



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA DE  
INCOMPATIBILIDAD HETEROMÓRFICO DE *Bouvardia  
ternifolia* (RUBIACEAE), UNA ESPECIE DISTÍLICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

PAULA ESTELÍ ROMERO OVALLE



DIRECTORA DE TESIS:

M. EN C. KARINA JIMÉNEZ DURÁN

MÉXICO D.F. 23 SEPTIEMBRE 2013



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.

### 1. Datos del alumno

Apellido paterno	Romero
Apellido materno	Ovalle
Nombre (s)	Paula Estelí
Teléfono	044 55 4557 9353
Carrera	Biología
Número de cuenta	303287892
Universidad Nacional Autónoma de México	Facultad de Ciencias

### 2. Tutor

Grado	M. en C.
Apellido paterno	Jiménez
Apellido materno	Durán
Nombre (s)	Karina

### 3. Sinodal 1

Grado	Dr.
Apellido paterno	Domínguez
Apellido materno	Pérez Tejada
Nombre (s)	César Augusto

### 4. Sinodal 2

Grado	M. en C.
Apellido paterno	Pérez
Apellido materno	Pacheco
Nombre (s)	Mónica Karina

### 5. Sinodal 3

Grado	M. en C.
Apellido paterno	Wong
Apellido materno	
Nombre (s)	José Gonzalo Ricardo

### 6. Sinodal 4

Grado	Dra.
Apellido paterno	Martínez
Apellido materno	Gordillo
Nombre (s)	Martha Juana

### 7. Datos del trabajo

Título	Caracterización del sistema de incompatibilidad heteromórfico de <i>Bouvardia ternifolia</i> (Rubiaceae), una especie distíllica
Número de páginas	89
Año	2013

## ***Dedicatoria***

A la mujer de mi vida, mi madre Leticia Ovalle Castro, porque con ella todo tiene sentido, caminar, voltear atrás, seguir adelante, soñar, preguntar, cuestionarse, gritar, llorar, amar, ayudar, pedir, exigir, perdonar, cambiar, probar, buscar, trabajar, sorprenderse... por regalarme a mi entera Andrea Estelí Romero Ovalle, mi brazo derecho, mi hemisferio emocional, mi buen oído, mi pie sano, mi mano diestra, ese tercer molar, mi lente, mi yo, mi tú, mi Sabina...

A mi padre Héctor José Romero Ortiz quien confía y exige, quien siempre tiene sed, quien provee y en el fondo, se alegra de poder hacerlo.

A mi hermano Salvador Romero Ovalle, por tenerte más cerca y por ofrecernos a Laura como un miembro más de la familia.

A mi abuela Laura Castro Astorga por reunir a la familia en ese pequeño espacio.

A mi tía Alma Ovalle Castro, porque te cito una y otra vez, por aferrarse a la vida, el instinto, la lucha, la demanda, por no dejar de caminar.

A Grecia Ramírez Ovalle por ser compañera, guía, amiga, prima del alma, por mostrarme la manera en la que se crece y se busca, por ser familia.

A Leslie Cid González, por siempre estar allí, para mí y para el mundo, por haberte encontrado entre los 7000 millones, nunca te perderé.

Y porque somos pareja que sabe que no está sola, a Roberto Arreola Ramos, te quiero en mi paraíso.

## ***Agradecimientos***

A la M en C. Karina Jiménez Durán por su trabajo sincero, meticuloso, entusiasta y preciso, así como por su amistad y consejos, por brindarse de todas las formas posibles para que se lograra este trabajo: micrografías, congresos, escritos, presentaciones, trabajos... Gracias.

A la Dra. G. Judith Márquez Guzmán por su taller, sus maravillosas clases, sobre todo por la paciencia eterna.

A la Dra. Margarita Collazo Ortega quien estuvo siempre al pendiente de sus queridos alumnos y por invariablemente regalarme sonrisas y abrazos francos. Además que con la Dra. Sonia Vázquez Santana, la Dra. Ana Laura López Escamilla y la Biól. Laura Patricia Olgún Santos hicieron sus observaciones, correcciones y sugerencias al presente trabajo.

A la M. en C. Monica Karina Pérez Pacheco por su apoyo en el trabajo de palinología, reiteradas gracias.

Al M. en C. José Ricardo Gonzalo Wong quien hizo amena la permanencia en el Laboratorio de Desarrollo de Plantas.

Al Sr. Antonio Torres, por permitirme observar a los pedregales, a la aferrada *Bouvardia ternifolia* y los mayitos, por transmitirme su serenidad y dedicación, por saludarme desde lejos... por su bitácora del jardinero.

A Nallély Suárez, Cesar Castillo, Montserrat Hernández, Juan Carlos Bravo, por ser compañeros de campo, de laboratorio, de trabajo, por escuchar, sugerir, enriquecer, por estar allí.

*Al comenzar mis estudios, el primer paso me agradó mucho,  
el mero hecho consciente, las formas, el poder moverme,  
el menor insecto o animal, los sentidos, la vista, el amor,  
el primer paso me dominó y tanto me agradó  
que me costó proseguir y si me detuve fue  
porque quise detenerme allí, holgazaneando para cantar  
eso en mis extasiados cantos.*

*Walt Whitman*

# Índice

I. Resumen .....	1
II. Introducción.....	3
III. Antecedentes .....	6
3.1. Sistemas reproductivos .....	6
3.2. Heterostilia .....	7
3.3. Distilia.....	9
3.4. Interacción polen-pistilo .....	10
3.5. Sistemas de incompatibilidad heteromórficos.....	15
3.6. Sistema de incompatibilidad de especies distílicas de la familia Rubiaceae .....	18
3.7. Polimorfismos auxiliares .....	20
3.8. <i>Bouvardia ternifolia</i> (Cav.) Schtdl.....	22
IV. Objetivos .....	25
4.1. Objetivo general .....	25
4.2. Objetivos particulares:.....	25
V. Material y métodos.....	26
5.1. Sitio de estudio.....	26
5.2. Especie de estudio <i>Bouvardia ternifolia</i> (Cav.) Schtdl. ....	26
5.3. Muestreo e identificación de la frecuencia de los morfos .....	27
5.4. Verificación de la hercogamia .....	28
5.5. Determinación del sistema de incompatibilidad heteromórfico.....	29
5.5.1. Identificación de un sistema de autoincompatibilidad e incompatibilidad intramorfo y la determinación de los tiempos de germinación de polen y crecimiento de tubos polínicos .....	29
5.5.2. Caracterización de los eventos tempranos en la interacción polen-pistilo .....	32
5.6. Identificación y descripción de polimorfismos auxiliares .....	33
5.6.1. Caracteres masculinos, granos de polen.....	33
5.6.1.1. Mediciones del grano de polen .....	33
5.6.1.2. Cuantificación de granos de polen.....	34
5.6.1.3. Prueba de viabilidad de grano de polen .....	35
5.6.1.4. Descripción y medición de la micromorfología del grano de polen .....	36
5.6.2. Caracteres femeninos .....	37
5.6.2.1. Longitud de papilas estigmáticas.....	37
5.6.2.2. Conteo de óvulos y semillas .....	38
5.6.3. Caracteres florales .....	39
5.6.4. Parámetros parentales.....	39
5.7. Análisis estadísticos .....	40
VI. Resultados .....	41
6.1. Muestreo y frecuencia de morfos florales en C.U.....	41
6.2. Cuantificación de la hercogamia .....	42
6.3. Determinación de un sistema de incompatibilidad heteromórfico .....	44
6.3.1. Identificación de un sistema de autoincompatibilidad e incompatibilidad intramorfo ..	44
6.3.2. Determinación de los tiempos de germinación de polen y crecimiento de tubos polínicos .....	46
6.3.3. Caracterización los eventos tempranos de la interacción polen-pistilo .....	49
6.4. Identificación y descripción de polimorfismos auxiliares .....	54
6.4.1. Caracteres masculinos.....	54
6.4.1.1. Mediciones de los granos de polen .....	54
6.4.1.2. Cuantificación de los granos de polen .....	56
6.4.1.3. Prueba de viabilidad de granos de polen .....	56
6.4.1.4. Descripción y medición de la micromorfología del grano de polen .....	57
6.4.2. Caracteres femeninos .....	60
6.4.2.1. Longitud de papilas estigmáticas.....	60
6.4.2.2. Cuantificación de óvulos y semillas .....	60
6.4.3. Caracteres florales .....	61
6.4.4. Parámetros parentales.....	61

6.4.4.1. Germinación y sobrevivencia de plántulas .....	61
VII. Discusión .....	63
7.1. Frecuencia de los morfos y hercogamia .....	63
7.2. Determinación de un sistema de incompatibilidad heteromórfico .....	65
7.2.1. Identificación del sistema de autoincompatibilidad e incompatibilidad intramorfo.....	65
7.2.2. Determinación de los tiempos de germinación de polen y crecimiento de tubos polínicos .....	67
7.2.3. Caracterización de los eventos tempranos en la interacción polen-pistilo .....	70
7.3. Identificación y descripción de polimorfismos auxiliares .....	72
7.3.1. Caracteres masculinos, granos de polen.....	72
7.3.2. Caracteres femeninos .....	76
7.3.3. Caracteres florales .....	77
VIII. Conclusión .....	79
IX. Perspectivas .....	80
X. Bibliografía .....	81

## Índice de figuras

Figura 1. Heterostilia .....	8
Figura 2. Interacción polen-pistilo. ....	13
Figura 3. Sistema de incompatibilidad heteromórfico .....	17
Figura 4. Mapa de Ciudad Universitaria.....	27
Figura 5. Flores Thrum y Pin de <i>B. ternifolia</i> .....	29
Figura 6. Polinizaciones manuales intermorfos, intramorfo y autopolinización .....	31
Figura 7. Medidas de polen de <i>B. ternifolia</i> .....	34
Figura 8. Medidas de microestructuras de grano de polen. ....	37
Figura 9. Proporción de cada morfo por zonas.....	42
Figura 10. Polinizaciones intermorfo a 48 horas.....	45
Figura 11. Polinizaciones ilegítimas a 48 horas.....	46
Figura 12. Crecimiento de los tubos polínicos en polinizaciones intermorfo .....	48
Figura 13. Crecimiento de tubos polínicos en polinizaciones ilegítimas.....	49
Figura 14. Micrografías de las primeras etapas de interacción polen-pistilo.....	53
Figura 15. Vistas polares de granos de polen .....	55
Figura 16. Vistas ecuatoriales de grano de polen.....	56
Figura 17. Micrografías del polen.....	59

## Índice de tablas

Tabla 1. Sistema de incompatibilidad en especies distílicas de la familia Rubiaceae .....	19
Tabla 2. Polimorfismos auxiliares reportados en especies distílicas. ....	21
Tabla 3. Zonas de muestreo en Ciudad Universitaria.....	28
Tabla 4. Interacción polen-pistilo .....	52
Tabla 5. Caracteres masculinos.....	58
Tabla 6. Caracteres femeninos y florales.....	61

## Índice de gráficas

Gráfica 1. Porcentaje de individuos Pin y Thrum en C.U.....	41
Gráfica 2. Medidas de los estambres y los pistilos. ....	43
Gráfica 3. Caracteres parentales .....	62

## I. Resumen

La heterostilia es un sistema reproductivo que se caracteriza por presentar dos o tres morfos florales con una disposición recíproca en la longitud de los estambres y de los pistilos, es decir, complementarios y que además cuenta con un sistema de incompatibilidad heteromórfico, cada morfo floral tiene polimorfismos auxiliares asociados, los cuales pueden estar ligados al locus *S* y que en su conjunto evitan la endogamia. Se sabe que la familia Rubiaceae presenta una gran cantidad de especies heterostílicas, entre ellas *Bouvardia ternifolia* la cual se considera una especie distílica, es decir, con dos morfos florales (Pin y Thrum). Sin embargo, no se ha descrito detalladamente la respuesta de incompatibilidad heteromórfica ni a los eventos tempranos de la interacción polen-pistilo. En el presente trabajo, se estudió la población de *B. ternifolia* de Ciudad Universitaria en México D.F., en el muestreo se determinó que la relación de los morfos fue 1:1. Los valores obtenidos en la reciprocidad con el índice de Richard y Koptur son los mayores reportados para la especie. Respecto al sistema de incompatibilidad heteromórfico, el rechazo de polen incompatible se observó entre la segunda y tercera hora post-polinización, cuando los tubos polínicos rebasan las papilas estigmáticas en el tejido de transmisión del estigma en intramorfo y autopolinizaciones (polinizaciones ilegítimas). De las polinizaciones intermorfos en las tasas de germinación y de crecimiento de tubos polínicos, no hubo diferencias entre los morfos, observándose los tubos polínicos en la base del estilo a las 48 horas post-polinización. En las etapas tempranas de interacción polen-pistilo no se observaron diferencias entre los morfos ni entre el tipo de polinización (intermorfo,

intramorfo y autopolinizaciones). De las estructuras asociadas a la distilia, los caracteres que presentaron diferencias significativas entre los morfos fueron: el tamaño de la corola, la producción de grano de polen, las microestructuras de la ornamentación del grano de polen (íntimamente relacionado con sistema de incompatibilidad heteromórfico) y la longitud de los tricomas de la corola, donde el morfo Thrum es el que presenta mayor tamaño de corola y de producción de polen, mientras que Pin tiene más grandes los tricomas. En tanto que las características estudiadas que no presentaron diferencias entre los morfos fueron el tamaño, forma y viabilidad del grano de polen; longitud de papilas estigmáticas, producción de óvulos y semillas y, tasas de germinación de semillas y sobrevivencia de plántulas. Por lo que se determinó que la población de *B. ternifolia* del pedregal de C.U. es estable y distílica, conservando un sistema de incompatibilidad heteromórfico, polimorfismos auxiliares y hercogamia recíproca.

**Palabras claves:** morfos florales, sistema de incompatibilidad heteromórfico, polimorfismos auxiliares, índice de Richard y Koptur, intermorfo, intramorfo y autopolinizaciones, interacción polen-pistilo y distilia.

## II. Introducción

Los sistemas reproductivos en las plantas resultan de la combinación de varias características, como la compatibilidad genética, la sexualidad, la variación temporal en la maduración de los sexos y las barreras morfológicas florales que promueven la autogamia o xenogamia (Bawa y Beach, 1981). Estos mecanismos son los que determinan los patrones de transmisión de genes y con ello la variación genética a nivel de especies o de poblaciones (Barrett, 1998).

La hercogamia es una barrera morfológica que resulta de la disposición diferencial de los órganos sexuales (estambres y pistilos) y en algunas especies se ve constituida por un polimorfismo en la altura de los estambres y pistilos con respecto a la base de la corola, los cuales son complementarios (hercogamia recíproca en una población), conocida como heterostilia (Lloyd y Webb, 1992).

La distilia es un tipo de heterostilia que presenta dos morfos florales con una relación generalmente de 1:1 en una población (Barrett *et al.*, 2000). Los morfos florales de la distilia son conocidos como Pin (pistilo largo y estambres cortos) y Thrum (pistilos cortos y estambres largos; Strobeck, 1972).

Las plantas distílicas suelen mostrar tanto hercogamia recíproca como un sistema de incompatibilidad heteromórfico, que permite el apareamiento sólo entre los morfos, aumentando el flujo génico y la variabilidad genética, que evita la depresión por endogamia y los factores que disminuyen la adecuación en las poblaciones de una especie ante las variables ambientales (Arroyo y Cabrera,

1977; Barrett, 1998). La polinización intermorfo promueve la polinización cruzada, puesto que los polinizadores tienden a llevar el polen de los morfos en diferentes lugares de su cuerpo (Darwin, 1877).

El sistema de incompatibilidad heteromórfico se caracteriza por contar con polimorfismos auxiliares que implican principalmente al polen y los estigmas de los morfos florales de las especies distílicas, como diferencias en la exina, colores del polen, y en el caso de los estigmas, en la estructura de las papilas estigmáticas, grado de humedad, colores y tamaños (Dulberger, 1992) y sustancias de reconocimiento como glicoproteínas, proteínas quinasas y poligalacturonasas (Nasrallah *et al.*, 1985; McCubbin *et al.*, 2006). Además de las relacionadas con otras estructuras florales (Suárez, 2013; Ornelas *et al.*, 2004; Leege y Wolfe, 2002; Wolfe, 2001; Paillet y Tompson, 1997; Arroyo y Dafni, 1995; Mazer y Hulfgard, 1993).

El sistema de rechazo en especies heterostílicas puede darse a diferentes niveles, desde la adherencia del grano de polen al estigma, hasta nivel del óvulo, evitando así la fecundación (Swanson *et al.*, 2004). Se han reportado diferencias entre los morfos en una misma especie, lo que indica que los mecanismos de reconocimiento pueden ser diferentes en cada uno de los morfos (Tamari y Shore, 2004). Para determinar dichas diferencias es necesario analizar aspectos de la interacción polen-pistilo en diferentes etapas y bajo distintas metodologías (Klein *et al.*, 2009).

No es fácil determinar la heterostilia en una población, mucho menos para una especie, ya que la hercogamia recíproca, en muchas ocasiones no es muy clara (relación estambres-pistilos y proporción poblacional). Sin embargo, los análisis genéticos, el estudio de polinizadores y un análisis del sistema de incompatibilidad heteromórfico pueden ayudar a dilucidarlo (Massinga *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se estudió la distilia de *Bouvardia ternifolia* en la población de Ciudad Universitaria México D.F., abordando para ello los siguiente aspectos: muestreo de la población para determinar la proporción de los morfos; realizar prueba de hercogamia recíproca mediante el índice de reciprocidad de Richard y Koptur; corroborar la existencia de un sistema de reconocimiento por medio de la observación del crecimiento de los tubos polínicos en polinizaciones intermorfos, intramorfos y autopolinizaciones y, caracterizar los eventos tempranos de los diferentes sistemas de polinización en la interacción polen-pistilo, así como identificar y describir polimorfismos auxiliares mediante diversas técnicas de microscopía que involucran medidas y conteos.

### III. Antecedentes

#### 3.1. Sistemas reproductivos

Considerando que las plantas pueden depender de un vector para la dispersión del polen que garantice su reproducción, éstas han evolucionado generando diversas adaptaciones asociadas con los agentes dispersores. Se han asociado las características florales con los modelos de dispersión del polen lo que permite elevar la probabilidad de polinización cruzada (xenogamia; Lloyd y Barrett, 1996). La hercogamia corresponde a una de las estrategias reproductivas para prevenir la autopolinización al tener una separación entre las estambres y el pistilo (Lloyd y Webb, 1992). Mientras que la hercogamia recíproca corresponde a la complementariedad en la longitud o disposición de estambres y pistilos de dos o tres morfos florales dentro de una población, los cuales son: enantiofilia, inversofilia y la heterofilia. a) La enantiofilia implica la deflexión del estilo a la derecha o a la izquierda de la flor, pudiendo expresarse a diferentes niveles de organización estructural, que incluyen a la flor, la inflorescencia y a los individuos dentro de una población; b) inversofilia en el que los morfos florales muestran posicionamiento alternativo vertical de los órganos sexuales, donde las anteras y estilos miran hacia abajo, lo cual sólo ha sido descrito en *Hemimeris racemosa* (Scrophulariaceae); c) heterofilia es una hercogamia recíproca vertical acompañado de un sistema de incompatibilidad esporofítico y polimorfismos auxiliares (Lloyd y Barrett, 1996).

Existe un mecanismo sexual temporal al que se le conoce como dicogamia, en el que puede presentarse la protoginia donde los órganos femeninos maduran primero que los masculinos, y la protándria, que es la maduración temprana de los órganos masculinos (Bertin, 1993). Mientras que la flexistilia es una combinación de hercogamia recíproca y dicogamia, ya que presenta una disposición recíproca de estambres y pistilos que maduran en tiempos diferentes, lo que garantiza una polinización cruzada.

### **3.2. Heterostilia**

La heterostilia es un sistema sexual complejo, en el que se involucran polimorfismos florales, hercogamia recíproca en la longitud de los órganos florales de los estambres y los pistilos, es decir, que existen dos o tres morfos florales y que estos se encuentran en una relación proporcional dentro de una población. Las poblaciones con dos morfos florales son conocidas como distílicas que tienen un solo nivel de estambres y, las poblaciones con tres morfos que tienen dos niveles de estambres son tristílicas. Ambos sistemas (distilia y tristilia) se caracterizan por estar acompañados de un sistema de reconocimiento específico asociado a polinizaciones recíprocas (Figura 1), es decir, que sólo se lleva a cabo la viabilidad de la polinización en el flujo de polen de un mismo nivel, ya sea de estambres largos a pistilos largos o de estambres cortos a pistilos cortos en el caso de la distilia y, en la tristilia hay tres niveles corto, mediano y largo (Barrett, 1992).

La heterostilia se ha documentado en 28 familias de angiospermas y la información filogenética indica que en al menos 23 de ellas han evolucionado independientemente, de éstas, cuatro familias son tristílicas Amaryllidaceae, Pontederiaceae, Oxalidaceae y Connaraceae. Dentro de las distílicas están en el grupo de las monocotiledóneas: Iridaceae; dicotiledóneas: Polygonaceae, Lythraceae, Erythroxylaceae, Linaceae, Olacaceae, Santalaceae, Saxifragaceae, Clusiaceae, Acanthaceae, Sterculiaceae, Turneraceae, Primulaceae, Plumbaginaceae, Boraginaceae y Rubiaceae. Ésta última familia evolutivamente relacionada con Loganiaceae, Menyanthaceae, Gentianaceae y Oleaceae. Finalmente las familias con reportes de distilia no confirmada son Caesalpinaceae, Ericaceae y Polemoniaceae. Además cabe señalar que las especies heterostílicas están relacionadas con las regiones tropicales (Barrett, 1992).

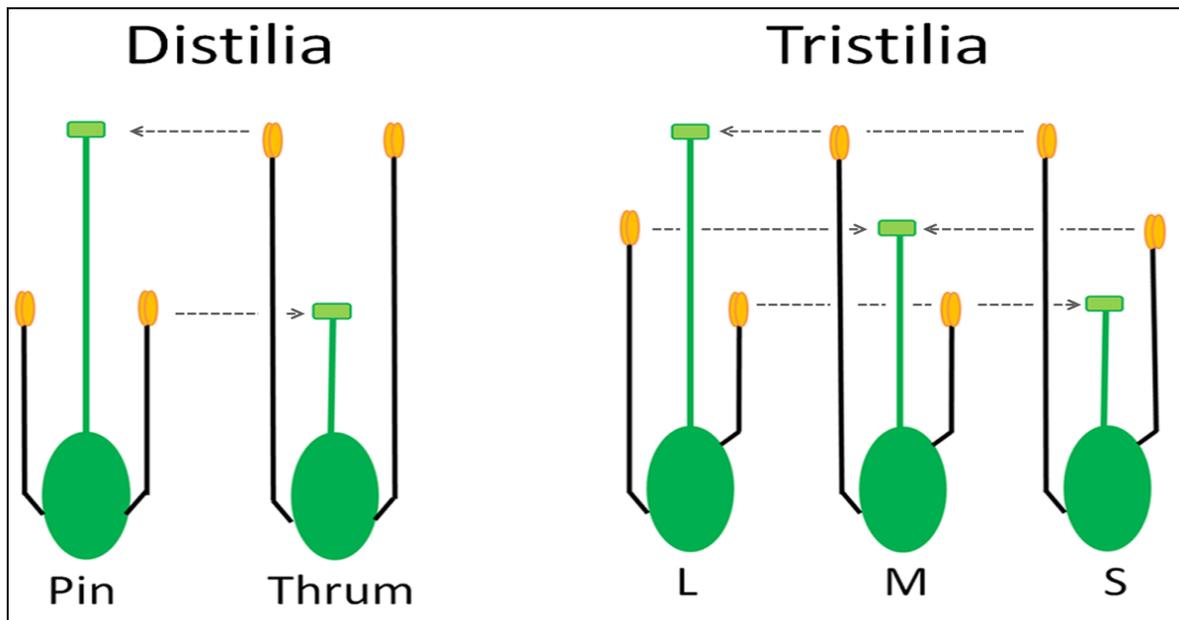


Figura 1. Heterostilia: Distilia (dos morfos florales) llamados Pin y Thrum; Tristilia (tres morfos florales) el morfo corresponde a la longitud del pistilo (L, M y S) largo, mediano y corto respectivamente. Las flechas grises indican los niveles recíprocos.

### 3.3. Distilia

Actualmente se sabe que las diferencias físicas entre los morfos de una especie distílica están determinadas por un sistema genético de un locus *S* con dos alelos (*S*, *s*) donde el homócigo dominante es letal, por lo que se obtiene un equilibrio poblacional 1:1 del Morfo Thrum (*Ss*) y Pin (*ss*; Lewis y Jones, 1992). Sin embargo, para constituir el conjunto de características propias de la distilia, ligadas a cada uno de los morfos, como son las longitudes de los órganos sexuales, el sistema de incompatibilidad y los polimorfismos auxiliares, se sugirió un modelo de tres genes ligados a *S* con dos variantes alélicas (*GPA*, *gpa*), en donde *G/g* controla la longitud del estilo y el sistema de reconocimiento femenino; *p/p* controla el tamaño de polen y el sistema de reconocimiento masculino y *A/a* controla la longitud de estambres o posición de las anteras.

El "supergen" consta de *GPA/gpa* para Thrum y *gpa/gpa* para Pin (Lewis y Jones, 1992). Así como también se han identificado otros genes posiblemente ligados al locus *S*, uno definido como el gen *s*, el cual confiere características a la superficie estigmática (longitud de las papilas) y otro gen relacionado con la ornamentación del grano de polen (de Netancour, 2001). Además los genes no ligados al Supergen, llamados genes modificadores, que están involucrados en el desarrollo de la flor (McCubbin *et al.*, 2006).

Se ha definido al sistema de rechazo de las especies distílicas como sistema de incompatibilidad heteromórfico esporofítico, el cual no tiene que ver con la genética y bioquímica que rigen a los sistemas de autoincompatibilidad

esporofíticos, sino por la parte que interfiere en la producción de sustancias en el sistema de rechazo femenino, por lo que el rechazo de la polinización puede darse a cualquier nivel (estigma, estilo u ovario), contrario a lo que se esperaría en el sistema de autoincompatibilidad esporofítico, en el cual el rechazo se da a nivel de superficie estigmática, donde el polen no germina (Athanasίου y Shore, 1997).

Respecto a los modelos de evolución de la distilia se han propuesto dos, el de incompatibilidad y el de transferencia de polen. El modelo de incompatibilidad propone que el fenotipo del ancestro era homostílico y que por procesos de depresión por endogamia fijaron la incompatibilidad dialéctica y para promover una polinización cruzada eficaz se seleccionó la hercogamia recíproca. Mientras que el modelo de transferencia de polen sugiere que el ancestro era una especie con hercogamia, donde la hercogamia recíproca funciona para promover el intercambio de polen eficientemente, del tal forma que por depresión por endogamia evolucionó a un sistema de incompatibilidad (Lloyd y Webb, 1992).

### **3.4. Interacción polen-pistilo**

La polinización inicia cuando el grano de polen ha sido captado por el estigma, y para que se lleve a cabo una polinización exitosa, el polen, que contiene las células espermáticas, debe llevarlas a través de los diferentes tejidos del pistilo hasta acceder al ovario (Figura 2; Swanson *et al.*, 2004). El pistilo proporciona todo lo que el polen requiere para germinar, incluyendo los nutrientes y las moléculas que guiarán al tubo polínico. Sin embargo, el pistilo no sólo facilita el

crecimiento del tubo polínico, sino también es una barrera que protege a los óvulos para que no accedan a él, especies o “tipos” de polen inapropiados (Swanson *et al.*, 2004).

El pistilo está compuesto de tres estructuras que son el estigma, el estilo y el ovario (Figura 2a). Cuando la superficie del estigma es seca, generalmente está compuesta de papilas estigmáticas, las cuales están cubiertas por ceras y una película proteica. Mientras que la pared celular del grano de polen tiene múltiples capas e incluyen a la intina, construida principalmente de celulosa y, la exina con una estructura ornamental intrincada compuesta de un biopolímero llamado esporopolenina (Figura 2b), donde la exina es la primera estructura masculina con quien interactúa el estigma, permitiendo un reconocimiento con las proteínas y lípidos (Swanson *et al.*, 2004).

Mediante mecanismos de reconocimiento y rechazo del polen, las células del pistilo discriminan entre polen, de especies diferentes y de la misma especie, de las plantas diferentes o de la misma planta (cuando existe un sistema de autoincompatibilidad). En *Arabidopsis* que son plantas modelo se han determinado las distintas fases de interacción polen-pistilo (Johnson y Preuss, 2002).

La interacción polen-pistilo es el conjunto de fenómenos físicos y bioquímicos que involucran a ambas estructuras sexuales una vez que se ha dado la polinización, la cual se divide en cinco fases: fase I, de adherencia e hidratación del grano de polen; fase II, el grano de polen germina y crece en las papilas estigmáticas; fase

III, el tubo polínico entra en el tejido de transmisión y atraviesa el estilo; fase IV, el tubo polínico atraviesa del estilo al funículo de un ovario no fertilizado y; fase V, el ápice del tubo polínico se dirige a las células sinérgidas de un óvulo y liberan las células espermáticas (Figura 2; Johnson y Preuss, 2002).

La fase I se divide en varias etapas, de las cuales la etapa temprana de la adhesión es la captura de polen, la cual, es únicamente dependiente de la exina. La segunda es la formación de la capa de adhesión en el punto de contacto con el estigma, es la etapa donde intervienen lípidos, carbohidratos y proteínas del polen y del estigma, porque es justo cuando se generan las fuerzas adhesivas. La última etapa ocurre con la hidratación del grano de polen, ya que éste, está sumamente desecado y metabólicamente inactivo. Sólo después de que recibe el líquido y nutrientes necesarios del estigma se activa, polariza y es posible que germine y elongue el tubo polínico a través del estigma (Zinkl *et al.*, 1999).

En la fase II, para que se lleve a cabo la germinación del grano de polen sobre el estigma, los lípidos de la capa externa del polen determinan la polaridad de la germinación del grano de polen, ya que se establece un gradiente de humedad. Y para que se lleve a cabo la adherencia del tubo polínico al estigma y al tejido de transmisión del estigma es necesario que se generen proteínas de adhesión, ricas en cisteína, las cuales dependen únicamente del pistilo (Park *et al.*, 2000).

En la fase III, una vez que el tubo polínico se ha introducido en la matriz celular del estigma comienza el proceso de secreción de enzimas digestivas por parte del tubo polínico, que permite atravesar el tejido de transmisión del estilo. Mientras

que el tejido de transmisión del estilo secreta libremente azúcares, aminoácidos glicolípidos, polisacáridos, lípidos y proteínas dentro de la matriz extracelular, proveyendo los nutrientes y recursos que necesita el tubo polínico para crecer rápidamente. En particular las arabindinogalacto-proteínas (AGPs) juegan diversos papeles entre el estilo y el tubo polínico, contribuyendo a la estructura, defensa, señalización, adherencia, nutrición y guía del tubo polínico (Cheung *et al.*, 1995).

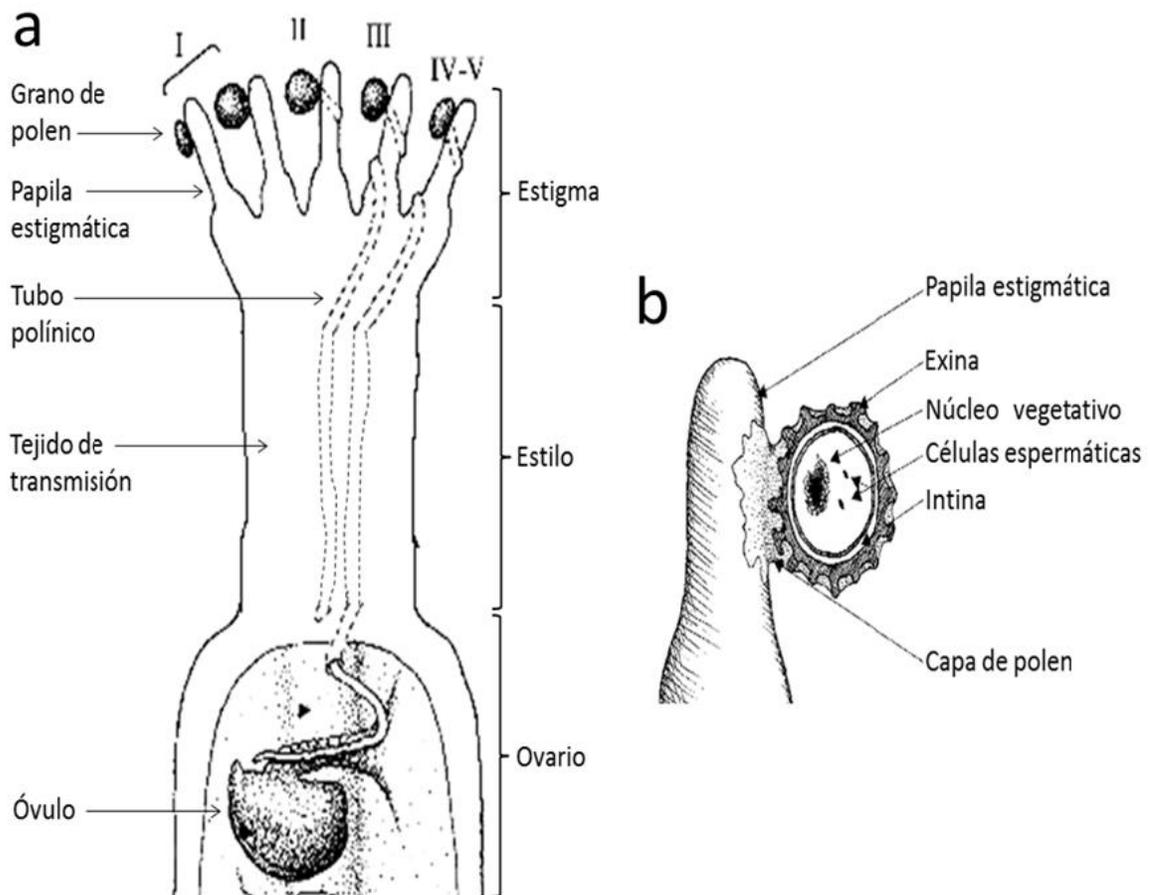


Figura 2. Interacción polen-pistilo. a) se esquematizan y señalan las estructuras del pistilo y las cinco fases de interacción polen-pistilo; b) se esquematiza la adherencia del grano de polen al estigma de la Fase I y se señalan las estructuras del grano de polen (Modificada de Swanson *et al.*, 2004).

El único trabajo en el que se contempla como tal la interacción polen-pistilo en especies distílicas es el de Klein *et al.* (2009) los cuales investigan los aspectos físicos celulares de la interacción polen-pistilo en polinizaciones legítimas e ilegítimas de *Psychotria nuda*. Ellos observaron que hay distintas respuestas por parte de cada uno de los morfos sugiriendo que hay mecanismos específicos de reconocimiento e incompatibilidad en el morfo Pin y en Thrum, donde el rechazo se da en la mayoría de las pruebas a nivel del estigma, sólo en el morfo Pin algunos tubos polínicos se hallaron en el primer tercio del estilo. Añaden que en las polinizaciones incompatibles no hay formación de tapones de calosa y que en el morfo Thrum en las puntas hay una gran concentración de calosa, mientras que en Pin esa misma zona estaban poco teñidas las muestras. Por lo que el sistema de incompatibilidad heteromórfico estaría dándose principalmente en la fase II, sin embargo también en la fase III de la interacción polen-pistilo. En las observaciones ultracelulares también describen las diferencias tanto entre polinizaciones compatibles e incompatibles, como entre morfos, en estas últimas hallan diferencias en la estructura de la pared celular, en las características del protoplasma y en organelos celulares: aparato de Golgi, mitocondrias, amiloplastos y vesículas, de las cuales se refiere su ubicación dentro del tubo polínico y características generales.

### **3.5. Sistema de incompatibilidad heteromórfico**

Cuando las flores son hermafroditas la autopolinización es probable, sin embargo sistemas de incompatibilidad previenen la fertilización de la misma planta o de plantas emparentadas. Los sistemas de incompatibilidad se clasifican en homomórficos y heteromórficos, en los sistemas homomórficos la incompatibilidad depende de una respuesta bioquímica controlada por un locus S multialélico y puede ser de dos tipos: incompatibilidad gametofítica o esporofítica (Campbell y Reece, 2007).

En la incompatibilidad gametofítica el reconocimiento se da con el tubo polínico, el cual es una estructura haploide ( $n$ ), y el nivel de rechazo es generalmente en el estilo o hasta el ovario, y el estigma suele ser de superficie húmeda. Mientras que en la incompatibilidad esporofítica interactúan tejidos del esporofito progenitor del polen, diploides ( $2n$ ), es decir, generalmente el tapete del grano de polen y el estigma, el cual es seco, y el sitio de inhibición es el estigma, impidiendo incluso la hidratación y/o germinación del grano de polen (Campbell y Reece, 2007).

El sistema de incompatibilidad heteromórfico es propio de especies heterostílicas, ya sea distílicas o tristílicas y la respuesta de rechazo está controlada por un locus S dialélico que permite la fecundación sólo en polinizaciones intermorfo, es decir legítimas Pin x Thrum o Thrum x Pin. Mientras que en polinizaciones intramorfo, es decir Pin x Pin o Thrum x Thrum, o en autopolinizaciones es decir en polinizaciones de polen de una misma flor o planta, se lleva a cabo un rechazo del

polen, el cual se puede dar a distintos niveles en la interacción polen-pistilo, desde el estigma, hasta el ovario (Dulberger, 1992).

El sistema de incompatibilidad heteromórfico está controlado por el supergen GPA por lo que el polen está íntimamente relacionado con el reconocimiento y/o rechazo, y en las cuales su morfología (tamaño o estructura) está involucrada, ya que el morfo Thrum (Ss), se define con granos de polen grandes y pistilos cortos, mientras que el Pin (ss) con granos de polen pequeños y pistilos largos, por lo que al hacer polinizaciones legítimas es posible obtener semillas (Lewis y Jones, 1992). Mientras que en polinizaciones ilegítimas (intramorfo o autopolinizaciones) el sistema de incompatibilidad se activa y se inhibe el crecimiento del tubo polínico en el pistilo, ya sea a nivel de estigma, estilo u ovario (Figura 3; Lewis y Jones, 1992).

Cabe mencionar que en los sistemas de incompatibilidad heteromórficos se han identificado diferencias en las tasas de crecimiento de los tubos polínicos de los morfos, dando como resultado que los tiempos de llegada a la base del estilo entre un morfo y otro sean iguales, pese a que las longitudes de los estilos sean significativamente diferentes, por lo que se compensan con la velocidad de crecimiento, la cual está asociada al tamaño del polen (Lewis y Jones, 1992).

Sin embargo se han encontrado especies distílicas con un sistema de incompatibilidad multialélico, pero estos sistemas suelen estar relacionados con poblaciones con una heterostilia incompleta, por ejemplo, con un bajo índice de reciprocidad entre la longitud de estambres y de pistilos (de Netancour, 2001).

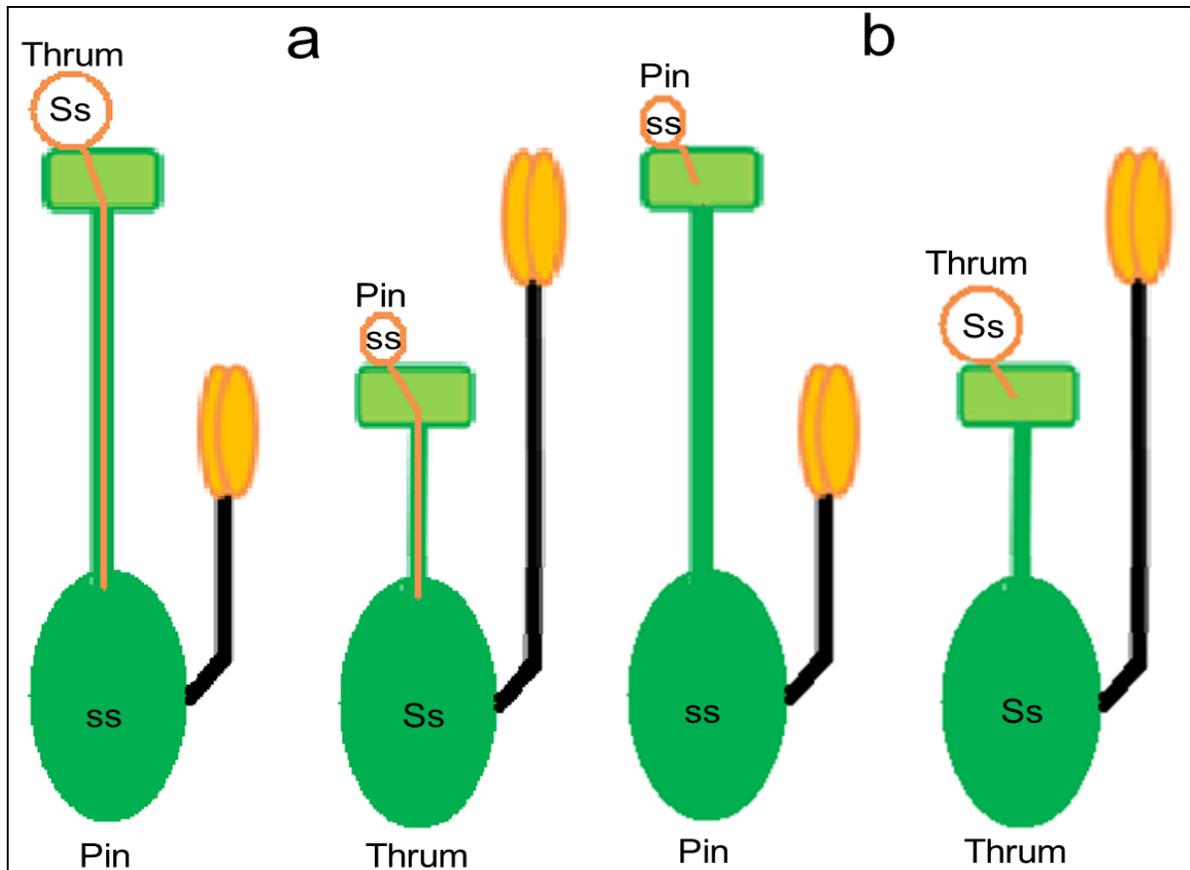


Figura 3. Sistema de incompatibilidad heteromórfico: a) polinización legítima (intermorfo) donde el polen proviene del morfo complementario y por lo tanto es compatible, b) polinización ilegítima (intra-morfo o autopolinización) donde el polen proviene del mismo morfo por lo que es incompatible.

Los genes del sistema de incompatibilidad heteromórfico regulan la producción diferencial de proteínas, las cuales se expresan en estigmas y estilos del morfo Thrum y en el polen del morfo Pin (Athanasίου y Shore, 1997). Cabe señalar que ninguno de estos genes asociados a la distilia y en particular al sistema de incompatibilidad heteromórfico han sido debidamente identificados o analizados (Klein *et al.*, 2009).

Las familias en las que se ha estudiado el sistema de incompatibilidad heteromórfico son Boraginaceae, Gentianaceae, Linaceae, Malvaceae,

Menyanthaceae, Oxilidaceae, Plumbaginaceae, Primulaceae, Rubiaceae y Turneracea (Wolfe *et al.*, 2009; Wang *et al.* 2005; Dulberger, 1992).

### **3.6. Sistema de incompatibilidad de especies distílicas en la familia Rubiaceae**

Con respecto al sistema de incompatibilidad heteromórfico en la incompatibilidad en la familia Rubiaceae, en la mayoría de los estudios consideran observaciones en microscopía confocal y/o generación de frutos y semillas, por lo que sólo reconoce si se presenta un sistema de rechazo y el nivel al que se lleva a cabo éste, solamente el trabajo de Klein *et al.* (2009) considera los aspectos ultraestructurales mediante microscopía electrónica de transmisión.

De las especies estudiadas de la familia Rubiaceae se ha reportado que hay diferencias en el rechazo entre los morfos, ya sea en las características de los tubos polínicos, en el nivel de rechazo o en la formación de frutos, así como un aparente rompimiento del sistema de incompatibilidad heteromórfico. De lo cual también se observa que el nivel de rechazo varía entre el estigma y diferentes niveles del estilo para esta familia (Tabla 1).

Cabe señalar que la mayoría de los trabajos reportados para sistemas de incompatibilidad heteromórfico se han hecho en especies del género *Psychotria* (Cardoso y Cardoso, 2004), el cual es un género relacionado con *Bouvardia* ambos dentro de la misma tribu Psychotrieae (página web: *Missouri Botanical*

Garden, [www.mobot.org](http://www.mobot.org)). Así como también se ha hecho trabajos de incompatibilidad en otras poblaciones de *B. ternifolia* (Faivre, 2002).

Tabla 1. Sistema de incompatibilidad en especies distílicas de la familia Rubiaceae

Especie	SI	Sitio de inhibición	Formación de frutos (polinizaciones ilegítimas)	Autor
<i>Psychotria acuminata</i> <i>Cephaelis elata</i> <i>Coussarea sp.</i> <i>Faramea sp.</i> <i>Psychotria sp.</i> <i>Rudgea corniflora</i>	No Sí Sí Sí Sí Sí	/ Pin en estilo, Thrum en estigma.	En todas la polinizaciones En menor proporción	Bawa y Beach, 1983
<i>Guettarda scabra</i>	P	/	Sí por igual en Thrum	Richard y Koptur, 1993
<i>Gaertnera vaginata</i>	Sí	/	Thrum en intramorfo (-)	Pailler y Thompson, 1997
<i>Psychotria poeppigiana</i> <i>P. chiapensis</i> <i>Bouvardia ternifolia</i>	Sí Sí Sí	Pin primer medio del estilo, Thrum no germinan o estigma. Pin intramorfo en segundo medio del estilo y autopolinizaciones en primer medio del estilo, Thrum desde estigma hasta base del estilo.	/ / /	Faivre, 2002
<i>Psychotria birotula</i> <i>P. mapourioides</i> <i>P. jasminoides</i>	Sí Sí Sí	Pin en todo el estilo hasta la base y Thrum en estigma.	Thrum autopolinización (-) Thrum intramorfo (-) En menor proporción	Castro <i>et al.</i> , 2004
<i>Psychotria nuda</i>	Sí	Pin en estigma y Thrum en distintos niveles del estilo	Thrum intramorfo (-)	Castro y Araujo, 2004 Klein <i>et al.</i> , 2009
<i>Psychotria sp.</i>	Sí	Estigma en ambos morfos	/	Cardoso y Cardoso, 2004
<i>Pentasia prunelloides</i> <i>P. angustifolia</i>	Sí P	Pin estigma, Thrum estilo /	Thrum intramorfo (-) Intramorfo ambos (-)	Massinga <i>et al.</i> , 2005
<i>Psychotria ipecacuanha</i>	P	Primer tercio del estilo	Intramorfo ambos (-)	Rossi <i>et al.</i> , 2005
<i>Palicourea marcgravii</i> <i>P. officinalis</i>	P	/	Intramorfo y autopolinizaciones en ambos morfos (-)	Consolaro <i>et al.</i> , 2009
<i>Palicourea rigida</i>	Sí	Pin en autopolinizaciones en base del estilo e intrapolinizaciones a lo largo del estilo, Thrum en estigma.	Pin ambas polinizaciones (-)	de Oliveira <i>et al.</i> , 2010
<i>Hedyotis acutangula</i>	P	Base del estilo en ambos morfos.	Intramorfo y autopolinizaciones en ambos morfos (-)	Wu <i>et al.</i> , 2010

Nota: Sistema de incompatibilidad (SI), sistema de incompatibilidad parcial o indefinido (P), no aplica o no se menciona (/), en menor proporción (-).

### 3.7. Polimorfismos auxiliares

La variedad de polimorfismos auxiliares varía entre especies y entre morfos, por lo que ningún juego específico de características ha sido determinado como patrón. Se han identificado polimorfismos masculinos, femeninos y florales, los cuales suelen estar ligados al locus S y fungen como mecanismos auxiliares en el sistema de cruce (Tabla 2; Dulberger, 1992).

Con respecto a los polimorfismos auxiliares dentro de la familia Rubiaceae se han encontrado patrones, por ejemplo, el diámetro y largo de la corola en el morfo Thrum es más grande que el Pin, como en *Palicourea fendleri* y *P. petiolaris* (Sobrevila *et al.*, 1983), *Luculia gratissima* (Murray, 1990), *Guettarda scabra* (Richards y Koptur, 1993), *Manettia luteorubra* (Passos y Sazima, 1995), *Quinchamalium chilense* (Riveros *et al.*, 1995), *Gaertnera vaginata* (Paillet y Thompson, 1997), entre otros. Así mismo se ha observado que el morfo Thrum es el que presenta un mayor tamaño en corola y polen, por ejemplo, en el género *Psychotria* (Cardoso y Cardoso, 2004). Sin embargo, la importancia de los polimorfismos auxiliares todavía no es muy clara.

Naiki y Nagamasu (2003) han reportado diferencias en la estructura y ornamentación de la exina de especies distílicas del género *Damnacanthus*, así como también variedad de formas dentro de un mismo individuo, mientras que en especies homostílicas del mismo género no hay tales observaciones, es decir, el grano de polen no tiene variación en el número de colpos.

Tabla 2. Polimorfismos auxiliares reportados en especies distilicas.

<b>Carácter</b>	<b>Especie</b>	<b>Autor</b>
Tamaño de los granos de polen*	<i>Primula farinosa</i> <i>Gaertnera vaginata</i> <i>Palicourea padifolia</i> <i>Turnera diffusa</i>	Mazer y Hultgard, 1993 Pailler y Thompson, 1997 Ornelas <i>et al.</i> , 2004 Suárez, 2013
Forma de los granos de polen*	<i>Arcytophyllum lavarum</i>	García, 2008
Producción de granos de polen*	<i>Primula farinosa</i> <i>Turnera ulmifolia</i> <i>Gaertnera vaginata</i> <i>Palicourea padifolia</i> <i>Psychotria nuda</i> <i>Turnera diffusa</i>	Mazer y Hultgard, 1993 Baker y Shore, 1995 Pailler y Thompson, 1997 Cardoso y Cardoso, 2004 Ornelas <i>et al.</i> , 2004 Suárez, 2013
Viabilidad de granos de polen	<i>Amsinckia grandiflora</i>	Ornduff, 1976
Ornamentación del grano de polen*	<i>Turnera ulmifolia</i> <i>Linum pubescens</i> <i>Damnacanthus</i> <i>Bouvardia ternifolia</i>	Baker y Shore, 1995 Wolfe, 2001 Naiki y Nagamasu, 2003 López, 2007
No. de colpos del grano de polen	<i>Damnacanthus</i>	Naiki y Nagamasu, 2003
Color de los granos de polen	<i>Linum pubescens</i> <i>Linum suffruticosum</i>	Wolfe, 2001 Armbruster <i>et al.</i> , 2006
Longitud de estambres	<i>Turnera diffusa</i>	Suárez, 2013
Longitud del estigma	<i>Turnera diffusa</i>	Suárez, 2013
Lóbulos del estigma*	<i>Ophiorrhiza napoensis</i> <i>Palicourea padifolia</i> <i>Turnera diffusa</i>	Kudoh <i>et al.</i> , 2001 Ornelas <i>et al.</i> , 2004 Suárez, 2013
Tamaño de papilas estigmáticas*	<i>Guettarda scabra</i> <i>Gaertnera vaginata</i> <i>Psychotria chiapensis</i> <i>Palicourea padifolia</i>	Richard y Koptur, 1993 Pailler y Thompson, 1997 Faivre y McDade, 2001 Ornelas <i>et al.</i> , 2004
Longitud de células del estilo	<i>Jasminum fruticans</i> <i>Primula vulgaris</i>	Tompson y Dommeè, 2000 Webster y Gilmartin, 2006
Tamaño del ovario	<i>Gelsemium sempervirens</i>	Leege y Wolfe, 2002
Forma de ovario	<i>Turnera diffusa</i>	Suárez, 2013
Producción de óvulos	<i>Primula farinosa</i>	Mazer y Hultgard, 1993
Tamaño de la corola*	<i>Palicourea fendleri</i> <i>Luculia gratissima</i> <i>Guettarda scabra</i> <i>Manettia luteorubra</i> <i>Quinchamalium chilense</i> <i>Gaertnera vaginata</i> <i>Bouvardia ternifolia</i>	Sobrevila <i>et al.</i> , 1983 Murray, 1990 Richards y Koptur, 1993 Passos y Sazima, 1995 Riveros <i>et al.</i> , 1995 Pailler y Thompson, 1997 Hernández, 2006; López, 2007
Color de la corola	<i>Linum pubescens</i>	Wolfe, 2001
Producción de néctar*	<i>Palicourea padifolia</i>	Ornelas <i>et al.</i> , 2004
Concentración de néctar	<i>Narcissus tazetta</i>	Arroyo y Dafni, 1995

(\*) Caracteres que se han reportado en la familia Rubiaceae.

### 3.8. *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltidl

Faivre y McDade (2001), hicieron un estudio de la hercogamia recíproca de *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltidl en una población de Tucson, Arizona, que anteriormente había sido reportada como distíllica. En este caso reportaron una continuidad en la altura de los pistilos y los estambres, indicando que no es estrictamente heterostíllica. Además hicieron análisis para los dimorfismos florales de las dimensiones de la corola, los pétalos, las anteras, los filamentos, los estigmas y los estilos.

Hernández (2006), estudió las poblaciones de Acuitlapilco y La Malinche Tlax. Tlaxcala, quien no encontró dimorfismo en los granos de polen, pero sí observó diferencias significativas en la longitud de la corola, así como la longitud de los estambres y de los pistilos fue recíproca, atribuyéndolo a la gran variedad de polinizadores para *B. ternifolia*. El autor concluye que el éxito reproductivo femenino en ambos morfos florales fue similar.

López (2007), en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, evaluó con los marcadores moleculares ISSR (por sus siglas en inglés *Inter Simple Sequence Repeats*) de 20 familias maternas (10 plantas Pin y 10 plantas Thrum) determinó la importancia de la hercogamia por medio de la tasa de fecundación cruzada. Encontró un total de 67 loci polimórficos repetibles. Reportó homostilia en la prueba de hercogamia recíproca con el índice de reciprocidad por la continuidad en los valores máximos, sin embargo al comparar con los valores de índice de reciprocidad reportados para otros taxones, determinó que *B. ternifolia* era

heterostílica. Encontró diferencias significativas entre los morfos florales en el largo de la corola, los estilos, los estambres y las anteras; describió que los granos de polen son tricolpados, reticulados con ornamentación supraverrugada en el téctum, que la ornamentación de la exina difiere entre los morfos y el ancho del lumen fue mayor en el morfo Thrum, mientras que en el morfo Pin el ancho de la columela. También reportó que la población de *B. ternifolia* del Pedregal de San Ángel se reproduce principalmente por polinización cruzada y que sólo el 4.5% de la progenie de la población proviene de cruas endogámicas, y que la gran mayoría de la progenie de polinización cruzada presentó paternidad múltiple, es decir, las semillas de un solo fruto proceden de diferentes donadores de polen.

Respecto al sistema de incompatibilidad Faivre (2002), en una población de Tucson, Arizona, estudió dos especies del género *Psychotria* y a *B. ternifolia*, en el que identificó que el nivel de rechazo para esta última, suelen ser diferentes entre morfos y entre polinizaciones ilegítimas (intramorfo y autopolinizaciones). En el caso de Pin intramorfo el nivel de rechazo se da en la mitad del estilo y en autopolinizaciones en el primer tercio del estilo. Mientras que para Thrum en ambos tratamientos varía desde el estigma hasta la base del estilo. También identificó que la capacidad de crecimiento del tubo polínico está relacionada con la longevidad del estigma.

Con relación al polen, Bilbatúa (2010), en la población de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel, examinó las tasas de germinación y de crecimiento de los tubos polínicos *in vitro* para ambos morfos florales, en el que relacionó el tamaño y forma del grano de polen, determinando que entre más grande y más esférico es,

más capacidad de germinación tiene y mayor velocidad de crecimiento de los tubos polínicos y que, sólo para el morfo Thrum es significativo el tamaño y la forma. Lo anterior lo asoció a la función sexual que se le atribuye a cada uno de los morfos, correspondiendo al morfo Thrum la función masculina.

Considerando el concepto más estricto de distilia, es necesario profundizar en el estudio del sistema desde el punto de vista ecológico, bioquímico y estructural de diferentes poblaciones de una especie que haya sido identificada con hercogamia recíproca, de tal forma que para *Bouvardia ternifolia* se han estudiado los caracteres florales asociados a la distilia. Sin embargo los trabajos de polinizaciones (interacción polen-pistilo y sistema de compatibilidad) y de las características del polen no han sido debidamente caracterizados, así como han diferido entre poblaciones, con lo cual se corrobora la importancia de estudiarla en diferentes poblaciones para estudios posteriores, ya sea genéticos y/o evolutivos.

## **IV. Objetivos**

### **4.1. Objetivo general:**

Confirmar si *Bouvardia ternifolia* es una especie distíllica con un sistema de incompatibilidad heteromórfico.

### **4.2. Objetivos particulares:**

- Conocer la proporción de los morfos Pin y Thrum en una muestra de la población de Ciudad Universitaria.
- Corroborar la hercogamia recíproca en *B. ternifolia*.
- Determinar la existencia de un sistema de incompatibilidad heteromórfico.
- Caracterizar los eventos tempranos de la interacción polen-pistilo en polinizaciones legítimas e ilegítimas.
- Identificar y describir polimorfismos auxiliares en los morfos.

## **V. Material y métodos**

### **5.1. Sitio de estudio**

El muestreo, las colectas y los experimentos se realizaron entre los meses de septiembre y noviembre de 2009 en la población de *B. ternifolia* ubicada en Ciudad Universitaria, entre los pequeños pedregales de las facultades (Tabla 3) sitio que Rzedowski y Rzedowski (1954) lo describen como matorral xerófilo, con una altitud de 2240 m. Presenta un relieve topográfico muy pronunciado, que según Álvarez *et al.* (1982) es lo que produce mosaicos de condiciones microclimáticas. La temperatura media anual es de 15.5 °C, con variaciones extremas de -6 °C hasta 34.6 °C y una precipitación pluvial de 870 mm anuales. Tiene una superficie total original de 4000 ha (Valiente y Luna, 1990).

### **5.2. Especie de estudio *Bouvardia ternifolia* (Cav.) Schltdl.**

Pertenece a la familia Rubiaceae, subfamilia Rubioidae, Tribu Psychotrieae. Su distribución abarca la cuenca de México, Estado de Oaxaca, Sonora y hasta el centro de Texas. Es un arbusto perenne, con crecimiento rápido en lugares abiertos, se localiza en bosques, matorrales y pastizales. Tiene hojas opuestas pecioladas enteras, elíptico-lanceolares; con inflorescencias en cimas terminales; flores actinomorfas, con cuatro pétalos connados, de color rojos, cuatro anteras adnadas a la corola. Florece de junio a septiembre, pero en condiciones óptimas de riego florecen todo el año (página web: Conabio, [www.conabio.gob.mx](http://www.conabio.gob.mx)).

### 5.3. Muestreo e identificación de la frecuencia de los morfos

Con la finalidad de conocer la frecuencia y ubicación de los morfos florales, así como la determinación de la proporción de los morfos Pin y Thrum se muestreó una parte de la población de *B. ternifolia*, en Ciudad Universitaria (C.U.) de la siguiente forma:

1. Se hicieron recorridos por todas las veredas, camellones y áreas verdes de Ciudad Universitaria (Figura 4) considerando sólo las plantas que tenían flores, para poder reconocer el morfo floral. Pudiéndose establecer cinco zonas principales de estudio (Tabla 3).
2. Al identificar los morfos por la presencia de flores se etiquetaron asignándoles un número y un color diferente para Pin y Thrum.

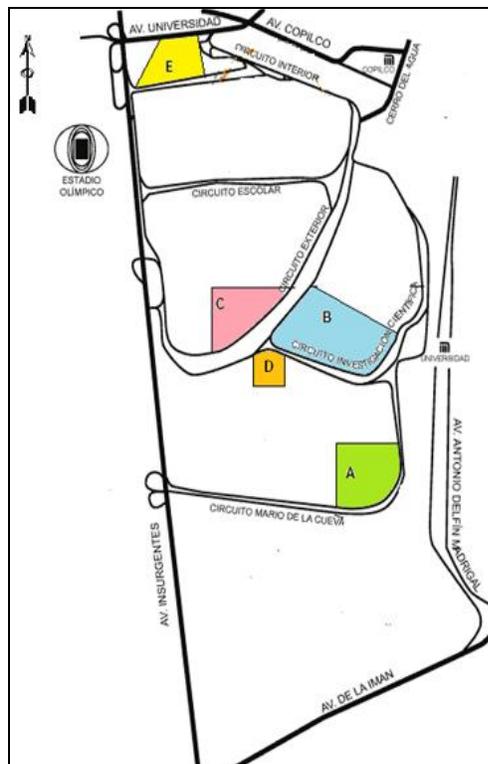


Figura 4. Mapa de Ciudad Universitaria. Se muestran con color y letras las zonas donde se llevó a cabo el muestreo, colectas y trabajo de campo.

Tabla 3. Zonas de muestreo en Ciudad Universitaria.

Zona	Dependencia
A	Facultad de Ciencias Políticas
B	Facultad de Ciencias y al Conjunto E y D de Química
C	Facultad de Contaduría y una sección del Anexo de Ingeniería
D	Estacionamiento de la Facultad de Contaduría
E	Facultad de Psicología

#### 5.4. Verificación de la hercogamia

La hercogamia recíproca se verificó mediante la relación del largo de los estambres y de los pistilos, para lo cual se utilizó el siguiente procedimiento:

1. Se midió con un vernier digital ( $\pm 0.02$  mm Stainless-Hardened) la longitud de los estambre y los pistilos de un total de 210 flores (Figura 5), 105 para Pin y 105 para Thrum, 15 inflorescencias de siete individuos del morfo Pin y 14 inflorescencias de 12 individuos del morfo Thrum. Las flores fueron colectadas considerando las cinco zonas establecidas en el muestreo.
2. Se aplicó el índice de reciprocidad de Richards y Koptur (1993):

$R = (EL) - (PL) / (EL) + (PL)$  para caracteres largos, y  $R = (EC) - (PC) / (EC) + (PC)$  para caracteres cortos, donde E es longitud de estambres, P longitud de pistilos, L largos y C cortos. Correspondiendo a hercogamia recíproca perfecta un valor de índice de cero y, no perfecta cuando es diferente de cero.

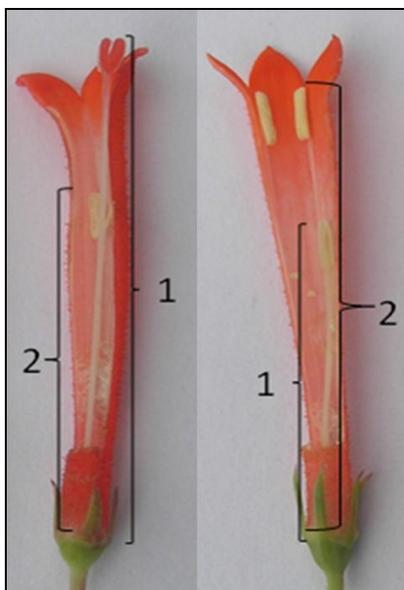


Figura 5. Flores Thrum y Pin respectivamente de *B. ternifolia*, en donde se señalan las medidas tomadas: 1) largo de pistilos, 2) largo de estambres.

## **5.5. Determinación del sistema de incompatibilidad heteromórfico**

### **5.5.1. Identificación del sistema de autoincompatibilidad e incompatibilidad intramorfo y la determinación de los tiempos de germinación de polen y crecimiento de tubos polínicos**

Considerando que se ha reportado que las barreras de autoincompatibilidad e incompatibilidad intramorfos están presentes en las plantas distílicas, además para determinar si en *B. ternifolia* existe algún sistema de reconocimiento y caracterizarlo, así como para identificar diferencias en la germinación y/o crecimiento de los tubos polínicos entre los morfos, se realizaron los siguientes tratamientos:

1. Se colectaron inflorescencias con botones florales y se mantuvieron en charolas con agua para que se conservaran hidratadas y en un lugar aislado de polinizadores. Removiéndose las flores abiertas y los herbívoros.
2. Los botones florales se emascularon 48 horas antes de la antesis de ambos morfos florales, para evitar que haya autopolinización.
3. Para los cinco tipos de tratamientos (intermorfo, intramorfo y autopolinización, control positivo y control negativo) se hicieron 15 repeticiones (Figura 6).

Intermorfo: Polinización de pistilos con polen de anteras recíprocas, es decir, Pin x Thrum y Thrum x Pin.

Intramorfo: Polinización de pistilos con polen de anteras pertenecientes al mismo morfo, pero de individuos diferentes, es decir, Pin x Pin y Thrum x Thrum, procurando que estos procedieran de sitios diferentes para evitar que estuvieran emparentadas.

Autopolinización: Se polinizaron pistilos con polen del mismo individuo pero de diferente flor (autopolinización geitonógama).

Control positivo: se descubrieron las flores ya emasculadas.

Control negativo: se dejaron las flores cubiertas y sin polinizar.

4. El método para procesar las muestras consistió en (versión modificada de López y colaboradores 2005), Fijar 48 horas post-polinización (para la identificación de un sistema de autoincompatibilidad e incompatibilidad intramorfo). Para la determinación de los tiempos de germinación y

crecimiento de tubos polínicos se fijaron a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 24 horas post-polinización con ácido acético y alcohol 3:1, dejándose 24 horas como mínimo en la solución a temperatura ambiente.

5. Los pistilos se aclararon y suavizaron con sulfito de sodio 10% p/v se y colocaron en autoclave durante 5 min.
6. Para poder hacer las observaciones finales los pistilos se mantuvieron en solución de azul de anilina a 4°C y en oscuridad por al menos un día.
7. Finalmente los pistilos se aplastaron, las observaciones y micrografías se hicieron en un microscopio de epifluorescencia *Olympus BX50*.

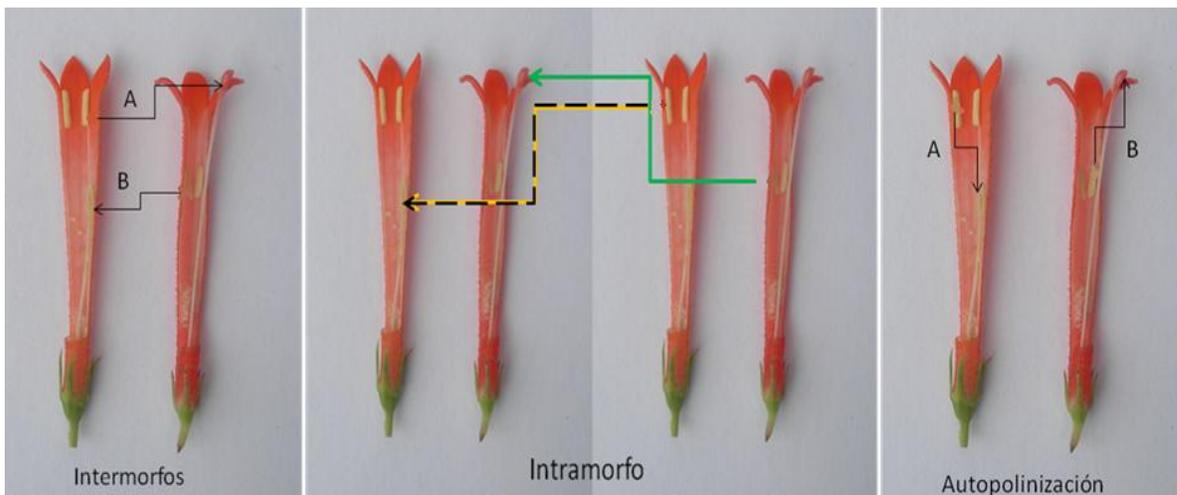


Figura 6. Polinizaciones manuales intermorfos, intramorfo y autopolinización. Cada flor corresponde a un individuo de la población y las flechas indican el tipo de polinización.

### **5.5.2. Caracterización de los eventos tempranos en la interacción polen-pistilo**

Las observaciones de la interacción polen-pistilo permitieron caracterizar la adherencia, hidratación y germinación del grano de polen en el estigma, y determinar si esta interacción se da en los tres tratamientos de polinizaciones (intermorfos, intramorfos y autopolinizaciones), así como identificar si hay diferencias entre los morfos y entre los tipos de polinizaciones, ya sea en los tiempos de cada etapa o en las características de cada una. El siguiente protocolo se basó en lo sugerido por López *et al.* (2005):

1. Se hicieron todos los tratamientos de polinizaciones mencionados para la determinación de la existencia de incompatibilidad heteromórfica en 10 flores de individuos diferentes.
2. Para fijar las muestras se usó FAA (formaldehído 10%, ácido acético 50% y alcohol 5%) a los 5, 15, 30 y 45 min post-polinización, tiempos que fueron definidos a partir de pruebas preliminares de polinización de una hora.
3. Los pistilos se deshidrataron en 30, 50, 70, 80, 96 y 100% de etanol durante 15 min, más dos cambios de etanol al 100%.
4. Se desecó a punto crítico con CO<sub>2</sub>. Y se cubrieron las muestras con oro según el protocolo de tratamiento ya establecido para observaciones en MEB
5. Las observaciones y micrografías se hicieron en un microscopio electrónico de barrido *JEOL JSM 5900LV*.

## **5.6. Identificación y descripción de polimorfismos auxiliares**

Los polimorfismos asociados a los morfos pueden identificarse en las estructuras florales, tanto en granos de polen, pistilos y corolas, por lo que se practicaron los siguientes métodos de observación de las diferentes estructuras.

### **5.6.1. Caracteres masculinos, granos de polen**

#### **5.6.1.1. Mediciones del grano de polen**

Para determinar si existen diferencias en el tamaño, forma del polen y número de colpos entre los morfos florales, se realizó una acetólisis de granos de polen de ambos morfos mediante el siguiente protocolo (Erdtman, 1966):

1. Se disectaron las anteras de flores en anthesis de 10 flores de 10 individuos diferentes y se maceraron en seco con palillos de madera en un tubo de vidrio.
2. Se adicionaron dos volúmenes de mezcla acetólica (anhídrido acético y ácido sulfúrico 9:1) partiendo del volumen del macerado.
3. El tubo se mantuvo en baño María a 65-75 °C ocho minutos, sin dejar de macerar y se paró la reacción con un volumen de ácido acético al 10%.
4. Se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min, se decantó y agregó ácido acético al 10%. Nuevamente se centrifugó, se decantó y añadió agua destilada.
5. Se tamizó el contenido y se colocó en un tubo limpio para volver a centrifugar a los mismos parámetros mencionados anteriormente para obtener un concentrado final, el cual se montó con gelatina.

6. Las observaciones y micrografías de los granos de polen de cada uno de los morfos se hicieron a 40X en un microscopio *Olympus BX27*.
7. A cada grano de polen se le midió la distancia polar y la distancia ecuatorial (Figura 7) con ayuda del programa *Image Pro 6.3* y para determinar la forma se obtuvo el cociente de dichos ejes.
8. Para la determinación del número de colpos y frecuencias para cada morfo se contabilizaron los colpos de 100 granos de polen.

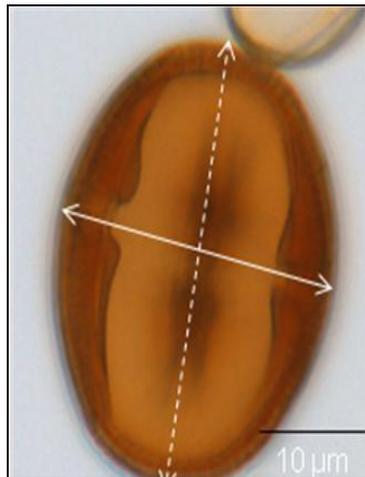


Figura 7. Medidas de polen de *B. ternifolia* del morfo Pin en vista ecuatorial. Se marcan con línea continua la distancia ecuatorial y con línea punteada la distancia polar.

#### **5.6.1.2. Cuantificación de granos de polen**

El conteo de los granos de polen permite apreciar si existen diferencias en la producción de granos de polen entre los morfos. La metodología que se usó es la siguiente, basada en Massinga *et al.* (2005):

1. Se colectaron todos los estambres de 10 flores en pre-antesis de 10 individuos para cada uno de los morfos y se colocaron en tubos Eppendorf.
2. Se añadió 200  $\mu$ L de etanol al 100% y 15  $\mu$ L de Tween 20 (polioxietileno) y el tejido se maceró.
3. Con la finalidad de degradar el tejido de las anteras y liberar los granos de polen se añadió 300  $\mu$ L de HCl al 10% y se incubó a 40 °C, durante 20 min.
4. Para sedimentar el polen se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min y se resuspendió el precipitado en 400  $\mu$ L de una solución 3:1 de ácido láctico y glicerol.
5. Se revolvió la solución con ayuda de un *Vortex* durante 30 s, tomando 1  $\mu$ L de la solución y se contabilizaron los granos de polen en el microscopio óptico a 40X, realizándose 10 repeticiones por cada muestra y el cálculo total de los granos de polen por cada flor se obtuvo multiplicando el promedio de las repeticiones por 400.

#### **5.6.1.3. Prueba de viabilidad de grano de polen**

Para determinar si existen diferencias en el porcentaje de viabilidad de los granos de polen en cada uno de los morfos y reconocer si éste influye en las diferencias de generación de semillas, se aplicó la prueba de Alexander (1969).

1. Se colectó el polen de 10 flores de 10 individuos diferentes.

2. Sobre un portaobjetos se añadió suficiente colorante de Alexander cubriendo en su totalidad los granos de polen, se calentó durante unos segundos para fijar el colorante.
3. Se contabilizaron los granos de polen viables (color morado) y no viables (color verde) en cinco campos de una cámara de Neubauer en un microscopio óptico a 40X.

#### **5.6.1.4. Descripción y medición de la micromorfología del grano de polen**

La ornamentación del grano de polen se observó usando microscopía electrónica de barrido (MEB). Con esta técnica se determinaron las diferencias morfológicas de Pin y Thrum. El procedimiento fue el siguiente:

1. Se colectaron anteras de flores en preantesis de cada uno de los morfos y se fijaron con FAA.
2. Se procesó el material usando el mismo método mencionado en interacción polen-pistilo y se tomaron micrografías de al menos 30 granos de polen.
3. Las microestructuras se midieron con el programa *Image Pro Plus 7*, las cuales fueron: el ancho de la columela, el diámetro de las gemas y el perímetro de los lúmenes (Figura 8).

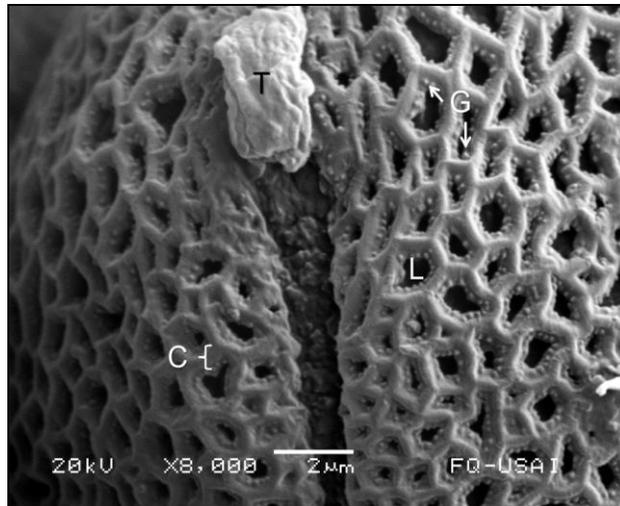


Figura 8. Medidas de microestructuras de grano de polen. Tapón del poro (T); columela (C); lumen (L); y gemas (G).

## 5.6.2. Caracteres femeninos

### 5.6.2.1. Longitud de papilas estigmáticas

Mediante el uso del MEB se midieron las longitudes de las papilas estigmáticas y se observó la apariencia y ornamentación de las mismas, con el fin de establecer diferencias entre los morfos, para ello:

1. Se emascularon flores aproximadamente 48 horas antes de la antesis, para evitar contaminación del grano de polen que pudieran afectar las observaciones posteriores.
2. Se fijaron 15 pistilos cuando las flores estaban en antesis, frescas y con una apariencia de receptividad del estigma (se ven plumosos).
3. Se procesaron las muestras como se menciona en el apartado de interacción polen-pistilo.
4. Se tomaron micrografías y se midieron con el programa *Image Pro Plus 7*.

### **5.6.2.2. Conteo de óvulos y semillas**

Para determinar si se presenta una función femenina o masculina por parte de alguno de los morfos fue necesario cuantificar la cantidad de óvulos que producen ambos morfos florales para evaluar si hay diferencias significativas, mientras que el conteo de semillas permitió corroborar la función sexual de cada uno de los morfos.

1. Para el conteo de los óvulos se colectaron 50 flores en antesis, de 10 individuos de cada morfo.
2. Se disectó la zona de los carpelos y se fijaron con FAA.
3. Los óvulos se extrajeron manualmente y se cuantificaron haciendo observaciones con un microscopio estereoscópico.
4. Para el conteo de semillas se colectaron en campo 30 frutos sin dehiscencia de 10 individuos de cada morfo floral.
5. Se guardaron individualmente cada uno de los frutos para evitar que las semillas de los distintos frutos se mezclaran en caso de que se liberarán las semillas.
6. Para acelerar el proceso de dehiscencia de los frutos se mantuvieron en una estufa a 30°C durante una semana.

### **5.6.3. Caracteres florales**

Para determinar si hay diferencias en el tamaño y forma de las corolas entre los morfos florales:

1. A las flores en antesis de ambos morfos, se les midió con un vernier digital Stainless-Hardened ( $\pm 0.02$  mm) el ancho de la corola y el largo a 105 flores de 15 inflorescencias, de siete individuos del morfo Pin y 105 flores de 14 inflorescencias de 12 individuos del morfo Thrum.
2. Además para establecer diferencias micromorfológicas de la corola se fijaron y procesaron para hacer observaciones en MEB de los tricomas ubicados en la base interior de las corolas, de los cuales se midió su longitud con el programa *Image Pro plus 7* y se hicieron observaciones generales para describirlos.

### **5.6.4. Parámetros parentales**

Para determinar si hay diferencias en la germinación de semillas y de la sobrevivencia de las plántulas entre los morfos, considerando sólo el cuidado parental:

1. Se colectaron dos frutos maduros de 10 individuos diferentes, se tomaron las semillas y se mezclaron por cada morfo floral.
2. En semilleros con 49 pocillos se colocó una semilla por cada uno de ellos y se regaron diariamente durante un mes.

3. Los registros que se tomaron fueron: tiempo de germinación, exposición de cotiledones y de desarrollo de las primeras hojas.

### **5.7. Análisis estadísticos**

Para determinar si la proporción de la población corresponde a la teórica (1:1), se aplicó una  $X^2$ .

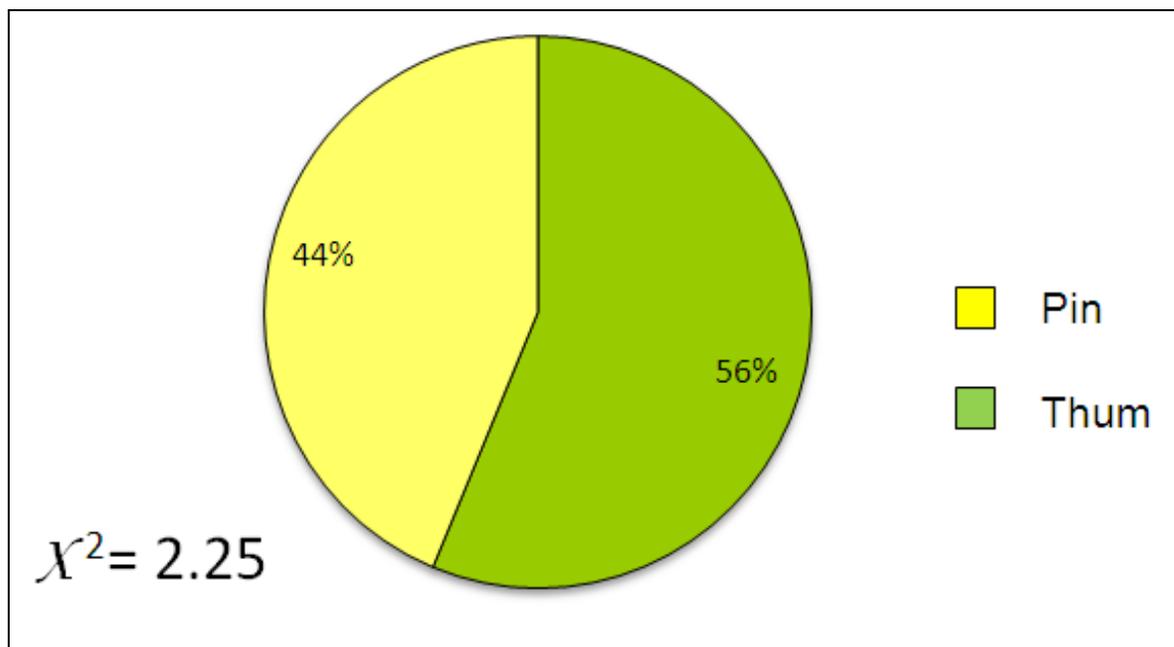
Se realizaron *t-student* de dos muestras con el programa *MINITAB* en cada uno de los caracteres considerados como polimorfismos auxiliares, es decir: tamaño y forma de granos de polen, microestructuras de la exina, producción y viabilidad del polen, producción de óvulos y semillas, longitud de papilas estigmáticas, dimensiones de la corola (diámetro y longitud) y de la longitud de los tricomas.

Para establecer si existen diferencias significativas entre los morfos florales para todos los caracteres analizados, así como para determinar la reciprocidad entre los órganos sexuales (pistilos del morfo Pin y estambres de Thrum y viceversa) y del mismo modo que para evaluar el nivel de la hercogamia se hizo una *t-student* comparando estambres y pistilos de un mismo morfo tanto Pin como Thrum.

## VI. Resultados

### 6.1. Muestreo y frecuencia de morfos florales en C.U.

Se contaron un total de 144 individuos de *B. ternifolia* en las cinco zonas, la proporción de cada una fue diferente: 37% y 63% en la zona A, 38% y 62% en la B, 39% y 61% en la C, 20% y 80% en la D y 63% y 37% en la E del morfo Pin y Thrum respectivamente, sin embargo las zonas más proporcionales son las intermedias (B y C), pero el conjunto de todos los individuos considerados en las zonas fue de 63 para el morfo Pin y 81 individuos para el morfo Thrum, correspondiendo a un 44% y 56% respectivamente (Gráfica 1; Figura 9), este porcentaje en relación a la proporción esperada 1:1 no es estadísticamente significativo ( $\chi^2=2.25$  a un valor de tablas de 1.64).



Gráfica 1. Porcentaje de individuos Pin y Thrum obtenida del muestreo en C.U.

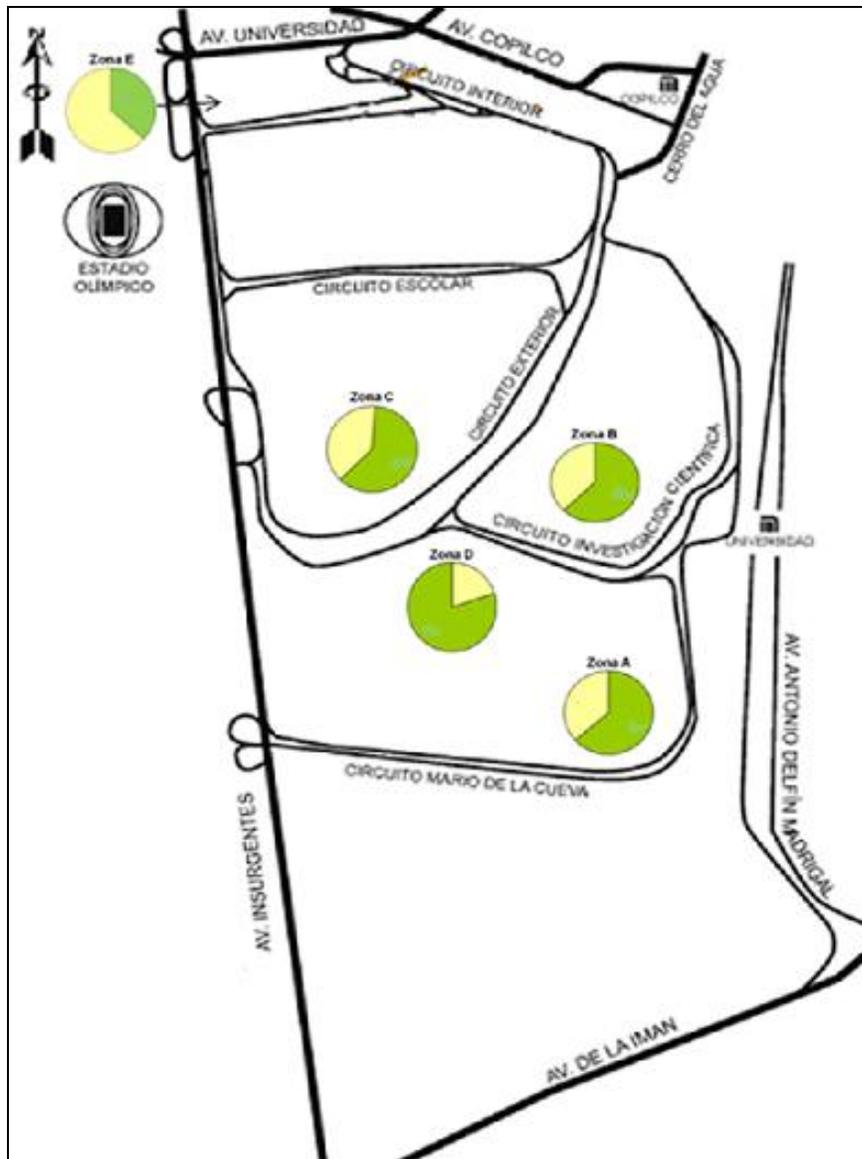


Figura 9. Proporción de cada morfo por cada una de las zonas.

## 6.2. Cuantificación de la hercogamia

El promedio de la longitud de los estambres en el morfo Pin fue de  $18.407 \pm 0.51$  mm y para los pistilos de  $25.36 \pm 0.161$  mm, para los estambres del morfo Thrum el promedio fue de  $24.965 \pm 0.334$  mm y para los pistilos de  $17.284 \pm 0.255$  mm (Gráfica 2).

- Índice de reciprocidad para estambres y pistilos largos:

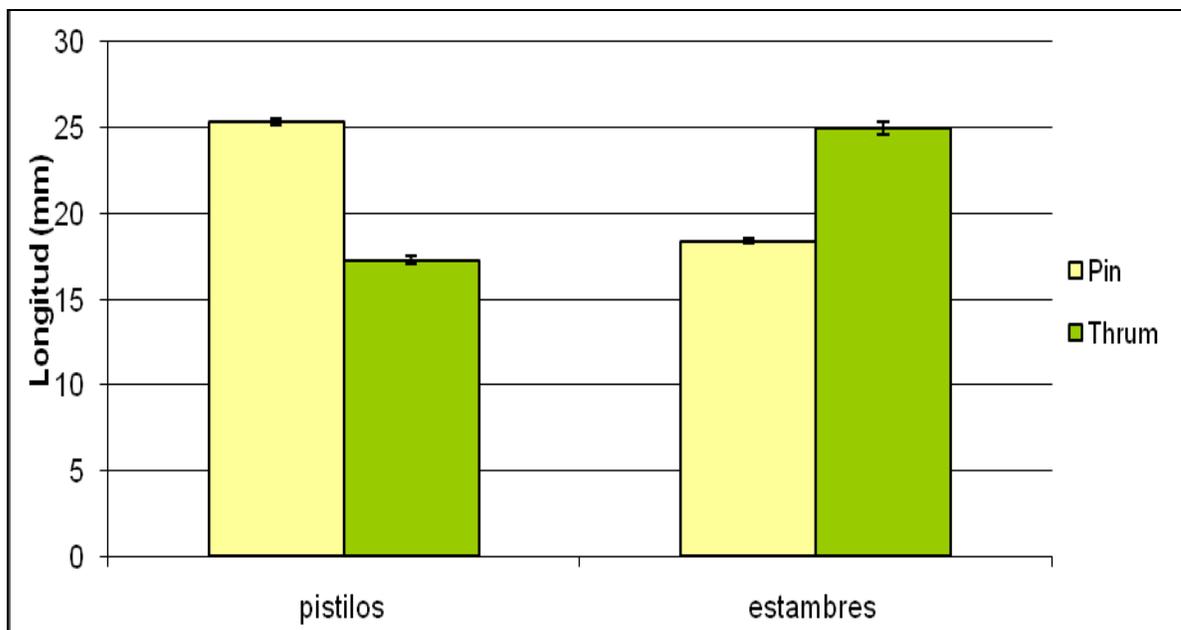
$$R=(24.965)-(25.36)/(24.965)+(25.36)= 0.0070$$

- Índice de reciprocidad para estambres y pistilos cortos:

$$R=(18.407)-(17.284)/(18.407)+(17.284)= 0.032$$

Se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los pistilos de cada morfo y los estambres, ( $t=27.93$ ,  $P<0.0001$  y  $t= -15.28$   $P <0.0001$  respectivamente), por lo que se considera hercogamia, es decir, una diferencia significativa entre estambres y pistilos.

Se determinó que hay diferencias entre los estambres de Pin y los pistilos de Thrum ( $t=2.9152$   $P=0.004203$ ). Mientras que los estambres de Thrum con los pistilos de Pin no presentaron diferencias ( $t =-0.8315$   $P=0.4072$ ).



Gráfica 2. Medidas de los estambres y los pistilos para cada uno de los morfos florales.

### **6.3. Determinación del sistema de incompatibilidad heteromórfico**

#### **6.3.1. Identificación del sistema de autoincompatibilidad e incompatibilidad intramorfo**

Para determinar la incompatibilidad heteromórfica los pistilos se fijaron a 48 horas post-polinización, considerando como aceptación de polen la observación de crecimiento de tubos polínicos hasta la base del estilo y como rechazo del polen a la no germinación de los granos de polen o la presencia de tubos polínicos en el estigma.

En las polinizaciones intermorfo de ambos morfos, los tubos polínicos alcanzaron la base del estilo, es decir, que el polen germinó y los tubos polínicos crecieron a través del tejido de transmisión del estilo. Sin embargo, no se observaron diferencias entre Pin y Thrum (Figura 10).

En las polinizaciones intramorfo del morfo Pin los granos de polen germinaron y los tubos polínicos perforaron el estigma, mientras que en el morfo Thrum los tubos polínicos se hallaron en la base del estigma con acumulaciones de calosa en los ápices, propios de una polinización incompatible.

Para ambos morfos florales en las autopolinizaciones geitonógamas los tubos polínicos no rebasaron el tejido de transmisión del estigma, es decir, que los ápices de los tubos polínicos se hallaron justo por debajo de las papilas estigmáticas. Mientras que en las autopolinizaciones del morfo Pin la mayoría de los granos de polen no germinaron y en el resto, los tubos polínicos no perforaron el estigma y tenían acumulaciones de calosa (Figura 11).

Para el caso del control negativo, es decir, en el cual no se llevó a cabo ninguna polinización, permitió verificar que hay control sobre el manejo de polen y por lo tanto de las polinizaciones manuales ya que en ninguna de las muestras se observó grano de polen en el estigma.

Mientras que para el control positivo el cual permitió reconocer los tipos de polinizaciones en campo, en las cuales se observaron polinizaciones ilegítimas (tubos polínicos en papilas estigmáticas), legítimas (tubos polínicos en la base del estilo) e incluso interespecíficas (cuatro tipos de polen diferentes), es decir, de especies diferentes (Swanson *et al.*, 2004).

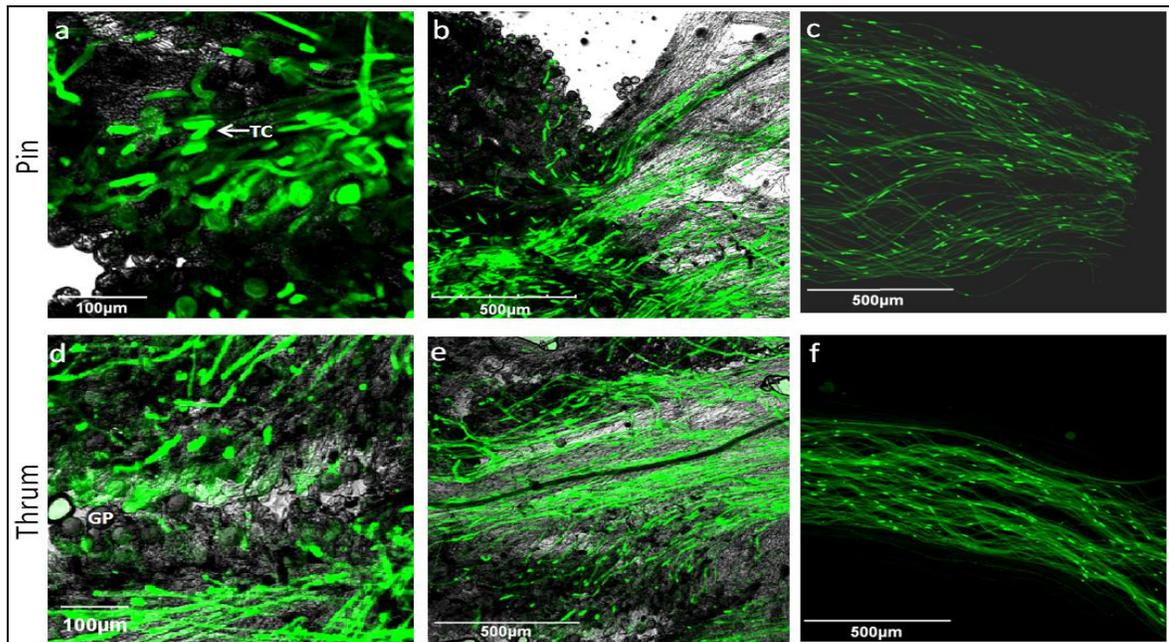


Figura 10. Polinizaciones intermorfo a 48 horas para ambos morfos florales. En verde los tubos polínicos. Detalle del estigma donde se observan granos de polen (GP) y tapones de calosa (TC) propios de del crecimiento de los tubos polínicos (a y d); sección que muestra estigma y tejido de transmisión del estilo en campo claro (b y e); último tercio del estilo con tubos polínicos hasta la base en campo oscuro (c y f).

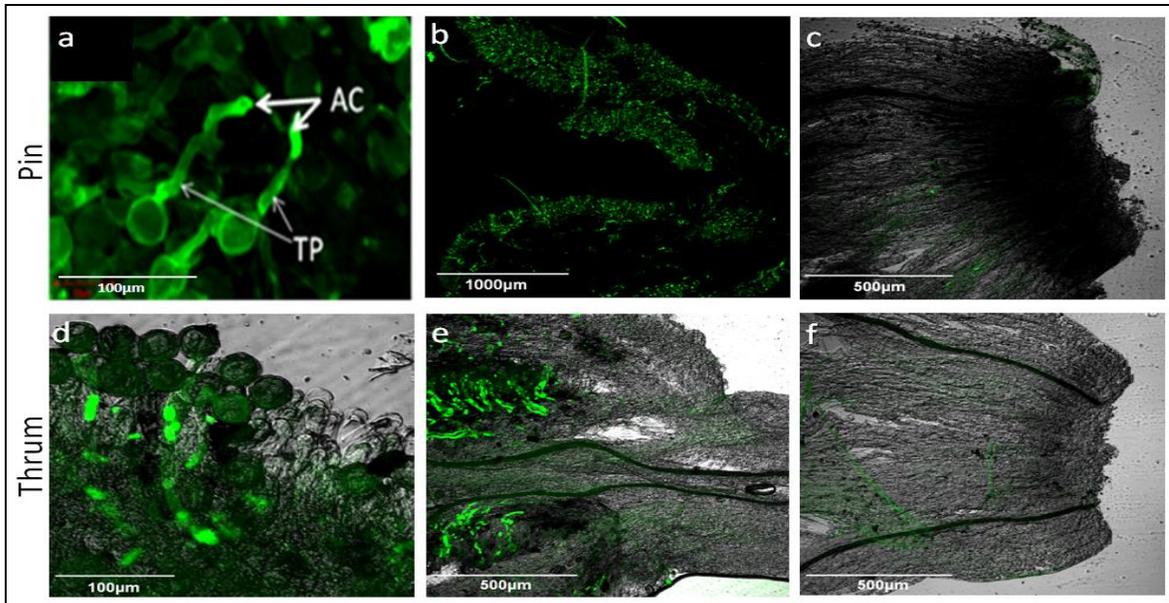


Figura 11. Polinizaciones ilegítimas a 48 horas para ambos morfos florales. Se observan tubos polínicos (TP) en el estigma, acumulación de calosa (AC) en el ápice de los tubos polínicos, propios de polinizaciones incompatibles en campo oscuro de una autopolinización (a); sección que muestra estigma y tejido de transmisión del estilo en campo oscuro y campo claro respectivamente (b y e); último tercio del estilo sin tubos polínicos hasta la base en campo oscuro (c y f); granos de polen y TP entre papilas estigmáticas en campo claro de una autopolinización (d).

### 6.3.2. Determinación de los tiempos de germinación de polen y crecimiento de tubos polínicos

En los tratamientos de polinización donde los pistilos se fijaron a diferentes tiempos post-polinización para ambos morfos se observó lo siguiente:

En las polinizaciones intermorfo de Pin se vio: que entre la primera y segunda hora los granos de polen germinaron; entre la hora 3 y 4 los tubos polínicos se encontraron en el tejido de transmisión del estigma, apenas por debajo de las papilas estigmáticas; mientras que de la quinta a la séptima hora los tubos polínicos se hallaron entre la base del estigma y el primer tercio del estilo y; a las 24 horas se observaron en la base del estilo (Figura 12).

Para las polinizaciones intermorfo del morfo Thrum: a la 1er hora los granos de polen estuvieron germinados; a las dos horas, los tubos polínicos se encontraron entre el tejido de transmisión del estigma, apenas por debajo de las papilas estigmáticas y entre la base del estigma; a la 3era hora los tubos polínicos se localizaron en el primer tercio del estilo; entre la 4ta y 5ta hora, los tubos polínicos se hallaron en el límite del primer tercio del estilo; para las 6ta y 7ma horas se vieron en el segundo tercio del estilo y; hasta las 24 horas los tubos polínicos se observaron la base del estilo (Figura 12).

Mientras que en las polinizaciones ilegítimas (intramorfo y autopolinizaciones) para las primeras 24 horas post-polinización se observaron resultados muy similares en ambos morfos florales.

Entre la 1ra y 2da hora post polinización en polinizaciones ilegítimas los granos de polen germinaron. En la 2da y 3er hora de las polinizaciones los tubos polínicos se ubicaron entre papilas estigmáticas y tejido de transmisión del estigma justo por debajo de las papilas. En ambos morfos florales, así como en el tipo de polinización no se observaron diferencias en el nivel de crecimiento desde la 3er hora hasta las 24 horas, sin embargo sí es importante resaltar que en todas las polinizaciones ilegítimas, es decir, desde la 3era hasta las 24 en el morfo Pin los tubos polínicos se apreciaron torcidos, sin orientación o sin haber atravesado entre las papilas estigmáticas, mientras que los del morfo Thrum siempre se mantuvieron derechos y bien orientados introducidos entre papilas estigmáticas (Figura 13).

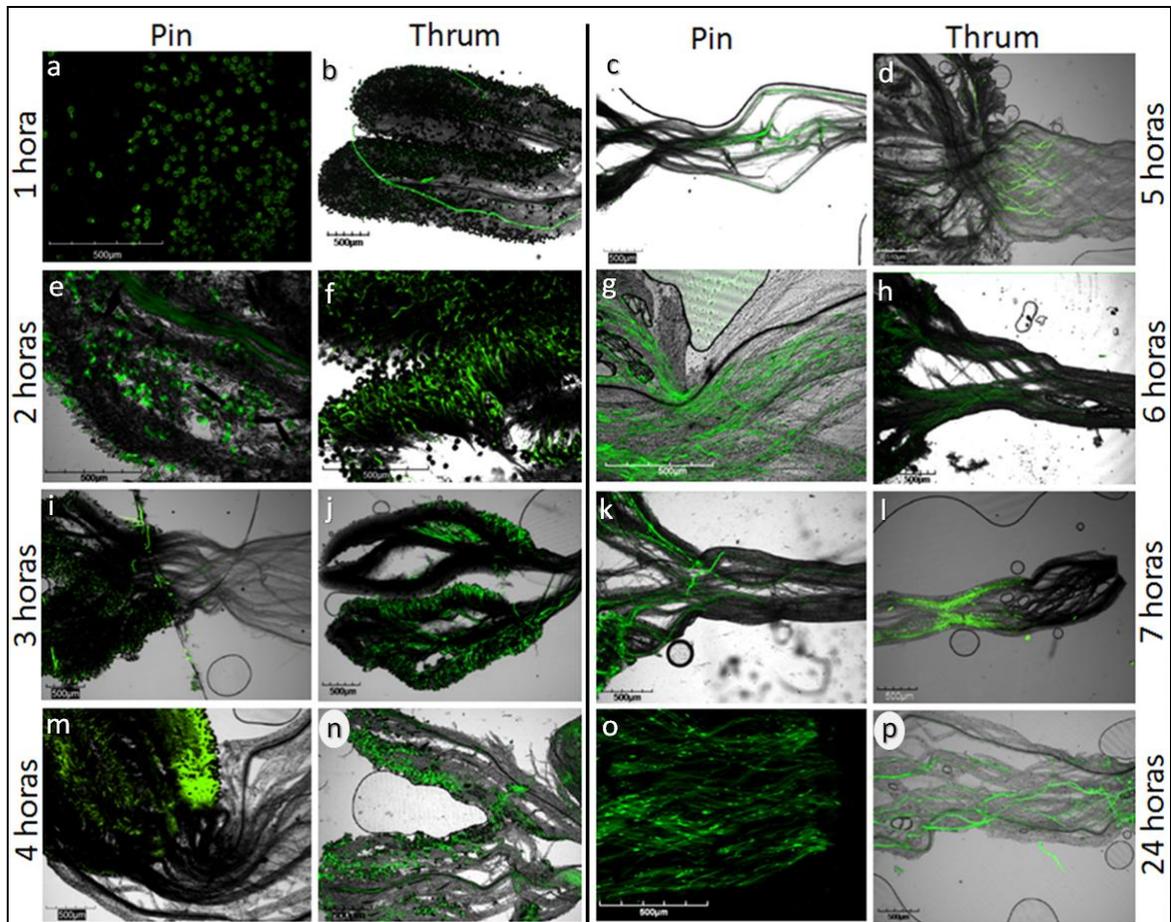


Figura 12. Crecimiento de los tubos polínicos en polinizaciones intermorfo para ambos morfos florales (fluorescencia de la calosa propia de los TP) según la hora correspondiente. Granos de polen germinados sobre el estigma en campo oscuro (a); granos de polen sin germinar y germinados sobre estigma en campo claro (b); panorámica de la parte inferior del estigma y primer tercio del estilo en campo claro (c, d, h, k); TP entre papilas estigmáticas en campo claro (e, f, i, j, m, n); primer tercio del estilo (g); segundo y último tercio del estilo (l); base del estilo con presencia de TP en campo oscuro (o) y; último tercio del estilo en campo claro (p).

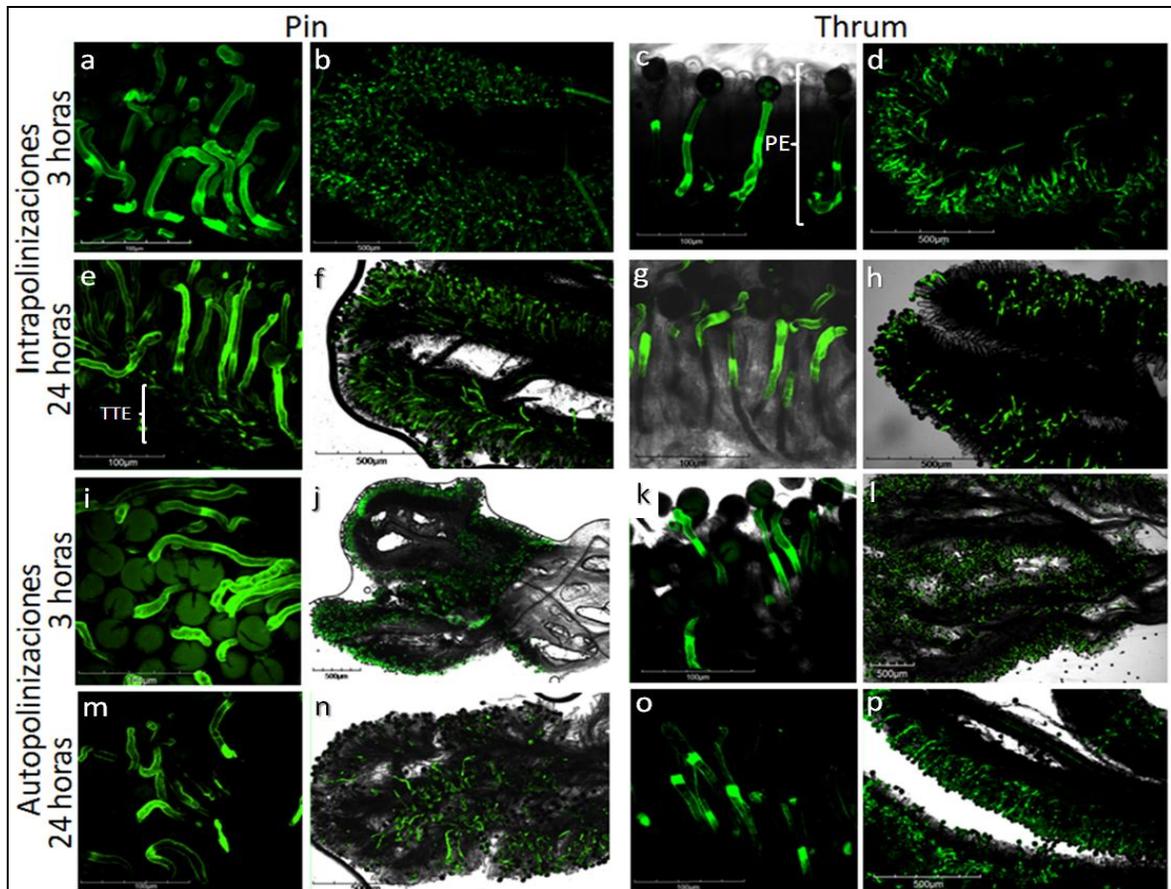


Figura 13. Crecimiento de tubos polínicos en polinizaciones ilegítimas de ambos morfos florales donde se observa el mismo nivel de crecimiento de los TP para las 3 y las 24 horas de polinización. Detalles del crecimiento del tubo polínico con torcimiento en campo oscuro (a, e, i, m); granos de polen y tubos polínicos entre papilas estigmáticas bien orientados en campo claro (c, g, k,) en campo oscuro (o); estigma con granos de polen y tubos polínicos a nivel de papilas estigmáticas en campo oscuro (b, d); panorámicas del estigma con granos de polen y tubos polínicos a nivel de papilas estigmáticas en campo claro (f, h, j, l, n, p). En (e) se señala el tejido de transmisión del estilo (TTE) y en (c) se la extensión de las papilas estigmáticas (PE).

### 6.3.3. Caracterización de los eventos tempranos de la interacción polen-pistilo

En los tiempos definidos para identificar las etapas de interacción polen-pistilo se reportan las siguientes observaciones (Tabla 4), considerando la abundancia de granos polen dada por la adherencia, la hidratación, la apariencia de los tapones que protegen los poros de los colpos del polen; germinación del grano de polen,

tubo polínico y adherencia a papilas estigmáticas, así como de la turgencia e integridad de las papilas estigmática.

Se observó que la interacción entre polen y pistilo genera alteraciones no sólo en el polen, sino también en el estigma, ya que en los primeros minutos las papilas estigmáticas se observan íntegras, sin ninguna deformación, turgentes, es decir, hidratadas, mientras que en los minutos más avanzados (30 a 45 min) las papilas se ven deshidratadas, rotas, deformes como si estuvieran pasando por una lisis celular, pudiéndose también determinar que las papilas estigmáticas están íntimamente involucradas al sistema de reconocimiento entre morfos e interespecífico.

En el caso del polen, en la primera fase de interacción polen-pistilo, la adherencia se observó entre los 5 y 15 minutos, ya que a los 5 min hay muy poco polen y a los 15 min hay mucho. La hidratación del grano de polen se llevó a cabo instantes después de la adherencia, ya que no se observan muestras donde haya adherencia sin hidratación. Entre los 15 y 30 min todos los tapones del poro se hincharon.

La fase II de interacción polen-pistilo se lleva a cabo entre los 30 y 45 min en todos los tratamientos de polinización. La germinación se observó entre los 30 y 45 min. Mientras que la adhesión del tubo polínico a las papilas estigmáticas, la cual fue poco evidente, se observó sólo a los 45 min, aunque se hallaron pocos granos de polen germinados o con tubos polínicos adheridos a papilas estigmáticas a los 45 min. Los granos de polen que se encontraron inmersos en

las papilas estigmáticas, se observaron deshidratados, como si hubieran perdido material celular.

Se observó que la etapa de adherencia de la fase I de la interacción polen-pistilo es diferente entre polinizaciones legítimas e ilegítimas. La adherencia es más rápida en las polinizaciones intramorfo y autopolinizaciones que en las intermorfo.

Sin embargo no se observaron diferencias sustanciales en las respuestas del polen y las papilas estigmáticas entre los morfos, en ninguno de los tratamientos de polinización (Figura 14).

Tabla 4. Interacción polen-pistilo: Observaciones generales de características del polen y papilas estigmáticas y la germinación de tubos polínicos en etapas tempranas.

	min	Pin	Thrum
<b>Polinización intermorfo</b>	5	Poco polen. Adherencia evidente, polen hidratado y con tapones de poros hinchados.	Poco polen. Adherencia evidente, polen hidratado y con tapones de poros hinchados.
	15	Poco polen. Colpos del polen expandidos y deforme por el hinchamiento de los tapones. Sólo las papilas en contacto con polen se deshidratan. Polen en base de papilas.	Más polen. Colpos del polen expandidos y deforme por el hinchamiento de los tapones. Polen inmerso entre papilas. Polen aglomerado. Papilas deshidratadas. Polen con tapones de exina adherido a papilas.
	30	Mucho polen. Tapones de polen muy hinchados, polen deformando. Polen a distintos niveles en punta y en base de papilas. Polen germinado y con tubo polínico adherido a estigma. Papilas deshidratadas.	Mucho polen. Polen germinado. Papilas deshidratadas.
	45	Papilas degradadas sólo en contacto con polen. Papilas agrupadas con cierta adherencia (aglomeradas). Granos de polen con tubos polínicos adheridos a papilas.	Mayor lisis de papilas, totalmente degradadas. Con algunos granos de polen germinados. Granos de polen completamente inmersos en el estigma.
<b>Polinización intramorfo</b>	5	Mucho polen. Adherencia evidente, polen hidratado pero sin tapones evidentes. Papilas aglomeradas y ligeramente deshidratadas.	Mucho polen. Adherencia evidente, polen hidratado pero sin tapones evidentes. Papilas aglomeradas y ligeramente deshidratadas.
	15	Granos de polen con tapones muy hinchados. Papilas en contacto con polen degradadas.	Granos de polen con colpos expandidos pero tapones poco hinchados. Polen inmerso en papilas estigmáticas deshidratadas.
	30	Tapones muy hinchados. Pocos granos de polen germinados. Papilas en contacto con polen claramente deshidratadas y aglomeradas.	Tapones muy hinchados. Pocos granos de polen germinados. Papilas en contacto con polen claramente deshidratadas y aglomeradas.
	45	Granos de polen germinados. Granos de polen con tubos polínicos. Los granos de polen pierden turgencia. Papilas degradadas.	Granos de polen germinados. Granos de polen con tubos polínicos. Los granos de polen pierden turgencia. Papilas degradadas.
<b>Autopolinización</b>	5	Concentración media de granos de polen. Adherencia evidente y granos de polen hidratados. Papilas turgentes y bien separadas.	Concentración media de granos de polen. Adherencia evidente y granos de polen hidratados. Papilas turgentes y bien separadas.
	15	Muchos granos de polen. Tapones hinchados. Papilas ligeramente deshidratadas.	Muchos granos de polen. Tapones hinchados. Papilas ligeramente deshidratadas.
	30	Mucho polen abortivo. Tapones de polen muy hinchados. Papilas degradadas.	Granos de polen germinados. Papilas deshidratadas.
	45	Tubos polínicos evidentes. Papilas estigmáticas degradadas y apiladas.	Tubo polínico evidente. Papilas muy degradadas.

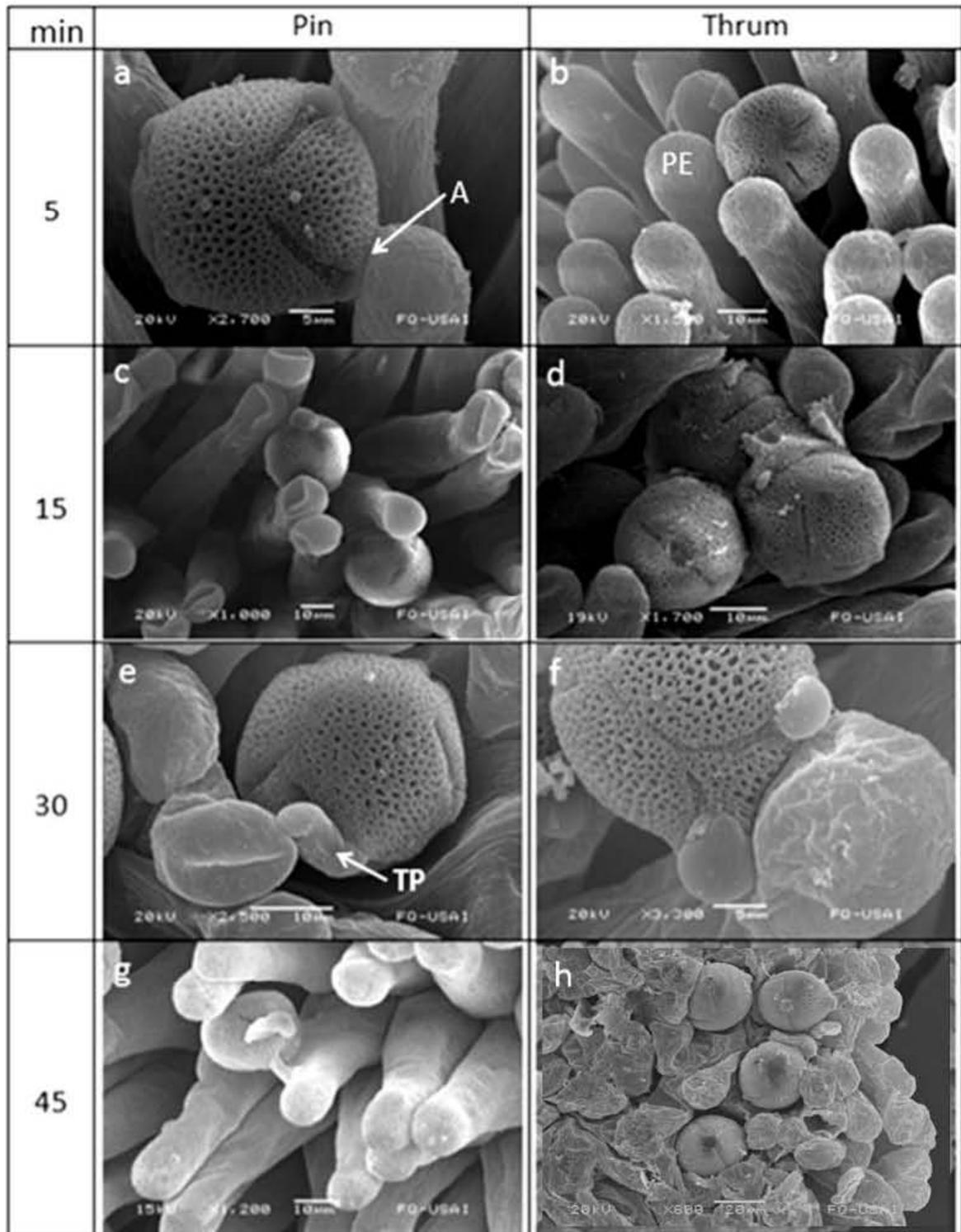


Figura 14. Micrografías de las primeras etapas de interacción polen-pistilo observadas en microscopio electrónico de barrido. Granos de polen adheridos a papilas estigmáticas turgentes (a, b) señalando el área de adherencia (A) y la papila estigmática (PE); granos de polen adheridos, hidratados, con tapón de poro hinchado y papilas estigmáticas deshidratadas (c, d); granos de polen con tubo polínico (TP) adherido a papila estigmática deshidratada (e); grano de polen polarizado y germinado (f); papilas estigmáticas aglomeradas con grano de polen germinado (g) y granos de polen sobre estigma con papilas completamente deshidratadas y en lisis celular (h).

## **6.4. Identificación y descripción de polimorfismos auxiliares**

### **6.4.1. Caracteres masculinos**

Con el fin de esquematizar y resumir la información de los caracteres masculinos cuantitativos considerados para reconocer polimorfismos auxiliares en la página 58 se muestran todos los caracteres, sus medias y desviaciones, así como los resultados de la *t-student* (Tabla 5).

#### **6.4.1.1. Mediciones de los granos de polen**

En el morfo Pin se obtuvo un promedio de la distancia ecuatorial de  $32.69 \pm 4.57$   $\mu\text{m}$  y el de la distancia polar a  $37.02 \pm 4.06$   $\mu\text{m}$ . En el morfo Thrum el promedio de la distancia ecuatorial fue de  $38.49 \pm 2.89$   $\mu\text{m}$  y el de la distancia polar de  $38.51 \pm 2.18$   $\mu\text{m}$ . Los estadísticos mostraron que no hay diferencias significativas en las medidas de los ejes entre los morfos florales (eje ecuatorial  $t=-1.74$   $P=0.084$  y del eje polar  $t=-1.59$   $P=0.117$ ).

En la relación de las distancias para determinar la forma, el morfo Pin tuvo un valor de  $1.15 \pm 0.15$   $\mu\text{m}$  y 20% con forma oblato-esferoidal, 17% prolato-esferoidal y 60% de la subprolato. Para el morfo Thrum los valores fueron  $1.00 \pm 0.08$   $\mu\text{m}$  y 53% oblato-esferoidal, 37% prolato-esferoidal y 6% subprolato (Figura 16). Los estadísticos para la forma mostraron que no hay diferencias significativas ( $t=-1.37$   $P=0.176$ ).

El número de colpos que se observaron en ambos morfos fueron tres, cuatro y cinco (Figura 15), sin embargo las frecuencias no resultaron iguales. El número de colpos más frecuente correspondió a cuatro (tetrazonocolporados) con 62.5% y 76.64% en Pin y Thrum respectivamente.

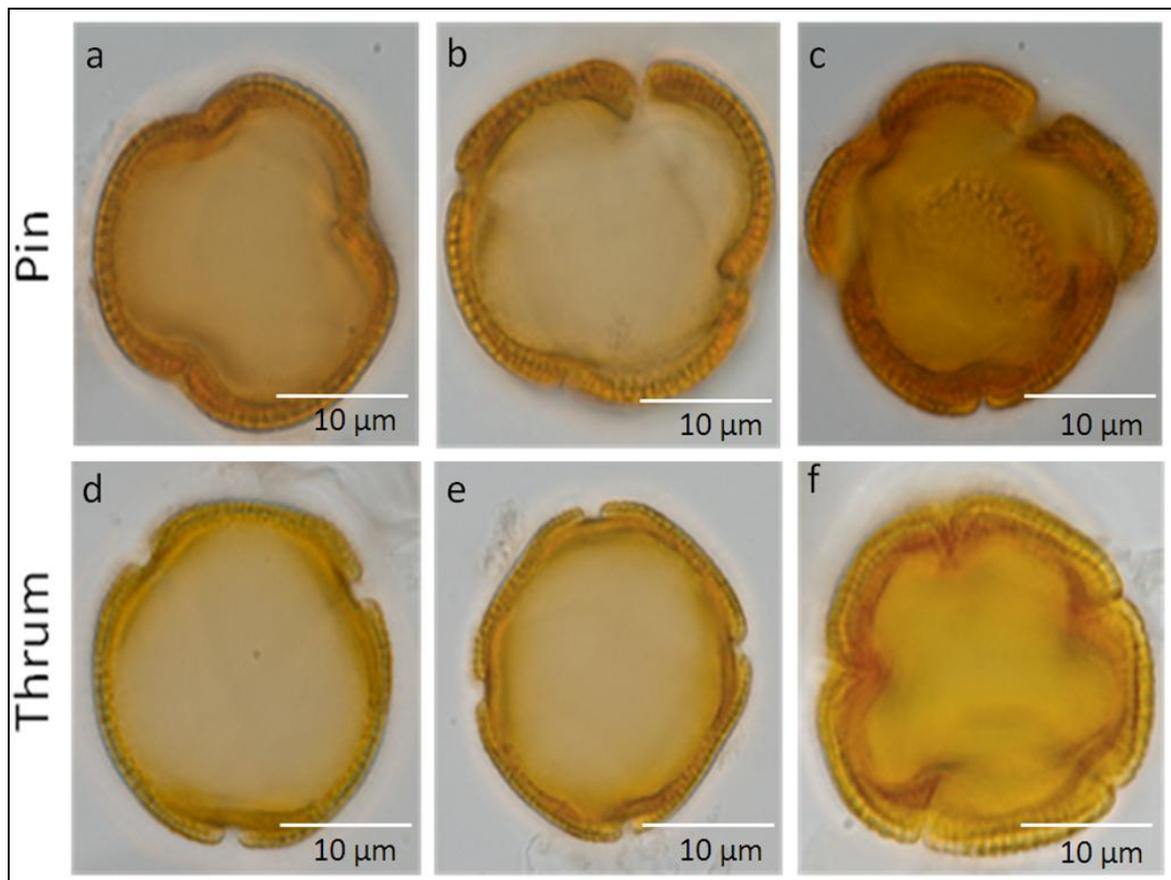


Figura 15. Vistas polares de granos de polen para ambos morfos florales donde se muestran las variedades en el número de colpos. Trizonocolporados (a, d); tetrazonocolporados (b, e); pentazonocolporados con deformación o asimétricos (c, f).

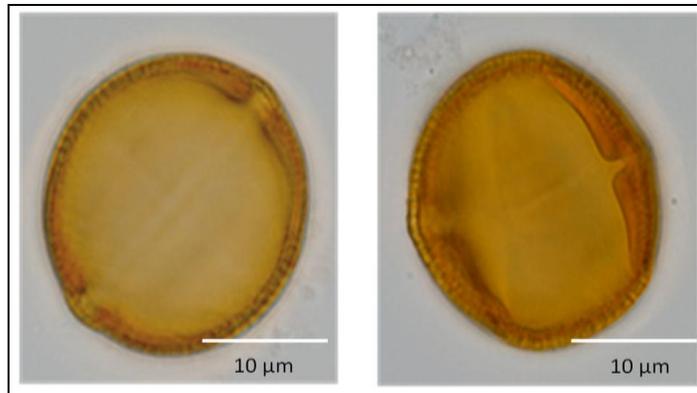


Figura 16. Vistas ecuatoriales de grano de polen. Grano de polen con forma oblato-esferoidal del morfo Pin (a) y; grano de polen con forma prolato-esferoidal del morfo Thrum (b).

#### **6.4.1.2. Cuantificación de los granos de polen**

En la contabilización de los granos de polen se obtuvieron  $16960 \pm 3321$  granos por flor para el morfo Pin y  $25000 \pm 5116$  para el morfo Thrum, por lo que estadísticamente se determinaron diferencias en la producción de polen ( $t=-4.17$   $P=0.001$ ).

#### **6.4.1.3. Prueba de viabilidad de granos de polen**

Se observaron 330 granos de polen del morfo Pin, de los cuales 15 eran no viables, correspondiente al 4.55%, mientras que en el morfo Thrum se contabilizaron 257 granos de polen de los cuales 17 eran no viables, es decir, el 6.61%.

#### **6.4.1.4. Descripción y medición de la micromorfología del grano de polen**

El grano de polen para ambos morfos florales se observó al microscopio óptico y electrónico de barrido, las aberturas fueron tri-, tetra- y pentazonocolporados, las cuales están cubiertas por una membrana microverrugada y en la parte central de dicha abertura presentan un tapón de exina que cubre al poro. La exina es tectada, microrreticulada con gemas dispuestas en la periferia de la columela.

Se observaron diferencias entre los morfos en la ornamentación de la exina, en el morfo Pin la retícula tiene mayor volumen (bordeada), las gemas están en una sola hilera, por lo que el área del lumen parece mayor en proporción con la de la columela, mientras que en el morfo Thrum la retícula es plana y la densidad de las gemas es mayor y se presentan en mas de una hilera (Figura 17).

La columela del morfo Pin fue más grande  $0.4364 \pm 0.0938 \mu\text{m}$  que la del morfo Thrum  $0.3800 \pm 0.0674 \mu\text{m}$ . Mientras que el lumen de Pin resultó ser más pequeña  $1.7331 \pm 0.9488 \mu\text{m}$  que la de Thrum  $3.2424 \pm 1.0454 \mu\text{m}$ . Lo anterior concuerda con las observaciones, ya que en el morfo Thrum la densidad de las gemas parecen reducir el área del lumen.

En las mediciones de las microestructuras del grano de polen se determinó que hay diferencias entre los morfos tanto en el ancho de la columela ( $t=5.9818$   $P=6.313e-09$ ) como en el perímetro del lumen ( $t=-13,0933$   $p<2,2e-16$ ). Mientras que en el diámetro de las gemas no hubo diferencias ( $t=-0,5789$   $p=0,5631$ ).

Tabla 5. Caracteres masculinos: Media y desviación estándar de todos los caracteres sexuales masculinos para ambos morfos florales y el valor de la P en negritas los valores significativos.

<b>Carácter</b>	<b>Pin</b>	<b>Thrum</b>	<b>Valor de P</b>
Long. estambres mm	18.41 ±0.51	24.96 ±0.33	<b>2.2&lt;e-16</b>
Polen			
Eje ecuatorial µm	32.69 ±4.57	38.49 ±2.89	0.084
Eje polar µm	37.02 ±4.06	38.51 ±2.18	0.117
Cociente de ejes (forma)	1.15 ±0.15	1.00 ±0.08	0.176
No. de tetracolporados %	62.5	76.64	
No. polen	16,960 ±3,321	25,000 ±5,116	<b>0.001</b>
Viabilidad %	95.45	93.39	
Micromorfología del polen µm			
Diámetro de columela	0.4364 ±0.0938	0.3800 ±0.0674	<b>6.313e-09</b>
Diámetro de gemas	0.1872 ±0.0741	0.2408 ±0.0619	0.5631
Perímetro del lumen	1.7331 ±0.9488	3.2424 ±1.0454	<b>&lt;2.2e-16</b>

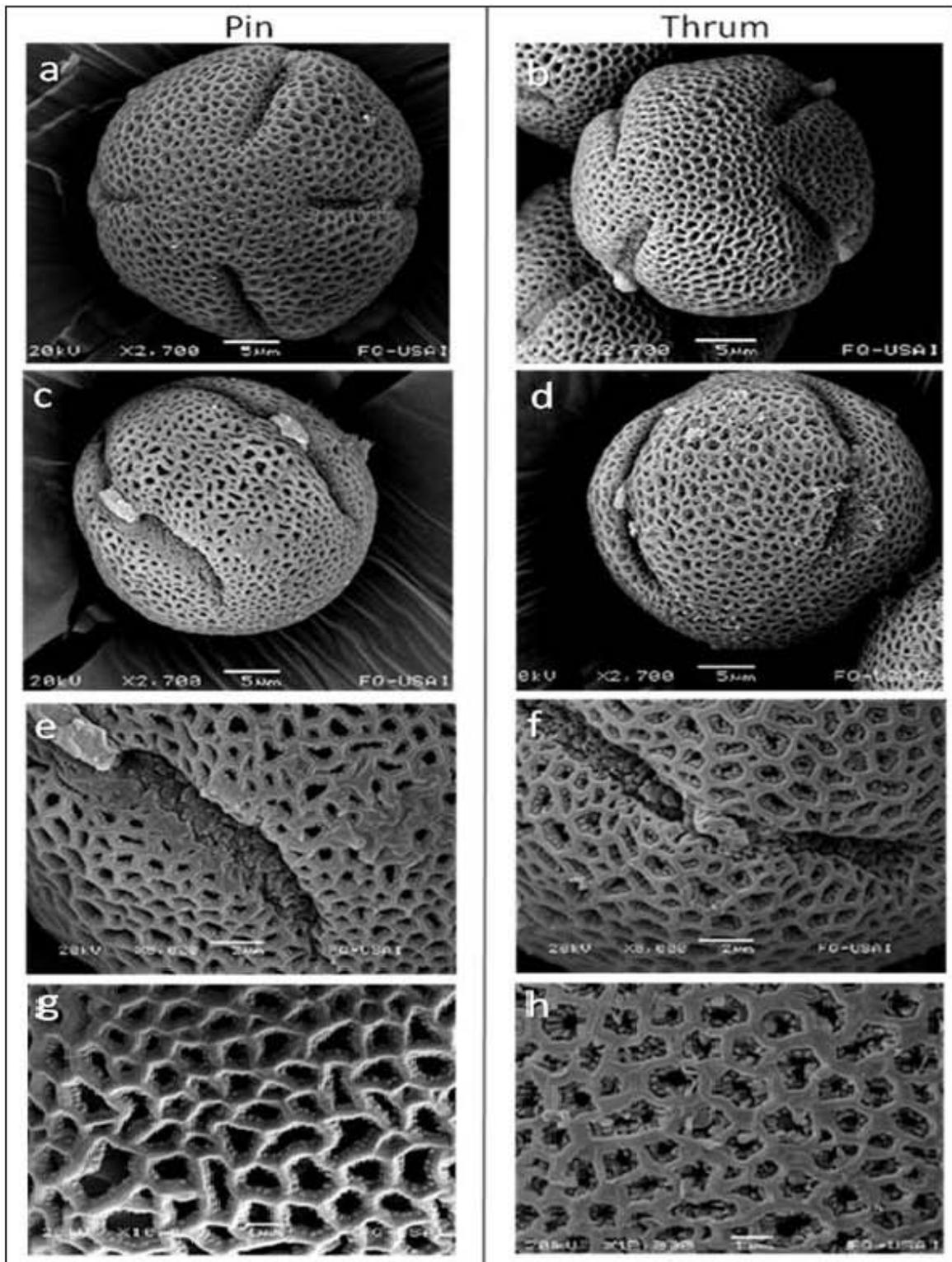


Figura 17. Micrografías del polen. Vistas polares de granos de polen tetrazonocolporados (a, b); vista ecuatorial donde se observan los colpos y los tapones de los poros (c); vista ecuatorial del grano de polen sin tapones de poros evidentes (d); detalle de las aberturas y tapones para ambos morfos (e, f), detalle de la ornamentación reticulada de la exina donde se observa en los márgenes la densidad de las gemas y volumen de la columela (g, h).

## **6.4.2. Caracteres femeninos**

En la página 61 se muestran los resultados de las medias, desviaciones y probabilidades de los polimorfismos femeninos (Tabla 6).

### **6.4.2.1. Longitud de papilas estigmáticas**

En La longitud de las papilas para el morfo Pin fue de  $76.40 \pm 8.80\mu\text{m}$  y del morfo Thrum  $79.33 \pm 8.43\mu\text{m}$ . por lo que no se determinaron diferencias significativas entre los morfos florales ( $t=-1.135$   $P=0.2622$ ).

### **6.4.2.2. Cuantificación de óvulos y semillas**

En la determinación de la producción de óvulos de cada uno de los morfos los valores obtenidos son para Pin  $56.17 \pm 8.11$  y para Thrum  $54,57 \pm 8.22$  óvulos. Mientras que en la generación de semillas corresponde a  $27.51 \pm 10.38$  y  $30.79 \pm 13.02$  Pin y Thrum respectivamente, mostrando una producción poco mayor el morfo Thrum. Los estadísticos correspondientes para la generación de óvulos ( $t=0.76$   $P=0.451$ ) y de semillas ( $t=-1.40$   $P=0.165$ ) no determinaron diferencias estadísticamente significativas entre los morfos florales.

Por otro lado en la relación de producción de óvulos y semillas para ambos morfos, hubo diferencias significativas ( $t=14.06$ ,  $P<0.0001$ ) y ( $t=9.89$ ,  $P<0.0001$ ) respectivamente, es decir, que se produce en mayor cantidad óvulos.

### 6.4.3. Caracteres florales

La corola del morfo Pin midió a lo ancho  $2.767 \pm 0.387$  mm de diámetro y  $25.706 \pm 1.962$  mm de largo, mientras que el morfo Thrum  $3.011 \pm 0.379$  mm y  $28.621 \pm 3.294$  mm respectivamente. Por lo que se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre los morfos (diámetro  $t=-4.75$   $P<0.0001$ ) y (longitud  $t=-5.42$   $P<0.0001$ ), siendo el morfo Thrum significativamente más grande.

En la longitud de los tricomas de la corola también se determinaron diferencias significativas ( $t=6.4436$   $P=1.579e-07$ ). Los tricomas del morfo Pin fueron más grandes  $615.38 \pm 129.38$   $\mu\text{m}$  y, de Thrum  $382.50 \pm 88.64$   $\mu\text{m}$ .

Tabla 6. Caracteres femeninos y florales: Media y desviación estándar de los caracteres sexuales femeninos y florales para ambos morfos florales y el valor de la P en negritas los valores significativos.

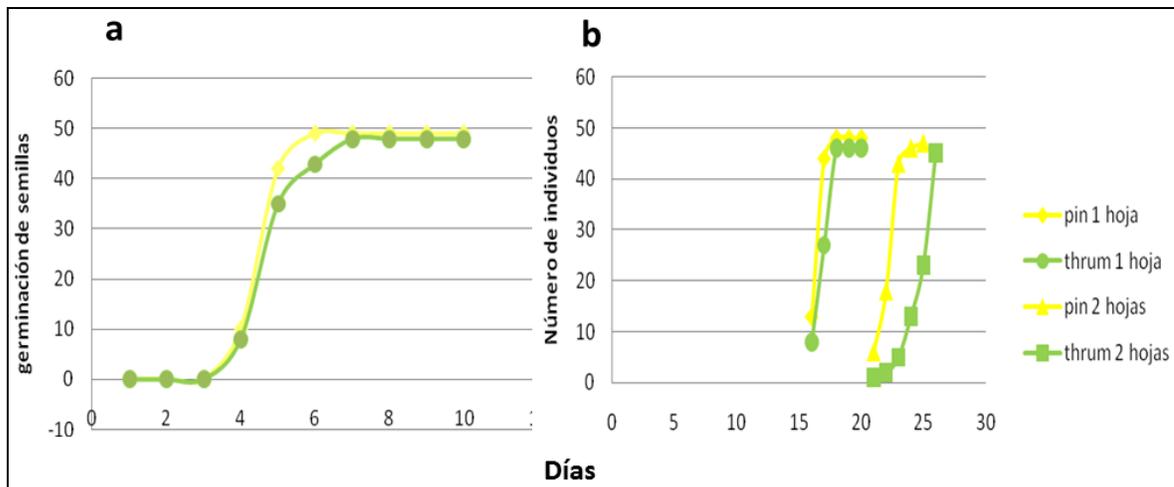
Carácter	Pin	Thrum	Valor de P
Long. de pistilos mm	25.36 $\pm$ 0.16	17.28 $\pm$ 0.25	<b>0.0001</b>
Long. de papilas estigmáticas $\mu\text{m}$	76.40 $\pm$ 8.80	79.33 $\pm$ 8.43	0.2622
Corola			
Longitud mm	25.71 $\pm$ 1.96	28.62 $\pm$ 3.29	<b>&lt;0.0001</b>
Diámetro mm	2.77 $\pm$ 0.39	3.01 $\pm$ 0.38	<b>&lt;0.0001</b>
Long. de tricomas $\mu\text{m}$	615.38 $\pm$ 129.38	382.50 $\pm$ 88.64	<b>1.579e-07</b>
No. de óvulos	56.17 $\pm$ 8.11	54.57 $\pm$ 8.22	0.451
No. de semillas	27.51 $\pm$ 10.38	30.79 $\pm$ 13.02	0.165
Sobrevivencia de plántula %	95.92	91.84	

### 6.4.4. Parámetros parentales

#### 6.4.4.1. Germinación y sobrevivencia de plántulas

Las semillas tardaron entre cuatro y cinco días en germinar para ambos morfos, sin encontrarse diferencia, de los seis a los nueve días la mayoría expusieron sus

cotiledones. Entre los 16 y 18 días para ambos morfos desarrollaron el primer par de hojas. Entre el 22 y 25 días desarrollaron el segundo par de hojas. A los 30 días sobrevivieron 47 plántulas de Pin y 45 de Thrum (Gráfica 3).



Gráfica 3. Caracteres parentales: a) Germinación de las semillas y b) desarrollo de hojas de ambos morfos florales.

## VII. Discusión

### 7.1. Frecuencia de los morfos y hercogamia

La proporción de los morfos 44% Pin y 56% Thrum no difiere significativamente de la relación 1:1. Los valores de López (2007) de 46% Pin y 54% Thrum obtenidos de la población de *Bouvardia ternifolia* de la Reserva del Pedregal de San Ángel, son muy parecidos a los obtenidos en este trabajo, lo cual es uno de los factores que puede indicar la estabilidad de la distilia en la especie, así como del éxito reproductivo, del despliegue floral y de la sobrevivencia de ambos morfos (Thompson *et al.*, 2003).

Respecto a la hercogamia recíproca, Richards y Koptur (1993) reportan que para el índice de reciprocidad, valores por debajo de 0.05 son considerados igual a hercogamia recíproca. Los valores obtenidos en el presente trabajo corresponden a 0.0070 para caracteres largos, y 0.032 para caracteres cortos en ambos casos, por lo que puede considerarse que *B. ternifolia* es una especie con hercogamia recíproca. Cabe mencionar que el índice de reciprocidad de Richard y Koptur (1993) da un valor para cada carácter (pistilos y estambres largos y cortos), sin embargo, dicho índice es el más usado en otros estudios para determinar la hercogamia, lo que permite comparar de manera directa los resultados obtenidos en otras poblaciones de *B. ternifolia*, por ejemplo, Hernández (2006) obtuvo valores mayores a 0.05 (0.072 y 0.059) respectivamente. La población estudiada en el presente trabajo es mucho más recíproca que la de Hernández (2006), lo cual es un factor más que indica la estabilidad de la distilia. Del mismo modo, en el

presente trabajo, se obtuvieron valores que indican una mayor reciprocidad que los obtenidos por López (2007) en la Reserva del Pedregal de San Ángel; por Faivre y McDade (2001) en Tucson, Arizona y; por Torres (2007) en la Malinche, Tlaxcala, es decir, que la población estudiada en el presente trabajo es la más recíproca o puede ser la más estable en la distilia de *B. ternifolia*.

Sánchez *et al.* (2008), sugieren que es necesario aplicar estadísticas o índices que aporten información que relacione ambos valores de reciprocidad de R-K, que dé un solo valor de reciprocidad y que al mismo tiempo aporte información de la precisión, es decir, de la dispersión de los valores obtenidos sobre los valores reales de la población. También reportan que cambia la cuantificación de la hercogamia recíproca según el método para evaluarla, es decir, que en una misma población con el índice de R-K se puede considerar recíproca, y con otro método no y concluyen sugiriendo usar un conjunto de métodos para evaluar y corroborar la hercogamia recíproca. Por lo que en el presente trabajo se aplicó una *t-student* entre caracteres cortos y entre caracteres largos, esperando que no se hallaran diferencias, sin embargo sólo resultaron recíprocos los caracteres cortos, es decir, estambres de Pin y pistilos de Thrum ( $t=2.9152$   $P=0.004203$ ), lo que diverge con los resultados del índice de R-K, ya que en ese caso los caracteres más recíprocos fueron los largos.

Sin embargo, en el presente trabajo se considera el índice R-K y el comparar caracteres largos y cortos por separado (correlacionar), porque es lo que permite confrontar con otras especies y poblaciones ya estudiadas, así como el hecho de que se den dos valores para cada uno de los caracteres permite obtener

información sobre la capacidad reproductiva y la variabilidad entre los morfos florales.

Con respecto a la hercogamia propiamente dicha, es decir, la separación de estambres y estigmas, López (2007) reportó que no había diferencias en algunos individuos, por lo que considera que hay homostilia en la población. Además sugiere que la homostilia puede estar relacionada con la longitud de la corola, ya que las anteras se encuentran adnadas a la corola. Por lo que sería de gran interés hacer un análisis de la morfometría y del desarrollo de las anteras. Sin embargo, en el presente estudio, sí se determinó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los pistilos y los estambres de cada morfo, por lo que se considera hercogamia propiamente dicha.

## **7.2. Determinación del sistema de incompatibilidad heteromórfico**

### **7.2.1. Identificación del sistema de autoincompatibilidad e incompatibilidad intramorfo**

Respecto al sistema de reconocimiento del polen y de los tratamientos de polinizaciones, se corroboró la existencia de un sistema de incompatibilidad, ya que sólo se llevó a cabo la aceptación de polen de polinizaciones intermorfos, mientras que los dos tipos de polinizaciones ilegítimas (intramorfos y autopolinizaciones) fueron rechazadas y hubo diferencias entre ellas.

El nivel de rechazo de polen incompatible se da entre papilas estigmáticas y tejido

de transmisión del estigma, ya que los tubos polínicos acumulan calosa en los ápices, lo cual es propio de una polinización incompatible (Boavida *et al.*, 2005).

Se observó que se detuvo el crecimiento de los tubos polínicos desde la tercera hora de polinización y permanece igual a las 48 horas. Lo cual coincide con observaciones hechas por Cardoso y Cardoso (2004), donde reporta que para *Psychotria nuda* el nivel de rechazo es específico de estigmas. Sin embargo, hay varios reportes en el mismo género y otras especies de la familia Rubiaceae donde el nivel de rechazo del tubo polínico puede variar desde el estigma hasta la base del estilo, ya sea dependiendo del morfo (Bawa y Beache, 1983; Faivre, 2002; Castro *et al.*, 2004; Castro y Araujo, 2004 y Massinga *et al.*, 2005) o dependiendo del tipo de polinización ilegítima (intramorfo o autopolinización), como lo reportado por de Oliveira *et al.* (2010), donde observan que en polinizaciones intramorfos para la especie *Palicourea rigida*, el rechazo de polen se da a lo largo del estilo, mientras que en autopolinizaciones se da sólo en la base del estilo.

En las polinizaciones de 48 horas intramorfo de Pin los granos de polen germinaron y los tubos polínicos no rebasan la base de las papilas estigmáticas, mientras que en el morfo Thrum los tubos polínicos se hallaron atravesando tejido de transmisión del estigma y con acumulaciones de calosa en los ápices. Al observarse diferencias en el rechazo de los tubos entre los morfos se pudo determinar que *B. ternifolia* cuenta con un sistema de incompatibilidad heteromórfico como lo reportado por Klein *et al.* (2009) y Faivre (2002). En ambos trabajos se estudian especies de la familia Rubiaceae y se observa que hay

distintas respuestas entre morfos tanto en los tiempos de crecimiento del tubo polínico, nivel de rechazo y características del tubo polínico.

Se observaron diferencias entre las polinizaciones ilegítimas (intramorfo y autopolinizaciones), ya que en las autopolinizaciones la mayoría de los granos de polen no germinaron y los tubos polínicos que crecieron se quedaron en la superficie estigmática. Mientras que en las polinizaciones intramorfo germinó una mayor cantidad de polen y los tubos polínicos se hallaron en la base de las papilas estigmáticas. Lo cual coincide con observaciones hechas por Faivre (2002), en tres especies de Rubiaceae, entre ellas a *B. ternifolia*, donde el nivel de rechazo de polinizaciones intramorfos y autopolinizaciones es diferente. Cabe mencionar que los resultados reportados por él, difieren de los obtenidos en el presente trabajo, ya que él observó que el nivel de rechazo en Pin intramorfo se da en la segunda mitad del estilo y en autopolinizaciones en el primer medio del estilo, mientras que en Thrum tanto en polinizaciones intramorfos como en autopolinizaciones se dio desde el estigma hasta la base del estilo, mientras que lo observado en el presente trabajo es que el nivel de rechazo estuvo acotado en el estigma.

#### **7.2.2. Determinación de los tiempos de germinación de polen y crecimiento de tubos polínicos**

En las observaciones de los tiempos de polinización también se determinaron diferencias entre los morfos en el sistema de reconocimiento a la primera hora, ya

que en el morfo Thrum el polen germinó más rápido, el crecimiento del tubo polínico también fue un poco más acelerado y con menos variación. Al respecto, Faivre (2002) y Klein *et al.* (2009) observaron los mismos resultados en especies de *Psychotria* (Rubiaceae). Sin embargo, concluyeron que dicha reacción debe ser considerada de menor importancia en la germinación de polen en polinizaciones ilegítimas, ya que no es frecuente y puede estar determinado por factores ambientales.

La velocidad de crecimiento de los tubos polínicos en polinizaciones Intermorfos para ambos morfos florales se determinó en relación a su ubicación en el pistilo (por tercios) y no con escala, y dado que se observaron en sitios parecidos a los mismos tiempos, se puede decir que la capacidad de crecimiento del morfo Pin sí resultó compensatoria, sin embargo el morfo Thrum aun así fue ligeramente más rápido en el crecimiento de tubos polínicos. Por lo que es posible que haya mecanismos que amortigüen las diferencias competitivas entre los morfos, como los tiempos de receptividad del estigma, viabilidad del polen, el vigor del grano de polen, la herbivoría, la atracción de la flor por los polinizadores, etc.

Respecto a la velocidad de crecimiento y capacidad compensatoria entre los morfos, son pocos los trabajos en la familia Rubiaceae que han evaluado la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos así como la relación que existe con el tamaño y/o forma de los granos de polen, lo cual debe ser de importancia para determinar si la distilia de dichas especies, así como sus sistema de incompatibilidad heteromórfico está relacionado con el modelo del supergen GPA, ya que Lewis y Jones (1992) indican que el morfo Thrum (Ss), se define con

granos de polen grandes y pistilos cortos, mientras que el Pin (ss) con granos de polen pequeños y pistilos largos, por lo que al hacer polinizaciones legítimas, por ejemplo Pin x Thrum, granos de polen grandes en pistilos largos, el polen del morfo Pin crecerá más rápido a través del estilo Thrum, es decir, que la velocidad de crecimiento del tubo polínico está dada por el tamaño del grano de polen, lo que permite que la fertilización entre los morfos sea a tiempos muy similares.

Wu *et al.* (2010), reportan que en *Hedyotis acutanguli* (Rubiaceae) en polinizaciones intermorfos de Pin la velocidad de crecimiento del tubo polínico es más rápida. Mientras que Bilbatúa (2010) en *B. ternifolia* mediante pruebas in vitro, determinó que las tasas de crecimiento de tubos polínicos son similares entre los morfos, sin embargo un factor determinante para la velocidad de germinación y crecimiento del tubo polínico es la forma del grano de polen. Sin embargo en el presente sí se observa una función compensatoria entre morfos en la velocidad de crecimiento de los tubos polínicos a través del estilo que no está asociada al tamaño del polen, lo cual puede estar indicando que la velocidad no sólo depende de las características del polen, sino también del tejido de transmisión del estilo, es decir, de una fuerte interacción polen-pistilo.

En las polinizaciones ilegítimas (intramorfos y autopolinizaciones) no se observaron diferencias en el nivel de rechazo desde la tercera hora hasta las 24 horas. Se corroboró el sistema de incompatibilidad heteromórfico, ya que en el morfo Pin los tubos polínicos se apreciaron torcidos, sin orientación o sin haber atravesado las papilas estigmáticas. Por lo que es posible que en el sistema de rechazo puedan estar involucradas arabidínogalato-proteínas (AGPs) las cuales

fungen también como guías del tubo polínico (Cheung *et al.*, 1995) o bien, proteínas ricas en cisteínas, las cuales están involucradas con la adhesión del tubo polínico a las papilas estigmáticas (Park *et al.*, 2000).

### **7.2.3. Caracterización de los eventos tempranos en la interacción polen-pistilo**

Se observó que la interacción entre polen y pistilo genera alteraciones no sólo en el polen, sino también en las papilas estigmáticas, pudiéndose evidenciar y corroborar que están íntimamente involucradas en el sistema de reconocimiento. Al respecto Klein *et al.* (2009) también observaron alteraciones en ambas estructuras, y que no hay diferencias en las características de las papilas estigmáticas en polinizaciones legítimas e ilegítimas de *Psychotria nuda*.

Desde los primeros minutos de la interacción polen-pistilo se observaron alteraciones en la estructura de las papilas estigmáticas. Hiratsuka *et al.* (2002) reportan que en algunas angiospermas las células en contacto con el tubo polínico sufren un proceso de muerte celular, así como que la necrosis es usualmente observada a periodos cortos en los estigmas. Klein *et al.* (2009) determinan que la pérdida de turgencia en las papilas estigmáticas puede ser un indicativo de necrosis.

A los 45 min de la polinización, el nivel de degradación de las papilas estigmáticas fue evidente, sin embargo, entre los cinco y 30 minutos las alteraciones de las

papilas estigmáticas sólo fueron en las que tenían contacto con el polen, por lo que coinciden con las conclusiones de Klein *et al.* (2009), donde la alteración de las papilas estigmáticas es consecuencia de la polinización y/o el envejecimiento y no de una reacción de incompatibilidad. Del mismo modo determinan que el hecho de que sólo se observen en necrosis las células del estigma en contacto con polen y las que están lejos no, indica que parte del estigma puede permanecer funcional aún después de polinizaciones ilegítimas.

Mediante las polinizaciones a cortos tiempos se pudieron establecer las etapas y las características de la interacción polen-pistilo de *B. ternifolia*. Se observó que la etapa de adherencia de la fase I de la interacción polen-pistilo es diferente entre polinizaciones legítimas e ilegítimas, ya que la adherencia es más rápida en las polinizaciones intramorfo y autopolinizaciones, por lo que se puede inferir que el sistema de incompatibilidad se activa desde la primera fase de reconocimiento, así como también que pueden existir mecanismos diferentes en el sistema de reconocimiento de polinizaciones legítimas e ilegítimas. Wu *et al.* (2010) también determinan que hay diferencias en la capacidad, tipo y velocidad de respuesta entre polinizaciones legítimas e ilegítimas (intramorfos y autopolinizaciones). Sin embargo, cabe señalar que en el presente, es el primer trabajo donde se analizan y observan diferencias en etapas tempranas de reconocimiento, así como de interacción polen-pistilo propiamente dicho, ya que se describen las características de ambas estructuras de reconocimiento.

Sin embargo, se determinó que el sistema de incompatibilidad heteromórfico se activa estrictamente en etapas más avanzadas, pudiendo corresponder con la fase

II y/o III en el tejido de transmisión (Swanson *et al.*, 2004), tal como lo reportado por Bawa y Beach (1983) en *Cephaelis elata*, *Coussarea sp.*, *Faramea sp.*, *Psychotria sp.* y *Rudgea corniflora*; Castro *et al.* (2004) en *Psychotria birotula*, *P. mapourioides*, *P. jasminoides*; Castro y Araujo (2004) en *Psychotria nuda*; Massinga *et al.* (2005) en *Pentasia prunelloides* y *P. angustifolia*; Rossi *et al.* (2009) en *Psychotria ipecacuana*; de Oliveira *et al.* (2010) en *Palicourea rigida* y; Wu *et al.* (2010) en *Hedyotis acutángula*, donde la inhibición del tubo polínico se da entre el estigma y el estilo.

### **7.3. Identificación y descripción de polimorfismos auxiliares**

#### **7.3.1. Caracteres masculinos, granos de polen**

De todos los caracteres masculinos considerados, sólo se observaron diferencias en la producción de polen, en la apariencia de la exina y en las microestructuras de la ornamentación de la exina (columela y lumen). En la producción de polen, donde es el morfo Thrum el que produce una mayor cantidad de polen, lo cual coincide con datos para *Turnera diffusa*, *Psychotria nuda*, *Palicourea padifolia*, *Damnacanthus sp.* y *Gaertnera vaginata* aportados respectivamente por Suárez (2013); Cardoso y Cardoso (2004); Ornelas *et al.* (2004); Naiki y Nagamasu (2003); Pailler y Tompson (1997); Baker y Shore (1995) y; Mazer y Hultgard (1993). Al respecto, García (2008) sugiere que estas diferencias podrían estar involucradas en una posible función masculina por parte del morfo Thrum.

Respecto a los dimorfismos del grano de polen, Hernández (2006) no encontró diferencias entre los morfos en *B. ternifolia* en una población en una población diferente, por lo que se puede decir que la población estudiada en el presente trabajo la distilia es más estable está reforzada, así como que puede haber otras poblaciones de *B. ternifolia* que esté en rompiendo con las características propias de la distilia, ya sea por cuestiones ecológicas o estrictamente genéticas. Mientras que López también determinó diferencias entre los morfos en la ornamentación de la exina, sin embargo sus observaciones sólo fueron aparentes sin que se llevara a cabo una medición de las microestructuras.

Con respecto al dimorfismo de la exina del polen, en diversos trabajos se menciona esta característica asociada a especies heterostílicas (Baker, 1959; Wolfe, 2001; Naiki y Nagamasu, 2003), así como íntimamente relacionado con el sistema de incompatibilidad heteromórfico (donde se incluye dimorfismo en las papilas estigmáticas; Richard y Koptur 1993; Paillet y Tompson 1997; Ornelas *et al.*, 2004).

No se apreciaron diferencias en el tamaño ni en la forma del grano de polen, los cuales son los polimorfismos auxiliares más comunes reportados en especies heterostílicas (Dulberger, 1992). Así como también se ha reportado que influyen en la velocidad de crecimiento del tubo polínico y que son compensatorios a la longitud de los pistilos (Lewis y Jones, 1992), sin embargo, en el presente trabajo, no se observó que influyera el tamaño, aun así el crecimiento de los tubos polínicos fue proporcional entre los morfos, es decir, que puede no influir el tamaño del polen en la velocidad de crecimiento.

En el presente estudio, mediante polinizaciones a distintos tiempos se observó que hay un mecanismo compensatorio del crecimiento de los tubos polínicos, ya que se hallaron casi en las mismas zonas, considerando que el pistilo de un morfo es más grande que el otro. Mecanismos que pueden depender no sólo del grano de polen (tamaño y/o forma) y su vigorosidad, sino de la capacidad de respuesta, concentración de nutrimento o de la selectividad del pistilo o que existen mecanismos de reconocimiento y nutrición diferentes entre los morfos (Swanson *et al.*, 2004).

En el presente trabajo se observaron granos de polen tri-, tetra y pentazonocolporados, sin embargo los tres tipos de polen se hallaron tanto en el morfo Pin como en Thrum, así como con frecuencias similares. Es decir, que la morfología del grano de polen puede tener plasticidad ambiental o una diversidad de genes involucrados en su constitución, contrario a lo reportado por Naiki y Nagamasu (2003) en *Damnacanthus sp.* donde determinaron que el número de colpos sí es un carácter asociado a la distilia. Cabe señalar que ambos géneros pertenecen a la familia Rubiaceae, es una de las familias con mayor diversidad en morfología del grano de polen (Moore *et al.*, 1991).

El polen observado en este trabajo y que se describe según terminologías de Moore *et al.* (1991) concuerda con los caracteres propios de la familia, subfamilia y la tribu a la que pertenece *B. ternifolia*. Tuvo un tamaño promedio de 34.855  $\mu\text{m}$ , la forma de oblato-esferoidal a subprolato, número de aberturas de tres a cinco, zonoaberturado, colpado y exina reticulada (Dessein *et al.*, 2005).

Las observaciones hechas en el presente trabajo de los granos de polen, demuestran que hay diferencias considerables a los reportados por López (2007), ya que según las observaciones de la forma y estructura del polen que se reporta en dicho trabajo coincide más bien con un grano de polen inviable, que se observó en este trabajo, como lo demuestra la prueba de Alexander (1969) y la escasa frecuencia de observación, tanto en microscopía óptica como de barrido.

También se han hecho revisiones de trabajos que reportan dimorfismo del grano de polen, la cuales demuestran que en muchos de los casos esto corresponde a especies diferentes (Baker, 1959) o a especies dioicas, donde en unas flores el grano de polen no es funcional y en otras donde los estigmas están atrofiados (Skottsberg 1944). Sin embargo no es el caso para la población de *B. ternifolia* estudiada en este trabajo, dado que en las polinizaciones intermorfos los granos de polen de ambos morfos desarrollaron tubos polínicos y en campo se han observado frutos en ambos morfos florales, por lo que queda demostrado que ambos granos de polen y estigmas son funcionales y que pertenecen a la misma especie.

Cabe señalar que tampoco se observaron diferencias en el color del grano de polen, y que los únicos trabajos en los que se ha reportado este polimorfismo asociado a la distilia es en *Linum pubescens* (Wolfe, 2001) y *Linum suffruticosum* (Armbruster *et al.*, 2006) pertenecientes a la familia Linaceae.

### 7.3.2. Caracteres femeninos

No se determinaron diferencias entre los morfos en las características de las papilas estigmáticas, en la ornamentación aparente ni en el tamaño. Se esperaba que hubiera tales diferencias pues está asociado al sistema de rechazo de especies heterostílicas, y dado que sí se hallaron diferencias en el polen y un sistema de incompatibilidad heteromórfico, lo cual reforzaría y evidenciaría el sistema de polimorfismos auxiliares asociados a la distilia y las diferencias en el sistema de reconocimiento entre morfos.

En la familia Rubiaceae, en *Palicourea padifolia* (Ornelas *et al.*, 2004), *Gaertnera vaginata* (Pailler y Tompson, 1997) y *Guettarda scabra* (Richard y Koptur, 1993) se reportaron diferencia en las papilas estigmáticas de los morfos, así como también en *Psychotria sp.*, que es un género relacionado con *B. ternifolia* (Faivre y McDade, 2001) y quienes además concluyeron que dicha característica es un polimorfismo auxiliar que está asociado al proceso de interacción polen-pistilo en las primeras etapas.

Con respecto a la producción de óvulos, que pudiera estar relacionada con el dimorfismo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Del mismo modo se cuantificaron las semillas para determinar si, pese a que la producción de óvulos es la misma, pudiera haber una mayor cantidad de fertilización o de abortos en uno de los morfos, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas, lo cual refuerza las observaciones en

campo de las proporciones de la población, donde ésta última sugiere un mismo éxito reproductivo en ambos morfos florales (Thompson *et al.*, 2003).

Sin embargo, la diferencia entre la producción de óvulos y de semillas sí es significativa para ambos morfos, lo que podría indicar que hay una menor disponibilidad de polen, lo cual suele estar involucrado con la producción de polen, herbívora de éste, o con la función del polinizador.

Se ha reportado que en algunas especies o poblaciones distílicas, uno de los morfos tiene una función masculina y el otro una femenina, lo que responde a que un morfo produce significativamente más polen y el otro produce mayor cantidad de óvulos y por ende, también de semillas (Baker y Shore, 1995), sin embargo, al respecto no se identificaron diferencias significativas.

Aunque no es significativa la diferencia en la producción de semillas entre los morfos, el morfo Thrum podría compensar la falta de reciprocidad y la menor exposición del pistilo con el hecho de, tener más grande la corola y que las anteras estén en el margen de ésta, haciéndolo más atractivo visualmente en tamaño, color y contraste.

### **7.3.3. Caracteres florales**

Se determinó diferencia en el tamaño y forma de la corola, siendo el morfo Thrum el más grande, lo cual coincide con lo reportado en muchas especies de la familia y que pudiera estar determinado genéticamente (Sobrevila *et al.*, 1983; Murray,

1990; Richard y Koptur, 1993; Passos y Sazima 1995; Riveros *et al.*, 1995; Pailler y Tompson, 1997).

Dicha diferencia en el tamaño de la corola en el morfo Thrum, así como también que las anteras estén en la parte superior pueden ser determinantes en el atractivo visual para los polinizadores, lo que puede estar beneficiando a dicho morfo.

Mientras que en el morfo Pin los tricomas de la base de la corola son significativamente más largos, los cuales pueden funcionar como una protección contra la herbívora del polen y para evitar el consumo de néctar por otros polinizadores que no correspondan al colibrí (Hernández, 2006), por lo que pueden compensar la diferencia en la atracción de la corola del morfo Thrum. Cabe señalar que este último carácter floral es la primera vez que se estudia.

Con respecto a los caracteres parentales, es decir, a la germinación de semilla y producción de las primeras hojas, no se observaron diferencias entre los morfos, por lo que se puede considerar que tiene igual oportunidad de desarrollarse y establecerse. Lo cual puede reafirmarse con la frecuencia de los morfos hallada en campo. Cabe señalar que este último carácter floral es la primera vez que se evalúa en especies heterostílicas, así como es un elemento que Bilbatúa (2010) sugiere también para evaluar la posibilidad de una división de funciones sexuales, quien considera al morfo Pin relacionado con una función femenina.

## VIII. Conclusiones

- Se determinó que la población de *B. ternifolia* en el Pedregal de Ciudad Universitaria es estable y distílica, dada la relación de los morfos, el índice de reciprocidad, la presencia de un sistema de incompatibilidad heteromórfico y que cuenta con polimorfismos auxiliares.
- Se corroboró la existencia de un sistema de incompatibilidad heteromórfico, con características propias de la población estudiada, rechazo a nivel de estigma y diferencias de reconocimiento y rechazo entre los morfos.
- La velocidad de crecimiento de los tubos polínicos es compensatoria entre los morfos, sin estar asociado el tamaño del polen.
- El sistema de reconocimiento se da desde los primeros minutos de interacción, donde se ven involucrados tanto el polen como las papilas estigmáticas.
- Entre los polimorfismos auxiliares asociados al sistema de incompatibilidad se puede considerar a la ornamentación de la exina del grano de polen.
- Otros polimorfismos auxiliares son la corola y los tricomas internos de la base de la corola.
- Hay diferencia en los polimorfismos auxiliares reportados para las distintas poblaciones que se han estudiado de *B. ternifolia*, además de que en el presente trabajo se reportan otros caracteres.

## **IX. Perspectivas**

- Haber determinado el nivel de rechazo del tubo polínico, permitirá reconocer o acotar las sustancia o proteínas que puedan estar involucradas en el sistema de incompatibilidad heteromórfico.
- Una vez que se ha identificado la existencia de un sistema de incompatibilidad heteromórfico y los polimorfismos auxiliares posiblemente involucrados, es factible hacer estudios genéticos para reconocer si están o no asociados al locus S.
- Sería de gran interés hacer un análisis de la morfometría y del desarrollo de la corola y punto de inserción de las anteras a ésta, y de su relación con el crecimiento del pistilo, ya que las anteras están adnadas a la corola. Ello para reconocer qué factor morfológico determina la hercogamia, si es longitud celular o densidad celular, así como el momento en el que ocurre el fenómeno, ya que pueden ser una guía en la genética de la hercogamia recíproca propiamente dicho, en qué momento se activan los genes y qué genes pueden estar involucrados.

## X. Bibliografía

- Alexander M.P. 1969. Differential staining of aborted and non aborted pollen. *Stain Technol.* **44**: 117-122.
- Álvarez S.F., L.J. Carabias, J. Meave, F.D. Nava, Z.F. Rodríguez, G.C. Tovar y A. Valiente. 1982. Proyecto para la creación de una reserva en el Pedregal de San Ángel. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Armbruster W.S., R. Pérez-Barrales, J. Arroyo, M.E. Edwards y P. Vargas. 2006. Three-dimensional reciprocity of floral morphs in wild flax (*Linum suffruticosum*): a new twist on heterostyly. *New. Phytol.* **171**: 581-590.
- Arroyo M.T.K. y E. Cabrera. 1977. Preliminary self-incompatibility test for some tropical cloud forest species in Venezuela. *Newsletter* **8**: 72-77.
- Arroyo J. y A. Dafni. 1995. Variations in habitat, season, flower traits and pollinators in dimorphic *Narcissus tazetta* L. (Amaryllidaceae) in Israel. *New. Phytol.* **129**: 135-145.
- Athanasiou A. y J.S. Shore. 1997. Morph-Specific proteins in pollen and styles of distylous *Turnera* (Turneraceae). *Gen. Soc. Am.* **146**: 669-679.
- Baker A.M. y J.S. Shore. 1995. Pollen competition in *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *Am. J. Bot.* **82**: 717-725.
- Baker H.G. 1959. Pollen dimorphism in the Rubiaceae. *Evol.* **10**: 23-31.

- Barrett S.C.H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. En S.C.H. Barrett, Evolution and function of heterostyly. Ed. Springer-Verlag. Nueva York. pp: 1-29.
- Barrett S.C.H. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. *T. Plant. Scien.* **3**: 335- 341.
- Barrett S.C.H., L.K. Jesson y A.M. Baker. 2000. The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. *Ann. Bot.* **85**: 253-265.
- Bawa K.S. y J.H. Beach. 1981. Evolution of sexual systems in flowering plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **68**: 254-274.
- Bawa K.S. y J.H. Beach. 1983. Self-incompatibility systems in the Rubiaceae of a tropical lowland wet forest. *Am. J. Bot.* **70**: 1281-1288.
- Bertin R.I. 1993. Incidence of monoecy and dichogamy in relation to self-fertilization in angiosperms. *Am. J. Bot.* **80**: 557-560.
- Bilbatúa N.K.P. 2010. Efectos de la variación morfológica del grano de polen sobre la tasa de germinación y crecimiento del tubo polínico en *Bouvardia ternifolia*. Tesis de licenciatura en biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- Campbell N.A., J.B. Reece. 2007. Biología. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. pp: 774-775.
- Cardoso C.C. y A.A. Cardoso. 2004. Distyly and sequential pollinators of *Psychotria nuda* (Rubiaceae) in the Atlantic rain forest, Brazil. *Plant Syst. Evol.* **244**: 131-139.

- Castro C.C. y A.C. Araujo. 2004. Distyly and sequential pollinators of *Psychotria nuda* (Rubiaceae) in the Atlantic rain forest, Brazil. *Plant Syst. Evol.* **244**: 131-139.
- Castro C.C., P.E.A.M. de Oliveira y M.C. Alves. 2004. Breeding systems and flora morphometry of distylous *Psychotria* L. species in the Atlantic rain Forest, SE Brazil. *Plant Biol.* **6**: 755-760.
- Consolaro H., R.D.P. Toledo, R.L. Ferreguti, J. Hay y P.E. de Oliveira. 2009. Distilia e homostilia em species de *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) do cerrado do Brasil Central. *Rev. Bras. Bot.* **32**: 677-689.
- Cheung A.Y., H. Wang y H.M. Wu. 1995. A floral transmitting tissue-specific glycoprotein attracts pollen tubes and stimulates their growth. *Cell.* **82**: 383-93
- Darwin C. 1877. The different forms of flowers and plants of the same species. Londres, Reino Unido.
- de Oliveira A., A.S. Palmira, H. Consolaro, M.A.B. Granjas y P.E. Oliveira. 2010. Breeding biology and distyly in *Palicourea rigida* H.B. y K. (Rubiaceae) in the cerrados of central Brazil. *Acta Bot. Bras.* **24**: 686-696.
- Desein S., H. Ochoterena, P. de Block, F. Lens, E. Robbrecht, P. Schols, E. Smets, S. Vinckier y S. Huysmans. 2005. Palynological characters and their phylogenetic signal in Rubiaceae. *The Bot. Rev.* **71**: 354-414.
- Dulberger R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. En S.C.H. Barrett, Evolution and function of heterostyly. Ed. Springer-Verlag, Nueva York. pp: 41-84.

- Erdtman. 1966. Pollen morphology and plant taxonomy angiosperms (An Introduction to Palynology). Ed. Hafner Publ. Co. Nueva York. 553 pp.
- Faivre A.E. 2002. Variation in pollen tube inhibition sites within and among three Heterostylous species of Rubiaceae. *Int. J. Plant. Sci.* **163**: 783-794.
- Faivre A.E. y L.A. McDade. 2001. Population-level variation in the expression of heterostyly in three species of Rubiaceae: does reciprocal placement of anthers and stigmas characterize heterostyly? *Am. J. Bot.* **88**: 841-853.
- García R.C. 2008. Asymmetry in pollen flow promotes gender specialization in morphs of the distylous neotropical herb *Arcytophyllum lamarum* (Rubiaceae). *Evol. Ecol.* **22**: 743-755.
- Hernández G.A. 2006. Colibríes y especialización sexual en el arbusto distílico *Bouvardia ternifolia* (Rubiaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- Hiratsuka R., Y. Yamada y O. Terazaka. 2002. Programmed cell death of *Pinus nucellus* in response to pollen tube penetration. *J. Plant Res.* **115**: 141-148.
- Johnson M.A., D. Preuss. 2002. Plotting a course: Multiple signals guide pollen tubes to their targets. *Dev. Cell.* **2**: 273-81.
- Klein D.E., L. Freitas y M. Da Cunha. 2009. Self-incompatibility in a distylous species of Rubiaceae: is there a single incompatibility response of the morphs? *Sex. Plant. Reprod.* **22**: 121-131.

- Kudoh H., T. Sugawara, S. Wu y J. Murata. 2001. Morph-specific correlations between floral traits in a distylous *Ophiorrhiza napoensis* (Rubiaceae) population in southern China. *J. Trop. Eco.* **17**:719-728.
- Leege L.M. y L.M. Wolfe. 2002. Do floral herbivores respond to variation in flower characteristics in *Gelsemium sempervirens* (Loganiaceae), a distylous vine. *Am. J. Bot.* **89**: 1270-1274.
- Lewis D. y D.A. Jones. 1992. Genetics of heterostyly. En S.C.H. Barrett, Evolution and function of heterostyly. Ed. Springer-Verlag. Nueva York. pp: 129-150.
- Lloyd D.G. y C.J. Webb. 1992. The evolution of heterostyly. En SCH Barrett, Evolution and function of heterostyly. Ed. Springer-Verlag. Nueva York. pp: 151-178.
- Lloyd D.G. y S.C.H. Barrett. 1996. Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plant. Ed. Chapman & Hall. Nueva York 413 pp.
- López C.M.L., J.G. Márquez y G.S. Murguía. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Facultad de Ciencias. UNAM. México. pp 178.
- López V.A. 2007. Evolución del sistema reproductivo de *Bouvardia ternifolia*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- Massinga P.H., S.D. Johnson y L.D. Harder. 2005. Heteromorphic incompatibility and efficiency of pollination in two distylous *Pentanisia* species (Rubiaceae). *Ann. Bot.* **95**: 389-399.

- Mazer S.J. y U.M. Hultgard. 1993. Variation and covariation among floral traits within and among four species of northern European *Primula* (Primulaceae). *Am. J. Bot.* **80**: 474-485.
- McCubbin A.G., C. Lee y A. Hetrick. 2006. Identification of genes showing differential expression between morph in developing flowers of *Primula vulgaris*. *Sex. Plant Reprod.* **19**:63-72.
- Moore D.D., J.A. Webb y M.E. Collinson 1991. Pollen analysis. Segunda edición. Blackwell scientific publication. pp 322.
- Murray B.G. 1990. Heterostyly and pollen-tube interactions in *Luculia gratissima* (Rubiaceae). *Ann. Bot.* **65**: 691-698.
- Naiki A. y H. Nagamasu. 2003. Distyly and pollen dimorphism in *Damnacanthus* (Rubiaceae). *J. Plant Res.* **116**: 105-113.
- Nasrallah J.B., T.H. Kao y M.L. Goldberg, M.E. 1985. A cDNA clone encoding an S-locus-specific glycoprotein from *Brassica oleraceae*. *Nature.* **318**: 263-263.
- de Netancour D. 2001. Incompatibility and incongruit in wild and cultivated plants segunda edición, Springer Verlag. Berlin Heidelberg. Nueva York. Pp 322.
- Ornduff R. 1976. The reproductive system of *Amsinckia grandiflora*, a distylous species. *Syst. Bot.* **1**:57-66.
- Ornelas J.F., L. Jiménez, C. González y A. Hernández. 2004. Reproductive ecology of distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) in tropical montane cloud

- forest. I. Hummingbirds effectiveness as pollen vectors. *Am. J. Bot.* **91**: 1052-1060.
- Pailler T. y J.D. Thompson. 1997. Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in *Gaertnera vaginata* (Rubiaceae) endemic to La Réunion Island. *Am. J. Bot.* **84**: 315-327.
  - Park S.Y., G.Y. Jauh, J.C. Mollet, K.J. Eckard y E.A. Nothnagel. 2000. A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an *in vitro* stylar matrix. *Plant Cell.* **12**: 151–64.
  - Passos L. y M. Sazima. 1995. Reproductive biology of the distylous *Manettia luteo-rubra* (Rubiaceae). *Bol. Act.* **108**: 309-313.
  - Richards J.H. y S. Koptur. 1993. Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* (Rubiaceae). *Am. J. Bot.* **80**: 31-40.
  - Riveros M., M.T.K. Arroyo y A. M. Humaña. 1995. An unusual kind of distyly in *Quinchamalium chilense* (Santalaceae) on Volcán Casablanca, Southern Chile. *Am. J. Bot.* **74**: 313-320.
  - Rossi A.A.B., L.O. de Oliveira y M. F. Vieira. 2005. Distyly and variation in floral traits in natural populations of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). *Rev. Bras. Bot.* **28**: 285-294.
  - Rzedowski J. y G.C. Rzedowski. 1954. Vegetación del Pedregal de San Ángel, *An. Esc. Nac. Cien. Biol.* **8**: 59-129.
  - Sánchez J.M., V. Ferrero y L. Navarro. 2008. A new approach to the quantification of degree of reciprocity in distylous (*sensu lato*) plant populations. *Ann. Bot.* **192**: 463- 472.

- Sobrevila C., N. Ramírez y N. Xena. 1983. Reproductive biology of *Palicourea fendleri* and *P. petiolaris* (Rubiaceae), heterostylous shrubs of a tropical cloud forest in Venezuela. *Biotrop.* **15**: 161-169.
- Skottsberg C. 1944. On the flower dimorphism in Hawaiian Rubiaceae. *Ark. F. Bot.* **31**: 1-28.
- Strobeck C. 1972. Heterozygosity in Pin-Thrum plants or with partial sex linkage. *Gen.* **72**: 667-678.
- Suárez P.N. 2013. Caracterización de polimorfismos florales de la especie distílica *Turnera diffusa* (Turneraceae). Tesis de licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- Swanson R., A.F. Edlund y D. Preuss. 2004. Species specificity in pollen-pistil interactions. *Annu. Rev. Genet.* **38**: 793-818.
- Tamari F. y J.S. Shore. 2004. Distribution of style and pollen polygalacturonases among distylous and homostylous *Turnera* and *Piqueria* spp. (Turneraceae). *Heredity.* **92**: 380-385.
- Thompson J.D. y B. Dommeé. 2000. Morph-specific patterns of variation in stigma height in natural populations of distylous *Jasminum fruticans*. *New Phytol.* **148**: 303-314.
- Torres D.I. 2007. Efecto de la herbívora en la interacción colibríes y arbustos distílicos de *Bouvardia ternifolia*, experimentación en campo en la Malinche, Tlaxcala. Tesis de licenciatura (Biólogo). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.

- Valiente A.B. y E.G. Luna. 1990. Una lista florística actualizada para la Reserva del Pedregal de San Ángel, México D.F. *Act. Bot. Mex.* **9**: 13-30.
- Wang Y., Q.F. Wang, Y.H. Guo y S.C.H. Barrett. 2005. Reproductive consequences of interactions between clonal growth and sexual reproduction in *Nymphoides peltata*: a distylous aquatic plant. *New Phytol.* **165**: 329-336.
- Webster M.A. y P.M. Gilmartin. 2006. A analysis of late stage flower development in *Primula vulgaris* reveals novel differences in cell morphology and temporal aspects of floral heteromorphy. *New Phytol.* **171**: 591-603.
- Wolfe L.M., P.H. Massinga y S.D. Johnson. 2009. A quantitative evaluation of the distylous syndrome in *Sedaea grandu* (Gentianaceae). *S. Afr. J. Bot.* **75**: 785-790.
- Wolfe L.M. 2001. Associations among multiple floral polymorphism in *Linum pubescens* (Linaceae) a heterostylous plant. *Int. J. Plant. Sci.* **162**: 335-342.
- Wu X., A. Li y D. Zhaung. 2010. Cryptic self-incompatibility and distyly in *Hedyotis acutanguli* Champ. (Rubiaceae). *Plant Biol.* **12**: 484-494.
- Zinkl GM, B.I. Zwiebel, D.G. Grier y D. Preuss. 1999. Pollen-stigma adhesion in *Arabidopsis*: a species-specific interaction mediated by lipophilic molecules in the pollen exine. *Development* **126**: 5431-5440.

Páginas web:

- <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/rubiaceae/bouvardia-ternifolia/fichas/ficha.htm>. Consultada 25 de noviembre de 2009.
- <http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/welcome.html>. Consultada 24 de marzo de 2009.