, 1992; Agren & Ericson, 1996). Modifications of incompatibility were obtained from a previously published index of incompatibility modification based on hand-crossing experiments performed for each of 10 populations (Weller *et al.*, 2007). For both short- and long-styled plants in each population, the mean number of seeds produced by the illegitimate cross ( $S \times m/L$  and  $L \times m/S$ ) was divided by the mean number of seeds produced by the corresponding legitimate cross ( $S \times s/L$  and  $L \times l/S$ ; the first capital letter represents the morph of the recipient plant and the latter the anther level of the donor morph; i.e.  $m/L$  is the mid level anther of the long-styled morph). The index of incompatibility modification for each of nine tristylous and one distylous population was then obtained by averaging these two ratios (see Weller *et al.*, 2007). High values of the

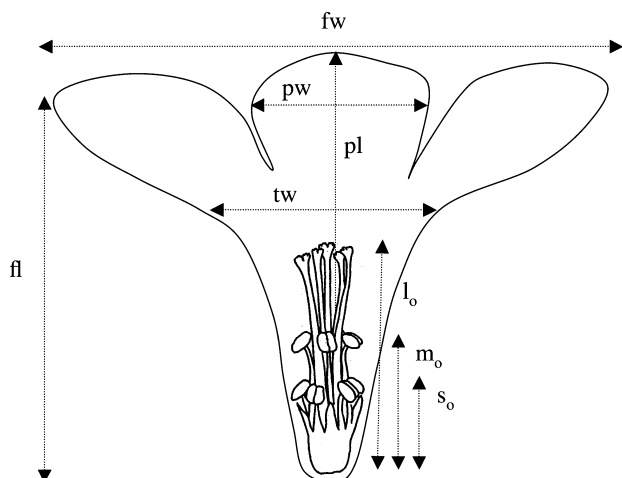


**Fig. 3** Distribution of 12 distylous and tristylous populations of *Oxalis alpina* in the Sky Island region of the Sonoran Desert. The number in parentheses after each population name corresponds to the extent of incompatibility modification of each population. For frequencies of the short-, mid- and long-styled morphs, see Weller *et al.* (2007). Modified from Marshall (1957) and McLaughlin (1995).

index correspond to populations in which illegitimate crosses produce as many seeds as legitimate crosses. These populations were those with a lower frequency, or even absence, of the mid-styled morph (Fig. 2).

### Phenotypic measurements

In the summer of 2005, we measured five flowers per plant of 30 plants per morph from nine populations of *O. alpina*. Given the low availability of plants in three additional populations, their sample sizes per morph were reduced to 10 plants. Because we had estimates of the extent of incompatibility modification for only 10 populations, analyses based on this index excluded the remaining two populations. Plants from each population were collected in 2001–2004. In all cases, we avoided the collection of plants less than 1 m apart in order to minimize the probability of sampling genetically related individuals. Bulbs were planted in soil-less mix at the University of California-Irvine glasshouse (Weller *et al.*, 2007). Given that plants from all populations were grown in the glasshouse in similar conditions, most of the observed morphological variation should have a genetic component. Eight morphometric measurements were taken from each flower (Fig. 4). These attributes were chosen because they have been shown to be related to pollinator attraction and flower handling (corolla traits) and pollen donation and deposition (style and stamen lengths) in various species (Conner & Rush, 1996; Conner *et al.*, 2003). The three different reproductive whorls of each morph are referred to as the short ( $s_o$ ), mid ( $m_o$ ) and long ( $l_o$ ) sexual organs (see Fig. 4). Depending on the floral morph, the short, mid and long sexual organs will correspond to the



**Fig. 4** Morphological floral traits measured in the three floral morphs of *Oxalis alpina*: flower width (fw), petal length (pl), petal width (pw), flower length (fl), flower tube width (tw), length of the short ( $s_o$ ), mid ( $m_o$ ) and long ( $l_o$ ) sexual organs (whose identity changes depending on the floral morph; see 'Phenotypic measurements' section).

length of the stigma or one of the two stamen levels. Except for the length of the reproductive whorls (which were measured under the microscope, STEMI SR Zeiss, Oberkochen, Germany), all measurements were performed with a Mitutoyo (CD-6, CSX, Mitutoyo Corp., Kawasaki, Kanagawa, Japan) digital calliper to the nearest 0.01 mm. Trait means were calculated for each plant and used as independent observations in statistical analyses.

We tested whether differences in flower morphology among *O. alpina* populations, representing the evolutionary transition from tristily to distily, fitted the hypothesized pattern of increased reciprocal positioning of sexual organs of short- and long-styled plants (Fig. 1). In order to increase the reciprocity between two morphs of a formerly tristylous system, both within- and between-morph floral modifications should occur. The within-morph component of reciprocity ( $R_W$ ) refers to the convergence of the two stamen whorls of a given morph to the same length (the mid and long stamens of short-styled plants, or the mid and short stamens of long-styled plants), whereas the between-morph component of reciprocity ( $R_B$ ) measures how well the stamen length of a given morph matches the height of the style of its reciprocal morph.  $R_W$  and  $R_B$  were calculated for each morph in every population. A value of unity for  $R_W$  and  $R_B$  indicates that the two stamen whorls of short- or long-styled flowers have converged to the same length, and that the mid stamens of either short- or long-styled plants have reached the length of their new target styles, respectively. Differences in flower size among populations were accounted for by dividing  $R_W$  and  $R_B$  of each floral morph by the length of the longest whorl in each population, the long styles.

To address changes in reciprocity along the evolutionary gradient, we integrated  $R_W$  and  $R_B$  into one composite index describing the extent of reciprocity ( $R_I$ ) within a population.  $R_I$  ranges from zero to unity, with unity expressing perfect reciprocity between long and short morphs (see formulae for the calculation of  $R_W$ ,  $R_B$ ,  $R_I$  in the legend of Fig. 6).

### Statistical analyses

**Patterns of variation in flower morphology** Because we were interested in determining whether the flower morphology of short- and long-styled morphs changed during the breakdown of tristily, we first looked for differences in overall flower morphology among morphs and populations (and their interaction) by means of multivariate analysis of variance (MANOVA) (JMP version 5.1, SAS Institute Inc, 2005). Univariate analyses were also performed to determine which traits were modified during this evolutionary transition.

To describe the relationships among floral traits and how they changed during the shift from tristily to distily, we performed a principal components analysis (PCA) including all 12 populations (JMP version 5.1, SAS Institute Inc,

2005). Plant means of each floral trait were used as the raw data for PCA. Sexual organs and corolla traits were included together in this analysis. Because principal components (PCs) are linear combinations of the original variables, they can be used as integrated descriptors of the independent covariance groups that make up the flower (Kleinbaum *et al.*, 1988; Marcus, 1990; Reymont & Jöreskog, 1993; Ordano *et al.*, 2008). In order to determine whether these covariance groups changed during the breakdown of tristylly, we performed two independent analyses of covariance (ANCOVAs) in which we evaluated the effect of morph (long and short), the extent of incompatibility modification (covariate) and the interaction term (morph  $\times$  extent of incompatibility modification) on the scores derived from the first two PCs. Only the values of the short- and long-styled morphs for each population were included in these analyses because these are the floral morphs that were expected to change.

**Reciprocal morphological adjustments between sexual organs during the breakdown of tristylly** According to our hypothesis, both  $R_W$  and  $R_B$  should show a positive relationship with the extent of incompatibility modification. We tested whether these two dependent variables followed the predicted trend by means of two independent covariance analyses. The extent of incompatibility modification (the covariate), the effect of morph (long and short) and the interaction of morph  $\times$  extent of incompatibility modification were included in these models as independent variables. A significant effect of the covariate would indicate that both  $R_W$  and  $R_B$  changed during the tristylly–distylly transition, whereas a significant effect of the morph term would indicate that both floral morphs differed in the extent of reciprocity. Finally, a significant interaction term (morph  $\times$  extent of incompatibility modification) would indicate that the rate of change in either  $R_W$  or  $R_B$  varied between long and short plants. In order to evaluate whether the extent of reciprocity ( $R_i$ ) increased along this evolutionary gradient, we then regressed  $R_i$  per population against the extent of incompatibility modification. A Shapiro–Wilk's test was performed on residuals of  $R_W$ ,  $R_B$  and  $R_i$  to evaluate whether they were normally distributed.

**Relationship between floral integration and the breakdown of tristylly** Given our expectation that the increment in reciprocal placement between sexual organs of short- and long-styled plants may reduce the extent of integration of the whole flower, we first searched for a correlation between the magnitude of floral integration and the extent of incompatibility modification by means of regression analysis. The magnitude of floral integration was estimated for each population and floral morph through the calculation of the variance among the eigenvalues of the correlation matrix of floral attributes ( $INT = \text{Var}[\lambda_i], i = 1, \dots, 8$ ; Wagner, 1984).

A high variance among eigenvalues results from phenotypes characterized by strong correlations among traits, and thus most of the phenotypic variation will be accounted for by the first PC (i.e. high levels of phenotypic integration). Because correlation matrices from different populations were estimated using different numbers of plants, the integration value for each population was corrected by subtracting the expected integration value [expected(INT) = (number of traits – 1)/number of plants; Wagner, 1984; Herrera *et al.*, 2002]. Each short- and long-styled plant was considered as an independent observation in these calculations. In order to determine whether INT values were significantly different from zero, 95% confidence intervals were calculated by bootstrapping (S-PLUS 2000, Mathsoft, Inc., 1999). Previous analyses showed that INT estimates did not differ among floral morphs; thus, we only show results for population estimates.

Second, we explored whether the pattern of floral integration (characterized by the covariance structure of the floral matrix) had a significant relationship with the extent of incompatibility modification. Because only one phenotypic matrix can be calculated for each level of analysis (morph and extent of incompatibility modification), we used the procedures outlined by Roff (2002), relying on the jack-knife to produce a set of pseudovalues of the covariances between floral traits. These values were used in a multivariate ANCOVA (MANCOVA) in which morph, extent of incompatibility modification (covariate) and the interaction term (morph  $\times$  extent of incompatibility modification) were included as independent variables. A morph effect would indicate that at least some of the covariances of the floral matrices differ between long and short plants. A significant effect of the extent of incompatibility modification would indicate that changes in the pattern of covariation among floral traits were related to the tristylly–distylly transition. Finally, a significant interaction term (morph  $\times$  extent of incompatibility modification) would show that the rate of change in the pattern of covariation among floral traits differed between floral morphs during the evolutionary transition from tristylly to distylly.

## Results

### Patterns of variation in flower morphology

MANOVA indicated that flower morphology differed significantly among morphs (Wilks'  $\lambda = 1.95$ ,  $F_{8,476} = 116.02$ ,  $P < 0.0001$ ) and populations (Wilks'  $\lambda = 0.08$ ,  $F_{88,3130} = 16.43$ ,  $P < 0.0001$ ), and that the interaction between morphs and populations was also significant (Wilks'  $\lambda = 0.40$ ,  $F_{88,3130} = 5.21$ ,  $P < 0.0001$ ). Univariate tests showed a significant effect of morph, population and the interaction term on all floral attributes ( $P \leq 0.04$ ), except for the morph term for three floral traits and the

**Table 1** Results of a principal components analysis (PCA) using the correlation matrix among eight morphological floral traits from 12 populations of *Oxalis alpina* from the Sonoran Sky Islands

	PC1	PC2
% of explained variance	57.26	15.29
Accumulated variance	57.26	72.56
Petal length	0.43	-0.17
Petal width	0.36	-0.13
Flower length	0.37	-0.07
Flower width	0.42	-0.20
Flower tube width	0.39	-0.24
Short sexual organs	0.22	0.62
Mid sexual organs	0.20	0.64
Long sexual organs	0.33	0.18

Loadings of individual traits on the first two principal components (PCs) are presented.

interaction term for five floral traits [see Fig. S1 (Supporting Information) for a description of attribute variation among morphs and populations].

PCA indicated that the first two PCs accounted for 72.56% of the total variation in flower morphology (Table 1). Loadings of PC1 were all relatively high and positive (Table 1), indicating that this component represents the variation in flower size. Positive loadings on the second component (PC2) were related to the length of the short, mid and long reproductive whorls ( $s_o$ ,  $m_o$ ,  $l_o$ ; Table 1). However, the lengths of the short ( $s_o$ ) and mid ( $m_o$ ) sexual organs had higher loadings than those of the long sexual organs ( $l_o$ ). Thus, differences in the magnitude of loadings for each floral morph indicated that changes in short ( $s_o$ ) and mid ( $m_o$ ) sexual organs were larger than those in long sexual organs ( $l_o$ ). Accordingly, PC2 was interpreted as the 'relative position of sexual organs'. These results suggest that *O. alpina* flowers are composed of two relatively

**Table 2** Results from analysis of covariance (ANCOVA) on the scores for principal component 1 (PC1) (flower size) and PC2 (relative position of sexual organs) derived from a principal components analysis (PCA) on short- and long-styled morphs of 10 populations of *Oxalis alpina* representing the evolution from tristylly to distylly

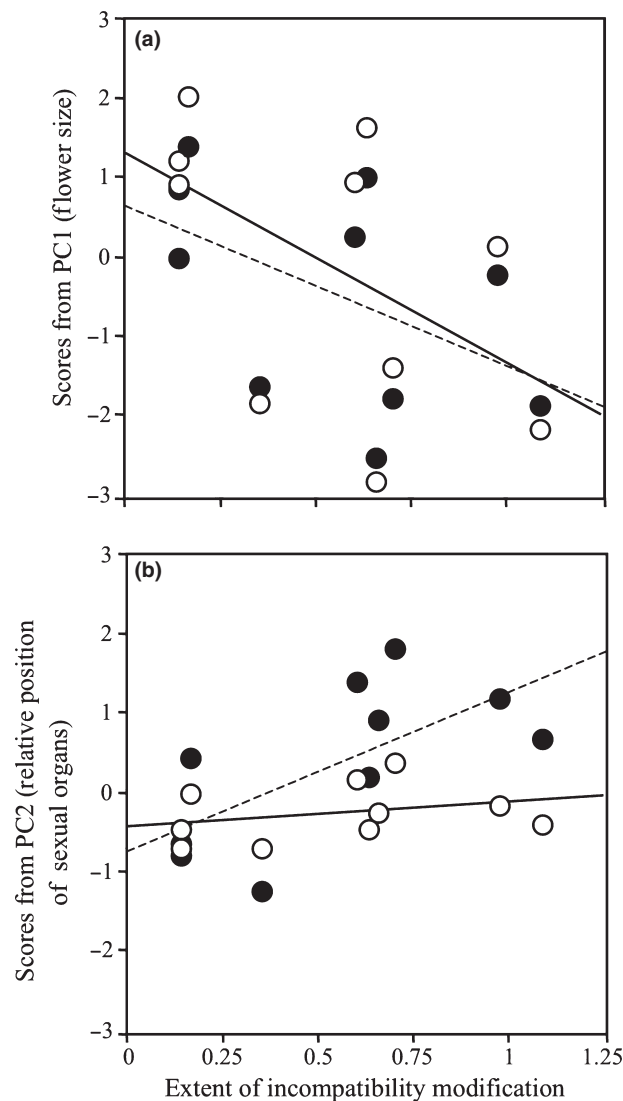
Variable	Source of variation	df	F	P
PC1	Morph	1	0.24	0.6278
	Extent of incompatibility modification	1	5.38	0.0339
	Morph × extent of incompatibility modification	1	0.08	0.7756
PC2	Morph	1	5.42	0.0332
	Extent of incompatibility modification	1	6.72	0.0196
	Morph × extent of incompatibility modification	1	3.47	0.0806

Error degree of freedom for both analyses was 16.

independent sets of correlation pleiades (*sensu* Berg, 1960): flower size and the relative position of the sexual organs.

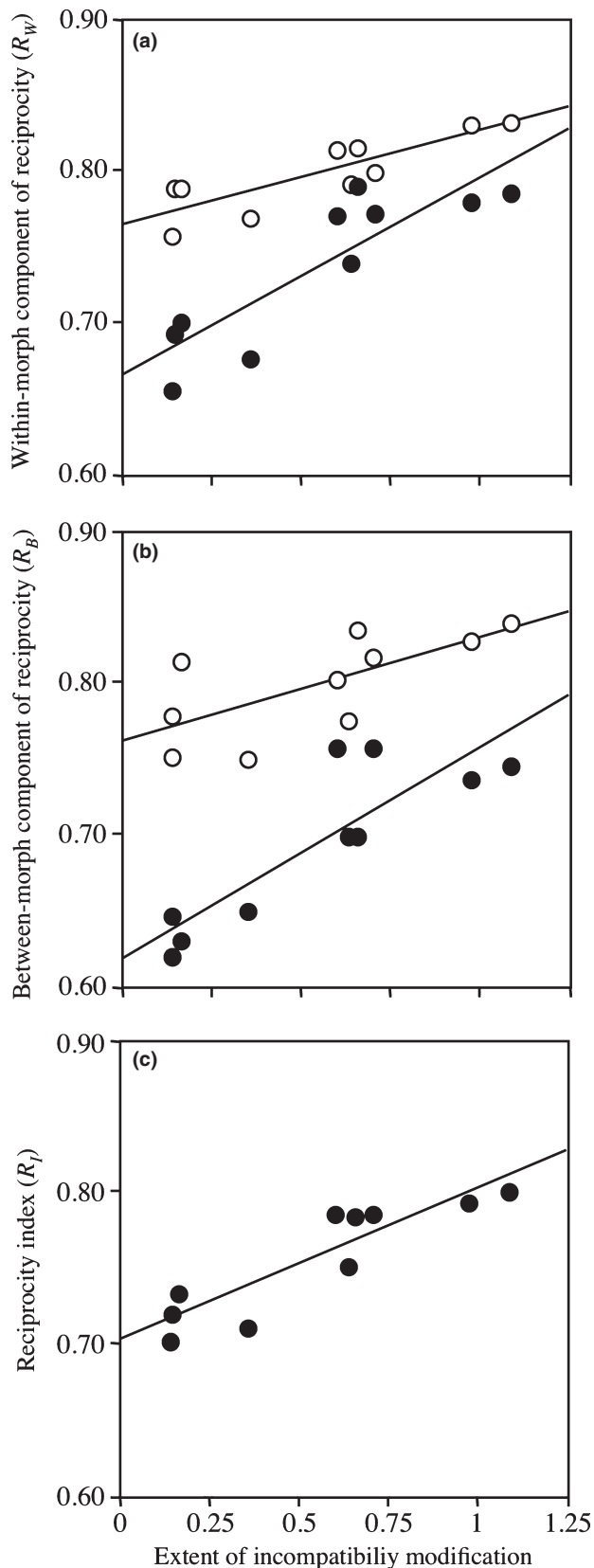
ANCOVA performed on the scores from the first PC revealed that the evolutionary transition from tristylly to distylly had a significant negative effect on flower size (scores from PC1,  $R^2 = 0.26$ , Table 2). No differences in flower size were detected between floral morphs, nor was the interaction term significant (morph × extent of incompatibility modification; Fig. 5a).

ANCOVA performed on the scores derived from PC2 indicated that 49% of the variance in the relative position of sexual organs was explained by differences between morphs and by the extent of incompatibility modification (Fig. 5b). The significant effect of morph (Table 2) indi-



**Fig. 5** Relationship between PC1 (flower size; a) and PC2 (relative position of sexual organs; b) of short- and long-styled floral morphs and the extent of incompatibility modification in 10 populations of *Oxalis alpina*. Filled circles and broken lines, short-styled floral morph; open circles and full lines, long-styled floral morph.





**Fig. 6** Relationship between different estimations of reciprocity among sexual organs of long and short floral morphs and the extent of incompatibility modification in tristylous and distylous populations of *Oxalis alpina*. Filled circles, short-styled floral morph; open circles, long-styled floral morph. (a) Within-morph component of reciprocity ( $R_W$ ) ( $R_{Wshort} = 1 - [mS - lS/L]$ ;  $R_{Wlong} = 1 - [mL - sL/L]$ ). (b) Between-morph component of reciprocity ( $R_B$ ) ( $R_{Bshort} = 1 - [mS - L/L]$ ;  $R_{Blong} = 1 - [mL - S/L]$ ). (c) Reciprocity index ( $R_I = [(R_{Wshort}) + (R_{Wlong}) + (R_{Bshort}) + (R_{Blong})]/4$ ).

icates that sexual organs of short- and long-styled morphs are organized differently. In addition, the significance of the extent of the incompatibility modification term demonstrates that changes in the relative position of sexual organs of short- and long-styled morphs are related to the tristylous–distylous transition. However, the interaction term (morph  $\times$  extent of incompatibility modification; Table 2) was not significant (slopes of lines similar; Fig. 5b). Overall, changes in flower size and in the relative position of sexual organs account for most of the variation in flower morphology, and indicate that such variation can be explained by differences between morphs and the extent of incompatibility modification.

#### Reciprocal morphological adjustments between sexual organs during the breakdown of tristylous

In accordance with our expectation, the within-morph component of reciprocity ( $R_W$ ) was positively related to the extent of incompatibility modification ( $F_{1,16} = 17.84$ ,  $P < 0.0006$ ,  $R^2 = 0.77$ ). This result indicates that the two anther whorls of the short- and long-styled morphs converged to almost the same length during the evolution from tristylous to distylous (Fig. 6a). The analysis also detected a significant morph, but not interaction, effect, indicating that both floral morphs differed in the relative difference in length between anther whorls across the tristylous–distylous transition ( $F_{1,16} = 35.22$ ,  $P < 0.0001$ ), and showed a similar pattern of change in reciprocity ( $R_W$ ) ( $F_{1,16} = 3.28$ ,  $P = 0.088$ ; Fig. 6a). The between-morph component of reciprocity ( $R_B$ ) also showed a positive relationship with the extent of incompatibility modification, thus indicating that the difference between mid stamens (of short- and long-styled plants) and long and short styles decreased during the evolution from tristylous to distylous ( $F_{1,16} = 30.03$ ,  $P < 0.0001$ ;  $R^2 = 0.87$ ; Fig. 6b). Again, a significant effect of floral morph was detected ( $F_{1,16} = 74.66$ ,  $P < 0.0001$ ), but not for the interaction term ( $F_{1,16} = 3.43$ ,  $P = 0.082$ ; Fig. 6b). Regression analysis, evaluating the overall changes in the extent of reciprocity ( $R_I$ ) along the evolutionary gradient, showed a strong positive relationship ( $F_{1,8} = 23.74$ ,  $P = 0.0012$ ;  $R^2 = 0.74$ ; Fig. 6c). Finally, a Shapiro Wilk's test showed that  $R_W$ ,  $R_B$  and  $R_I$  were all normally distributed ( $W \geq 0.94$ ,  $P \geq 0.58$ ). These results confirmed our hypothesis that, during the evolutionary shift from tristylous

**Table 3** Results from a multivariate analysis of covariance (MANCOVA) to determine the effect of morph, extent of incompatibility modification (covariable) and their interaction on floral phenotypic matrices (the pattern of floral integration) of *Oxalis alpina*

Source of variation	Wilks $\lambda$	Approx. $F$	df	$P$
Morph	0.26	3.18	36, 433	< 0.0001
Extent of incompatibility modification	0.12	1.44	36, 433	0.0490
Morph $\times$ extent of incompatibility modification	0.07	0.86	36, 433	0.6984

Replicates of the phenotypic matrices for each population were obtained using the jackknife approach proposed by Roff (2002; see section on Statistical analyses).

to distyly, both anther whorls of the short- and long-styled floral morphs converged to the length of the target style (long and short styles, respectively).

### Relationship between floral integration and the breakdown of tristily

Floral integration ranged from 0.99 ( $\pm$  0.28 SE, hereafter) in the San Luis population to 2.82 ( $\pm$  0.30) in San Jose. These values correspond to only 12.37–35.25% of the maximum level of floral integration that can be obtained with a matrix of eight attributes. Bootstrapping showed that all values were significantly different from zero (see Table S1).

Regression analyses, evaluating whether or not the magnitude of floral integration diminished during the transition from tristily to distyly, failed to detect a significant relationship ( $F_{1,8} = 0.01$ ,  $P = 0.92$ ). In contrast, MANCOVA performed on the pseudovalues produced by the jackknife MANOVA (Roff, 2002) detected significant effects of morph and incompatibility modification, indicating that the pattern of floral integration differs between floral morphs and that this pattern changes during the evolution of distyly from tristily (Table 3). In summary, the tristily–distyly transition involved modifications in the pattern, but not in the magnitude, of floral integration.

### Discussion

In this study, we have shown that the loss of the mid-styled morph in *O. alpina* is associated with modifications in the floral phenotypes that increase the morphological reciprocity between short- and long-styled plants. Such changes, in turn, seem to be moving the floral phenotypes towards a new distylous adaptive peak. Although this adjustment entails modifications in both the flower size and the relationships among sexual traits, no evidence of changes in the magnitude of floral integration was found. Our analyses further revealed that the pattern of floral integration (the

structure of the phenotypic floral matrix) changed during the evolution of distyly from tristily, probably reflecting modifications in the allometric, functional or pleiotropic relationships among floral traits.

Previous studies analysing the consequences of the breakdown of tristily on floral morphology have reported changes in the length of the mid stamens (Mulcahy, 1964; Ornduff, 1964; Weller, 1979; Eckert & Barrett, 1994; Eckert & Mavraganis, 1996). Other important features, however, such as modifications in flower size (Barrett *et al.*, 2004; Hodgins & Barrett, 2006, 2008), other sexual organs or the entire variance–covariance matrix have received much less attention (but see O’Neil & Schmitt, 1993). As predicted, the loss of the mid-styled morph in *O. alpina* resulted in modifications in the floral phenotype, increasing the reciprocity between formerly illegitimate sexual organs of the short- and long-styled floral morphs. This process involved both the within- and between-morph components of reciprocity and, as revealed by PCA, morphological adjustment entailed modifications in the length of both the stamens and styles, and in the flower size. Our results indicate that the selective pressures favouring a higher reciprocity between short- and long-styled plants affect the whole floral phenotype.

Even though the breakdown of tristily involved changes in both the flower size and relative position of the sexual organs, the magnitude of floral integration was apparently independent of this evolutionary process. The average magnitude of floral integration among populations of *O. alpina* ( $20.37\% \pm 2.10$ ) falls near the average observed for flowering plants ( $21.5\% \pm 1.72$ , Ordano *et al.*, 2008). This result is unexpected because a high magnitude of floral integration was predicted on the basis of the selective value of reciprocal morphology between floral morphs in heterostylous species. The magnitude of floral integration varied greatly among populations, with a threefold difference between the population having the lowest and highest value. It is likely that the magnitude of floral integration in *O. alpina* has played a minor role during the evolution of a distylous floral phenotype.

Although other studies have tested the adaptive role of the magnitude of floral integration, the evidence of its putative adaptive value is controversial (Fornoni *et al.*, 2009; Harder, 2009). For example, experimental modifications of the extent of floral integration in *Lavandula latifolia* had no significant effects on pollination success (Herrera, 2001). Ordano *et al.* (2008) estimated the intensity of selection acting on individual floral integration in three Rosaceae species, and showed that this attribute is selectively neutral. Studies based on the comparative method, or looking for differences in floral integration among populations with dissimilar pollinator faunas, have found no support for the adaptive value of floral integration (Herrera *et al.*, 2002; Armbruster *et al.*, 2004). Pérez-

Barrales *et al.* (2007), but Pérez *et al.* (2007), in contrast, reported that phenotypic floral integration responded to pollinator-mediated selection in *Narcissus papyraceus* and *Schizanthus* species, respectively. Anderson & Busch (2006) found that outcrossing species of the family Brassicaceae had higher levels of floral integration than conspecific selfing species. Higher levels of phenotypic integration in floral relative to vegetative traits in *Dalechampia scandens* implicitly assume the importance of floral integration in pollination biology (Hansen *et al.*, 2007). Thus, more empirical studies are necessary before we can definitively conclude that there is an adaptive role for the magnitude of floral integration (Fornoni *et al.*, 2009).

In contrast with the magnitude of floral integration, we found a significant relationship between the pattern of floral integration and the extent of incompatibility modification, a result in agreement with other studies showing that the pattern of phenotypic integration is generally responsive to natural selection (Herrera *et al.*, 2002; Ashman, 2003; Olsson, 2004). Our analyses also revealed that the pattern of covariation among floral traits changed during the breakdown of tristily, and this was consistent with our adaptive hypothesis. Hence, it is likely that natural selection modified the strength of covariation among specific floral traits in order to reshape the flower of short- and long-styled plants according to the new selective regime imposed by the loss of the mid-styled morph. These adjustments resulted in an increment in the reciprocal morphology during the evolution of a derived distylous floral phenotype.

Our analyses assume that the floral morphology in populations of *O. alpina* has evolved independently. A preliminary phylogeographical study suggests that geographical aggregation of distylous populations of *O. alpina* in the northwestern Sky Islands (Fig. 3) resulted from several independent evolutionary events (J. Pérez-Alquicira, unpublished). Future studies should explore how the ancestry of these populations may have influenced the geographical variation in flower morphology in *O. alpina*.

In addition to the increase in reciprocity between short- and long-styled plants, the breakdown of tristily involved a marked change in flower size. This was an unexpected result because flower size, at least in theory, evolves in response to the selective pressures exerted by the most common/efficient pollinators (Galen, 1989; Mitchell, 1994; Conner & Rush, 1996). The reduction in flower size in distylous populations suggests that the magnitude of the selective pressures favouring increased reciprocity may have negative consequences for the pollination of *O. alpina*. Given that the identity of the principal pollinators [two species of small bee (*Heterosaurus*; Andrenidae) contributing to 94.5–100% of the floral visits] does not change among the populations studied, the reduction in flower size and the increase in reciprocity cannot be explained by changes in pollinator species. The similarity in pollinator fauna of tristylous and

distylous populations of *O. alpina* suggests that the fitness consequences of a reduction in flower size should be explored.

Our PCA indicates that more than half of the morphological floral variation is a result of differences in size, with an additional 15% accounted for by differences in the relative position of sexual organs. Although the shortest path to evolve a distylous floral phenotype in *O. alpina* would require modifications only in the relationships among sexual organs, it is the variation in flower size that corresponds to the axis of maximum variation. Because this axis is one of minimum resistance to morphological change, we suggest that the reduction in flower size is a byproduct of the selective pressures acting on the rearrangement of the sexual organs (Björklund, 1996; Merilä & Björklund, 2004). Results from our study support this interpretation because flower size was reduced by 0.78 SD (the difference between the means of the standardized scores (PC1) of tristylous and distylous populations), whereas the relative position of sexual organs (PC2) changed by only 0.40 and  $-0.33$  SD (for short- and long-styled morphs, respectively), a twofold difference between these two components. These results suggest that, although natural selection is apparently driving the floral phenotype towards a distylous adaptive peak, the constraints imposed by the structure of the phenotypic matrix have forced the evolution of smaller flowers. This explanation relies on the assumption that the phenotypic variance-covariance matrix represents a fair estimate of the genetic floral matrix (Roff, 1997; Waitt & Levin, 1998; Stepan *et al.*, 2002).

Taken together, results from this study indicate that the breakdown of tristily in *O. alpina* is accompanied by major changes in the morphology of short- and long-styled plants. Most of the observed floral modifications were associated with flower size, suggesting that the evolutionary trajectory is driven chiefly by the axis of maximum phenotypic variation. Accordingly, the evolution of flower morphology in *O. alpina* seems to have been conditioned (but not prevented) by the structure of the phenotypic floral matrix. In spite of this restriction, reciprocal herkogamy between formerly illegitimate sexual organs of short- and long-styled plants increased during the evolution from tristily to distily. Thus, the available evidence suggests that natural selection operating on flower morphology is strong enough to overcome any potential constraint resulting from the correlations among traits.

## Acknowledgements

We thank Rubén Pérez for technical and field assistance, and Mariano Ordano for statistical advice. We are grateful to Ann Sakai, Diane Campbell, Luis Eguiarte, Sonia Sultan and three anonymous reviewers for helpful comments on the manuscript. P.S. acknowledges the academic support

received from the Posgrado en Ciencias Biomédicas and the Instituto de Ecología of the Universidad Nacional Autónoma de México. She was supported by PhD fellowships from CONACYT and UNAM-DGEP, and by an investigation fellowship from CONACYT. This study was also supported by grants from UC-MEXUS, UNAM (DGAPA IN217803) and CONACYT (47858-Q).

## References

- Agren J, Ericson L. 1996. Population structure and morph-specific differences in tristylous *Lythrum salicaria*. *Evolution* 50: 126–139.
- Alexandersson R, Johnson SD. 2002. Pollinator-mediated selection on flower-tube length in a hawkmoth-pollinated *Gladiolus* (Iridaceae). *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 269: 631–636.
- Anderson IA, Busch JW. 2006. Relaxed pollinator-mediated selection weakens floral integration in self-compatible taxa of *Leavenworthia* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 93: 860–867.
- Armbruster WS, di Stilio VS, Flores TC, Velásquez Runk JL. 1999. Covariance and decoupling of floral and vegetative traits in nine Neotropical plants: a re-evaluation of Berg's correlation pleiades concept. *American Journal of Botany* 86: 39–55.
- Armbruster WS, Pélabon C, Hansen TF, Mulder CPH. 2004. Floral integration, modularity and accuracy: distinguishing complex adaptations from genetic constraints. In: Pigliucci M, Preston K, eds. *Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes*. New York, NY, USA: Oxford University Press, 23–49.
- Arnold SJ. 1992. Constraints on phenotypic evolution. *American Naturalist* 140: S85–S107.
- Ashman TL. 2003. Constraints on the evolution of males and sexual dimorphism: field estimates of genetic architecture of reproductive traits in three populations of gynodioecious *Fragaria virginiana*. *Evolution* 57: 2012–2025.
- Badyaev AV. 2004. Integration and modularity in the evolution of sexual ornaments. An overlooked perspective. In: Pigliucci M, Preston K, eds. *Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes*. New York, NY, USA: Oxford University Press, 50–79.
- Barrett SCH, Glover DE. 1985. On the Darwinian hypothesis of the adaptive significance of tristily. *Evolution* 39: 766–774.
- Barrett SCH, Harder LD, Cole WW. 2004. Correlated evolution of floral morphology and mating-type frequencies in a sexually polymorphic plant. *Evolution* 58: 964–975.
- Berg RL. 1960. The ecological significance of correlation Pleiades. *Evolution* 14: 171–180.
- Björklund M. 1996. The importance of evolutionary constraints in ecological time scales. *Evolutionary Ecology* 10: 423–431.
- Campbell DR. 2009. Using phenotypic manipulations to study multivariate selection of floral traits associations. *Annals of Botany* 103: 1557–1566.
- Charlesworth D. 1979. The evolution and breakdown of tristily. *Evolution* 33: 489–498.
- Chernoff B, Magwene PM. 1999. Morphological integration: forty years later. In: Olson EC, Miller RL, eds. *Morphological integration*. Chicago, IL, USA: University of Chicago Press, 319–353.
- Conner J, Rush S. 1996. Effects of flower size and number on pollinator visitation to wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Oecologia* 105: 509–516.
- Conner J, Via S. 1993. Patterns of phenotypic and genetic correlations among morphological and life-history traits in wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Evolution* 47: 704–711.
- Conner J, Franks R, Stewart C. 2003. Expression of additive genetic variances and covariances for wild radish floral traits: comparison between field and greenhouse environments. *Evolution* 57: 487–495.
- Darwin C. 1877. *The different forms of flowers on plants of the same species*. London, UK: John Murray.
- Denton MF. 1973. A monograph of *Oxalis*, section *Ionoxalis* (Oxalidaceae) in North America. *Publications of the Museum. Michigan State University Biological Series* 4: 455–615.
- Domínguez CA, Avila G, Vázquez-Santana S, Márquez J. 1997. Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany* 84: 626–632.
- Eckert CG, Barrett SCH. 1992. Stochastic loss of style morphs from populations of tristylous *Lythrum salicaria* and *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Evolution* 46: 1014–1029.
- Eckert CG, Barrett SCH. 1994. Tristily, self-compatibility and floral variation in *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 53: 1–30.
- Eckert CG, Mavraganis K. 1996. Evolutionary consequences of extensive morph loss in tristylous *Decodon verticillatus* (Lythraceae): a shift from tristily to distily? *American Journal of Botany* 83: 1024–1032.
- Fornoni J, Ordano M, Boege K, Domínguez CA. 2009. Phenotypic integration: between zero and how much is too much. *New Phytologist* 183: 248–250.
- Galen C. 1989. Measuring pollinator-mediated selection on morphometric floral traits: bumblebees and the alpine sky pilot, *Polemonium viscosum*. *Evolution* 43: 882–890.
- Ganders FR. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607–635.
- Hansen TF, Pélabon C, Armbruster WS. 2007. Comparing variational properties of homologous floral and vegetative characters in *Dalechampia scandens*: testing the Berg Hypothesis. *Evolutionary Biology* 34: 86–98.
- Harder LD. 2009. Questions about floral (dis)integration. *New Phytologist* 183: 247–248.
- Herrera CM. 2001. Deconstructing a floral phenotype: do pollinators select for corolla integration in *Lavandula latifolia*? *Journal of Evolutionary Biology* 14: 574–584.
- Herrera CM, Cerdá X, García MB, Guitián J, Medrano M, Rey PJ, Sánchez-Lafuente AM. 2002. Floral integration, phenotypic covariance structure and pollinator variation in bumblebee-pollinated *Helleborus foetidus*. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 108–121.
- Herrera CM, Castellanos MC, Medrano M. 2006. Geographic context of floral evolution: towards an improved research programme in floral diversification. In: Harder LD, Barrett SCH, eds. *Ecology and evolution of flowers*. Oxford, UK: Oxford University Press, 278–294.
- Hodgins KA, Barrett SCH. 2006. Mating patterns and demography in the tristylous daffodil *Narcissus triandrus*. *Heredity* 96: 262–270.
- Hodgins KA, Barrett SCH. 2008. Geographic variation in floral morphology and style-morph ratios in a sexually polymorphic daffodil. *American Journal of Botany* 95: 185–195.
- Johnson SD. 2006. Pollinator-driven speciation in plants. In: Harder LD, Barrett SCH, eds. *Ecology and evolution of flowers*. Oxford, UK: Oxford University Press, 311–325.
- Kirkpatrick M, Lofsvold D. 1992. Measuring selection and constraint in the evolution of growth. *Evolution* 46: 954–971.
- Kleinbaum DG, Kupper LL, Muller KE. 1988. *Applied regression analysis and other multivariate methods*. Boston, MA, USA: PWS-Kent.
- Lewis D. 1975. Heteromorphic incompatibility system under disruptive selection. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 188: 247–256.
- Lewis D, Rao AN. 1971. Evolution of dimorphism and population polymorphism in *Pemphis acidula* Forst. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 178: 79–94.
- Lloyd DG, Webb CJ. 1992. The selection of heterostyly. In: Barrett SCH, ed. *Evolution and function of heterostyly*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 179–207.

- Marcus LF. 1990. Traditional morphometrics. In: Rohlf FJ, Bookstein FL, eds. *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop*. Special Publication No. 2. Ann Arbor, MI, USA: Museum of Zoology, University of Michigan, 78–122.
- Marshall JT. 1957. *Birds of pine-oak woodland in southern Arizona and adjacent Mexico*. Pacific Coast Avifauna Number 32. Berkeley, CA, USA: Cooper Ornithological Society.
- Mathsoft Inc. 1999. *S-Plus 2000 guide to statistics*. Seattle, WA, USA: Mathsoft.
- McLaughlin S. 1995. An overview of the flora of the Sky Islands, south-eastern Arizona: diversity, affinities, and insularity. In: DeBano LF, Gottfried GC, Hamre RH, Edminster CB, Folliot PF, Ortega-Rubio A, eds. *Biodiversity and management of the Madrean Archipelago: the Sky Islands of the southwestern United States and northwestern Mexico*. Fort Collins, CO, USA: USDA Forest Service, General Technical Report RM-GTR-264, 60–70.
- Merilä J, Björklund M. 2004. Phenotypic integration as a constraint and adaptation. In: Pigliucci M, Preston K, eds. *Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes*. New York, NY, USA: Oxford University Press, 107–129.
- Mitchell RJ. 1994. Effects of floral traits, pollinator visitation, and plant size on *Ipomopsis aggregata* fruit production. *American Naturalist* 143: 870–889.
- Mulcahy DL. 1964. The reproductive system of *Oxalis priceae*. *American Journal of Botany* 51: 1045–1050.
- Nilsson LA. 1988. The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature* 334: 147–149.
- O'Neil P, Schmitt J. 1993. Genetic constraints on the independent evolution of male and female reproductive characters in the tristylous plant *Lythrum salicaria*. *Evolution* 47: 1457–1471.
- Olsson K. 2004. *Population differentiation in Lythrum salicaria along a latitudinal gradient*. PhD thesis, Umeå, Sweden: Umeå University.
- Ordano M, Fornoni J, Boege K, Domínguez CA. 2008. The adaptive value of phenotypic floral integration. *New Phytologist* 179: 1183–1192.
- Ornduff R. 1964. The breeding system of *Oxalis suksdorfii*. *American Journal of Botany* 51: 307–314.
- Ornduff R. 1972. The breakdown of trimorphic incompatibility in *Oxalis* section *Corniculatae*. *Evolution* 26: 52–65.
- Pérez F, Arroyo MTK, Medel R. 2007. Phylogenetic analysis of floral integration in *Schizanthus* (Solanaceae): does pollination truly integrate corolla traits? *Journal of Evolutionary Biology* 20: 1730–1738.
- Pérez-Barrales R, Arroyo J, Armbruster WS. 2007. Differences in pollinator faunas may generate geographic differences in floral morphology and integration in *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae). *Oikos* 116: 1904–1918.
- Reyment RA, Jöreskog KG. 1993. *Applied factor analysis in the natural sciences*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Roff D. 1997. *Evolutionary quantitative genetics*. New York, USA: Chapman and Hall.
- Roff D. 2002. Comparing G matrices: A MANOVA approach. *Evolution* 56: 1286–1291.
- SAS Institute Inc. 2005. *JMP Version 5*. Cary, NC, USA: SAS.
- Schlichting CD, Pigliucci M. 1998. *Phenotypic evolution: a reaction norm perspective*. Sunderland, MA, USA: Sinauer.
- Schluter D. 1996. Adaptive radiation along genetic lines of least resistance. *Evolution* 50: 1766–1774.
- Smith RA, Rauscher MD. 2008. Selection for character displacement is constrained by the genetic architecture of floral traits in the ivyleaf morning glory. *Evolution* 62: 2829–2841.
- Stebbins GL. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I: Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1: 307–326.
- Steppan SJ, Phillips PC, Houle D. 2002. Comparative quantitative genetics: evolution of the G matrix. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 320–327.
- Wagner GP. 1984. On the eigenvalue distribution of genetic and phenotypic dispersion matrices: evidence for a nonrandom organization of quantitative character variation. *Journal of Mathematical Biology* 21: 77–95.
- Waitt DE, Levin DA. 1998. Genetic and phenotypic correlations in plants: a botanical test of Cheverud's conjecture. *Heredity* 80: 310–319.
- Weller SG. 1979. Variation in heterostylous reproductive systems among populations of *Oxalis alpina* in southeastern Arizona. *Systematic Botany* 4: 57–71.
- Weller SG. 1981. Pollination biology of heteromorphic populations of *Oxalis alpina* (Rose) Knuth (Oxalidaceae) in south-eastern Arizona. *Biological Journal of the Linnean Society* 83: 189–198.
- Weller SG. 1986. Factors influencing frequency of the mid-styled morph in tristylous populations of *Oxalis alpina*. *Evolution* 40: 279–289.
- Weller SG. 1992. Evolutionary modifications to tristylous breeding systems. In: Barrett SCH, ed. *Evolution and function of heterostyly*. Berlin, Germany: Springer-Verlag, 247–272.
- Weller SG, Domínguez CA, Molina-Freaner FE, Fornoni J, LeBuhn G. 2007. The evolution of distyly from tristyly in populations of *Oxalis alpina* (Oxalidaceae) in the Sky Islands of the Sonoran Desert. *American Journal of Botany* 94: 972–983.

## Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

**Fig. S1** Variation (mean  $\pm$  1 SE) in eight floral traits in the long-, mid- and short-styled floral morphs in distylous and tristylous populations of *Oxalis alpina* from the Sonoran Sky Islands.

**Table S1** Magnitude of phenotypic floral integration (INT) of distylous and tristylous populations of *Oxalis alpina* from the Sonoran Sky Islands

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.

## Supporting information – legend to Fig. S1, and Table S1

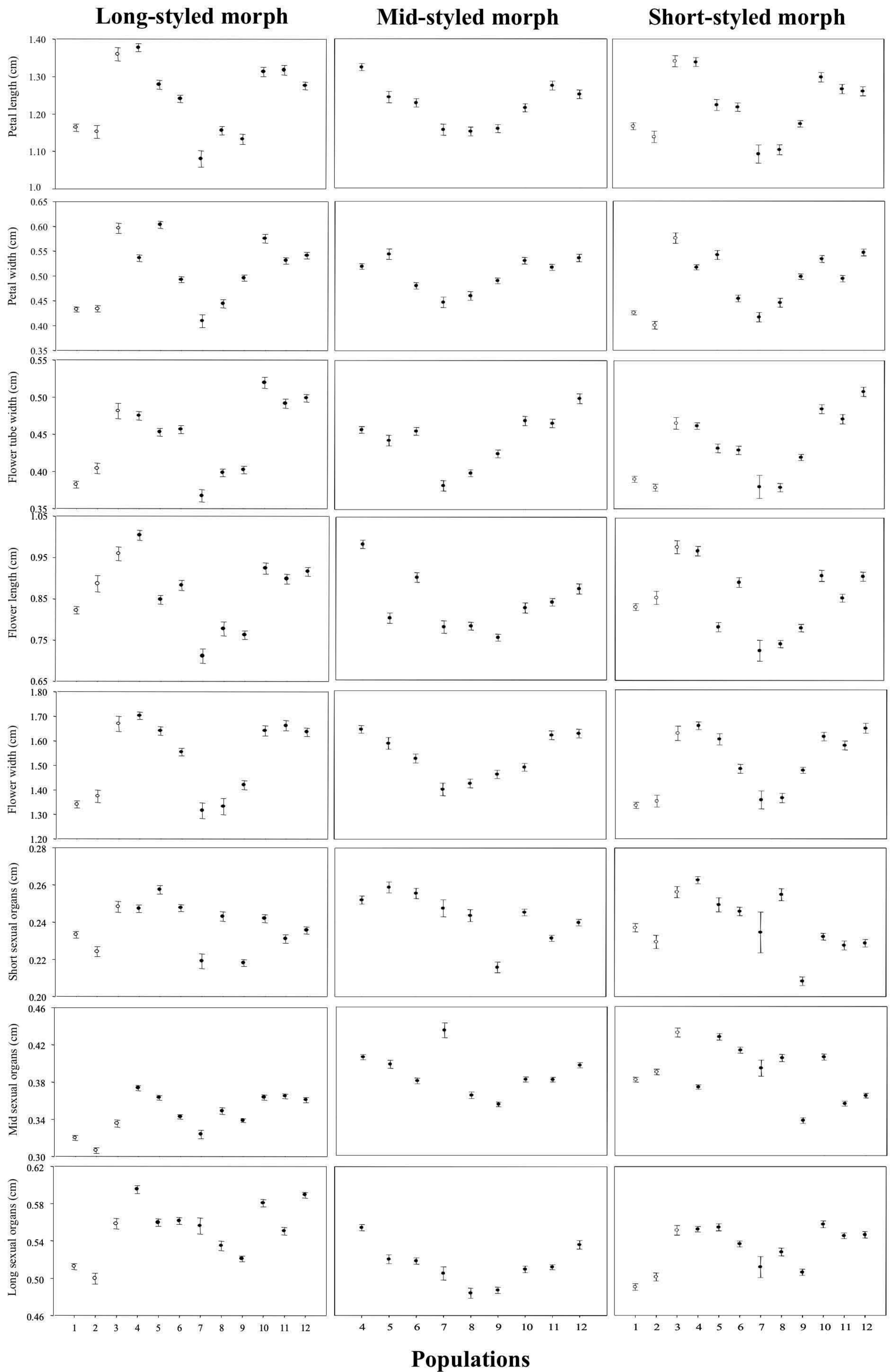
**Fig. S1** Variation (mean  $\pm$  1SE) in eight floral traits in the long-, mid- and short-styled floral morphs in distylous (open symbols) and tristylous populations (solid symbols) of *O. alpina* from the Sonoran Sky Islands. Populations are ordered according to the frequency of the mid morph.

**Table S1** Magnitude of phenotypic floral integration (INT) of distylous and tristylous populations of *Oxalis alpina* from the Sonoran Sky Islands. INT was measured as the variance of eigenvalues of phenotypic correlation matrices. Populations are ordered according to the level of floral integration.

<b>Population</b>	<b>Integration index</b>	<b>95% Confidence interval</b>
Sierra San Luis	0.996	0.672 - 1.545
Animas Mts.	1.069	0.648 - 1.330
Morse Canyon, Chiricahua Mts.	1.231	0.943 - 1.565
Pinal Mts.	1.235	0.606 - 1.824
Santa Catalina Mts.	1.348	0.997 - 1.777
Sierra La Mariquita	1.379	1.007 - 1.684
Crest Trail, Chiricahua Mts.	1.497	0.855 – 1.840
White Mts.	1.626	0.997 – 2.067
Sierra La Purica	1.775	1.227 – 2.335
Sierra Azul	1.951	1.528 – 2.383
Sierra Los Ajos	2.625	2.184 - 3.026
Sierra San Jose	2.826	2.306 - 3.314

**Fig. S1**

**Floral traits**





### **Capítulo 3**

**Efecto de los atributos florales, de la densidad y de la frecuencia de los morfos sobre el éxito reproductivo de las plantas en tres poblaciones de *Oxalis alpina* que representan el gradiente tristilia-distilia.**

## **Resumen**

En las especies que presentan polimorfismos florales como las tristílicas, la variación en la morfología floral, así como en la densidad de individuos y las frecuencias de los morfos pueden determinar los patrones de apareamiento y el éxito reproductivo de las plantas en las poblaciones. En este trabajo se evaluó la acción de la selección fenotípica a través de la función femenina (como la probabilidad de producir un fruto) sobre dos módulos florales: el tamaño de la flor (componente 1, CP1) y la posición de los órganos sexuales (CP2) en tres poblaciones naturales de *Oxalis alpina* que representan el gradiente tristilia-distilia, las cuales difieren en la frecuencia del morfo intermedio y el nivel de modificación en el sistema de incompatibilidad. Además se evaluó el efecto de la densidad y las frecuencias sobre el éxito reproductivo de las plantas. Los análisis revelaron un efecto de la selección sobre los atributos florales en dos de las tres poblaciones. La selección favorece a los individuos con flores más grandes y valores más altos del CP2 en Mariquita, la población tristílica no modificada, lo cual se asocia con bajos niveles de reciprocidad en las cruces ilegítimas. En contraste, la probabilidad de producir una cápsula es mayor en los individuos de flores pequeñas y valores bajos del CP2 que promueven una alta reciprocidad ilegítima en Morse Canyon, la población tristílica que presenta una modificación completa en el sistema de incompatibilidad. La falta de un efecto significativo de la selección sobre las flores en la población distílica Pinery Canyon podría significar que el fenotipo floral en esta población es el resultado final de un proceso selectivo que favoreció un incremento en la transferencia de polen entre dos morfos. Los resultados también mostraron que la probabilidad de producir un fruto es mayor en las plantas del morfo largo que en las del corto. En contra de lo esperado, no se detectó un efecto de la frecuencia ni de la densidad sobre el éxito reproductivo de las plantas en ninguna población, lo cual pone de manifiesto la revisión del diseño experimental en este tipo de estudios. Sin embargo, se encontró una relación positiva entre la densidad de plantas y la probabilidad de que los individuos del morfo largo produzcan una cápsula.

### Capítulo 3

#### **Efecto de los atributos florales, de la densidad y de la frecuencia de los morfos sobre el éxito reproductivo de las plantas en tres poblaciones de *Oxalis alpina* que representan el gradiente tristilia-distilia.**

En numerosas ocasiones se ha propuesto que la amplia diversidad de sistemas reproductivos y diseños florales en las angiospermas surgió como resultado de las presiones selectivas ejercidas por los polinizadores (Barrett, 2002; Harder y Johnson, 2009). Por lo tanto, se esperaría que los atributos florales de atracción, así como aquellos asociados con la transferencia de polen, influyeran sobre el éxito reproductivo de las plantas incrementando la eficiencia en la polinización. Aunque la evidencia del efecto de la selección natural sobre atributos florales es vasta (Campbell, 1989; Galen, 1989; Campbell *et al.* 1991; Conner y Rush, 1997; Maad, 2000; Alexandersson y Johnson, 2002; Caruso *et al.* 2003; Johnson *et al.* 2009), son pocos los trabajos que lo han evaluado en especies que presentan polimorfismos florales o un sistema reproductivo en transición (O'Neil, 1997; Hodgins y Barrett, 2008).

La heterostilia es un polimorfismo floral determinado genéticamente caracterizado por la presencia de dos (distilia) o tres (tristilia) morfos florales en las poblaciones que difieren en la posición relativa de las anteras y los estigmas (Lloyd y Webb, 1992). El morfo largo presenta un estilo largo y dos niveles de estambres, los intermedios y los cortos; el morfo intermedio tiene un estilo de longitud intermedia ubicado entre dos niveles de estambres: largos y cortos y; el morfo corto presenta un estilo corto por debajo de un nivel de estambres intermedios y otro de estambres largos. La transferencia de polen legítima que se da a través de los apareamientos entre morfos distintos (entre los órganos sexuales del mismo nivel) en las especies heterostílicas mantiene las frecuencias de los morfos en el equilibrio a través de la selección dependiente de las frecuencias (Thompson *et al.* 2003; Barrett *et al.* 2004; Brys *et al.* 2007). Así, el éxito reproductivo de las plantas es el resultado de cómo la morfología floral, la densidad de individuos y las frecuencias de los morfos influyen sobre los patrones de apareamiento en las

poblaciones. Por lo tanto, la variación en estos parámetros podría alterar el funcionamiento del polimorfismo si la transferencia legítima de polen fuera afectada.

*Oxalis alpina* es una especie tristílica cuyas poblaciones representan la transición tristilia-distilia caracterizada por la pérdida del morfo intermedio y la modificación en el sistema de incompatibilidad (Weller *et al.* 2007). Evidencia previa en poblaciones controladas demuestra que la evolución de la distilia en esta especie está asociada con un reajuste morfológico en el fenotipo floral que incrementa la reciprocidad entre los órganos sexuales de los morfos largo y corto (Sosenski *et al.* 2010). Dado que las transiciones evolutivas entre sistemas reproductivos generalmente involucran cambios en las presiones selectivas que operan sobre los individuos, la presencia de poblaciones tristílicas y distílicas en esta especie, la convierte en un modelo idóneo para evaluar el efecto de la morfología floral, la densidad y la frecuencia sobre el éxito reproductivo de las plantas durante la evolución de un sistema reproductivo a otro (Eckert *et al.* 1996; McCauley y Brock, 1998; Barrett, 2008). En este sentido, se esperaría encontrar un efecto diferencial de la selección que opera sobre la morfología floral en las poblaciones que representan el gradiente tristilia-distilia. Al respecto se han planteado las siguientes predicciones: En una población tristílica isoplética donde el sistema de incompatibilidad no está modificado (La Mariquita) los atributos florales que promueven la transferencia legítima de polen entre los tres morfos están ya tan ajustados entre sí, que no se esperaría encontrar un efecto de la selección sobre ellos o si lo hubiera, éste debería ser muy débil. En contraste, se esperaría que la selección fuera más intensa sobre la morfología floral en la población tristílica modificada (Morse Canyon) que se está ajustando, y que fuera muy baja o nula en la población distílica (Pinery Canyon) que ya presenta un fenotipo floral derivado que favorece la transferencia de polen entre sólo dos morfos.

Si las plantas son organismos sociales (i.e., coexisten con otros individuos de la misma o distinta especie en un ambiente específico), es probable que su desempeño así como las presiones selectivas que enfrentan puedan variar como consecuencia de esta interacción (Bell,

2008). Esto se debe a que la convivencia entre individuos involucra la competencia por recursos abióticos como la luz, el agua y los nutrientes, y bióticos como polinizadores y parejas potenciales con las cuales reproducirse (Bennington y Stratton, 1998; Gunton y Kunin, 2009). En este contexto, los vecinos intraespecíficos, especialmente en las especies que se entrecruzan obligadamente, pueden llegar a convertirse en agentes selectivos que operan sobre la sobrevivencia y la reproducción de las plantas en las poblaciones (Bennington y Stratton, 1998; Gunton y Kunin, 2009). Por lo tanto, se esperaría que las plantas que crecen en un parche donde la densidad de flores es alta tuvieran una mayor probabilidad de atraer polinizadores y de conseguir pareja que aquellas en un parche con menos flores. Lo anterior supone que el despliegue floral es determinante en el comportamiento de forrajeo de los polinizadores, pues actúa como un facilitador que incrementa las visitas, y por lo tanto, el apareamiento de las plantas (Knight, 2003). Este escenario, sin embargo, podría resultar desfavorable si un gran despliegue floral produjera limitación por polinizadores como consecuencia de la competencia entre las plantas por los mismos visitantes, lo que reduciría el número de visitas por planta y consecuentemente, su éxito reproductivo. Considerando ambas alternativas, se esperaría detectar un efecto estabilizador de la selección sobre la densidad de las plantas en las poblaciones (O'Neil, 1997; Parra-Tabla y Vargas, 2004).

Por otro lado, asumiendo que la selección dependiente de las frecuencias es el principal mecanismo que mantiene a las poblaciones heterostílicas a través de los apareamientos entre plantas de distintos morfos, se esperaría que las plantas del morfo más frecuente tuvieran un menor éxito reproductivo (i.e. selección negativa dependiente de las frecuencias) pues la probabilidad de obtener una pareja de un morfo distinto al suyo se reduciría, es decir, tendrían menos donadores y receptores de polen legítimo (Barrett *et al.* 2004; Hodgins y Barrett, 2008).

Aunque diversos trabajos se han enfocado en estimar, de manera independiente, el efecto de la selección fenotípica (Johnston, 1991; Stanton y Young, 1994; Conner, 1997; O'Neil, 1997; Caruso *et al.*, 2003; van Kleunen *et al.* 2008; Nattero *et al.* 2010), dependiente de las frecuencias

(Cresswell y Galen, 1991; Eckert, 1996; Gigord, 2001; Thompson *et al.* 2003; Barrett *et al.* 2004; Brys *et al.* 2008) y de la densidad (Bennington y Stratton, 1998; Gunton y Kunin, 2009) en el éxito reproductivo de los individuos en poblaciones naturales de plantas, existe poca evidencia de su acción conjunta (Silander, 1978; Bennington y Stratton, 1998; Groom, 1998; Castillo *et al.* 2002; Stelikh *et al.* 2005) y nula en especies tristílicas. Por eso, el propósito general de este estudio es analizar el régimen selectivo que se establece en tres poblaciones naturales de *O. alpina* que representan el gradiente evolutivo tristilia-distilia, para lo cual se han planteado los siguientes objetivos particulares: 1) Evaluar el efecto de la morfología floral y, 2) de la densidad y la frecuencia de los morfos sobre el éxito reproductivo de los individuos.

## Material y métodos

### *Especie y poblaciones de estudio*

*Oxalis alpina* (Rose) Knuth (sección *Ionoxalis*) es una especie herbácea perenne ampliamente distribuida desde Guatemala al sureste de Estados Unidos. Las plantas presentan flores en forma de embudo y de color rosa pálido que son polinizadas principalmente por abejas solitarias (*Heterosaurus bakeri* y *H. neomexicanus*; Weller, 1981).

En agosto del 2006 se caracterizó la fenología floral en tres poblaciones de *Oxalis alpina* que presentan variación en las frecuencias de los morfos florales y en el nivel de modificación del sistema de incompatibilidad (definido por Weller *et al.* 2007 como la pérdida relativa de incompatibilidad entre cruza ilegítimas): una en el estado de Sonora (La Mariquita) y dos en las montañas Chiricahua en Arizona, Estados Unidos (Morse Canyon y Pinery Canyon). La Mariquita es una población tristílica isoplética (34S:36M:30L) con muy poca modificación en el sistema de incompatibilidad (0.139), mientras que Morse Canyon es una población tristílica anisoplética (27S:25M:48L) con una modificación total del sistema de incompatibilidad (0.974). Pinery Canyon, por su parte, es una población distílica (50S:50L) con una modificación total del sistema de incompatibilidad.

### *Muestreo y censos*

Con el fin de evaluar el efecto de la selección fenotípica sobre la morfología floral se muestrearon 200 individuos de cada morfo (largo, intermedio y corto) por población, cada uno de los cuales fue marcado con una etiqueta de papel numerada para su posterior identificación. El criterio de inclusión de las plantas en el muestreo se basó en que éstas tuvieran al menos una flor abierta y uno o dos botones en desarrollo al inicio de la temporada de floración. Cada población fue censada en tres intervalos separados entre sí por 4-6 días durante un periodo de 18 días. En cada censo se registró el número de 1) escapos, 2) botones florales, 3) flores abiertas, 4) cápsulas inmaduras, y 4) cápsulas maduras. En el primer censo se colectó una flor por individuo, mientras que en el último, se colectaron el resto de las flores disponibles, así como todas las cápsulas producidas por individuo. Tanto las flores como las cápsulas fueron preservadas en una solución de FAAA (10% formaldehído, 50% alcohol etílico, 35% agua destilada, 5% ácido acético) hasta su procesamiento en el microscopio. Estos datos fueron utilizados en el análisis de selección. Debido a las fuertes lluvias de la temporada y al daño por herbívoros, algunas de las plantas muestreadas desaparecieron o murieron antes de que los individuos fructificaran o las semillas pudieran ser colectadas. En el caso de las plantas que sobrevivieron, algunas cápsulas se perdieron por las mismas razones.

Para estimar la densidad de plantas y la frecuencia de los morfos asociadas a cada uno de los individuos que fueron muestreados para el análisis de selección se contó el número de plantas (y se registró su morfo) en una circunferencia de 64 cm (equivalente a  $1\text{m}^2$ ) alrededor de cada uno de los 200 individuos focales por población. La delimitación de esta área se basó en una estimación aproximada de la distancia observada a la que se desplazan los polinizadores entre las plantas de un mismo parche. Esta área fue delimitada utilizando una cinta métrica. La *densidad* de individuos de cada morfo alrededor de una planta focal se estimó como un producto del número total de individuos de un morfo por su probabilidad de producir flores (calculada como un cociente del número total de flores de un morfo entre el número total de escapos del

mismo morfo en el área considerada). La *frecuencia* de cada morfo se calculó como el cociente de su densidad entre la sumatoria de las densidades de los tres morfos. Por último, la densidad global asociada a cada individuo focal se estimó como la sumatoria del número absoluto de individuos de cada morfo multiplicada por la probabilidad de que un escapo produjera flores (calculada como un cociente entre el número total de flores y el número total de escapos).

### *Morfología floral*

Todas las flores fueron disecadas para medir los siguientes atributos: longitud del pétalo, ancho del pétalo, longitud de los órganos sexuales del nivel corto, intermedio y largo. Cada uno de los niveles de los órganos sexuales corresponde a la longitud del estigma o de los estambres dependiendo del morfo. La longitud y ancho del pétalo se midieron con un vernier digital Mitutoyo (D-6, CSX, Mitutoyo Corp.) a una precisión de 0.1 mm. Para medir el resto de los caracteres se utilizó un microscopio estereoscópico ME Zeiss modelo Discovery V8 Stereo que, por medio del programa de PC AxioVision Rel. 4.6 y una cámara fotográfica SONY PowerShot A620 de 7.1 Megapíxeles, digitaliza y amplifica las imágenes obtenidas, permitiendo medir las longitudes de los atributos florales.

### *Análisis estadístico*

#### *Efecto de los atributos florales, la densidad y la frecuencia sobre el éxito reproductivo*

Los resultados de Sosenski *et al.* (2010) demostraron que la flor de *O. alpina* está formada por dos módulos, uno que tiene que ver con el *tamaño floral* (primer componente principal, CP1) y otro, con la *posición relativa de los órganos sexuales* (CP2). Considerando esto, y con el fin de analizar el patrón de covariación en las flores en las tres poblaciones naturales que representan el gradiente tristilia-distilia en esta especie, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) en el que se incluyeron las medidas de los cinco caracteres de la flor en los individuos del morfo corto y largo de las tres poblaciones. Aunque la evidencia demuestra que el CP2



representa la posición relativa de los órganos sexuales, para lograr una interpretación más precisa de su significado biológico se evaluó cuál es su relación con el índice de reciprocidad. La predicción al respecto es que si la evolución de la distilia está asociada con un cambio en la posición de los órganos sexuales y, al mismo tiempo, con un incremento en la reciprocidad entre los órganos sexuales de los morfos largo y corto, entonces debería existir una relación entre el CP2 y la reciprocidad ilegítima. Esto significa que la selección debería favorecer una baja reciprocidad ilegítima en La Mariquita, y una alta reciprocidad ilegítima en Morse Canyon y en Pinery Canyon. Para evaluar la asociación entre los scores del CP2 y el índice de reciprocidad en cada población se realizó una regresión lineal incluyendo ambas variables (para su estimación revisar Sosenski *et al.* 2010).

Con el fin de estimar el efecto de la morfología floral, de la frecuencia y de la densidad de individuos sobre el éxito reproductivo femenino (como la probabilidad de producir una cápsula) se utilizó un modelo de regresión nominal logística:

$$\pi(x) = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 x}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 x}}$$

Donde  $\beta_0$  y  $\beta_1$  son los parámetros que serán estimados.  $\pi(x)$  es la probabilidad de que  $y_i = 1$  para un  $x_i$  (proporción presencia/ausencia, P/A).  $\beta_0$  es la constante (intercepto) y  $\beta_1$  es el coeficiente de regresión (pendiente) que mide la tasa de cambio en  $\pi(x)$  para un cambio dado en  $X$  (Quinn y Keough, 2006).

A diferencia del método multivariado propuesto por Lande y Arnold (1983) para estimar el tipo y la intensidad de la selección, el análisis logístico considera el éxito reproductivo como una variable dicotómica, es decir, analiza dos datos por individuo, lo cual incrementa los grados de libertad del modelo. Los valores estimados no son directamente comparables con los coeficientes de regresión que describen el cambio evolutivo en la ecuación de Lande y Arnold (1983). Sin embargo, éstos pueden ser transformados en el equivalente estadístico de dichos

gradientes mediante el procedimiento propuesto por Janzen y Stern (1998) que consiste en multiplicar cada uno de los estimados por una constante que resulta de promediar los valores esperados (de todos los individuos incluidos en el análisis) de la probabilidad de que un individuo produzca una cápsula (Benítez-Vieyra *et al.* 2009; Tabla 3, ver coeficientes  $\alpha$  y  $\beta$ ). El error estándar obtenido para cada uno de los estimados fue multiplicado por la misma constante.

Debido a que los componentes principales se comportan como variables independientes que sintetizan la covariación en los atributos de interés y pueden ser usados en los modelos de regresión, estudios previos han evaluado el efecto de la selección natural sobre ellos (Parra-Tabla y Bullock, 2000; Ordano *et al.* 2008; Boege 2011). Así, los valores (*scores*) del CP1 y del CP2 obtenidos del ACP fueron incorporados simultáneamente en el análisis logístico como variables independientes que describen la variación en la morfología floral. En el mismo modelo se consideró el efecto de morfo, población, densidad, así como las interacciones: CP1  $\times$  población, CP2  $\times$  población, y morfo  $\times$  densidad. Ninguno de los términos que incluía la frecuencia de los morfos ni tampoco el término cuadrático densidad  $\times$  densidad tuvieron un efecto significativo sobre la variable de respuesta, por lo cual fueron eliminados del modelo. El número de eventos de éxito o fracaso al producir una cápsula fue la variable dependiente. Análisis preliminares en La Mariquita y Morse Canyon no detectaron un efecto del morfo intermedio sobre la probabilidad de producir frutos, por lo tanto, para poder analizar a las tres poblaciones en un modelo único (considerando que la población distílica Pinery Canyon presenta dos morfos), sólo se incluyó a los individuos del morfo corto y largo.

## Resultados

El análisis de componentes principales reveló que las cargas del CP1 fueron positivas, lo que apoya los resultados de Sosenski *et al.* (2010) en relación a que este componente representa la variación en el tamaño de la flor. En lo que respecta al CP2, las cargas positivas se relacionaron

con la longitud de los órganos sexuales cortos e intermedios, por lo que este componente puede interpretarse como la posición relativa de los órganos sexuales (Tabla 1). Los análisis de regresión lineal detectaron una relación negativa entre los scores del CP2 y el índice de reciprocidad en las tres poblaciones (Mariquita:  $F_{1, 704} = 130.53$ ,  $P < 0.0001$ ,  $R^2 = 0.15$ , Fig. 1A; Morse Canyon:  $F_{1, 644} = 169.19$ ,  $P < 0.0001$ ,  $R^2 = 0.20$ , Fig. 1B; Pinery Canyon:  $F_{1, 784} = 302.92$ ,  $P < 0.0001$ ,  $R^2 = 0.27$ , Fig. 1C). Estos resultados sugieren que el CP2 explica el reacomodo en la posición de los órganos sexuales asociado con un incremento en la reciprocidad ilegítima entre el morfo largo y corto (cruzas ilegítimas:  $L \times mS$  y  $S \times mL$ ).

El modelo de regresión logística no detectó un efecto significativo del CP1 (tamaño de la flor) ni del CP2 (posición de los órganos sexuales) sobre la probabilidad de producir una cápsula (Tabla 2). Sin embargo, los términos de interacción CP1  $\times$  población, y CP2  $\times$  población sí fueron significativos (Tabla 2), es decir, el efecto de ambos módulos florales sobre la adecuación de los individuos difiere entre poblaciones. El gradiente de selección obtenido de la relación entre el CP1 y la probabilidad de producir una cápsula fue positivo en Mariquita y negativo en Morse Canyon (Tabla 3), lo cual sugiere que la selección favorece a los individuos de flores grandes en Mariquita y de flores pequeñas en Morse Canyon (Fig. 2A). El análisis también encontró una relación positiva entre el CP2 y la probabilidad de producir una cápsula en Mariquita (Tabla 3; Fig. 2B). Esto significa que los individuos seleccionados son aquellos con valores más altos del CP2 a los que se asocia un índice de reciprocidad ilegítima más bajo. La relación entre el CP2 y el éxito reproductivo es inversa en Morse Canyon, pues la selección favorece a las plantas con valores más bajos del CP2, es decir, una alta reciprocidad ilegítima (Tabla 3; Fig. 2B).

El modelo reveló que la probabilidad de producir una cápsula difiere entre morfos (Tabla 2), lo cual se debe al efecto positivo del morfo largo sobre la variable de respuesta (Tabla 3). Es decir, las plantas de este morfo presentan una mayor probabilidad de producir cápsulas que las del morfo corto (morfo largo:  $p = 0.72$ ; morfo corto:  $p = 0.68$ ). El análisis también detectó

diferencias en la probabilidad de producir cápsulas entre poblaciones, pero sólo el efecto de Mariquita y de Morse Canyon fueron significativos (Tabla 2; La Mariquita:  $p=0.79$ ; Morse Canyon:  $p=0.49$ ). Por otro lado, mientras que la densidad por sí sola no afectó el éxito reproductivo de los individuos, la interacción morfo  $\times$  densidad tuvo un efecto significativo (Tabla 2) asociado al morfo largo (Tabla 3). Esto indica que el morfo de los individuos puede afectar su éxito reproductivo si estos se encuentran en un ambiente con pocas o muchas plantas. En términos generales, los resultados de esta parte de la investigación sugieren un efecto diferencial de la selección natural sobre los atributos florales en Mariquita y Morse Canyon. Sin embargo, en contra de lo esperado no hubo un efecto de la frecuencia ni de la densidad sobre la probabilidad de producir una cápsula.

## Discusión

Los resultados de este capítulo son contundentes al demostrar un efecto de la selección natural sobre la morfología floral de los morfos largo y corto durante la transición tristilia-distilia en *O. alpina*. Se detectó un efecto significativo del tamaño de la flor (CP1) y la posición relativa de los órganos sexuales (CP2) sobre el éxito reproductivo de los individuos en dos poblaciones de esta especie. Esto indica que ambos módulos florales se encuentran bajo el efecto de la selección y que ésta varía entre poblaciones. Aunque no se detectó una asociación entre la morfología floral y la probabilidad de producir un fruto en Pinery Canyon, esta relación fue significativa en La Mariquita y Morse Canyon. En el caso de La Mariquita, la selección favorece a los individuos con flores más grandes que presentan valores más altos para la posición relativa de los órganos sexuales (CP2), a los que se asocian bajos niveles de reciprocidad en las cruzas ilegítimas  $L \times mS$  y  $S \times mL$ . En Morse Canyon, en cambio, la probabilidad de producir una cápsula es mayor en aquellos individuos con flores más pequeñas y valores bajos o negativos del CP2 que promueven una alta reciprocidad ilegítima. Un trabajo reciente (Baena *et al.* enviado) apoya esta evidencia, pues reporta que el incremento en la reciprocidad entre los órganos sexuales del

morfo largo y corto durante la evolución de la distilia en *O. alpina* está relacionado con una alta probabilidad de que ocurra flujo de polen ilegítimo heteromórfico (en el que se incluyen las dos cruza modificadas:  $L \times mS$  y  $S \times mL$ ). La selección positiva sobre los dos módulos florales en La Mariquita y negativa sobre los mismos en Morse Canyon resalta la importancia de la selección correlativa en los casos en que dos o más atributos relacionados se mueven en la misma dirección.

Un estudio previo no detectó diferencias en la identidad de los polinizadores ni en la tasa de visitas entre los morfos en las tres poblaciones analizadas (Baena *et al.* enviado). Por lo tanto, el efecto diferencial de la selección en ambas poblaciones no parece ser el resultado de causas proximales ni ecológicas, sino de las restricciones impuestas por la matriz de varianza-covarianza de la flor. Esto significa que durante la evolución del fenotipo distílico derivado, la selección natural modificó la posición de los órganos sexuales a través de las correlaciones con los atributos de la corola, lo cual explicaría la reducción en el tamaño de la flor en Morse Canyon.

El equilibrio en las frecuencias de los tres morfos florales, y el buen funcionamiento del sistema de incompatibilidad en La Mariquita harían suponer que esta población se mantiene como un equilibrio evolutivamente estable. Bajo esta condición, se esperaría que los órganos sexuales de las plantas de los tres morfos estén ya tan ajustados morfológicamente entre sí, favoreciendo una alta reciprocidad legítima, que deberían presentar muy poca variación. Sin embargo, la evidencia demostró lo contrario. La presencia de una relación entre los caracteres florales y el éxito reproductivo de las plantas sugiere que esta población representa uno de los primeros pasos en la evolución de la tristilia hacia la distilia, lo cual implicaría que las flores se están modificando. La evidencia presentada por Weller *et al.* (2007) sostiene este resultado, pues aun cuando la producción de semillas a partir de cruza ilegítimas heteromórficas en esta población es mínima comparada con las cruza legítimas, existe una muy ligera modificación en el sistema de incompatibilidad, que asociada con niveles significativos de flujo ilegítimo de polen (Baena *et al.* enviado) podrían tener un efecto sobre la evolución de la morfología floral.

La evidencia de selección sobre los atributos florales en Morse Canyon coincide con lo esperado, pues la modificación total del sistema de incompatibilidad en esta población ha generado cambios en la morfología floral que incrementan la reciprocidad entre los órganos sexuales del morfo largo y corto. En este sentido, Weller *et al.* (2007) demostraron que aunque la producción de semillas a partir de las cruzas ilegítimas  $L \times mS$  y  $S \times mL$  en esta población es menor que la de las cruzas legítimas, es también mayor que la de otro tipo de cruzas ilegítimas. En contraste, la falta de un efecto significativo de la morfología floral sobre el éxito reproductivo de los individuos en Pinery Canyon apunta a que las presiones selectivas que operan sobre las flores durante la disolución de la tristilia son más intensas al inicio de la transición y se van relajando conforme el polimorfismo evoluciona hacia la distilia, pues probablemente el reacomodo en los órganos florales está en su etapa final. Por lo tanto, es probable que las características del fenotipo distílico derivado tengan ya muy poca variación y por eso no sea posible detectar selección. En ese sentido, la distilia en *O. alpina* podría ser interpretada como un polimorfismo evolutivamente estable que incrementa la transferencia de polen entre dos morfos. Aunque no se han realizado las cruzas que permitirían determinar el nivel de modificación en la incompatibilidad en esta población, el análisis de los flujos de polen demuestra que la probabilidad de recibir polen de cruzas legítimas e ilegítimas es equivalente (Baena *et al. enviado*), lo cual demuestra que el sistema de incompatibilidad está completamente modificado. Para evaluar la hipótesis de que la distilia es un estado evolutivamente estable sería interesante analizar la frecuencia con que este polimorfismo, en comparación con la tristilia, se ha perdido o modificado en las especies que lo presentan.

Otros estudios también han detectado un efecto de la selección sobre atributos florales morfológicos y fenológicos en especies tristílicas (O'Neil, 1997; Olsson, 2004; Hodgins y Barrett, 2008). En *N. triandrus*, por ejemplo, se reportó una relación negativa entre el tamaño de la flor y el número de semillas producidas por el morfo intermedio (Hodgins y Barrett, 2006a). Mientras que otro trabajo en la misma especie encontró un efecto positivo del número de flores

sobre la adecuación femenina y la presencia de selección estabilizadora sobre el ancho de la corola y la longitud de la flor a través de la función masculina (Hodgins y Barrett, 2008). En *L. salicaria* existe evidencia de selección sobre el tiempo de floración y la producción de flores (O'Neil, 1997; Olsson, 2004; Colautti y Barrett, 2010). Sin embargo, ningún trabajo hasta ahora analizó el cambio en las presiones de selección que operan sobre las flores durante la transición de la tristilia a la distilia.

El análisis de selección reveló que las plantas del morfo largo presentan una mayor probabilidad de producir cápsulas que las del morfo corto en La Mariquita y Morse Canyon. Varios trabajos en especies tristílicas también han detectado diferencias en el éxito reproductivo entre morfos (*D. verticillatus*, Eckert y Barrett, 1995; *L. salicaria*, Ågren, 1996; Ågren y Ericson, 1996; y *N. triandrus*, Hodgins y Barrett, 2006), pero algunos otros no (Barrett, 1977; Weller, 1981; Price y Barrett, 1982; Barrett *et al.* 1989). Aunque la diferencia en este caso es sólo del 6%, es probable que esté asociada con el sesgo hacia el morfo largo en las poblaciones tristílicas de *O. alpina* de la sección *Ionoxalis*. Debido a que la tasa de visita y el tipo de polinizadores no difiere entre morfos en ninguna de las dos poblaciones (Baena *et al. enviado*), la alta adecuación y frecuencia del morfo largo podría atribuirse a las ventajas asociadas con su genotipo recesivo y a que podría estar funcionando mejor como receptor de polen ya que tiene el estigma expuesto. Sin embargo, la hipótesis de la especialización sexual no ha sido probada experimentalmente en *O. alpina* (Dulberger, 1992; Eckert y Barrett, 1995). Este resultado sugiere que la variación en el éxito reproductivo entre morfos podría jugar un papel importante en la evolución de las frecuencias de los morfos, particularmente en condiciones de limitación por polen, por lo tanto, sería importante evaluar si las poblaciones de *O. alpina* presentan limitación por polen y si ésta varía entre morfos.

En contra de lo que se esperaba, no se detectó evidencia de selección dependiente de las frecuencias ni de la densidad en ninguna de las poblaciones, pero sí un efecto de la interacción morfo  $\times$  densidad asociado al morfo largo. Este resultado indica que aunque en términos

generales la densidad parece no afectar la adecuación, la probabilidad de que una planta del morfo largo produzca una cápsula está relacionada negativamente con el número de vecinos alrededor suyo. Es probable que aunque estar en un parche muy denso aparentemente representa una ventaja para las plantas porque eso incrementa su probabilidad de ser visitadas y conseguir pareja, existe un umbral de densidad por encima del cual esta ventaja se reduce si las plantas compiten por polinizadores.

La falta de un efecto significativo de los términos frecuencia y densidad, así como su interacción y el componente cuadrático densidad  $\times$  densidad sobre el éxito reproductivo de los individuos en las poblaciones podría tener distintas explicaciones. Una alternativa sería que la variación en densidad y frecuencia es demasiado baja como para apreciar un efecto significativo aunque lo hubiera. Por otro lado, si el área utilizada para estimar la frecuencia y la densidad de las plantas alrededor de cada individuo focal (equivalente a 1m<sup>2</sup>) no reflejara el verdadero rango de forrajeo de los polinizadores de *O. alpina*, el resultado encontrado podría deberse a un error de muestreo. Es decir, si la distancia a la que se desplazan los polinizadores dentro o entre parches fuera mayor a la que se consideró en este trabajo, es probable que el número total de plantas contadas alrededor de cada individuo marcado haya sido subestimado. Por lo tanto, sería importante determinar con precisión la distancia de forrajeo de los polinizadores, que según Hodgins y Barrett (2006b) podría estar relacionada negativamente con la densidad.

Por otro lado, debido a que el censo de densidad y frecuencia en cada población se realizó una sola vez a lo largo de toda la temporada reproductiva, es probable que éste no represente el verdadero entorno social de las plantas. Si existiera un patrón de variación temporal y/o espacial en la representación de los morfos en las poblaciones de *O. alpina*, Para resolver lo anterior, se requiere de un estudio longitudinal que permita dar un seguimiento más fino del entorno social de cada planta y así evaluar Además sería importante mapear las plantas en las poblaciones para determinar si la distribución de los morfos a lo largo de la temporada reproductiva es aleatoria o agregada.



Los resultados de este trabajo demuestran un efecto de la selección fenotípica sobre los atributos florales en dos poblaciones que representan el gradiente tristilia-distilia, pero no dependiente de las frecuencias ni de la densidad. Las presiones selectivas que operan sobre la morfología floral indican que los dos módulos florales de esta especie: el tamaño de la flor y la posición relativa de los órganos sexuales son esenciales durante el proceso de transferencia de polen y polinización que se lleva a cabo entre individuos de distintos morfos. Esta evidencia apoya los resultados de Sosenski *et al.* (2010) en relación a que la evolución de la distilia está asociada con modificaciones en el fenotipo floral que incrementan la reciprocidad ilegítima entre el morfo largo y corto. Sin embargo, la no detección de selección dependiente de las frecuencias y de la densidad pone a consideración el diseño experimental que deberá emplearse en estudios futuros de este tipo. Para tener un registro completo del verdadero contexto social que rodea a un individuo a lo largo de su temporada reproductiva, se sugiere un registro longitudinal de la densidad y la frecuencia o la modificación artificial de ambas variables.

#### Literatura citada

- Ågren J. 1996. Population size, pollinator limitation, and seed set in the self-incompatible herb *Lythrum salicaria*. *Ecology* **77**: 1779-1790.
- Ågren J. y Ericson L. 1996. Population structure and morph-specific fitness differences in tristylous *Lythrum salicaria*. *Evolution* **50**: 126-139.
- Alexandersson R. y Johnson S.D. 2002. Pollinator-mediated selection on flower-tube length in a hawkmoth-pollinated *Gladiolus* (Iridaceae). *Proceedings of the Royal Society of London B* **269**: 631-636.
- Baena F., Fornoni J., Sosenski P., Molina-Freaner F.E., Weller S.G., Pérez-Ishiwara R. & Domínguez C.A. Changes in reciprocal herkogamy during the tristily-distily transition in *Oxalis alpina* increases legitimate pollen transfer. *Enviado a Journal of Evolutionary Biology*.

- Barrett S.C.H. 1977. The breeding system of *Pontederia rotundifolia* L., a tristylous species. *New Phytologist* **78**: 209-220.
- Barrett S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews* **3**: 274-284.
- Barrett S.C.H. 2008. Major evolutionary transitions in flowering plant reproduction: An overview. *International Journal of Plant Sciences* **169**: 1-5.
- Barrett S.C.H., Morgan M.T. y Husband B.C. 1989. The dissolution of a complex genetic polymorphism: the evolution of self-fertilization in tristylous *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *Evolution* **43**: 1398-1416.
- Barrett S.C.H., Harder L.D. y Cole W.W. 2004. Correlated evolution of floral morphology and mating-type frequencies in a sexually polymorphic plant. *Evolution* **58**: 964-975.
- Bell G. 2008. *Selection. The mechanism of evolution*. Oxford University Press. Oxford.
- Benítez-Vieyra S., Medina A.M. y Cocucci A.A. 2009. Variable selection patterns on the labellum shape of *Geoblasta pennicillata*, a sexually deceptive orchid. *Journal of Evolutionary Biology* **22**: 2354-2362.
- Boege K. 2011. Induced responses to competition and herbivory: natural selection on multi-trait phenotypic plasticity. *Ecology* **91**: 2628-2637.
- Bennington C.C. y Stratton D.A. 1998. Field tests of density- and frequency-dependent selection in *Erigeron annuus* (Compositae). *American Journal of Botany* **85**: 540-545.
- Campbell D.R., Waser N.M., Price M.V., Lynch E.A. y Mitchell R.J. 1991. Components of phenotypic selection: pollen export and flower corolla width in *Ipomopsis aggregata*. *Evolution* **45**: 1458-1467.
- Campbell D.R. 1989. Measurements of selection in a hermaphroditic plant: variation in male and female pollination success. *Evolution* **43**: 318-334.
- Caruso C.M., Peterson S.B. y Ridley C.E. 2003. Natural selection on floral traits of *Lobelia* (Lobeliaceae): spatial and temporal variation. *American Journal of Botany* **90**: 1333-1340.

- Castillo R.A., Cordero C. y Domínguez C.A. 2002. Are reward polymorphisms subject to frequency- and density-dependent selection? Evidence from a monoecious species pollinated by deceit. *Journal of Evolutionary Biology* **15**: 544-552.
- Colautti R.I. y Barrett S.C.H. 2010. Natural selection and genetic constraints on flowering phenology in an invasive plant. *International Journal of Plant Sciences* **171**: 960-971.
- Conner J.K. 1997. Floral evolution in wild radish: The role of pollinators, natural selection, and genetic correlations among traits. *International Journal of Plant Sciences* **158**(6 Suppl.): S108-S120.
- Conner J.K. y Rush S. 1997. Measurements of selection on floral traits in black mustard, *Brassica nigra*. *Journal of Evolutionary Biology* **10**: 327-335.
- Cresswell J.E. y Galen C. 1991. Frequency-dependent selection and adaptive surfaces for floral character combinations: The pollination of *Polemonium viscosum*. *The American Naturalist* **138**: 1342-1353.
- Donohue K. 2004. Density-dependent multilevel selection in the great lakes Sea Rocket. *Journal of Ecology* **85**:180-191.
- Eckert C.E. y Barrett S.C.H. 1995. Style morph ratios in tristylous *Decodon verticillatus* (Lythraceae): selection versus historical contingency. *Ecology* **76**: 1051-1066.
- Eckert C.G., Manicacci D. y Barrett S.C.H. 1996. Frequency-dependent selection on morph ratios in tristylous *Lythrum salicaria* (Lythraceae). *Heredity* **77**: 581-588.
- Galen C. 1989. Measuring pollinator-mediated selection on morphometric traits: bumblebees and the alpine sky pilot, *Polemonium viscosum*. *Evolution* **43**: 882-890.
- Gigord L.D.B., Macnair M.R. y Smithson A. Negative frequency-dependent selection maintains a dramatic flower color polymorphism in the rewardless orchid *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soò. 2001. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 6253-6255.
- Groom M.J. 1998 Allee effects limit population viability of an annual plant. *American Naturalist* **151**: 487-496.

- Gunton R.M. y Kunin W.E. 2009. Density-dependence at multiple scales in experimental and natural plant populations. *Journal of Ecology* **97**: 567-580.
- Harder L.D. y Barrett S.C.H. Eds. 2006. *Ecology and evolution of flowers*. Oxford University Press, Oxford.
- Harder L.D. y Johnson S.D. 2009. Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. *New Phytologist* **183**: 1-16.
- Hodgins K.A. y Barrett S.C.H. 2006. Female reproductive success and the evolution of mating-type frequencies in tristylous populations. *New Phytologist* **171**: 569-580.
- Hodgins K.A. y Barrett S.C.H. 2006. Mating patterns and demography in the tristylous daffodil *Narcissus triandrus*. *Heredity* **96**: 262-270.
- Hodgins K.A. y Barrett S.C.H. 2008. Natural selection on floral traits through male and female function in wild populations of the heterostylous daffodil *Narcissus triandrus*. *Evolution* **62**: 1751-1763.
- Janzen F.J. y Stern H.S. 1998. Logistic regression for empirical studies of multivariate selection. *Evolution* **52**: 1564-1571.
- Johnson M.T.J., Agrawal A.A., Maron J.L. y Salminen J.-P. 2009. Heritability, covariation and natural selection on 24 traits of common evening primrose (*Oenothera biennis*) from a field experiment. *Journal of Evolutionary Biology* **22**: 1295-1307.
- Johnston M.O. 1991. Natural selection on floral traits in two species of *Lobelia* with different pollinators. *Evolution* **45**: 1468-1479.
- Lande R. y Arnold S.J. 1983. The measurement of selection on correlated characters. *Evolution* **37**: 1210-1226.
- Lloyd D.G. y Webb C.J. 1992. The evolution of heterostyly. En: Barrett S.C.H. Ed. *Evolution and Function of heterostyly*, pp. 151-178. Springer-Verlag, Berlín.
- Maad J. 2000. Phenotypic selection in hawk moth-pollinated *Platanthera bifolia*: targets and fitness surfaces. *Evolution* **54**: 112-123.

- McCauley D.E. y Brock M.T. 1998 Frequency-dependent fitness in *Silene vulgaris*, a gynodioecious plant. *Evolution* **52**: 30-36.
- Nattero J., Sérsic A.N. y Cocucci A.A. 2010. Patterns of contemporary phenotypic selection and flower integration in the hummingbird-pollinated *Nicotiana glauca* between populations with different flower-pollinator combinations. *Oikos* **119**: 852-863.
- O'Neil P. 1997. Natural selection on genetically correlated phenological characters in *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae). *Evolution* **51**: 267-274.
- Olsson K. 2004. Population differentiation in *Lythrum salicaria* along a latitudinal gradient. Doctoral Dissertation. Umeå University. Sweden.
- Ordano M., Fornoni J., Boege K. y Domínguez C.A. 2008. The adaptive value of phenotypic floral integration. *New Phytologist* **179**: 1183-1192.
- Parra-Tabla V. y Bullock S.H. 2000. Phenotypic natural selection on flower biomass allocation in the tropical tree *Ipomoea wolcottiana* Rose (Convolvulaceae). *Plant Systematics and Evolution* **221**:167-177.
- Parra-Tabla V. y Vargas C.F. 2004. Phenology and phenotypic natural selection on flowering time of a deceit-pollinated tropical orchid, *Myrmecophila christinae*. *Annals of Botany* **94**: 243-250.
- Price S.D. y Barrett S.C.H. 1982. Tristyly in *Pontederia cordata*. *Canadian Journal of Botany* **60**: 897-905.
- Quinn G.P. y Keough M.J. 2006. *Experimental design and data analysis for biologist*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Silander J.A. 1978. Density-dependent control of reproductive success in *Cassia biflora*. *Biotropica* **10**: 292-296.
- Sosenski P., Fornoni J., Molina-Freaner F.E., Weller S.G. y Domínguez C.A. 2010. Changes in sexual organ reciprocity and phenotypic floral integration during the tristyly-distyly transition in *Oxalis alpina*. *New Phytologist* **185**: 829-840.

- Stanton M.L. y Young H.J. 1994. Selecting for floral character associations in wild radish, *Raphanus sativus* L. *Journal of Evolutionary Biology* **7**: 271-285.
- Stehlik I., Caspersen J.P. y Barrett S.C.H. 2006. Spatial ecology of mating success in a sexually polymorphic plant. *Proceedings of the Royal Society B* **273**: 387-394.
- Thompson J.D., Barrett S.C.H. y Baker A.M. 2003. Frequency-dependent variation in reproductive success in *Narcissus*: implications for the maintenance of stigma-height dimorphism. *Proceedings of the Royal Society of London B* **270**: 949-953.
- van Kleunen M. y Burczyk J. 2008. Selection on floral traits through male fertility in a natural plant population. *Evolutionary Ecology* **22**: 39-54.
- Weller S.G. 1981. Fecundity in populations of *Oxalis alpina* in southeastern Arizona. *Evolution* **35**: 197-200.
- Weller S.G., Domínguez C.A., Molina-Freaner F.E., Fornoni J. y LeBuhn G. 2007. The evolution of distyly from tristily in populations of *Oxalis alpina* (Oxalidaceae) in the Sky Islands of the Sonoran Desert. *American Journal of Botany* **94**: 972-985.

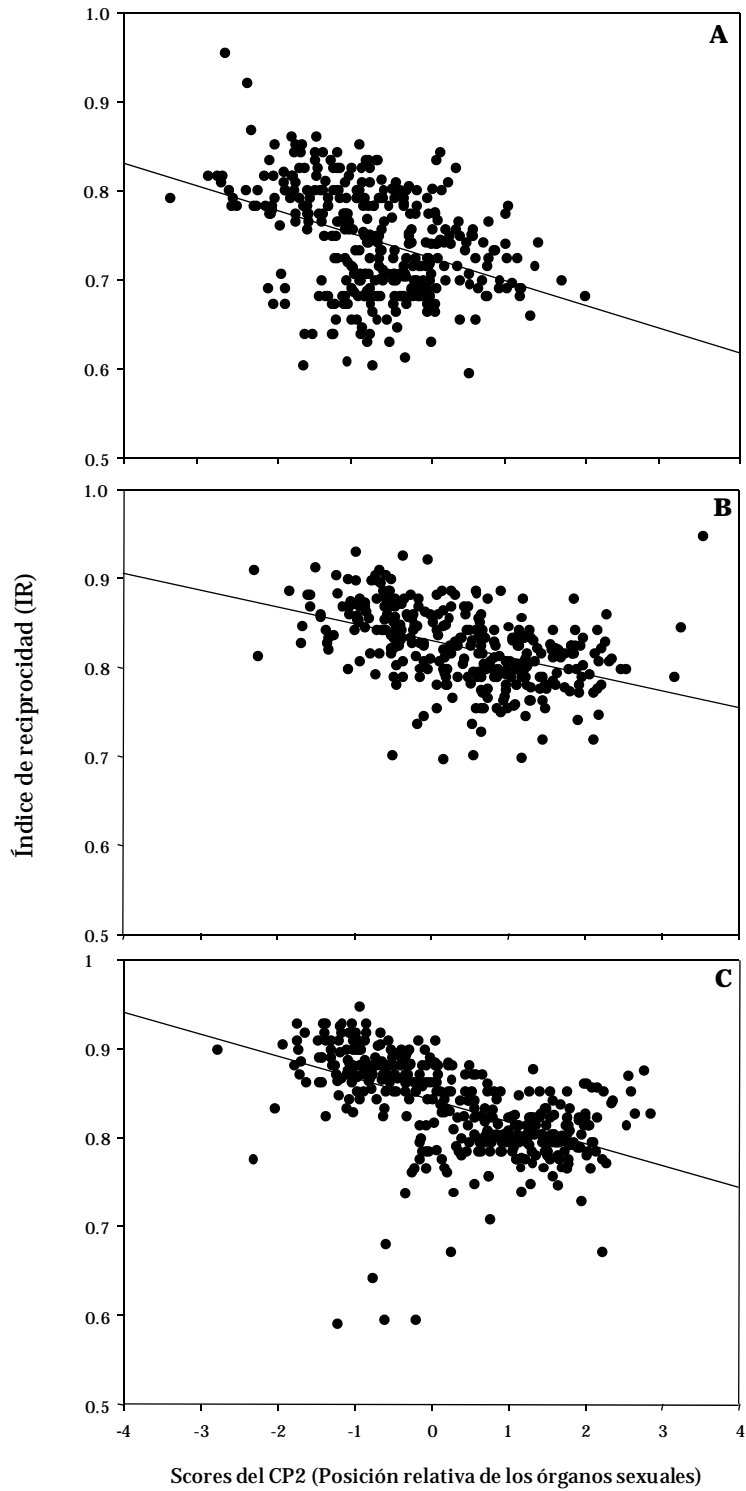


Figura 1. Relación entre los scores del CP2 (posición relativa de los órganos sexuales) y el índice de reciprocidad en Mariquita (A), Morse Canyon (B) y Pinery Canyon (C).

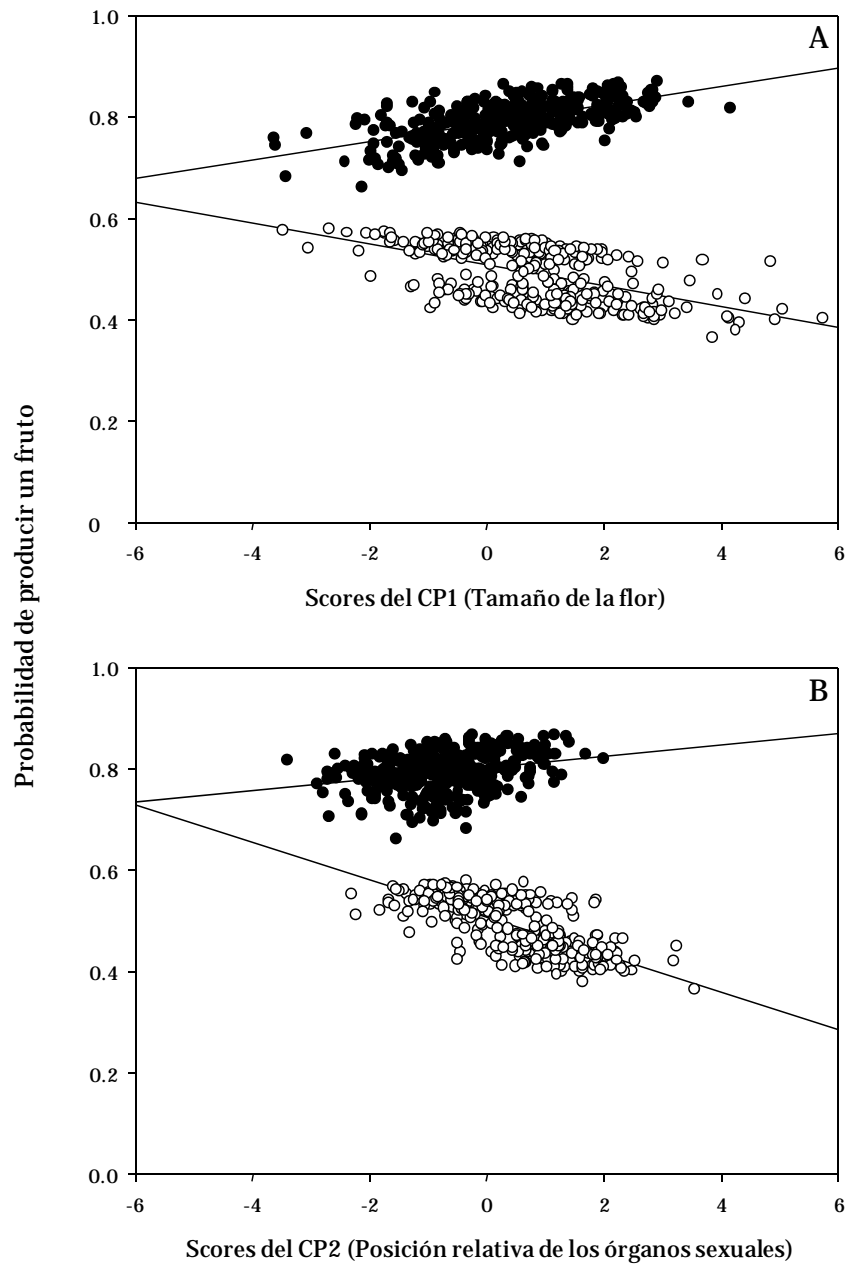


Figura 2. Relación entre el CP1 (tamaño de la flor; A) y el CP2 (posición relativa de los órganos sexuales; B) y la probabilidad de producir frutos en dos poblaciones de *O. alpina*: Mariquita (círculos negros) y Morse Canyon (círculos blancos).



Tabla 1. Resultados de un análisis de componentes principales (ACP) sobre cinco atributos florales en el morfo largo y corto de tres poblaciones de *Oxalis alpina*.

	CP1	CP2
% de varianza explicada	44.60	26.86
Varianza acumulada	44.60	71.47
Longitud del pétalo	0.51	-0.26
Ancho del pétalo	0.36	0.67
Órganos sexuales cortos	0.41	0.57
Órganos sexuales intermedios	0.44	0.50
Órganos sexuales largos	0.47	-0.29

Tabla 2. Modelo de regresión logística nominal que evalúa el efecto de la morfología floral (CP1: tamaño floral y CP2: posición de los órganos sexuales), el morfo, la población y la densidad de individuos sobre la adecuación femenina (como el número de eventos de éxito o fracaso de una planta para producir un fruto) de los individuos en tres poblaciones de *O. alpina*.

Fuente de variación	g.l.	$X^2$	P
CP1	1	0.82	0.3646
CP2	1	2.32	0.1276
Morfo	1	5.86	0.0154
Población	2	218.54	< 0.0001
CP1 × Población	2	6.17	0.0456
CP2 × Población	2	6.63	0.0362
Densidad	1	0.28	0.5966
Morfo × Densidad	1	10.29	0.0013

Tabla 3. Transformación de los valores estimados obtenidos ( $\alpha$ ) por el modelo de regresión logística en los gradientes de selección lineal ( $\beta$ ) que explican el cambio evolutivo según la ecuación de Lande y Arnold (1983). Para la descripción del procedimiento ver Janzen y Stern (1998).

<b>Fuente de variación</b>	<b><math>\alpha</math></b>	<b>ES</b>	<b><math>\beta</math></b>	<b>ES</b>
CP1	0.026	0.029	0.018	0.020
CP2	0.069	0.046	0.049	0.032
Morfo (L)	0.110	0.455	0.077	0.320
Población (Mar)	0.509	0.073	0.358	0.052
Población (Mor)	-0.908	0.063	-0.638	0.044
CP1 $\times$ Población (Mar)	0.105	0.044	0.074	0.031
CP1 $\times$ Población (Mor)	-0.072	0.037	-0.050	0.026
CP2 $\times$ Población (Mar)	0.127	0.062	0.089	0.044
CP2 $\times$ Población (Mor)	-0.124	0.049	-0.087	0.034
Densidad	0.003	0.006	0.002	0.004
Morfo (L) $\times$ Densidad	-0.018	0.006	-0.013	0.004

Morfo (L) se refiere al morfo largo; Población (Mar=Mariquita, Mor=Morse Canyon).

## Discusión general

Teóricamente se ha considerado a la tristilia como una estrategia evolutivamente estable, sin embargo, se ha demostrado que su disolución a otros sistemas reproductivos es un fenómeno común al menos en las especies revisadas en el capítulo 1 que representan a cuatro de las seis familias que han sido reportadas como tristílicas (Amaryllidaceae, Lythraceae, Oxalidaceae y Pontederiaceae). La pérdida de la isopletería en las poblaciones tristílicas, así como la presencia de poblaciones distílicas y algunas monostílicas en dichas especies es una evidencia de ello.

Con el fin de evaluar los procesos que explican la variación en las frecuencias de los morfos que caracterizan la disolución de la tristilia en las especies analizadas, el capítulo 1 puso a prueba dos hipótesis. Si la variación en las frecuencias de los morfos o la pérdida de un morfo en las poblaciones de una especie es aleatoria, entonces podría ser el resultado de la deriva génica. En contraste, cuando existe un patrón en el sesgo hacia algún morfo o en la pérdida de los morfos en las poblaciones de una especie, estos podrían atribuirse a la selección natural que de manera consistente actúa en contra de ciertos morfos. Los resultados revelaron que la pérdida de la isopletería en las poblaciones de *O. alpina* y *N. triandrus* se caracteriza, en términos generales, por un sesgo hacia el morfo largo y la baja frecuencia o la pérdida del morfo intermedio. Aunque las poblaciones de *L. salicaria* también presentan un exceso de plantas del morfo largo, el morfo que se pierde comúnmente es el corto, mientras que las poblaciones de *P. cordata* presentan un sesgo hacia los individuos del morfo corto y un déficit de plantas del morfo largo. La evolución convergente de las poblaciones distílicas a través de la pérdida recurrente de un mismo morfo, así como el sesgo hacia otro morfo en las poblaciones anisopléticas de las especies mencionadas sugiere un efecto de la selección sobre las frecuencias de los morfos en las poblaciones. Sin embargo, un estudio reciente propuso que si bien las presiones selectivas en contra del morfo intermedio fueron determinantes para su desaparición en las poblaciones distílicas de *O. alpina*, la distribución de esta especie en áreas donde los eventos fundador han sido muy intensos sugiere también un efecto importante de la deriva génica en la evolución de la distilia (Pérez-

Alquicira *et al.* 2010). Por otro lado, Barrett *et al.* (2004) reportaron un efecto latitudinal sobre la frecuencia del morfo intermedio en las poblaciones de *N. triandrus*, sin embargo, hasta el momento no hay una explicación concreta de cómo este tipo de agentes operarían diferencialmente sobre los morfos. El análisis de la variación geográfica en la abundancia y el tipo de polinizadores podría ayudar a resolver esta interrogante.

A diferencia de los resultados que apoyan un efecto de la selección en *O. alpina*, *N. triandrus*, *L. salicaria* y *P. cordata*, no parece haber un patrón en la variación de las frecuencias de los morfos (sesgo, déficit y pérdida) en las poblaciones de *D. verticillatus*. Esto significa que la evolución de la distilia y la monostilia en esta especie podría ser una consecuencia de la deriva génica. Es importante destacar que la evidencia obtenida a partir del capítulo 1 se basa en una aproximación estadística que considera el número de poblaciones que perdieron un morfo o presentan un sesgo hacia algún morfo. Por lo tanto, las conclusiones propuestas quedan a reserva de evaluar un mayor número de poblaciones en cada especie y de utilizar otras herramientas, como los marcadores moleculares que permitan estudiar, de una manera más fina, la variación dentro y entre las poblaciones.

El capítulo 2 puso a prueba la hipótesis de que la evolución de la distilia a partir de la tristilia en *O. alpina* debería generar un ajuste en la posición de los órganos sexuales de los morfos largo y corto que favoreciera un incremento en la transferencia de polen entre ellos. Además, dado que la flor es una estructura integrada por diversos atributos que covarían entre sí, se esperaba que otros caracteres florales también fueran afectados. Consecuentemente se predijo que la magnitud y el patrón de la integración floral fenotípica deberían modificarse durante la evolución de un fenotipo distílico derivado. Los resultados del capítulo 2 revelaron, como se esperaba, un cambio en la posición de los órganos sexuales de los morfos largo y corto que incrementa la reciprocidad entre ellos. Sorpresivamente, dicho reajuste involucró una reducción en el tamaño floral. Este resultado no se esperaba, ya que en teoría el tamaño de las flores se encuentra bajo selección mediada por polinizadores, sin embargo, la identidad de éstos

no difiere entre las poblaciones distílicas y tristílicas de *O. alpina*. Esto sugiere que aunque la selección natural ha dirigido al fenotipo floral hacia el pico adaptativo distílico a través de una alta reciprocidad entre los órganos sexuales, las restricciones impuestas por la estructura de la matriz de varianza-covarianza fenotípica han favorecido la evolución de flores más pequeñas. Por último, los resultados del capítulo 2 demostraron que la evolución de la distilia no afectó la magnitud de la integración floral, lo cual pone a discusión su papel adaptativo durante la evolución de un fenotipo distílico. En contraste, sí hubo una relación significativa entre el patrón de la integración floral y el nivel de modificación en la incompatibilidad, lo cual apoya la hipótesis de que las relaciones entre los atributos de la flor se modificaron durante la disolución de la tristilia.

La comprobación de la hipótesis de una modificación en el fenotipo floral que incrementa la reciprocidad durante la evolución de la distilia en poblaciones controladas de *O. alpina* destacó la importancia de estudiar la intensidad de la selección natural en una especie con un sistema reproductivo en transición. Por lo tanto, el capítulo 3 tuvo como objetivo general evaluar el régimen selectivo que se establece en tres poblaciones naturales de *O. alpina* que representan la transición tristilia-distilia. El primer objetivo particular consistió en analizar el efecto de los atributos florales sobre el éxito reproductivo de las plantas del morfo largo y corto.

En términos generales, los resultados del análisis de selección son consistentes con la hipótesis de un efecto diferencial de la selección sobre la morfología floral en las tres poblaciones, dadas las diferencias en el nivel de modificación de la incompatibilidad y la frecuencia del morfo intermedio entre ellas. Se detectó un efecto de la posición relativa de los órganos sexuales y el tamaño de la flor sobre el éxito reproductivo de las plantas en La Mariquita, la población tristílica isoplética con una ligera modificación, y en Morse Canyon, la población tristílica completamente modificada. Aunque los resultados en Morse Canyon apoyan la predicción propuesta para esa población, no se esperaba que la morfología floral estuviera bajo selección en La Mariquita, pues la alta reciprocidad que existe entre los tres morfos florales

haría suponer que los atributos están ya muy ajustados. Sin embargo, la ligera modificación en el sistema de incompatibilidad supone que esta población representa uno de los primeros pasos en la evolución de un fenotipo floral distílico. Por otro lado, como se esperaba, los atributos florales parecen no estar bajo selección en la población distílica Pinery Canyon, lo cual sugiere que ésta podría estar ya muy cerca del pico adaptativo en el que la transferencia de polen entre sólo dos morfos es eficiente. Evidencia reciente en la misma población confirman este resultado pues la probabilidad de producir semillas a partir de cruzas legítimas es equivalente a la de cruzas ilegítimas (Baena *et al. enviado*). Los resultados de esta parte de la investigación apuntan a que la selección natural ha jugado un papel fundamental en la evolución de un fenotipo floral derivado que incrementa la reciprocidad ilegítima entre los órganos sexuales de los morfos largo y corto cuando se pierde el morfo intermedio y se modifica el sistema de incompatibilidad.

El análisis de selección también reveló que la probabilidad de producir cápsulas es mayor en el morfo largo que en el corto, sin embargo, un estudio previo no detectó diferencias en las tasas de visitas (Baena *et al. enviado*) entre ambos. Esto indica que la variación en el éxito reproductivo en *O. alpina* no está relacionada con las preferencias de los polinizadores sino con otros factores como podría ser la eficiencia en la polinización o la limitación por polen. Aunque ambos morfos son visitados con la misma frecuencia, si el morfo largo funcionara mejor como receptor al tener el estigma expuesto, es probable que la desventaja del morfo corto se debiera a que presenta limitación por polen. Para probar esta hipótesis se requiere evaluar experimentalmente si las poblaciones de *O. alpina* presentan limitación por polen y si ésta difiere entre morfos, para lo cual se requiere contar con el número de semillas como medida de adecuación. La variación en el éxito reproductivo femenino entre morfos juega un papel importante en la evolución de las frecuencias de los morfos, por lo tanto, es probable que la ventaja del morfo largo esté relacionado con su alta frecuencia en las poblaciones analizadas en el capítulo 1.

Dado que el apareamiento entre las plantas tristílicas no sólo depende de las características florales, sino de la densidad y la frecuencia de los morfos, el segundo objetivo del capítulo 3 fue evaluar el efecto de ambos parámetros sobre el éxito reproductivo de las plantas de *O. alpina*. Los resultados del análisis de selección no apoyaron la hipótesis de que la probabilidad de producir una cápsula debería estar asociada con procesos dependientes de la densidad y la frecuencia, ya que su efecto no fue significativo en ninguna población. La falta de evidencia al respecto sugiere varias explicaciones y pone a discusión el diseño experimental a desarrollarse en este tipo de estudios.

Una de las predicciones del capítulo 3 fue que debería haber un efecto balanceador de la densidad sobre el éxito reproductivo de las plantas, es decir, si un gran despliegue floral generara competencia por polinizadores se esperaría que la selección natural favoreciera un valor de densidad óptimo que redujera los costos de la competencia, pero al mismo tiempo incrementara la atracción de las plantas. La floración sincrónica intraespecífica, en este sentido, promovería el entrecruzamiento y altos niveles de flujo génico. Sin embargo, este efecto no se detectó. En contraste, O'Neil (1997) detectó selección estabilizadora y direccional sobre la fenología floral en *L. salicaria*. Al mismo tiempo, diversos estudios han sugerido que los patrones de fenología floral están sujetos a la heterogeneidad ambiental (Lobo *et al.* 2003; Hirao y Kudo, 2008; Stevenson *et al.* 2008; Munguía-Rosas *et al.* 2011). Olsson y Agren (2003), por ejemplo, detectaron variación interpoblacional en la fenología floral de la especie tristílica *L. salicaria* como consecuencia de la altitud. Aunque se desconoce si la floración en las poblaciones de *O. alpina* está determinada por causas proximales, no se descarta la posibilidad de que el tiempo de floración pudiera variar a una escala espacio-temporal. Esto podría influir sobre la dispersión de polen y el éxito reproductivo de las plantas si la densidad afectara la preferencia en el forrajeo y esto se reflejara en una disminución en la frecuencia de visitas. En este caso, es probable que un solo censo poblacional a lo largo de la temporada reproductiva no represente la densidad real asociada a cada individuo focal.

Otra de las predicciones de este trabajo fue que debería haber selección negativa dependiente de las frecuencias en las tres poblaciones. Esto significa que el éxito reproductivo de las plantas de un morfo debería incrementarse cuando su frecuencia es baja, ya que eso aumentaría la probabilidad de conseguir una pareja de un morfo distinto al suyo. Esta predicción no se cumplió. El análisis no detectó un efecto de la frecuencia sobre el éxito reproductivo de las plantas en ninguna población. Este resultado podría estar relacionado con la escala temporal a la que se realizó el censo de los morfos en las poblaciones. Es muy probable que el conteo de las frecuencias en un momento particular de la temporada reproductiva no sea una representación fidedigna del contexto social de las plantas. Para resolver esta dificultad, habría censar la frecuencia de los morfos longitudinalmente o en varios intervalos, o diseñar un experimento en el cual se modifiquen artificialmente las frecuencias. Por otro lado, sería importante evaluar si existe o no un patrón de agregación temporal y espacial de los morfos para lo cual habría que mapear a las plantas. Stehlik *et al.* (2006), por ejemplo, encontraron diferencias en la agregación espacial de los morfos largo y corto en las poblaciones de la especie distílica *Narcissus assoanus*. Otro estudio, en cambio, detectó que la frecuencia de los morfos en las poblaciones de *Eichhornia paniculata* varía entre años (Husband y Barrett, 1992). Sin embargo, Hodgins y Barrett (2008) no detectaron variación temporal en la representación de los morfos florales en poblaciones de *N. triandrus* censadas en intervalos de 2 a 10 años.

Aunque las observaciones en campo sugieren que el apareamiento en las poblaciones de *O. alpina* generalmente ocurre entre plantas muy cercanas, es probable que el área considerada (1m<sup>2</sup>) para estimar la densidad y la frecuencia de los morfos asociadas a cada individuo focal no reflejara el verdadero rango de forrajeo de los polinizadores, y por lo tanto, tampoco la escala espacial a la que ocurre el apareamiento. Sin embargo, asumiendo que las distancias de forrajeo de los polinizadores generalmente se relacionan negativamente con la densidad, a través de una aproximación experimental muy similar, Hodgins y Barrett (2006) evaluaron la densidad en poblaciones distílicas y tristílicas de *N. triandrus* como la distancia promedio de cada planta



focal a los tres individuos más cercanos, la cual reportaron, está muy relacionada con el número de individuos por m<sup>2</sup>. Los resultados de esta parte sugieren que la detección de selección dependiente de la densidad y la frecuencia es muy susceptible a los patrones espaciales de distribución de las plantas (Brys *et al.* 2007; Brys *et al.* 2008). Por lo tanto para tener un mejor aproximado de la escala a la que operan las abejas y a la cual sería más factible detectar un efecto de la densidad y la frecuencia, habría que estimar la distancia a la que se mueven los polinizadores entre plantas y entre parches. Sin embargo, este tipo de análisis podrían no ser concluyentes si el flujo génico se extendiera más allá del área de los donadores considerados en el muestreo, lo cual podría modificar la distancia de dispersión (Hodgins y Barrett, 2008).

#### *Perspectivas futuras en el estudio de la tristilia*

Aunque el uso de marcadores moleculares ha permitido un gran avance en el estudio de la variación en las poblaciones tristílicas de varias especies, su contribución será indispensable para reconstruir la ruta evolutiva de la tristilia y para comprender los mecanismos evolutivos implicados en la transición de un sistema reproductivo a otro (Husband y Barrett, 1993; Kohn *et al.* 1996; Graham y Barrett, 2004; Ren *et al.* 2005; Hodgins y Barrett, 2006b, Pissard *et al.* 2006; Hodgins y Barrett, 2007; Tsyusko *et al.* 2007; Pérez-Alquicira *et al.* 2010). Indudablemente, uno de los aspectos más oscuros en torno al estudio de la evolución de la tristilia ha sido no poder determinar el punto de origen ni el fenotipo floral del ancestro de las especies tristílicas. Por lo tanto, será necesario desarrollar nuevos modelos que permitan inferir no sólo la morfología floral del probable ancestro, sino a los mecanismos involucrados en el origen de los tres morfos.

A pesar de la gran importancia del sistema de incompatibilidad en el funcionamiento y mantenimiento de la tristilia en muchas especies, prácticamente se desconocen los mecanismos moleculares de la incompatibilidad heteromórfica. El desarrollo de estudios en este campo permitirá un mejor entendimiento de los factores del polen y del estilo involucrados en las

reacciones de incompatibilidad, los cuales podrían ser determinantes en la evolución de un sistema reproductivo a otro (Kutaka *et al.* 2011). Por otra parte, aunque la hipótesis del supergen ha sido retomada en numerosas ocasiones, hasta ahora no ha podido ser comprobada. Por lo tanto, el desarrollo de investigaciones encaminadas a la determinación de los genes que controlan la tristilia, así como su localización en el genoma, será fundamental para lograr definir los procesos genéticos y del desarrollo que explican la evolución del fenotipo floral en especies tristílicas (Barrett *et al.* 2000).

#### Literatura citada

- Baena F., Fornoni J., Sosenski P., Molina-Freaner F.E., Weller S.G., Pérez-Ishiwara R. y Domínguez C.A. Changes in reciprocal herkogamy during the tristily-distily transition in *Oxalis alpina* increases legitimate pollen transfer. *Enviado a International Journal of Plant Sciences*.
- Barrett S.C.H., Harder L.D. y Cole W.W. 2004. Correlated evolution of floral morphology and mating-type frequencies in a sexually polymorphic plant. *Evolution* **58**: 964-975.
- Brys R., Jacquemyn H. y Hermy M. 2007. Impact of mate availability, population size, and spatial aggregation of morphs on sexual reproduction in a distylous, aquatic plant. *American Journal of Botany* **94**: 199-127.
- Brys R., Jacquemyn H. y Beeckman T. 2008. Morph-ratio variation, population size and female reproductive success in distylous *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *American Journal of Botany* **21**: 1281-1289.
- Graham S.W. y Barrett S.C.H. 2004. Phylogenetic reconstruction of the evolution of stilar polymorphisms in *Narcissus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* **91**: 1007-1021.
- Hirao A.S. y Kudo G. 2008. The effect of segregation of flowering time on fine-scale spatial genetic structure in an alpine-snowbed herb *Primula cuneifolia*. *Heredity* **100**: 424-430.

- Hodgins K.A. y Barrett S.C.H. 2006. Mating patterns and demography in the tristylous daffodil *Narcissus triandrus*. *Heredity* **96**: 262-270.
- Hodgins K.A. y Barrett S.C.H. 2007. Population structure and genetic diversity in tristylous *Narcissus triandrus*: insights from microsatellite and chloroplast DNA variation. *Molecular Ecology* **16**: 2317-2332.
- Hodgins K.A. y Barrett S.C.H. 2008. Geographic variation in floral morphology and style-morph ratios in a sexually polymorphic daffodil. *American Journal of Botany* **95**: 185-195.
- Husband B.C. y Barrett S.C.H. 1992. Pollinator visitation in populations of tristylous *Eichhornia paniculata* in northeastern Brazil. *Oecologia* **89**: 365-371.
- Husband B.C. y Barrett S.C.H. 1993. Multiple origin of self-fertilization in tristylous *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae): inferences from style morph and isozyme variation. *Journal of Evolutionary Biology* **6**: 591-608.
- Kohn J.R., Graham S.W., Morton B., Doyle J.J. y Barrett S.C.H. 1996. Reconstruction of the evolution of reproductive characters in Pontederiaceae using phylogenetic evidence from chloroplast restriction-site variation. *Evolution* **50**: 1454-1469.
- Kutaka J.J., Weller S.G., Domínguez C.A., Sakai A.K., Molina-Freaner F.E., Sosenski P. & Fornoni J. 2011. Female and male mediation of incompatibility modifications during the tristily-distily transition in *Oxalis alpina*. *International Journal of Plant Sciences* **172**: 644-654.
- Lobo J.A., Quesada M., Stoner K.E., Fuchs E.J., Herrerías-Diego Y., Rojas J. y Saborío G. 2003. Factors affecting phenological patterns of Bombaceous trees in seasonal forests in Costa Rica and Mexico. *American Journal of Botany* **90**: 1054-1063.
- Munguía-Rosas M.A., Ollerton J., Parra-Tabla V. y De-Nova J.A. 2011. Meta-analysis of phenotypic selection on flowering phenology suggests that early flowering plants are favoured. *Ecology Letters* **14**: 511-521.

- O'Neil P. 1997. Natural selection on genetically correlated phenological characters in *Lythrum salicaria* L. (Lythraceae). *Evolution* **51**: 267-274.
- Olsson K. y Agren J. 2002. Latitudinal population differentiation in phenology, life history and flower morphology in the perennial herb *Lythrum salicaria*. *Journal of Evolutionary Biology* **15**: 983-996.
- Pérez-Alquicira J., Molina-Freaner F.E., Piñero D., Weller S.G., Martínez-Meyer E., Rozas J. y Domínguez C.A. 2010. The role of historical factors and natural selection in the evolution of breeding systems of *Oxalis alpina* in the Sonoran desert "Sky Islands". *Journal of Evolutionary Biology* **23**: 2163-2175.
- Pissard A., Ghislain M. y Bertin P. 2006. Genetic diversity of the Andean tuber-bearing species, oca (*Oxalis tuberosa* Mol.), investigated by inter-simple sequence repeats. *Genome* **49**: 8-16.
- Ren M.X., Zhang Q.G. y Zhang D.Y. 2005. Random amplified polymorphic DNA markers reveal low genetic variation and a single dominant genotype in *Eichhornia crassipes* populations throughout China. *Weed Research* **45**: 236-244.
- Stehlik I., Caspersen J.P. y Barrett S.C.H. 2006. Spatial ecology of mating success in a sexually polymorphic plant. *Proceedings of the Royal Society B* **273**: 387-394.
- Stevenson P.R., Castellanos M.C., Cortés A.C. y Link A. 2008. Flowering patterns in a seasonal tropical lowland forest in western Amazonia. *Biotropica* **40**: 559-567.
- Tsyusko O.V., Tuberville T.D., Peters M.B., Crawford N., Hagen C., Weller S.G., Sakai A.K., Glenn T.C. 2007. Microsatellite markers isolated from polyploid wood-sorrel *Oxalis alpina* (Oxalidaceae). *Molecular Ecology Notes* **7**: 1284-1286.

## **Apéndice**

**La mediación femenina y masculina de las modificaciones en la incompatibilidad durante la transición tristilia - distilia en *Oxalis alpina***

## FEMALE AND MALE MEDIATION OF INCOMPATIBILITY MODIFICATIONS DURING THE TRISTYLY-DISTYLY TRANSITION IN *OXALIS ALPINA*

Julia J. Kutaka,<sup>\*†</sup> Stephen G. Weller,<sup>1,\*</sup> César A. Domínguez,<sup>‡</sup> Ann K. Sakai,<sup>\*</sup> Francisco E. Molina-Freaner,<sup>§</sup> Paula Sosenski,<sup>‡</sup> and Juan Fornoni<sup>‡</sup>

<sup>\*</sup>Department of Ecology and Evolutionary Biology, University of California, Irvine, California 92697, U.S.A.; <sup>†</sup>Department of Cell and Developmental Biology, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee 37232, U.S.A.; <sup>‡</sup>Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, C.P. 04510, México Distrito Federal, México; and <sup>§</sup>Departamento de Ecología de la Biodiversidad, Estación Regional del Noroeste, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 1354, C.P. 83000, Hermosillo, Sonora, México

Transitions between breeding systems offer an opportunity to understand the selective forces underlying these changes. In the evolutionary transition from tristylous to distylous, changes in tristylous self-incompatibility (SI) may be associated with modifications of female function, male function, or both. To test the hypothesis that modifications of pollen incompatibility reactions are associated with these changes, we used reciprocal factorial crosses in two *Oxalis alpina* populations that differed in their incompatibility relationships. Contrary to predictions, the population exhibiting stronger tristylous SI showed significant variation in both female and male components of incompatibility. The population with more highly modified tristylous SI at a putatively later stage in the evolution of distylous had less variation in both paternal and maternal control of incompatibility. The more highly modified population also showed evidence of correlations between the changes in maternal and paternal components of tristylous SI and between incompatibility and changes in floral morphology. Comparisons of these populations indicate that modifications of both female and male components of tristylous SI may occur before changes in floral morphology during the transition from tristylous to distylous in *O. alpina*.

**Keywords:** distylous, legitimate crosses, illegitimate crosses, reciprocal factorial crosses, *Oxalis alpina*, tristylous self-incompatibility, tristylous.

### Introduction

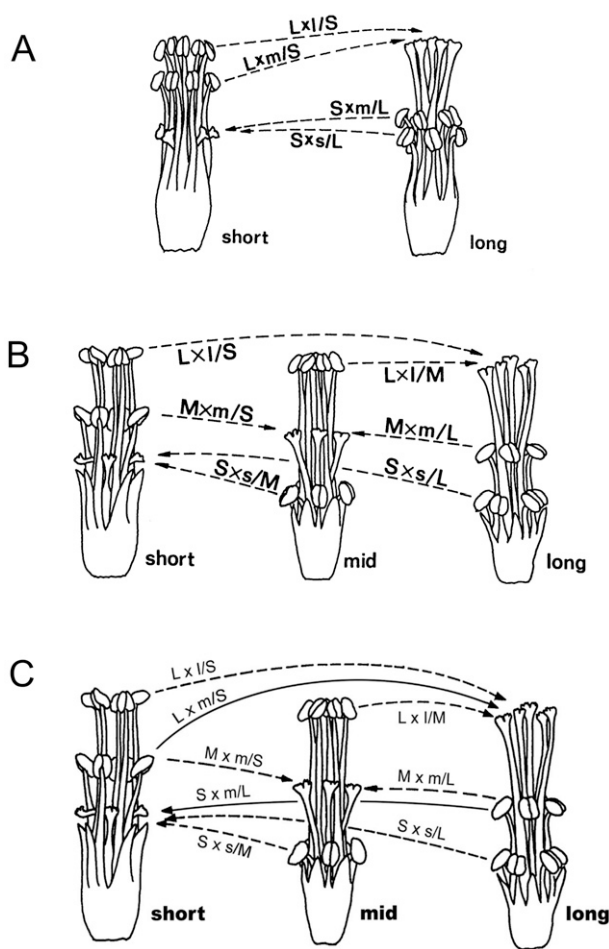
Flowering plants have a remarkable variety of breeding systems that influence genetic variation and the potential for evolutionary change. Evolutionary modifications of breeding systems often have profound effects on both the population biology of species and the evolutionary diversification of lineages, which underscores the importance of determining the factors underlying these changes (Barrett 2010). Because of the often deleterious effects of self-fertilization, plants have evolved diverse mechanisms to prevent self-fertilization and promote outcrossing. Self-incompatibility (SI) is a common breeding system in hermaphroditic plants wherein the stigma or the style rejects pollen produced by the same plant or by other plants with the same incompatibility type (Allen and Hiscock 2008).

In heterostylous, self-incompatible species, two or three self-incompatible mating types occur in a population and the positions of the stigmas and anthers vary with the mating type (Barrett 1992; Barrett and Shore 2008). In distylous species, the short-styled floral morph has stigmas that are located in the lower position of the flower and anthers that are located in the upper position, while in the long-styled floral morph, the positions of the stigmas and anthers are reversed

(fig. 1A). In tristylous species, stigmas occupy the lowest (in the short-styled morph), middle (in the mid-styled morph), or highest (in the long-styled morph) position, with anthers occupying the other two positions (fig. 1B). In both distylous and tristylous, only pollinations between pollen from anthers and stigmas at the same level, which were termed “legitimate” by Darwin (1877), typically lead to fertilization and seed production. Illegitimate crosses are those occurring between anthers and stigmas located at different levels, including all self-pollinations, and they typically do not produce viable seeds because of the incompatibility system. Mechanisms of control of the incompatibility between pollen and stigmas from different levels are not well understood and may be the result of maternal control expressed in the stigma, style, or ovary or paternal control expressed during stages of pollen development and pollen tube growth. The complex floral morphology of heterostyly may have evolved to facilitate pollen dispersal among individuals in populations with different mating types (Darwin 1877; Ganders 1974; Barrett and Glover 1985; Lloyd and Webb 1992a, 1992b; Barrett and Shore 2008).

Our objective in this article was to analyze the relative importance of maternal versus paternal control of heterostylous SI in populations of *Oxalis alpina* (section *Ionoxalis*; Oxalidaceae) that may be in transition from tristylous to distylous. Style morph expression in tristylous *O. alpina* and other species of section *Ionoxalis* is controlled by two linked loci (Weller 1976a; S. G.

<sup>1</sup> Author for correspondence; e-mail: sgweller@uci.edu.



**Fig. 1** A, Legitimate crosses between floral morphs in a distylous *Oxalis* species. Cross designations (e.g.,  $L \times I/S$ ) refer to the style morph of the female parent times the anther whorl of the male parent. B, Legitimate crosses among floral morphs in a tristylous *Oxalis* species. Cross designations as in A. In addition to the six legitimate crosses shown, there are 18 categories of illegitimate cross- and self-pollinations. C, Compatible crosses in a tristylous *Oxalis* species with incompatibility modifications. In addition to the six legitimate crosses, two illegitimate crosses ( $L \times m/S$  and  $S \times m/L$ ) produce seeds.

Weller, A. K. Sakai, C. Lucas, J. J. Weber, C. A. Domínguez, and F. E. Molina-Freaner, unpublished data). A dominant allele ( $S$ ) at the short/nonshort locus, which is epistatic to the mid/long locus ( $M$  or  $m$ ), results in expression of the short-styled morph; because of SI, only one copy of the dominant  $S$  allele occurs at the short/nonshort locus. In the absence of a dominant allele at the short/nonshort locus, the mid-styled phenotype is expressed when at least one dominant mid allele ( $M$ ) is present. Individuals that are homozygous-recessive at both loci express the long-styled phenotype. *Oxalis alpina* is tetraploid in the Sky Islands (Weller et al. 2007), isolated mountain ranges of southeastern Arizona and southern New Mexico in the United States and Sonora and Chihuahua in Mexico. Tetraploidy influences the segregation of progeny from mid-styled individuals that may have varying numbers of dominant ( $M$ ) alleles and from short-styled individuals with more than a single  $M$  allele.

We compared two tristylous populations that appear to be at different stages in the evolutionary transition from tristylous to distylous (Weller et al. 2007) and examined changes in maternal and paternal control of features of tristylous SI relationships associated with the transition. These two populations occur in the Sky Islands, where populations of *O. alpina* are either tristylous or distylous (through loss of the mid-styled morph [Weller 1976b; Weller et al. 2007]), and thus they provide an opportunity to test hypotheses for the evolution of distylous from tristylous. Phylogeographic analysis indicates that multiple independent transitions from tristylous to distylous have occurred in these populations (Pérez-Alquicira et al. 2010). Tristylous populations of *O. alpina* in the Sky Island region have variable incompatibility relationships. Some tristylous populations have incompatibility relationships that are similar to those of other tristylous species in section *Ionoxalis* (Weller 1980; Weller et al. 2007), with only legitimate crosses producing fruits with substantial numbers of seeds. In other tristylous populations, two illegitimate outcrosses ( $L \times m/S$  and  $S \times m/L$ , where crosses designate the maternal morph  $\times$  anther level/paternal morph) produce as many seeds per capsule as the legitimate ( $L \times I/S$  and  $S \times s/L$ ) outcrosses (fig. 1C; Weller 1976b; Weller et al. 2007). When seed production per fruit of the illegitimate  $L \times m/S$  and  $S \times m/L$  crosses is as high as their legitimate counterparts ( $L \times I/S$  and  $S \times s/L$  crosses, respectively), a population is described as having modified tristylous SI—that is, loss of incompatibility differentiation (Weller et al. 2007)—even if other categories of crosses in the same populations retain more typical tristylous SI relationships (Weller et al. 2007).

Loss of incompatibility differentiation of short- and long-styled morphs, through modification of either maternal or paternal control, may result in selection against the mid-styled morph and potentially lead to the evolution of a distylous breeding system (Weller 1976b, 1986; Weller et al. 2007). In a population with modified tristylous SI, the alleles carried by the short- and long-styled morphs have an advantage because pollen from two anther whorls of these morphs, in contrast to only one anther whorl of the mid-styled morphs, is compatible with long and short styles, respectively (fig. 1C). Because the genotypes of the short- and long-styled morphs carry fewer mid alleles than do the genotypes of the mid-styled morph, modification of incompatibility in the short- and long-styled morphs should select against the mid allele (Weller et al. 2007). In addition, modified tristylous SI could also result in selection against the mid-styled morph if pollination by fewer anther whorls results in reduced seed production of the mid-styled morph (Weller 1976b), although there is no evidence of reduced capsule production or reduced seed production per capsule for mid-styled morphs (Weller 1981). Alternatively, Charlesworth (1979) predicted selection against the mid-styled morph because of relatively greater expression of inbreeding depression in the progeny of mid-styled morphs. Mid-styled morphs were expected to have higher selfing than the short- and long-styled morphs because the styles of the mid-styled morph are in close proximity to two anther whorls. Charlesworth's (1979) argument assumes that the distance separating reproductive whorls is correlated with the strength of the incompatibility reaction. Results from earlier crosses (Weller et al. 2007) indicate that

mid-styled morphs of *O. alpina* are more self-compatible than the short- and long-styled morphs, which agrees with Charlesworth's (1979) prediction. If self-fertilization and inbreeding depression were high enough, selection against the mid-styled morph would be expected (Charlesworth 1979).

Modification of the tristylous SI system appears to be important in the transition from tristily to distily in *O. alpina*. Among the Sky Island populations, those with a higher frequency of the mid-styled morph have fewer changes in incompatibility in the short- and long-styled morphs ( $N = 10$  populations; Weller et al. 2007). The frequency of the mid-styled morph is also closely associated with morphological changes in the position of the stamen whorls of the short- and long-styled morphs (Weller 1979; Sosenski et al. 2010). Tristylous populations with incompatibility relationships resembling distylous populations and with reduced mid-styled morph frequencies have short- and long-styled morphs that resemble plants in distylous populations because their mid-level anthers have diverged from the mid anther position toward the adjacent long or short anther levels (Sosenski et al. 2010).

Modification of tristylous SI leading to high seed production following  $S \times m/L$  and  $L \times m/S$  crosses could arise due to modifications in maternal function (expressed in the stigma, style, or ovary), paternal function (expressed during pollen germination and pollen tube growth), or both. Modification of maternal and paternal control of tristylous incompatibility might result from different genes affecting either maternal or paternal function, or a single gene might act via epistasis or pleiotropy to affect both functions. Charlesworth (1979) viewed changes in paternal function mediated through pollen as the more likely explanation for the ability of mid-level pollen to successfully fertilize ovules in reciprocal crosses between short- and long-styled morphs, because fewer changes in the incompatibility system would be necessary than in the modification of stigmatic or stylar reactions. Changes in stigmatic or stylar function would require modifications that permit mid-level pollen of short- and long-styled morphs ( $m/S$  and  $m/L$  pollen; fig. 1C) to grow but maintain discrimination between the two pollen types of the mid-styled morph ( $l/M$  and  $s/M$  pollen; fig. 1C). Modifications of maternal function mediated through the stigma or style might lead to self-fertility. For example, short-styled morphs are usually successfully fertilized only by the short-level whorl of mid- or long-styled morphs ( $s/M$  and  $s/L$  pollen; fig. 1C). If the stylar recognition system of the short-styled morph underwent modifications and allowed mid-level pollen from the long-styled morph ( $m/L$  pollen) to germinate and fertilize ovules, mid-level pollen from the short-styled morph ( $m/S$  pollen) might also be capable of fertilizing ovules of the short-styled morph, which would lead to self-fertility or cross-compatibility among short-styled morphs. Little is known of the mechanisms governing cross-incompatibility versus SI in heterostylous species, although Darwin (1877) considered cross-incompatibility to be an unfortunate by-product of self-sterility in species with a limited number of incompatibility types (Weller 2010).

We had three major goals in our study. Our first objective was to assess the influence of maternal versus paternal effects on modification of tristylous SI in two populations of *O. alpina* in the Sky Islands. On the basis of Charlesworth's (1979) reasoning, we predicted that the paternal component would change more than the maternal component as incom-

patibility relationships were modified. We performed reciprocal factorial crosses in the greenhouse and examined maternal and paternal variation among plants within populations in terms of the extent of incompatibility modification in short- and long-styled morphs. We used seed production (seeds per capsule), a sensitive indicator of the extent of incompatibility (Weller et al. 2007), to estimate paternal versus maternal influences on incompatibility. On the basis of our earlier population-level results (Weller et al. 2007), in one population only legitimate crosses produced significant numbers of seeds while in the second population illegitimate  $S \times m/L$  and  $L \times m/S$  crosses had high seed production (fig. 1C; Weller et al. 2007). We interpreted these results with respect to likely mechanisms for SI versus cross-incompatibility and whether these mechanisms of discrimination differed from each other.

Our second objective was to determine whether modifications of maternal and paternal components of tristylous SI were correlated. For example, we asked whether genotypes with reduced modification of tristylous incompatibility expressed through maternal function had similarly reduced modification in paternal function.

Finally, we wished to determine whether variation in the tristylous incompatibility of short- and long-styled plants within populations was correlated with morphological change in the position of stamens. We expected greater incompatibility modification to be associated with a greater convergence of the position of the mid-level stamens with the short- or long-level stamens. These within-population predictions are similar to patterns detected among populations that varied in the extent of their incompatibility modification (Weller 1979; Sosenski et al. 2010). We used comparisons of changes within these two populations to infer the likely sequence of changes in trimorphic SI and morphology associated with the tristily-distily transition in *O. alpina*.

## Material and Methods

### Study Organism

*Oxalis alpina* (section *Ionoxalis*, Oxalidaceae) occurs from Guatemala to Arizona and New Mexico and is distylous throughout most of its range, although tristylous populations occur in southern Mexico and in the northern part of the distribution (Weller 1976b; Weller et al. 2007). Several lines of evidence suggest that distily is the derived condition. Most tristylous species are geographically restricted, diploid endemics of southern Mexico (Denton 1973), and distily is associated with an increase in ploidal level in more northern populations, suggesting that distily is the derived breeding system in section *Ionoxalis* (Weller and Denton 1976). Recent molecular studies (A. Gardner, personal communication, 2009) also support the derived nature of distily in section *Ionoxalis*.

### Study Populations

We used tristylous populations of *Oxalis alpina* from the Sierra San Luis (Weller and Sakai 958, US; San Luis population) in northeastern Sonora, Mexico, and from Morse Canyon in the Chiricahua Mountains (Weller 727, UC; Chiricahua population) in southeastern Arizona, U.S.A., for reciprocal



factorial crosses. The San Luis population (style morph ratios: 0.46 short : 0.21 mid : 0.33 long,  $n = 177$ ; sampled in 2007) had typical tristylous incompatibility relationships (despite apparent anisoplethy), with only legitimate crosses producing substantial numbers of seeds per fruit. All other crosses, including self-pollinations, produced very few seeds (Weller et al. 2007). The Chiricahua population (style morph ratios: 0.27 short : 0.25 mid : 0.48 long,  $n = 508$ ; sampled in 2001) differed from the San Luis population in that illegitimate  $S \times m/L$  and  $L \times m/S$  crosses produced the same number of seeds per fruit as did legitimate crosses (Weller 1976b; Weller et al. 2007), rendering the incompatibility relationships of the short- and long-styled morphs identical to those of distylous populations.

### Crossing Program

We used eight short-styled and eight long-styled individuals from the San Luis population and nine short-styled and eight long-styled individuals from the Chiricahua population for the reciprocal factorial crosses. Plants were grown from bulbs collected in the field at intervals of  $>1$  m to avoid potentially sampling identical genotypes (microsatellite markers confirm absence of clonal growth at this scale; O. Tsyusko, personal communication, 2010). To determine maternal and paternal effects on incompatibility, each short-styled individual and each long-styled individual was used as both a maternal and a paternal parent (64 reciprocal mating pairs in the San Luis population; 72 reciprocal mating pairs in the Chiricahua population). For each mating pair, we performed both legitimate outcrosses ( $S \times s/L$  and  $L \times l/S$ ) and illegitimate outcrosses ( $S \times m/L$  and  $L \times m/S$ ), with an average of  $\sim 11$  replications per mating pair (San Luis: mean = 10.76, SE = 0.06, range = 5–18,  $N = 2734$  crosses); Chiricahua: mean = 10.96, SE = 0.38, range = 6–25,  $N = 3157$  crosses).

Pollinations were performed in the greenhouse to prevent unwanted pollinations by biotic pollinators. Unpollinated controls distributed throughout the greenhouse produced no fruits and confirmed the absence of biotic pollinators. We used fine forceps to transfer pollen between floral morphs, and three of the five stigmas were coated with pollen to mimic natural levels of pollination and seed production (S. G. Weller, A. K. Sakai, and J. J. Weber, unpublished data). Forceps were washed with ethanol after each pollination to prevent contamination. Ripe fruits were collected 14–15 d after pollination. The number of viable seeds per capsule was used as a measure of the degree of compatibility of a cross. In *O. alpina*, inhibition of incompatible pollen tubes occurs in the styles (S. G. Weller, unpublished observations), although our overall goal in this study was not to determine the stage at which incompatibility occurs but rather to determine whether individuals vary in their loss of incompatibility differentiation and whether this loss occurs through male function and/or female function.

### Statistical Analysis

*Importance of maternal versus paternal components in changes in the incompatibility relationships.* Short-styled morphs and long-styled morphs were analyzed separately in each population. We used restricted maximum likelihood

(PROC MIXED; Littell et al. 1996; SAS Institute 2002–2005) to investigate the effects of cross type (legitimate vs. illegitimate) and variation among individual plants as female or male parents on seed production. Cross type was considered a fixed effect and tested using  $F$  ratios; the degrees of freedom for the fixed effect of cross type were estimated using the Kenward-Roger correction in SAS (SAS Institute 2002–2005). Plants were considered a random sample of maternal parents and paternal parents within each morph type, and thus the identities of individuals used as female and male parents were treated as random effects in PROC MIXED, with significance determined using log likelihood ratios tested against a  $\chi^2$  distribution. Significant main effects of the individuals used as female or male parents on seed production indicated maternal or paternal effects, potentially resulting from variation in ovule number, pollen viability, or a variety of other factors. Interactions between the identity of the female parent and cross type, treated as random effects in PROC MIXED, were of greater interest because they indicate the extent of modification of tristylous incompatibility mediated through the female parent. For example, a significant interaction indicates that female parents differed in the number of seeds per capsule that they produced following legitimate and illegitimate crosses. Interactions between the identity of the male parent and the cross type, which were also treated as random effects in PROC MIXED, were used to indicate the degree of modification of tristylous incompatibility mediated through the pollen of each individual used as a paternal parent. Each style morph was analyzed separately to determine whether legitimate and illegitimate crosses differed in seed production when interactions were not included in the analysis. Results of these latter analyses are reported in the text but are not tabled.

*Correlation of incompatibility modification in plants used as female and male parents.* We used a Spearman rank correlation to determine whether an individual plant had the same extent of incompatibility modification when used as a female parent as when used as a male parent in crosses. Separate correlations were calculated for each style morph (long styled or short styled) within each population.

*Correlation of incompatibility modifications and morphological modifications.* We used Spearman rank correlations to determine whether the positive correlation between convergence in the position of stamen whorls and the loss of incompatibility differentiation observed among populations was also present for individuals within populations. We calculated two indices of incompatibility modification for each plant (as a male parent and as a female parent), which were similar to indices used in earlier studies (Weller et al. 2007), and we calculated an index of stamen whorl convergence for each plant. The index of incompatibility modification was calculated for each long-styled individual that was used as a female parent as the mean number of seeds per capsule for the illegitimate  $L \times m/S$  cross divided by the mean value for the legitimate  $L \times l/S$  cross. This index approaches 1 as seed production of the illegitimate and legitimate crosses becomes more similar and the incompatibility between the  $L$  female parent and the  $m/S$  pollen is lost. A similar index was calculated for the same long-styled individual used as a male parent for illegitimate  $S \times m/L$  and legitimate  $S \times s/L$  crosses. Similar indices were calculated for short-styled plants used as female and male parents in crosses.

We calculated stamen whorl convergence on the basis of the lengths of the two stamen whorls and that of the style whorl for five flowers of each genotype. Morphological measurements were made using a Zeiss dissecting microscope for all plants from the Chiricahua population and for most of the plants (five of the eight short-styled plants and six of the eight long-styled plants) from the San Luis population (because of mortality, not all plants were measured for morphology). The morphological convergence index for each individual (based on the mean of five flowers per plant) was calculated as the distance between stamen whorls as a proportion of the longest whorl of the flower (either stamens or styles). For the short-styled morph, morphological convergence was calculated as

$$1 - \left( \frac{\text{length of long stamen whorl} - \text{length of mid stamen whorl}}{\text{length of long stamen whorl}} \right),$$

and morphological convergence for the long-styled morph was calculated as

$$1 - \left( \frac{\text{length of mid stamen whorl} - \text{length of short stamen whorl}}{\text{style length}} \right).$$

As the lengths of the stamen whorls converge to the same position, the values for these morphological convergence indices approach 1.

## Results

### *Objective 1: Maternal and Paternal Components of Modification of Tristylous SI*

*San Luis population: interaction of maternal identity and cross type on modification of incompatibility.* In the San Luis

population, seed production following legitimate ( $S \times s/L$ ) and illegitimate ( $S \times m/L$ ) crosses varied depending on the short-styled individual used as the female parent, as indicated by the highly significant interaction between the identity of the short-styled morph and the cross type (table 1A; random effect in PROC MIXED;  $\chi^2 = 268.7$ ,  $P < 0.0001$ ,  $df = 1$ ). Some short-styled individuals used as female parents (S18, S48, and S66) showed strong incompatibility reactions following illegitimate  $S \times m/L$  crosses, with high numbers of legitimate relative to illegitimate seeds, while others (S20, S34, and S39) had weaker incompatibility effects (fig. 2a). Similarly, for long-styled morphs in the San Luis population, seed production following legitimate ( $L \times l/S$ ) and illegitimate ( $L \times m/S$ ) crosses varied depending on the particular long-styled maternal parent, leading to a highly significant interaction between the identity of long-styled individual and the cross type (table 1B; random effect in PROC MIXED;  $\chi^2 = 161.3$ ,  $P < 0.0001$ ,  $df = 1$ ). Some long-styled maternal plants (L40, L58, and L76) had high numbers of legitimate relative to illegitimate seeds, while other maternal plants (L13, L22, and L31) had more similar legitimate and illegitimate seed production (fig. 2b), primarily due to differences in legitimate seed production.

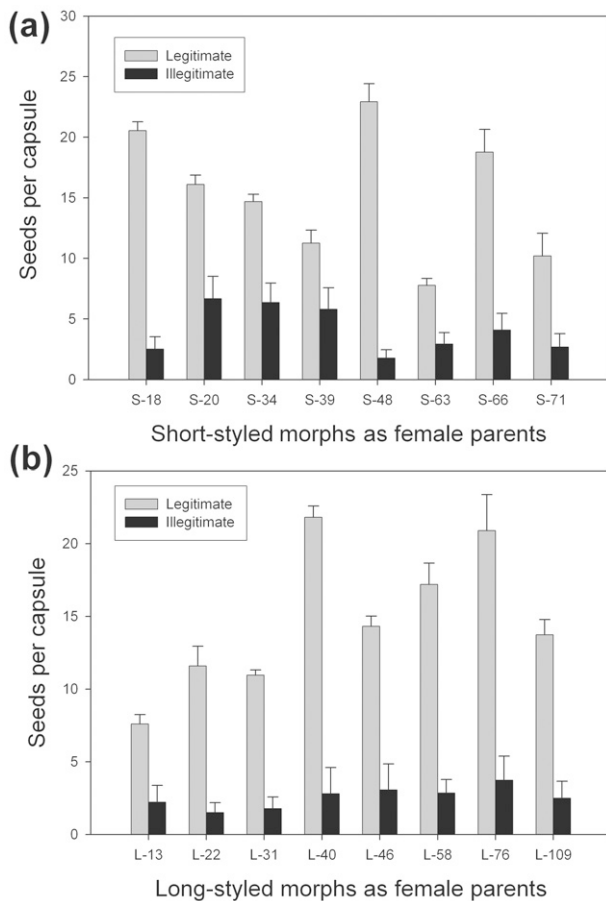
*San Luis population: interaction of paternal identity and cross type on modification of tristylous SI.* Seed production was significantly affected by the identity of the short-styled male parent in the San Luis population used in legitimate ( $L \times l/S$ ) and illegitimate ( $L \times m/S$ ) crosses (table 1B; interaction of male parent and cross type; random effect in PROC MIXED;  $\chi^2 = 124.9$ ,  $P < 0.0001$ ,  $df = 1$ ). Illegitimate  $L \times m/S$  crosses of long-styled individuals with pollen from some short-styled paternal parents (S18, S39, S63, S66, and S71) showed substantial incompatibility, while illegitimate crosses with other short-styled paternal parents (S20, S34, and S48) showed only moderate incompatibility (fig. 3a). Similarly, the

**Table 1**

#### **PROC MIXED Analysis of Incompatibility Relationships in *Oxalis alpina* as Measured by Seed Production per Capsule in the San Luis Population**

Source of variation	$\chi^2$	F	Probability (df = 1)
A. Short-styled individuals used as female parents in crosses:			
Cross type (legitimate vs. illegitimate)		22.36	<.0001
Short-styled morph, female effect	0		
Long-styled morph, male effect	0		
Interaction between short-styled maternal parent identity and cross type (legitimate vs. illegitimate)	268.7		<.0001
Interaction between long-styled paternal parent identity and cross type (legitimate vs. illegitimate)	119.5		<.0001
B. Long-styled individuals used as female parents in crosses:			
Cross type (legitimate vs. illegitimate)		40.78	<.0001
Long-styled morph, female effect	.4		.527
Short-styled morph, male effect	0		
Interaction between long-styled maternal parent identity and cross type (legitimate vs. illegitimate)	161.3		<.0001
Interaction between short-styled paternal parent identity and cross type (legitimate vs. illegitimate)	124.9		<.0001

Note.  $\chi^2$  values are presented for random effects or interactions containing random effects; F values are presented for cross type (legitimate vs. illegitimate), a fixed effect. A, Incompatibility in crosses of short-styled individuals with pollen from long-styled individuals (legitimate  $S \times s/L$  and illegitimate  $S \times m/L$  crosses). B, Incompatibility in crosses of long-styled individuals with pollen from short-styled individuals (legitimate  $L \times l/S$  and illegitimate  $L \times m/S$  crosses).



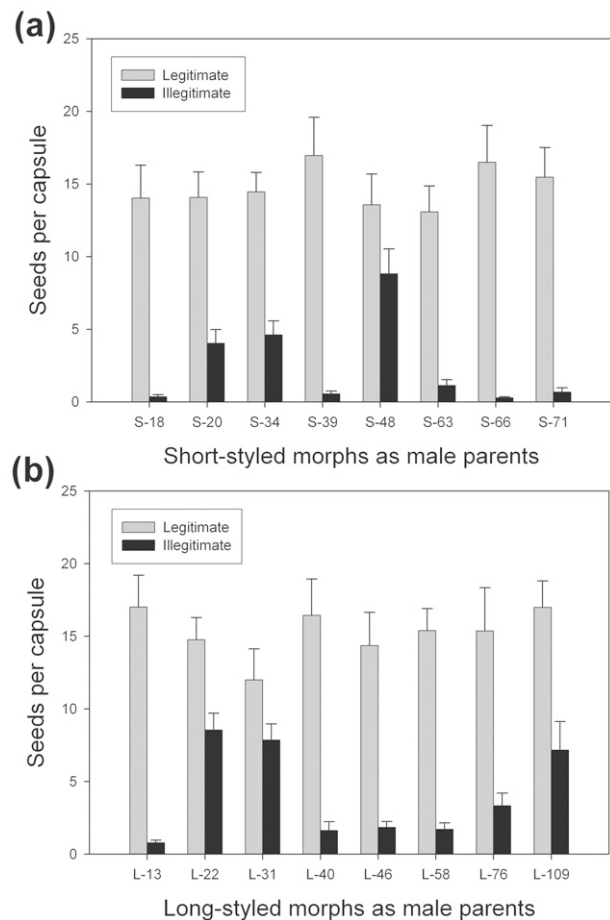
**Fig. 2** Female effects on incompatibility in the San Luis population. *a*, Seed production of short-styled individuals following legitimate and illegitimate crosses, with long-styled individuals as male parents. *b*, Seed production of long-styled individuals following legitimate and illegitimate crosses, with short-styled individuals used as male parents. Error bars represent 1 SE.

identity of the long-styled individual used as the male parent in legitimate ( $S \times s/L$ ) and illegitimate ( $S \times m/L$ ) crosses also had a highly significant effect on seed production (table 1A; interaction of male parent and cross type; random effect in PROC MIXED;  $\chi^2 = 119.5$ ,  $P < 0.0001$ ,  $df = 1$ ). Illegitimate  $S \times m/L$  crosses with some long-styled paternal parents (L13, L40, L46, and L58) showed strong incompatibility, while weaker incompatibility was observed for illegitimate pollen from other long-styled paternal parents (L22, L31, and L109; fig. 3b).

*Chiricahua population: interaction of maternal identity and cross type on modification of tristylous SI.* In the Chiricahua population, seed production was similar following legitimate and illegitimate crosses of short-styled maternal parents ( $S \times s/L$  and  $S \times m/L$  crosses; table 2A; interaction of female parent and cross type, random effect in PROC MIXED;  $\chi^2 = 0.7$ ,  $P = 0.403$ ; fig. 4a) and also for long-styled maternal parents ( $L \times l/S$  and  $L \times m/S$  crosses; table 2B; interaction of female parent and cross type, random effect in PROC MIXED;  $\chi^2 = 3.2$ ,  $P = 0.074$ ,  $df = 1$ ; fig. 4b).

*Chiricahua population: interaction of paternal identity and cross type on modification of tristylous SI.* Seed production between legitimate ( $L \times l/S$ ) and illegitimate ( $L \times m/S$ ) crosses did not differ among short-styled paternal parents (table 2B; interaction between male parent and cross type;  $\chi^2 = 0.7$ ; random effect in PROC MIXED;  $P = 0.403$ ,  $df = 1$ ; fig. 5a). Among long-styled paternal parents, however, seed production following legitimate ( $S \times s/L$ ) and illegitimate ( $S \times m/L$ ) crosses varied depending on the identity of the long-styled paternal parent (table 2A; interaction between male parent and cross type;  $\chi^2 = 33.1$ ; random effect in PROC MIXED;  $P < 0.0001$ ,  $df = 1$ ; fig. 5b). Compared with legitimate crosses, illegitimate crosses with mid-level pollen from long-styled paternal parents L2, L3, L4, L20, L27, and L28 had high seed production per capsule, while illegitimate crosses with mid-level pollen from long-styled paternal parents L1 and L21 had reduced seed production (fig. 5b).

*Main effect of cross type—modification of tristylous SI in the San Luis and Chiricahua populations.* The main effect of cross type in our mixed-model analyses confirms earlier



**Fig. 3** Male effects on incompatibility in the San Luis population. *a*, Seed production of long-styled individuals following legitimate and illegitimate crosses, with short-styled individuals as males. *b*, Seed production of short-styled individuals following legitimate and illegitimate crosses, with long-styled individuals used as male parents. Error bars represent 1 SE.

Table 2

## PROC MIXED Analysis of Incompatibility Relationships as Measured by Seed Production per Capsule in the Chiricahua Population

Source of variation	$\chi^2$	F	Probability (df = 1)
A. Short-styled individuals used as female parents in crosses:			
Cross type (legitimate vs. illegitimate)		.56	.475
Short-styled morph, female effect	24.0		<.0001
Long-styled morph, male effect	1.1		.294
Interaction between short-styled maternal parent identity and cross type (legitimate vs. illegitimate)	.7		.403
Interaction between long-styled paternal parent identity and cross type (legitimate vs. illegitimate)	33.1		<.0001
B. Long-styled individuals used as female parents in crosses:			
Cross type (legitimate vs. illegitimate)		.03	.876
Long-styled morph, female effect	11.7		.0006
Short-styled morph, male effect	.5		.480
Interaction between long-styled maternal parent identity and cross type (legitimate vs. illegitimate)	3.2		.074
Interaction between short-styled paternal parent identity and cross type (legitimate vs. illegitimate)	.7		.403

Note.  $\chi^2$  values are presented for random effects or interactions containing random effects; *F* values are presented for cross type (legitimate vs. illegitimate), a fixed effect. A, Incompatibility in crosses of short-styled individuals with pollen from long-styled individuals (legitimate  $S \times s/L$  and illegitimate  $S \times m/L$  crosses). B, Incompatibility in crosses of long-styled individuals with pollen from short-styled individuals (legitimate  $L \times l/S$  and illegitimate  $L \times m/S$  crosses).

work on both populations (Weller et al. 2007). In the San Luis population, seed production for legitimate crosses greatly exceeded seed production of illegitimate crosses for both short-styled and long-styled individuals ( $S \times s/L$  vs.  $S \times m/L$  crosses,  $F = 22.36$ ,  $P < 0.0001$ ,  $df = 1$ , 23;  $L \times l/S$  vs.  $L \times m/S$  crosses,  $F = 40.78$ ,  $P < 0.0001$ ,  $df = 1$ , 14.4; table 1). In the Chiricahua population, legitimate and illegitimate crosses did not differ in seed production for short-styled individuals ( $F = 0.56$ ,  $P = 0.475$ ,  $df = 1$ , 7.64) or long-styled individuals ( $F = 0.03$ ,  $P = 0.8755$ ,  $df = 1$ , 7.51; table 2).

**Main effects of maternal and paternal identity.** In the San Luis population, seed production of either maternal or paternal parents did not differ among short-styled individuals or long-styled individuals (main effects of female and male identity were not significant; figs. 2, 3; table 1). Differences among individual plants used as maternal parents were not significant for the San Luis population because of the high variance of the combined legitimate and illegitimate crosses; in contrast, separate analyses of legitimate and illegitimate crosses (data not shown) indicated significant differences among parents used as females for both style morphs, although differences among long-styled maternal plants following illegitimate crosses were barely significant. Similarly, differences in seed production among plants used as male parents were not significant for the San Luis population when legitimate and illegitimate crosses were considered together for calculation of interactions. When groups were analyzed separately, the main effects of male parent were significant for both morphs and both legitimate and illegitimate crosses (data not shown).

In the Chiricahua population, seed production did not differ among paternal parents (for either short-styled or long-styled plants; fig. 5; table 2) but seed production was significantly different among maternal parents (short-styled: main effect of female identity; table 2A;  $\chi^2 = 24$ ,  $P < 0.0001$ ; long-styled: main effect of female identity; table 2B;  $\chi^2 = 11.7$ ,

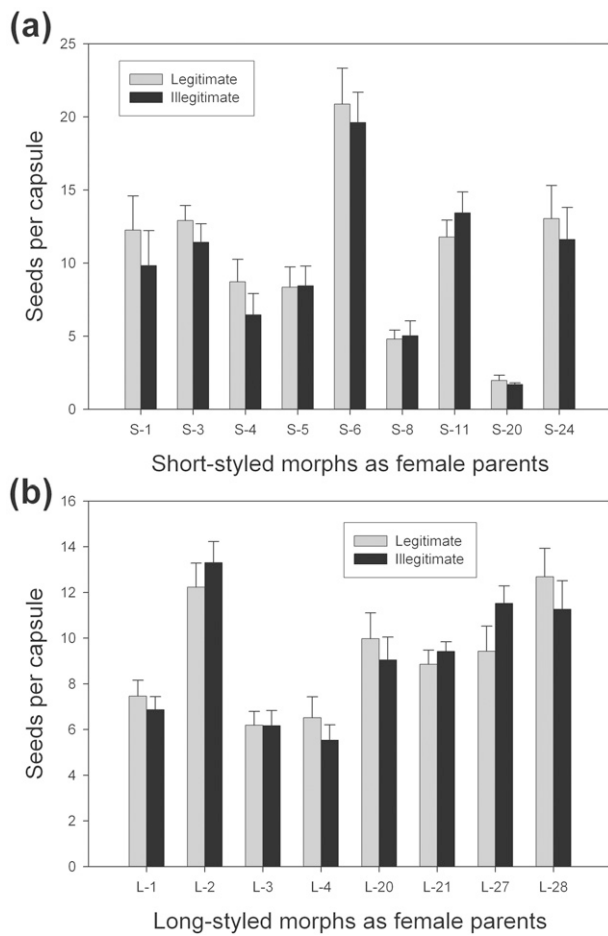
$P = 0.0006$ ). When legitimate and illegitimate crosses were analyzed separately, maternal identity and paternal identity were significant for all categories except short-styled morphs used as male parents (fig. 5a; data not shown).

#### Objective 2: Correlations between Maternal and Paternal Components of Modification of *Tristylous* SI

In the San Luis population, the extent of incompatibility modification in maternal function and paternal function in individuals was not correlated for either short-styled or long-styled plants. For example, when a given short-styled plant was used as a maternal parent, seed production from the  $S \times m/L$  cross was uncorrelated with seed production using the same short-styled plant as the male parent in the  $L \times m/S$  cross ( $n = 8$  short,  $\rho = 0.0714$ ,  $P = 0.867$ ;  $n = 8$  long,  $\rho = -0.310$ ,  $P = 0.456$ ). In contrast, in the Chiricahua population, the degree of incompatibility modification in maternal function and paternal function of short-styled individuals was positively correlated ( $n = 9$  short,  $\rho = 0.733$ ,  $P = 0.0246$ ), although long-styled individuals from the Chiricahua population did not show this correlation ( $n = 8$ ,  $\rho = -0.0238$ ,  $P = 0.955$ ).

#### Objective 3: Correlation between Extent of Incompatibility Modification and Degree of Morphological Modification

**San Luis population.** Incompatibility modification and adjustment of floral morphology was not correlated for either the short-styled morph (as females in crosses:  $n = 5$ ,  $\rho = 0.100$ ,  $P = 0.873$ ; as males in crosses:  $n = 5$ ,  $\rho = 0.000$ ,  $P = 1.00$ ) or the long-styled morph (as females in crosses:  $n = 6$ ,  $\rho = -0.486$ ,  $P = 0.329$ ; as males in crosses:  $n = 6$ ,  $\rho = -0.086$ ,  $P = 0.871$ ). The small number of individuals ( $n = 5$  or  $n = 6$ ) may have limited our ability to detect a significant relationship between incompatibility modification and morphology, although values for these tests were not close to significant.



**Fig. 4** Female effects on incompatibility in the Chiricahua population. *a*, Seed production of short-styled individuals following legitimate and illegitimate crosses, with long-styled individuals used as male parents. *b*, Seed production of long-styled individuals following legitimate and illegitimate crosses, with short-styled individuals used as male parents. Error bars represent 1 SE.

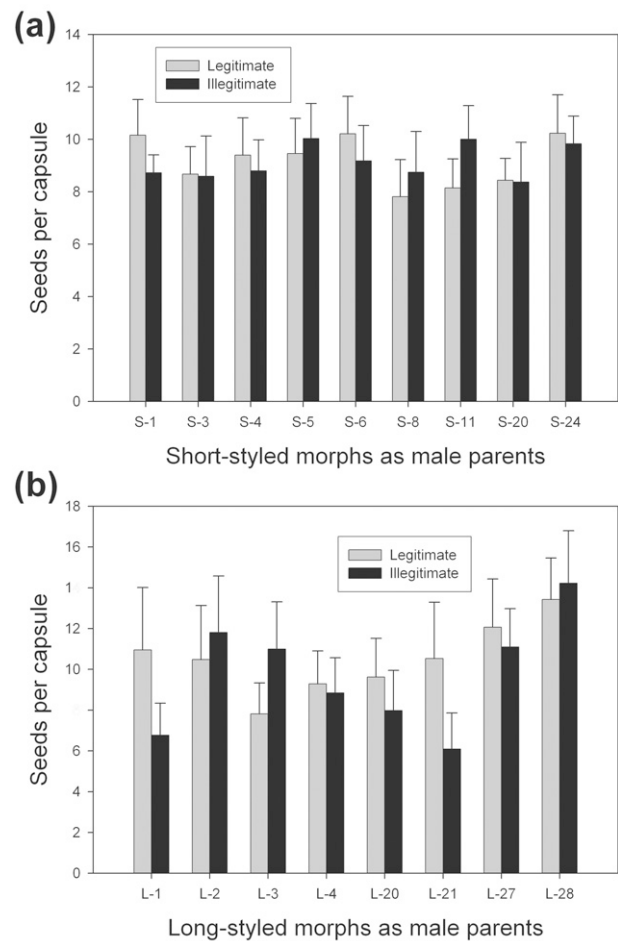
*Chiricahua population.* There were no significant correlations when short-styled individuals were used as maternal parents ( $n = 9$ ,  $\rho = 0.433$ ,  $P = 0.244$ ), but short-styled individuals as paternal parents had a positive correlation between the degree of incompatibility modification and morphological modification ( $n = 9$ ,  $\rho = 0.717$ ,  $P = 0.0298$ ). For long-styled individuals, incompatibility modification and morphological modification were not correlated (as female parents in crosses:  $n = 8$ ,  $\rho = 0.643$ ,  $P = 0.0856$ ; as male parents in crosses:  $n = 8$ ,  $\rho = -0.190$ ,  $P = 0.651$ ).

### Discussion

Variation in incompatibility and morphology among tristylous Sky Island populations of *Oxalis alpina* provides an opportunity to investigate the relative importance of female and male components of incompatibility modification. As well, it is a chance to examine how changes in incompatibility and morphology interface during the evolution of distyly.

### Maternal and Paternal Incompatibility Effects in the San Luis Population

Variation among individuals in the extent of modification in incompatibility reactions reveals that partial breakdown in typical tristylous SI has occurred in the San Luis population, mediated by both maternal and paternal incompatibility effects. Maternal control is implicated on the basis of the relatively high seed production in some female parents following illegitimate  $S \times m/L$  and  $L \times m/S$  crosses. Paternal control of the incompatibility reaction is also important on the basis of the ability of mid-level pollen from some parents to fertilize ovules following illegitimate  $S \times m/L$  and  $L \times m/S$  crosses. Further observations are necessary to differentiate among stigmatic, stylar, or ovular inhibition of pollen tubes, but on the basis of the inhibition of pollen tube growth in the styles (S. G. Weller, unpublished observations), this partial breakdown in incompatibility may result from stylar mediation of the success of pollen tubes produced by mid-level anthers. The small number of individuals with high seed production



**Fig. 5** Male effects on incompatibility in the Chiricahua population. *a*, Seed production of long-styled individuals following legitimate and illegitimate crosses, with short-styled individuals as male parents. *b*, Seed production of short-styled individuals following legitimate and illegitimate crosses, with long-styled individuals as male parents. Error bars represent 1 SE.

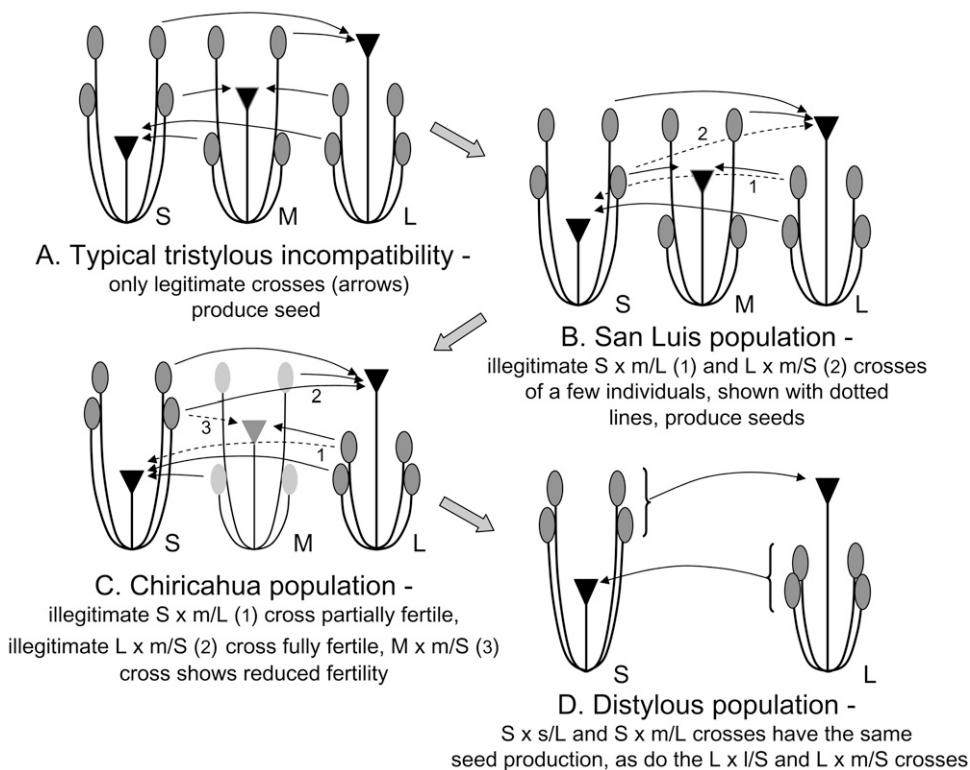
following illegitimate crosses is consistent with the suggestion that the San Luis population of *O. alpina* is in a very early stage of the evolution of incompatibility modifications hypothesized to select for distyly (fig. 6B; Weller et al. 2007). These results support Charlesworth's (1979) contention that modifications of pollen function are responsible for changes in incompatibility in short- and long-styled morphs in *O. alpina*, but in addition, changes in female function are also involved in the modification of tristylous SI.

#### Maternal and Paternal Incompatibility Effects in the Chiricahua Population

Because incompatibility in the Chiricahua population is highly modified (Weller et al. 2007), we did not expect to see significant interactions between maternal and paternal identity and cross type in this population. Contrary to our predictions, pollen from mid stamens of some long-styled individuals (m/L pollen) produced fewer seeds in pollinations of short-styled individuals (fig. 6C), indicating partial retention of ancestral incompatibility relationships.

#### Correlations between Incompatibility Modifications Expressed through Female and Male Function

When used as females in crosses, short-styled individuals in the Chiricahua population that had more highly modified tristylous SI also had more highly modified incompatibility reactions when used as male parents. These results are consistent with the hypothesis that genes controlling differentiation of incompatibility reactions in stigmas or styles also influence incompatibility reactions in pollen of the same individual. In contrast, in the San Luis population, where tristylous incompatibility is more typical but differences in incompatibility modification among individuals within style morphs were more pronounced, no correlations were found between stylar and pollen incompatibility reactions. Given the current very limited understanding of the mechanisms underlying heteromorphic incompatibility (summarized in Barrett and Shore 2008), the nature of potential pleiotropic interactions or epistasis affecting incompatibility reactions in styles and pollen are difficult to predict. The absence of correlations in the relatively less modified San Luis population, when compared with the very highly modified Chiricahua population, indicates that correlations may become more apparent as tristily evolves toward distyly.



**Fig. 6** Model for stages of tristily in *Oxalis alpina* presumed to lead to the evolution of distyly. S, M, and L refer to short-styled, mid-styled, and long-styled morphs, respectively; s, m, and l refer to anther whorl positions. A, Typical tristylous incompatibility, where only legitimate crosses produce seed. B, Sierra San Luis population, showing initial stage in modification of tristylous incompatibility. Illegitimate S x m/L (1; dotted line) and L x m/S (2; dotted line) crosses of a small proportion of short- and long-styled individuals produce some seeds. Morphological arrangements of anthers and stigmas show high reciprocity (see Sosenski et al. 2010). C, Chiricahua population, showing partially fertile S x m/L cross (1; dotted line), fully fertile L x m/S cross (2; dotted line), and M x m/S cross (3; dotted line), which has low seed production. Modifications of incompatibility in the short- and long-styled morphs select against the mid-styled morph, which declines in frequency. D, Distylous population, where the S x m/L and L x m/S crosses have the same seed production as their legitimate S x s/L and L x l/S counterparts. The mid-styled morph has disappeared from the population.

### *Correlations between Morphology and Incompatibility*

We found some evidence that incompatibility modification may occur before morphological modification of the positions of the anther whorls, contrary to arguments that morphological modifications precede incompatibility modifications in tristylous species (Charlesworth 1979; Barrett and Shore 2008). In the San Luis population, which is apparently in the very early stages of incompatibility modification (fig. 6B), morphological modifications of the anther whorl position and the degree of incompatibility modification were not correlated, although the sample size was limited. In the Chiricahua population (fig. 6C), where incompatibility relationships of short- and long-styled morphs are greatly modified and essentially identical to those found in distylous species (fig. 6D; Weller et al. 2007), short-styled individuals with more convergent anther whorls (i.e., more closely resembling the short-styled morph of a distylous species) also had more similar legitimate and illegitimate incompatibility reactions (e.g., seed production of  $L \times m/S$  and  $L \times l/S$  crosses was more similar). If the differences between these populations reflect the sequence of events that occurs during the evolution of distyly, then morphological adjustments follow modifications of incompatibility. Presumably, in populations with modified incompatibility and reduced frequency of the mid-styled morph, changes in the position of the mid anther whorls increase deposition of mid-level pollen on the stigmas of short- and long-styled morphs (Sosenski et al. 2010).

Modifications of incompatibility and anther whorl position within the Chiricahua population reflect patterns detected across populations. Among populations of tristylous *O. alpina*, convergence of anther whorls toward a single long position in the short-styled morph and a single short position in the long-styled morph increases as the mid-styled morph drops in frequency and incompatibility becomes increasingly modified in the direction of distyly (Weller 1979; Sosenski et al. 2010). Darwin (1877) and Lloyd and Webb (1992a) also noted that distances between anthers and stigmas in tristylous *Lythrum* and *Oxalis* species are closely correlated with the extent of fertility of crosses.

### *Mechanisms Controlling SI and Cross-Incompatibility*

Our results suggest that different mechanisms are likely to control SI and cross-incompatibility between floral morphs in *O. alpina*. In the San Luis population, acceptance of mid-level pollen by short- and long-styled morphs has a clear female component, as indicated by the significant interactions between maternal plant identity and cross type (legitimate or illegitimate). At the same time, self-pollinations using mid-level pollen in either the long- or short-styled morphs of this population result in little or no seed production (Weller et al. 2007). If the mechanisms for SI and incompatibility between different morphs are similar, then stigmas of long-styled plants that accept mid-level pollen from the short-styled morph (m/S pollen) should also accept their own mid-level pollen (m/L pollen), which, on the basis of the results of earlier crossing studies (Weller et al. 2007), they clearly do not. The same argument would apply to pollinations of the

short-styled morph. Our results are contrary to this prediction and suggest that different mechanisms control intermorph incompatibility and SI. Lloyd and Webb (1992a) argued that for heterostylous species in general, different mechanisms should control cross-incompatibility between individuals and SI within individuals. Other heterostylous taxa also support this pattern. In the Menyanthaceae, although short- and long-styled morphs are self-incompatible, they differ in their degree of intramorph incompatibility (Ornduff 1992).

### *Comparison of the San Luis and Chiricahua Populations*

The San Luis population (fig. 6B), which is presumably at an early stage in the evolution of distyly, shows variation among individuals for both male and female incompatibility effects, while in the Chiricahua population (fig. 6C), which is presumably at a later stage in the evolution of distyly, only long-styled individuals showed variability in their incompatibility relationships, and only as male parents. The importance of male effects in controlling incompatibility is supported by modifications of incompatibility that prevent the legitimate cross of mid-level pollen of short-styled individuals (m/S) from functioning on mid stigmas when the pollen has become completely compatible with long-styled individuals (fig. 6C; Weller et al. 2007). In contrast, in the Chiricahua population, variation in incompatibility modifications among individuals used as females in crosses has been lost during the evolution toward distyly. The correlation of degree of incompatibility modification and morphological adjustments of anther whorl position in the Chiricahua population but not in the San Luis population (cf. fig. 6B and fig. 6C) suggests that these morphological changes evolve after incompatibility changes are established in populations. Comparison of these two populations provides insights into the importance of maternal and paternal pollen effects in breeding system evolution in *O. alpina* and the potential temporal sequence in the modifications of female and male effects on tristylous SI in the evolution of distyly. Our results further suggest that modification of tristylous incompatibility, which is found in numerous isolated populations of *O. alpina* throughout the Sky Islands (Weller et al. 2007), follows a similar pathway despite the independent evolution of distyly (Pérez et al. 2010), the predicted outcome of these modifications.

### **Acknowledgments**

We thank Athena Vuong, Tiffany Ng, Tam Dang, Phuc Dang, Paul Ngo, and Linda Chau for data collection; Weigang Yang and Richard Basile for plant maintenance; and Diane Campbell for advice on experimental design and statistical analysis. We are grateful to Spencer C. H. Barrett for comments on the manuscript. This research was supported by an Undergraduate Research Opportunities Program (University of California, Irvine) grant to J. J. Kutaka, support from the University of California Institute for Mexico and the United States (UC MEXUS) to S. G. Weller and C. A. Dominguez, and support to S. G. Weller and A. K. Sakai through the National Science Foundation (DEB-0614164).

## Literature Cited

- Allen AM, SJ Hiscock 2008 Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. Pages 73–101 in VE Franklin-Tong, ed. Self-incompatibility in flowering plants: evolution, diversity, and mechanisms. Springer, Berlin.
- Barrett SCH 1992 Evolution and function of heterostyly. Springer, Berlin.
- 2010 Understanding plant reproductive diversity. *Philos Trans R Soc B* 365:99–109.
- Barrett SCH, DE Glover 1985 On the Darwinian hypothesis of the adaptive significance of tristily. *Evolution* 39:766–774.
- Barrett SCH, JS Shore 2008 New insights on heterostyly: comparative biology, ecology, and genetics. Pages 3–32 in VE Franklin-Tong, ed. Self-incompatibility in flowering plants: evolution, diversity, and mechanisms. Springer, Berlin.
- Charlesworth D 1979 The evolution and breakdown of tristily. *Evolution* 33:486–498.
- Darwin C 1877 The different forms of flowers on plants of the same species. J Murray, London.
- Denton MF 1973 A monograph of *Oxalis*, section *Ionoxalis* (Oxalidaceae) in North America. Publications of the Museum. Michigan State University Biological Series 4:455–615.
- Ganders FR 1974 Disassortative pollination in the distylous plant *Jepsonia heterandra*. *Can J Bot* 52:2401–2406.
- Littell RC, GA Milliken, WW Stroup, RD Wolfinger 1996 SAS system for mixed models. SAS Institute, Cary, NC.
- Lloyd DG, CJ Webb 1992a The evolution of heterostyly. Pages 151–178 in SCH Barrett, ed. The evolution and function of heterostyly. Monographs on theoretical and applied genetics 15. Springer, Berlin.
- 1992b The selection of heterostyly. Pages 179–207 in SCH Barrett, ed. The evolution and function of heterostyly. Monographs on theoretical and applied genetics 15. Springer, Berlin.
- Ornduff R 1992 Intrapopulation variation in the breeding system of *Villarsia lasiosperma* (Menyanthaceae), a distylous species. *Plant Syst Evol* 180:227–233.
- Pérez-Alquicira J, FE Molina-Freaner, D Piñero, SG Weller, E Martínez-Meyer, J Rozas, CA Domínguez 2010 The role of historical factors and natural selection in the evolution of breeding systems of *Oxalis alpina* in the Sonoran Desert “Sky Islands.” *J Evol Biol* 23:2163–2175.
- SAS Institute 2002–2005 SAS OnlineDoc, ver 9.1.3. SAS Institute, Cary, NC.
- Sosenski P, J Fornoni, FE Molina-Freaner, SG Weller, CA Domínguez 2010 Changes in sexual organ reciprocity and phenotypic floral integration during the tristily-distily transition in *Oxalis alpina*. *New Phytol* 185:829–840.
- Weller SG 1976a The inheritance of tristily in *Oxalis* section *Ionoxalis*. *Heredity* 37:387–393.
- 1976b Breeding system polymorphism in a heterostylous species. *Evolution* 30:442–454.
- 1979 Variation in heterostylous reproductive systems among populations of *Oxalis alpina* in southeastern Arizona. *Syst Bot* 4: 57–71.
- 1980 The incompatibility relationships of tristylous species of *Oxalis* section *Ionoxalis* of southern Mexico. *Can J Bot* 58: 1908–1911.
- 1981 Fecundity in populations of *Oxalis alpina* in southeastern Arizona. *Evolution* 35:197–200.
- 1986 Factors influencing frequency of the mid-styled morph in tristylous populations of *Oxalis alpina*. *Evolution* 40:279–289.
- 2010 The different forms of flowers: what have we learned since Darwin. *Bot J Linn Soc* 162(suppl):S114–S126.
- Weller SG, MF Denton 1976 Cytogeographic evidence for the evolution of distily from tristily in the North American species of *Oxalis* section *Ionoxalis*. *Am J Bot* 63:120–125.
- Weller SG, CA Domínguez, FE Molina-Freaner, J Fornoni, G LeBuhn 2007 The evolution of distily from tristily in populations of *Oxalis alpina* in the Sky Islands of the Sonoran Desert. *Am J Bot* 94:972–985.