



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Adecuación de la función masculina de los morfos florales
en la planta androdioica *Prockia krusei* (Salicaceae)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

GUADALUPE LIBERTAD ROLDÁN DÍAZ



DIRECTOR DE TESIS:

**DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ
GUZMÁN**

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

<p>1. Datos del alumno Roldán Díaz Guadalupe Libertad 51157505 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 103004969</p>
<p>2. Datos del tutor Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr. Juan Servando Núñez Farfán</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dra. Sonia Vázquez Santana</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dra. Paula Sosenski Correa</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 M. en C. Jaime Jiménez Ramírez</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito. Adecuación de la función masculina de los morfos florales en la planta androdioica <i>Prockia krusei</i> (Salicaceae) 91 pp. 2015</p>

**“Sin embargo, como todos los cambios verdaderos,
se produjo suave y lentamente por sí mismo, igual
que el crecimiento de una planta”**

Michael Ende



DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico desde el fondo de mi ser a mi querida Universidad, que me vio crecer física y mentalmente desde que era una pequeña cachorra, puma, feroz, sin olvidar que me ha abierto las puertas a un sinfín de oportunidades y me ha permitido tener grandes satisfacciones.

Principalmente se la dedico a mis padres quienes me han dado un ejemplo invaluable de lo que debe ser una persona con valores y principios, me dejaron elegir mi camino, dándome todas las herramientas para seguirlo y lo han andado de la mano conmigo a cada momento.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán, por su infinita paciencia, la cual probablemente ya haya agotado después de la espera, pero que siempre tuvo una sonrisa y un buen comentario positivo hacia mí. Sobre todo por sus enseñanzas y la forma tan bonita en que me explicaba cosas complicadas para mí.

A los miembros de mi jurado: Dr. Juan Servando Núñez Farfán, Dra. Sonia Vázquez Santana y M. en C. Jaime Jiménez Ramírez, por sus observaciones tan certeras que ayudaron a mejorar este trabajo. Quiero hacer especial mención de la Dra. Paula Sosenski quien no sólo siendo mi sinodal me enseñó muchas cosas, sino desde que fue mi profesora y por si fuera poco, siempre tuvo palabras de aliento para que volviera a tomar mi camino en mis momentos de mayor desesperación.

A Mónica Karina Pérez Pacheco y a José Gonzalo Ricardo Wong por enseñarme con paciencia y dedicación las técnicas de laboratorio necesarias para realizar este trabajo.

A mi MAMÁ, quien ha sido más que eso para mí, es mi amiga y la mejor consejera que alguien podría tener, estoy segura que muchas personas desearían tener la hermosa relación que llevo con ella.

A mi PAPÁ, quien desde que yo era pequeña me acercó a la ciencia y me explicaba cosas del universo de una forma en la que sólo un padre amoroso lo haría con su niña.

A mis hermanos: Viole, quien siempre ha tomado muy bien su papel de hermana mayor y me ha cuidado y me ha enseñado cosas que sólo ella podría con su enorme elocuencia y conocimiento, además por todas las experiencias que hemos vivido llenas de alegría; a Vicky quien también ha sido mi ejemplo de que la perseverancia y la inteligencia nos pueden llevar a grandes cosas, y no puedo olvidar a su dúo dinámico, Nachito, que junto con mi hermana siempre me daban muestras del enorme gusto que les daba que estudiara biología y no olvidaré que me daba tips para ir de campo y me proporcionó varias herramientas; a Virma y a Manuel por siempre estar al pendiente de mí y formar parte de esta familia muégano.

A Ambar y Tere, quienes no creo que estén conscientes de la enorme dicha que me hace tenerlas en mi vida y que desde que están, veo el mundo mejor y lo han llenado de alegría. Son mi apoyo bebé (en mis palabras cursis).

A Laura, Brenda y Paulina, mis hermanitas por convivencia y elección, que han sido mi apoyo en todo momento, mi paño de lágrimas y mi fuente de alegría.

A los “malacopa” (PIKY, OKY, DANY, TAPIA, Harry, Tory, Juan, Marisela, Lorena....) que han crecido conmigo y me han demostrado que las verdaderas amistades son para siempre a pesar de la distancia.

A todos los miembros del famosísimo “hoyo funky” (Iván, Lalo, Andrés, Hoper, Beto, Emiliano, Jara, Mario, Paola) con todas sus sedes, que fueron parte esencial de mi formación académica y personal. Aguantaron mis quejas y me invitaron a pasar las penas con ellos, que no se pierda esa bonita costumbre.

A todas las personas que he tenido el honor de considerar amigos e incluso mejores amigos y siempre me han brindado su apoyo y momentos increíbles: Sayuri, Yodi, Rafa, Mariana rasta, Karlita bebé, Sam, Willy, Robert, Chucho...

A Mario, que llegó en el momento justo que tenía que llegar y me está haciendo disfrutar al máximo esta etapa tan crucial y llena de cambios. Viene lo mejor.

ÍNDICE

Resumen	8
Introducción	9
Antecedentes	
<i>Sistemas de apareamiento en plantas</i>	10
<i>Sistemas reproductivos en plantas</i>	11
<i>Mantenimiento de especies androdioicas funcionales</i>	12
<i>Androdioecia como una estrategia evolutivamente estable</i>	18
<i>Evolución del androdioicismo</i>	19
Evolución de la androdioecia a partir del hermafroditismo.....	20
Evolución de la androdioecia a partir del dioicismo.....	21
<i>Evaluación de la adecuación en angiospermas</i>	25
Viabilidad de granos de polen.....	27
Germinación de granos de polen	27
<i>Grano de polen en angiospermas</i>	28
Aspectos morfológicos del polen.....	30
Heteromorfismo polínico.....	31
<i>Descripción de la especie</i>	32
Justificación	34
Objetivo general	34
Objetivos particulares	34
Materiales y métodos	35

<i>Conteo del número de estambres.....</i>	35
<i>Conteo del número de granos de polen.....</i>	36
<i>Tamaño de granos de polen.....</i>	38
<i>Viabilidad de granos de polen.....</i>	39
<i>Germinación de granos de polen.....</i>	40
<i>Análisis cualitativo de reservas en granos de polen.....</i>	42
Resultados	
<i>Conteo del número de estambres.....</i>	43
<i>Conteo del número de granos de polen.....</i>	44
<i>Morfología de los granos de polen.....</i>	47
<i>Tamaño de los granos de polen.....</i>	52
<i>Viabilidad de granos de polen.....</i>	54
<i>Germinación de granos de polen.....</i>	55
<i>Análisis cualitativo de reservas en granos de polen.....</i>	60
Discusión.....	62
<i>Estudios a futuro.....</i>	72
Conclusión.....	74
Referencias.....	75
Anexos.....	88

RESUMEN

El androdioicismo es un sistema reproductivo raro debido a las estrictas condiciones que se requieren para su mantenimiento, entre las que destaca, el que el morfo masculino deberá presentar el doble de ventaja en la adecuación, que el morfo hermafrodita. Para valorar si en *Prockia krusei* se presenta dicha condición, se evaluaron algunos de los componentes indirectos de la adecuación tanto en el morfo hermafrodita como en el masculino, como lo son el número de estambres por flor, el número de granos de polen por antera, así como la viabilidad, germinación y presencia de almidón de los mismos. Igualmente, se describió la morfología de los granos de polen. El número de estambres, el número de granos de polen, la viabilidad, la germinación de los granos de polen en dos de los medios utilizados, así como la presencia de almidón en los granos de polen, resultaron significativamente mayores en el morfo masculino, lo que concuerda con los principios que explican el mantenimiento de este sistema. La morfología de los granos de polen varió dentro y entre morfos florales. El morfo masculino presentó granos de polen tricolpados, tricolporados y tricolporoidados, mientras que en el morfo hermafrodita se encontraron granos de polen tricolpados y pericolpados.

Este trabajo apoya la evidencia de la androdioecia funcional en *P. krusei*, y permite realizar especulaciones acerca de su mantenimiento y evolución.

INTRODUCCIÓN

La androdioecia ha recibido atención por su rareza y porque ha resultado difícil explicar la persistencia de los machos en poblaciones hermafroditas. Los estudios sobre las especies androdioicas no sólo son a nivel morfológico, sino que han pasado al plano funcional, evitando confusiones en cuanto a la determinación de este tipo de sistema reproductivo. Una herramienta utilizada en estos casos son las pruebas de polinización, las cuales han logrado descartar varias especies que se creían androdioicas (Landry y Rathcke, 2007).

La floración y la fructificación de las plantas representa una de las únicas oportunidades en el ciclo de vida para movilizar los genes entre las poblaciones e individuos a través del polen y las semillas (Barrett, 2003). El sistema de apareamiento, que es la proporción de semillas que se producen por polinización cruzada o autopolinización, determina de manera importante el éxito reproductivo de los individuos, así como la estructura genética de las poblaciones.

Estudios previos (Mayorga-Lizaola, 2013; Vázquez-Barrón, 2013) determinaron que en *Prockia krusei* existía polimorfismo en los gineceos, de igual manera, se vio que individuos con el gineceo más pequeño que el androceo (morfo masculino) no producían frutos, en cambio, los individuos que presentaban flores con el gineceo sobresaliendo del androceo (morfo hermafrodita) sí los producían, con ello, se concluyó que *Prockia krusei* es una planta androdioica.

El propósito de esta investigación es determinar el papel que juega la adecuación de la función masculina en la reproducción y el mantenimiento de la androdioecia

en *Prockia krusei* (Salicaceae), bajo el supuesto que el morfo masculino presentará más del doble de ventaja en la adecuación de la función masculina sobre el morfo hermafrodita.

ANTECEDENTES

SISTEMAS DE APAREAMIENTO EN PLANTAS

Es la forma en que se transmiten los genes de una generación a otra a través de la reproducción sexual. Determinantes importantes de los sistemas de apareamiento de las plantas son los óvulos por parte de la madre y el éxito masculino a través del polen (fertilidad masculina; Barrett, 1998).

La probabilidad de las plantas de autofecundarse o entrecruzarse está asociada con una gran variedad de factores ecológicos, morfológicos y fisiológicos que, combinados, determinan y caracterizan el sistema de apareamiento (Raimúndez y Ramírez, 1998).

Algunos de los sistemas de apareamiento más comunes son:

*Autogamia: es aquella que se presenta cuando el transporte del polen se lleva a cabo dentro de la misma flor, llegando al estigma de ella. Se presenta en flores hermafroditas o monoclinas; es decir que tienen los dos sexos.

*Geitonogamia: Es el resultado de la transferencia de polen entre flores del mismo individuo. Común en las especies de floración masiva, genéticamente equivalente a la autofecundación (Barrett, 1998).

*Alogamia: Cuando el transporte de polen ocurre entre flores de individuos diferentes (Página en red: Hipertextos del área de la biología, 2013).

El hecho de que una flor sea hermafrodita, no supone necesariamente que la polinización sea por autogamia; por ejemplo, en la naturaleza, se observan un gran número de casos con complejos dispositivos de carácter anatómico y funcional que impiden la autopolinización o autogamia. En realidad, la polinización que más se presenta es la alogamia, aunque a la autogamia le corresponde asegurar la polinización cuando por causas diversas, la alogamia ha fracasado o no se presenta, aun así existen plantas que son normalmente autógamas (Jaramillo-Platt, 2006).

SISTEMAS REPRODUCTIVOS EN PLANTAS

Los sistemas reproductivos resultan de la combinación específica de varias características como compatibilidad genética, sexualidad, variación temporal en la maduración de los sexos o barreras morfológicas florales para evitar la autofecundación. De estos atributos, la unisexualidad y la autoincompatibilidad genética representan los caracteres más eficientes en promover la polinización cruzada. En este sentido, la información de los sistemas reproductivos de especies de plantas es importante, ya que determinan el flujo de genes y por consiguiente la estructura genética dentro de las poblaciones y la diferenciación genética entre ella (Lemus-Jiménez y Ramírez, 2005).

Las angiospermas son en su mayoría hermafroditas o cosexuales (75% - 90% del total de las especies), es decir que contienen tanto órganos sexuales femeninos

(pistilos) y masculinos (estambres). Los órganos sexuales pueden estar separados espacialmente en la flor (hercogamia) o pueden ser funcionales en diferentes momentos (dicogamia), reduciendo así la probabilidad de autopolinización (Barrett, 2002). Se ha considerado al hermafroditismo como ancestral, a partir de la cual ha evolucionado el mayor repertorio de sistemas reproductivos que se conoce en la naturaleza (Cuevas-García y Abarca-García, 2006).

Pocas angiospermas (~ 10%) tienen flores unisexuales, carácter que se asocia con un amplio espectro de estrategias de género, que involucran varias combinaciones de flores femeninas, masculinas y hermafroditas en la planta y en la población. A pesar de los patrones aparentemente complejos de la diversidad sexual en las plantas con flores, se pueden distinguir dos categorías en donde pueden entrar prácticamente todas las especies: Una de ellas es cuando las especies hermafroditas y monoicas son sexualmente monomórficas, donde todos los individuos presentan un único morfo. Mientras que las poblaciones dioicas y sus derivados son sexualmente polimórficas, pues presentan dos o más morfos, ya sean estrictamente unisexuales como en las dioicas o una combinación entre hermafroditas y femeninas (ginodioecia) o con masculinas (androdioecia; Dellaporta y Calderon-Urrea, 1993; Barrett, 2002; Gleiser y Verdú, 2005; Charlesworth, 2006).

MANTENIMIENTO DE ESPECIES ANDRODIOICAS FUNCIONALES

La androdioecia es un polimorfismo sexual en el cual individuos hermafroditas y masculinos coexisten en una población (Charlesworth, 1984; Barret, 1998; Stewart y Phillips, 2002; Saumitou-Laprade *et al.*, 2010). Los modelos teóricos que explican

la existencia y el mantenimiento de la androdioecia predicen que es un sistema de reproducción muy raro al presentarlo menos del 1% de las angiospermas (Lloyd, 1975; Aranha-Filho *et al.*, 2009).

La androdioecia ha sido bien estudiada en términos de teorías que predicen las condiciones que permiten su evolución y mantenimiento, pero la determinación de androdioecia funcional en las poblaciones naturales ha resultado difícil, es por ello que muchas especies han sido consideradas como androdioicas y posteriormente, determinadas como dioicas funcionales (Stewart y Phillips, 2002). De igual forma, es difícil distinguir la androdioecia y el hermafroditismo en algunas especies, pues las hermafroditas pueden presentar estambres muy similares al morfo masculino de la especie androdioica en cuanto a la frecuencia de dehiscencia y la liberación de polen (Aranha-Filho *et al.*, 2009).

La evolución de la androdioecia es poco probable, su existencia representa un desafío para los supuestos que subyacen en la teoría por ello es necesaria la reconciliación con las observaciones empíricas y se requiere una minuciosa exploración de las condiciones que han permitido a la androdioecia evolucionar en diversas especies (Charlesworth, 1984; Pannell y Verdú, 2006).

En general, se consideran especies androdioicas funcionales que se están manteniendo en una población de acuerdo a una Estrategia Evolutivamente Estable (EEE) si cumplen los siguientes requisitos: 1) doble ventaja en la adecuación masculina del morfo masculino sobre el hermafrodita, 2) baja frecuencia de

individuos masculinos (menor al 50%) y 3) que las flores hermafroditas presenten autoincompatibilidad o tasas de autofecundación bajas. Siendo estos requerimientos, una consecuencia el uno del otro (Lloyd, 1975; Charlesworth, 1984; Philbrick y Rieseberg, 1994; Stewart y Phillips, 2002; Wolf y Takebayashi, 2004; Pannel y Verdú, 2006; Landry y Rathcke, 2007; Saumitou-Laprade *et al.*, 2010).

1) Doble ventaja en la adecuación masculina del morfo masculino sobre el hermafrodita

Los individuos masculinos de poblaciones androdioicas se reproducen por polen, mientras que las hermafroditas lo hacen tanto por semilla como por polen. Además, los órganos sexuales masculinos y femeninos de las plantas que se reproducen por semilla juegan un papel desigual en los dos sistemas. Los granos de polen, a diferencia de los óvulos, no desarrollan semillas *in situ*, sino que deben ser transferidos al gineceo funcional de otro individuo. El éxito de un macho de una población androdioica implica la competencia directa entre las plantas productoras de polen, la proporción de sexos en la población, los sistemas de incompatibilidad y la producción de polen de las hermafroditas. Debido a que el número de granos de polen es mayor que el número de óvulos en cualquiera de los morfos, al hacer una comparación, no se debe tomar en cuenta sólo la cantidad de polen que producen los machos sino también la calidad de los mismos (Lloyd, 1975) .

Asimismo, dado que el genoma se hereda por ambos padres en el morfo masculino, la existencia de esterilidad femenina reduciría la adecuación de masculinos. Por ello

se debe compensar esa pérdida de adecuación femenina con aumento en la adecuación masculina (Charlesworth y Laporte, 1998).

Esta ventaja en la adecuación puede reflejarse en la producción de números de granos de polen, así como la capacidad de viabilidad y germinación de los mismos, por dar ejemplos.

2) Baja frecuencia de individuos masculinos

Las poblaciones androdioicas tenderán a mantener una frecuencia tan baja de individuos masculinos que no podrán ser fácilmente reconocidos en una población. Cuando la fecundación cruzada se mantiene constante a niveles bajos a moderados, la frecuencia masculina debe aumentar a medida que incrementa la depresión endogámica debido a que: la adecuación de las hermafroditas autocompatibles disminuye a medida que aumenta la depresión endogámica, la adecuación relativa de los masculinos incrementa a medida que disminuye la adecuación de las hermafroditas y crece la frecuencia de masculinos a medida que aumenta la adecuación masculina (Landry y Rathcke, 2007).

La doble ventaja de la adecuación es un requisito mínimo que permite la persistencia de las plantas macho a bajas frecuencias. La ventaja requerida de la adecuación de los masculinos aumenta de manera exponencial a medida que crece la frecuencia de masculinos a 50%, por lo que se espera que las poblaciones androdioicas tengan bajas frecuencias masculinas (Landry y Rathcke, 2007).

Abreviadamente, se esperan frecuencias bajas masculinas ya que la ventaja del doble en la adecuación se logra sólo si la frecuencia de machos es baja, por lo que si aumenta la frecuencia debería aumentar aún más la ventaja de los masculinos.

Saumitou-Laprade *et al.* (2010) demostraron que las proporciones de machos en las poblaciones androdioicas pueden ser mayores que las predichas teóricamente debido a que los hermafroditas pertenecen exclusivamente a uno de los dos grupos de auto-incompatibilidad gametofítica presentados en la especie *Phillyrea angustifolia*, y por lo tanto, cada uno puede interactuar con sólo la mitad de todos los receptores de polen. Por el contrario, los machos pueden polinizar todas las hermafroditas. Por lo tanto, en *P. angustifolia*, la desventaja reproductiva a la que los machos se enfrentan debido a la pérdida de la función femenina es compensada por el hecho de que todos los machos son totalmente compatibles con todos los receptores de polen, aunque éste se produzca en las mismas proporciones.

En términos más simples se puede considerar que la frecuencia masculina será baja si presenta alta adecuación relativa ya que se necesitará gran cantidad de óvulos disponibles para fecundar.

Género funcional

La morfología floral es uno de los criterios usados para clasificar los sistemas de apareamiento, así como la realización de polinizaciones controladas, pero uno de los criterios con mayor relevancia está basados en la adecuación del género funcional, el cual permite cuantificar el éxito reproductivo que tienen los individuos

o al beneficiarse del masculino (polen) o del femenino (producción de semillas; Delph y Wolf, 2005).

El género funcional de las hermafroditas está influenciado tanto por el polen y la producción de semillas (asignación de género) como por la frecuencia de unisexuales (el género funcional es dependiente de la frecuencia). Por ejemplo, si las hermafroditas producen mucho menos polen que los masculinos, éstos fecundarán a la mayoría de los óvulos. De esta manera, el género funcional de las hermafroditas será altamente sesgado hacia el femenino. Así, la producción de semillas y de polen de las hermafroditas en relación con los masculinos influye en la adecuación relativa de los dos morfos, y por lo tanto influye en la proporción de sexos (Delph y Wolf, 2005).

Un término que se ha ligado con la asignación de género en las hermafroditas es el de plasticidad, el cual supone que éstas pueden alterar su producción de semillas o de polen dependiendo de las condiciones ambientales. Sin embargo, en la mayoría de las especies que han sido descritas como androdioicas, la plasticidad en la producción de polen y óvulos no está presente (Delph y Wolf, 2005).

3) Autoincompatibilidad o tasas de autofecundación de bajas a moderadas.

La adecuación femenina tiende a ser limitada por los recursos que se necesitan para formar semillas y frutos, mientras que la adecuación masculina se ve limitada por las oportunidades de apareamiento y el costo de recompensas. De presentarse autofecundación de los individuos hermafroditas, esto dejaría menos óvulos disponibles para ser fecundados por el polen masculino, siempre y cuando no

existan mecanismos que eviten la autopolinización. Con lo que la adecuación masculina se reduciría al mínimo.

ANDRODIOECIA COMO UNA ESTRATEGIA EVOLUTIVAMENTE ESTABLE

Se entiende como una Estrategia Evolutivamente Estable (EEE) a una estrategia (en este caso la asignación a las funciones macho y hembra) que, de ser adoptada por la mayoría de los individuos de una población, una mutación no podrá invadir dicha población, que en este caso serían individuos con otro patrón de asignación a las funciones reproductivas (Eguiarte *et al.*, 1992).

Charnov (1982) describe la estabilidad evolutiva de la androdioecia gráficamente (Figura 1). Mientras que una curva cóncava (cuando los individuos femeninos y masculinos presentan su mayor adecuación) representa estabilidad de la dioecia, y una convexa (los hermafroditas presentan igual adecuación femenina y masculina) cuando la población se encuentre estable en el hermafroditismo.

La estabilidad de la androdioecia requiere una curva cóncava al final del masculino (favoreciendo a los masculinos unisexuales) y convexa al final de las femeninas (favoreciendo a las hermafroditas parcialmente femeninas). Aunque no se han encontrado situaciones biológicas en donde se presente este tipo de curva.

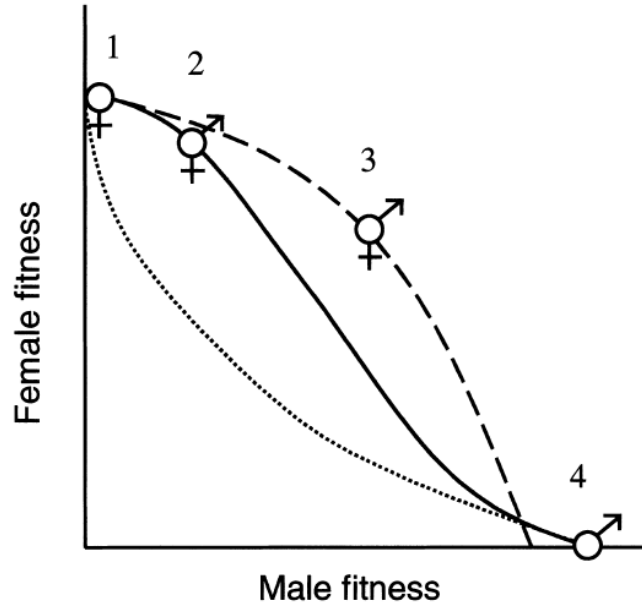


Figura 1. Curvas de ganancia propuestas por Charnov (1982). 1 y 4) Mayor adecuación femenina y masculina respectivamente que forman una curva cóncava representan estabilidad de la dioecia (línea punteada). 2 y 4) Mayor adecuación de hermafroditas sesgadas a las femeninas y de masculinos respectivamente formando una curva convexa al final de las femeninas y cóncava al final del masculino representando la estabilidad de la androdioecia (línea continua) 3) Adecuación masculina y femenina igual representando la estabilidad del hermafroditismo (línea discontinua).

Charlesworth y Charlesworth (1981) ampliaron este análisis a poblaciones parcialmente endogámicas y mostraron que la forma de las curvas de ganancia ya no es un buen predictor de que el sistema reproductivo será estable.

EVOLUCIÓN DEL ANDRODIOICISMO

Se han encontrado especies androdioicas pertenecientes a diversas familias de angiospermas (Alismataceae, Oleaceae, Cactaceae, Combretaceae, Datisceae, Euphorbiaceae, Cucurbitaceae, Moraceae) lo cual podría indicar que la

androdioecia ha evolucionado independientemente en varias ocasiones (Wolf y Takebayashi, 2004).

En estas rutas evolutivas se considera al androdioicismo como un estado intermedio entre el dioicismo y el hermafroditismo

-Evolución de la androdioecia a partir del hermafroditismo

Debido que se piensa que las flores hermafroditas son la forma ancestral, los modelos de evolución del androdioicismo han apuntado a que estas poblaciones surgieron a partir de hermafroditas (Charlesworth, 1984; Barrett, 2002).

Para que esto ocurra se requiere la invasión de un mutante con esterilidad femenina, creando una población androdioica, seguida de una gradual o abrupta disminución en la producción de hermafroditas que comenzarán a ser puramente femeninas dando lugar a una población dioica (Delph y Wolf, 2005).

La evolución del androdioicismo requiere de algunas condiciones, como lo es que la proporción de sexos sea constante, siendo menor la de los masculinos, y que se presenten altas tasas de entrecruzamiento (Wolf y Takebayashi, 2004)

Además, a diferencia de la ginodioecia, la androdioecia puede evolucionar a partir del hermafroditismo, como resultado de la selección para evitar la endogamia, ya que la autofecundación de inmediato hace que los óvulos no estén disponibles para los machos (Pannell, 2002b).

Según algunos autores (Richards, 1986; Lepart y Dommé, 1992) la presencia de vestigios de órganos sexuales en individuos unisexuales, apoyarían la hipótesis del origen del androdioicismo vía hermafroditismo.

Adicionalmente, Wolf y Takebayashi (2004) proponen que si las hermafroditas contribuyen genéticamente a partir de la función masculina, puede ser indicio que la evolución hacia la dioecia aún no ha llegado a su fin.

Para una revisión sobre las especies que se ha sugerido han evolucionado a partir de esta ruta ver Anexo 2.

-Evolución de la androdioecia a partir del dioicismo

La evidencia indica que la evolución de la androdioecia a partir de la dioecia ha ocurrido en repetidas ocasiones (Charlesworth, 1984; Pannell, 2002a; Wolf y Takebayashi, 2004; Pannell y Verdú, 2006).

De ser este el caso, se requiere que en una población dioica, haya una invasión y propagación ya sea de flores femeninas productoras de polen o de flores masculinas productoras de semillas. Inicialmente en la población aparecería evolutivamente un sistema sexual difícil de mantener conocido como trioecia, en el cual existen tres morfos: uno hermafrodita, uno masculino y el otro femenino. Posteriormente, se cree que lo más probable es un desplazamiento rápido de uno de los morfos unisexuales por las hermafroditas, surgiendo poblaciones androdioicas (Wolf y Takebayashi, 2004).

La invasión de las hermafroditas se podría ver favorecida si:

- La producción de semillas de las flores femeninas está limitada por la falta de polen, podría ser que éstas produjeran algo de polen para fecundar sus propios óvulos. Esta limitación de polen puede deberse a varios factores entre los que se encuentra una pérdida del movimiento del aire o de polinizadores bióticos, una baja

calidad de los gametos masculinos, pérdida de donadores de polen por bajas en la densidad poblacional, etc. (Wolf y Takebayashi, 2004).

-Las hermafroditas son autocompatibles. En hermafroditas, la limitación de polen no decrementa la producción de semillas pero sí incrementa la autofecundación (Wolf y Takebayashi, 2004).

-Las hermafroditas presentan alto éxito reproductivo total. Incluso si la reasignación de recursos para la producción de polen redujera la producción de óvulos, el aseguramiento de la reproducción debido a la auto-fecundación puede permitir a los hermafroditas tener una mayor adecuación total que las femeninas (Pannell et al. 2008).

Por otro lado, el mantenimiento de los masculinos se ve favorecido por hermafroditas que sean buenas productoras de semillas, con baja adecuación del polen y tasa de autofecundación baja.

Soportando la teoría de que el autocruzamiento es necesario para la evolución de la androdioecia a partir del dioicismo, todas las especies que se ha supuesto derivan de la dioecia son auto-compatibles y muestran importantes tasas de autocruzamiento (Wolf y Takebayashi, 2004).

Por otro lado, los individuos masculinos en una especie dioica habrán estado bajo selección por la alta fecundidad del polen durante muchas generaciones, mientras que un nuevo mutante hermafrodita que surge de una femenina probablemente es que tenga baja producción de polen (Wolf y Takebayashi, 2004).

Esto podría satisfacer la condición de la evolución de la androdioecia que se refiere a que los masculinos tienen al menos dos veces más éxito reproductivo masculino que las hermafroditas (Charlesworth, 1993).

Para una revisión sobre las especies que se ha sugerido han evolucionado a partir de esta ruta ver Anexo 3.

En los últimos años, ha tomado fuerza la hipótesis que implica una variante a esta ruta y se refiere a la EVOLUCIÓN DE LA ANDRODIOECIA A PARTIR DE UN INTERMEDIARIO HERMAFRODITA POR DINÁMICA POBLACIONAL.

Se han utilizado los patrones de diversidad genética en *Mercurialis annua* para proporcionar pruebas empíricas de la asociación entre la historia de la colonización y el sistema sexual en plantas.

Así, la importancia de la selección para el aseguramiento de la reproducción durante el establecimiento de la colonia, junto con la presión de competencia con compañeros locales, provee una explicación plausible para la evolución del hermafroditismo en especies androdioicas, es decir, las oportunidades de apareamiento dependen estrechamente de la densidad poblacional, (Obbard *et al.*, 2006).

Pannell (2000) ha sugerido que la evolución de la androdioecia en *Datisca*, *Mercurialis* y *Eulimnadia* a partir de dioecia puede tener un intermediario hermafrodita debido a la dinámica metapoblacional. Esto es que en una especie dioica con frecuente extinción y establecimiento de nuevas subpoblaciones, las femeninas con poca producción de polen (hermafroditas) podrían establecer nuevas poblaciones al realizar autofecundación. Así, debido a que la fecundidad de los granos de polen masculinos sería mayor que el de las hermafroditas, los masculinos podrían subsecuentemente establecerse en esa población hermafrodita.

En el caso extremo de que una población es fundada por un solo hermafrodita autocompatible, toda la progenie debe ser el resultado de autofecundación en caso de ocurrir reproducción. Si esta colonización es frecuente, se seleccionará la asignación de sexo femenino sesgada en hermafroditas a nivel metapoblación como consecuencia de episodios de la competencia local de compañeros.

Sin embargo, si el crecimiento del tamaño de la población y la densidad después de la colonización da lugar a un aumento de las oportunidades de exogamia, entonces la asignación de sexo femenino sesgada de la población fundadora ya no será evolutivamente estable, y la población estará abierta a la invasión de los individuos masculinos.

Esta invasión se hace posible porque los masculinos logran una ventaja mayor que la fertilidad sobre hermafroditas porque estos últimos invierten sólo ligeramente en función masculina (Pannell, 2001).

Sin embargo esta explicación no aborda los factores que permitirían que las femeninas se conviertan en incompatibles comunes en la población de origen para fundar nuevas poblaciones.

Para ello Wolf y Takebayashi (2004) proponen un modelo que muestra que la limitación de polen permitirá a las hermafroditas invadir vía selección positiva incluso si las hermafroditas tienen una reducción en la producción de óvulos debido a la reasignación de recursos necesaria para la producción de polen.

Ya que las condiciones para que los masculinos invadan una población hermafrodita son generalmente los mismos que se necesitan para el mantenimiento de los

masculinos después de la invasión hermafrodita a una población dioica, los requerimientos dentro de la población para que la androdioecia evolucione directamente de una población dioica o por medio de un intermediario hermafrodita son idénticos.

Lo más probable es que sólo se necesita un cambio de regulación de menor importancia en las hembras para activar (o no suprimir) una vía de desarrollo de espermatozoides o polen que normalmente sólo se activan en los machos; así es como surgió en los hermafroditas de *C. elegans*. Del mismo modo, las mutaciones de las hermafroditas se sabe que surgen espontáneamente en las especies de plantas dioicas a través de la pérdida de genes que suprimen el desarrollo femenino en los masculinos (Westergaard, 1946, 1958; Lardon *et al.*, 1999). Por lo tanto, la mutación de femenino a hermafrodita puede ser bastante común y no debería ser un obstáculo importante para el origen de androdioecia. Un punto importante en este modelo metapoblacional de la androdioecia es que existe una amplia variación de las proporciones de sexos en la población debido a la frecuente extinción y al constante establecimiento de nuevas subpoblaciones (Panell, 1997, 2001).

EVALUACIÓN DE LA ADECUACIÓN EN ANGIOSPERMAS

La adecuación se puede definir como el éxito de una entidad en la reproducción, por lo que se trata de la contribución promedio de un alelo o genotipo a la siguiente generación. El éxito reproductivo incluye no sólo el número de descendientes producidos, sino también la supervivencia de los mismos, ya que esto es un requisito previo para la reproducción (Futuyma, 2009).

Debido a la complejidad de estimar directamente la adecuación de los organismos, se ha hecho de manera indirecta utilizando características que pueden afectar la adecuación. Se ha establecido que ciertos caracteres morfológicos, fisiológicos, conductuales y demográficos que están relacionados con la variación genética, de tal suerte que algunas de estas características que afectan directa o indirectamente la sobrevivencia de los organismos se les llama “componentes de adecuación”. Los componentes de la adecuación en organismos que se reproducen sexualmente pueden dividirse en dos grandes rubros: de selección cigótica que incluye la viabilidad (probabilidad de supervivencia del genotipo a través de cada una de las edades en las que la reproducción pueda ocurrir, el éxito de apareamiento que se refiere al número de parejas que tienen un individuo, lo cual afectará la descendencia del individuo en el caso de los masculinos, pero en menor medida a las femeninas debido a que sus óvulos sólo pueden ser fecundados una vez) y a la fecundidad (que es el número de descendientes viables por individuo femenino); y de selección gamética que implica la ventaja de segregación, viabilidad de los gametos y el éxito de fecundación (Futuyma, 2009).

La variación en el éxito reproductivo de los donantes de polen puede ser una fuerza de selección en las plantas y de hecho es necesario saber de qué manera está contribuyendo un individuo con polen, ya que esto se relaciona directamente con el éxito reproductivo a partir de la función masculina. Aun así su importancia en las poblaciones naturales sigue siendo controvertido, ya que otros factores pueden intervenir en la adecuación, como el atractivo de la planta hacia los polinizadores,

la capacidad competitiva del polen, por ejemplo el crecimiento de los tubos polínicos, la longevidad y la germinación del polen (Burkhardt *et al.*, 2009).

Viabilidad de granos de polen

Se ha definido como la “capacidad de vivir, crecer, germinar y desarrollarse” (Lincoln *et al.*, 1982). Pero no es del todo cierto, debido a que aunque un grano de polen sea viable, se necesitan condiciones específicas para que sea germinado.

La elección del método para determinar la viabilidad de los granos de polen, se debe basar en la especie y lo que se desee observar (Hanna y Towill, 1995). Así, los métodos se basan en evaluar la actividad enzimática, la presencia de citoplasma, plasmalema, etc. Pero ninguno de ellos confirma que un grano de polen sea inviable, sólo es un estimado (Heslop-Harrison, 1992).

La viabilidad del polen puede ser medida en una amplia variedad de estudios que pueden estar relacionados con la genética y la interacción polen-estigma, programas de mejoramiento de cultivos, mantenimiento de banco de genes, la evaluación de la germinación del polen después de exponerse a ciertas condiciones, entre otros aspectos. Pero también suele ser una medida indirecta de la adecuación masculina (Dafni y Firmage, 2000).

Germinación de granos de polen

La germinación del grano de polen es el paso intermedio entre la hidratación del mismo y la elongación del tubo polínico, la cual se ve favorecida por las interacciones célula-célula entre el polen y el estigma y que comienza con la secreción de enzimas digestivas del propio tubo polínico y finaliza con la salida del

tubo polínico por una de las aberturas (Cruz-García y Cruz González-Zamora, 2013).

La germinación de granos de polen representa otra manera indirecta de medir la adecuación.

Puede ser medida *in vivo*, o *in vitro*. La germinación *in vitro* implica que se tendrán controladas las condiciones de temperatura, medio, etc. (Heslop-Harrison, 1979).

Suele ser un método bastante utilizado debido a la rapidez en que se obtienen resultados, a la sencillez y a que es totalmente cuantitativo (Shivanna y Johri, 1985).

Presenta algunas desventajas como que depende enormemente de la especie en cuestión, de la composición del medio, la temperatura y la duración de la prueba (Stanley y Linkens, 1974).

Además los resultados pueden verse afectados por el tiempo de la colección del polen, y la densidad de polen en medio de cultivo (La Porta y Roselli, 1991).

GRANO DE POLEN EN ANGIOSPERMAS

El polen es un grano producido por las plantas terrestres que se encuentra en los sacos polínicos de las anteras de las flores y contiene las células masculinas que darán origen a una nueva planta.

En plantas dicotiledóneas la meiosis es simultánea, es decir que la citocinesis se produce una vez que las dos divisiones nucleares se completan, se forma un sincicio con los cuatro núcleos derivados de la meiosis y la citocinesis aísla simultáneamente los cuatro productos (Ressayre *et al.*, 1998).

Un grano de polen está constituido por tres capas concéntricas: célula viva, intina y exina. La célula viva contiene al núcleo y los gametos masculinos, es la parte que germina, al efectuar la fecundación de la parte femenina de la flor. La intina tiene espesor regularmente homogéneo, está compuesta por celulosa y otros elementos incluyendo proteínas (Pearsall, 2000).

La exina es la capa externa, es más gruesa, está compuesta principalmente por esporopolenina, una de las sustancias orgánicas naturales más resistente dentro del reino vegetal ya que soporta la acción de los ácidos y las bases concentradas, así como el calentamiento hasta los 300 grados centígrados, solo degradable por ciertos oxidantes muy fuertes y por microorganismos (Sáenz, 1978).

La exina muestra un mayor grado de diferenciación estructural en las angiospermas, se pueden distinguir 2 partes: la endexina, es la capa interna, homogénea, y la ectexina es la capa externa, es la porción esculturada, consta de bastones o báculas que pueden unirse entre sí por los extremos formando el tectum (Fahn, 1982).

La ectexina es fácilmente estudiada al microscopio, por observación de la superficie y enfocando los componentes internos presentan características usadas para distinguir el polen de los diferentes tipos de taxones.

En la exina hay aperturas a través de las cuales germina el tubo polínico, las aperturas generalmente se dividen en dos tipos: poros y colpos. La localización de los poros en el grano de polen y el número de aperturas presentes son usualmente característicos del tipo de polen. El número de aperturas varía desde ninguno hasta cuarenta y es un buen carácter taxonómico, así muchos granos de polen de

dicotiledóneas tienen tres aperturas equidistantes; muchas monocotiledóneas, incluidas las hierbas, se caracterizan por la presencia de una sola apertura en la parte distal del eje polar (Pearsall, 2000).

Aspectos morfológicos del polen

Los estudios del polen son importantes en distintos rubros ya que su identificación ha sido usada en reconstrucción de vegetación y clima del pasado, taxonomía y evolución, reproducción de plantas, ecología, por mencionar algunos ejemplos (Dafni *et al.*, 2000).

Entre los caracteres fundamentales que se consideran en la pared de los granos de polen para describirlos están el tipo de abertura, cuya posición depende de la polaridad y simetría del grano (Erdtman, 1952; Martínez-Hernández *et al.*, 1993), la forma (Erdtman, 1943), el tamaño, la asociación (Martínez-Hernández *et al.*, 1993) y, por último, la estructura y escultura de la exina (Gamerro y Fortunato, 2001; Montenegro *et al.*, 2009).

El desarrollo del Microscopio electrónico de barrido (MEB) ha revolucionado el estudio de los rasgos de la superficie de los granos de polen al proporcionar una profundidad de foco imposible de lograr con el microscopio óptico. La disponibilidad de innumerables muestras de polen a partir de los ejemplares de herbario y las técnicas de preparación relativamente rápidas, permiten la revisión palinológica de varios taxa en un período de tiempo relativamente corto. Los caracteres taxonómicos que proporcionan los granos de polen incluyen la estructura de la pared del polen, polaridad, simetría, entre otros (Benítez *et al.*, 2006).

Heteromorfismo polínico

El heteromorfismo polínico se define como la producción por una sola planta de diferentes tipos de polen fértiles, cada uno de los cuales debe estar presente en todas las anteras, y por lo tanto en todas las flores, a lo largo del ciclo de vida (o al menos la mayoría de él; Ressayre *et al.*, 1998).

Muchos caracteres del polen pueden ser heteromórficos (tamaño, forma, estructura del polen, número de aberturas, etc.). El número de aberturas resulta ser interesante de estudiar debido a que es una característica discreta (ya que puede tener 1, 2, 3 o más aberturas), porque en la evolución, ha incrementado el número de aberturas en aberturas desde el Mesozoico y porque implica una posible relación con la adecuación del polen. La condición ancestral en plantas con semillas es tener granos de polen con una abertura.

Aunque no ha sido entendido del todo, se piensa que la ontogenia del grano de polen podría estar involucrada en el patrón de aberturas que se presenten. Una explicación para el heteromorfismo polínico puede ser es el mencionado por Ressayre *et al.* (1998) quienes sugieren que es probable que el número de aberturas esté vinculado con la división que sigue a la meiosis y que conduce a la formación de una tétrada de cuatro microsporas haploides. En la ontogenia de los granos de polen, se generan señales espaciales que son las responsables de la morfología del polen, como consecuencia de la meiosis y reflejan la distribución del núcleo, sin embargo falta realizar más investigaciones para entender cómo son expresadas y moduladas estas señales.

DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

Prockia krusei es una especie en forma de árboles o arbustos de hasta 4 m de alto, presenta tres tipos de inflorescencias: cimosas (un dicasio terminal y una flor lateral; la antesis inicia en la flor terminal y la lateral basal); terminales y axilares (aparecen como axilares cuando el fruto ha madurado, y una vez que el apical se ha renovado; Jiménez-Ramírez y Cruz-Durán, 2005; Figura 2).

Cada inflorescencia presenta de 3 a 5 flores, aunque se puede encontrar sólo una o hasta 5 de ellas. Las flores varían entre amarillas-verdes-rojas, son apétalas, con pedicelos ligeramente pubescentes con una bráctea basal de 3 mm de largo. El cáliz muestra de 3 a 4 sépalos fuertemente alados en el botón. El fruto es una baya globosa de 9 x 9 mm, con el cáliz persistente. Las semillas son ovoides (Jiménez-Ramírez y Cruz-Durán, 2005).

Se localiza en bosque tropical caducifolio, en altitudes de 1400-1420 m asociada a *Casearia corymbosa*, *Nopalea* sp., *Opuntia* sp., *Agave* sp., *Ipomoea* sp., *Bursera bipinnata*, *Bursera glabrifolia*, *Eysenhardtia* sp. y a miembros de la familia Tiliaceae, en rocas calizas. Florece de julio a agosto y fructifica en septiembre (Jiménez-Ramírez y Cruz-Durán, 2005).

Vázquez-Barrón (2013) encontró que sólo el pistilo largo (hermafrodita) es viable, con presencia de óvulos y saco embrionario tipo *Polygonum* compuesto por el aparato ovocelular, dos núcleos polares y tres células antípodas bien formadas. Presenta un estigma con papilas grandes y turgentes, estilo sólido con tejido de transmisión y óvulos campilótrofos. En cambio, el morfo con el pistilo corto

(masculino) presenta células colapsadas en el estigma poco desarrollado, con papilas colapsadas, el estilo sin tejido de transmisión diferenciado y óvulos arrestados cuando los tegumentos se están formando en una etapa temprana del desarrollo, con lo cual concluyó que es un pistilo no funcional.

Por otro lado, Mayorga- Lizaola (2013) encontró que el desarrollo del androceo y de los granos de polen no tuvo anomalías en ninguno de los dos morfos y con altos porcentajes de viabilidad para ambos. También realizó una descripción de la morfología de los granos de polen encontrando heteromorfismo polínico.

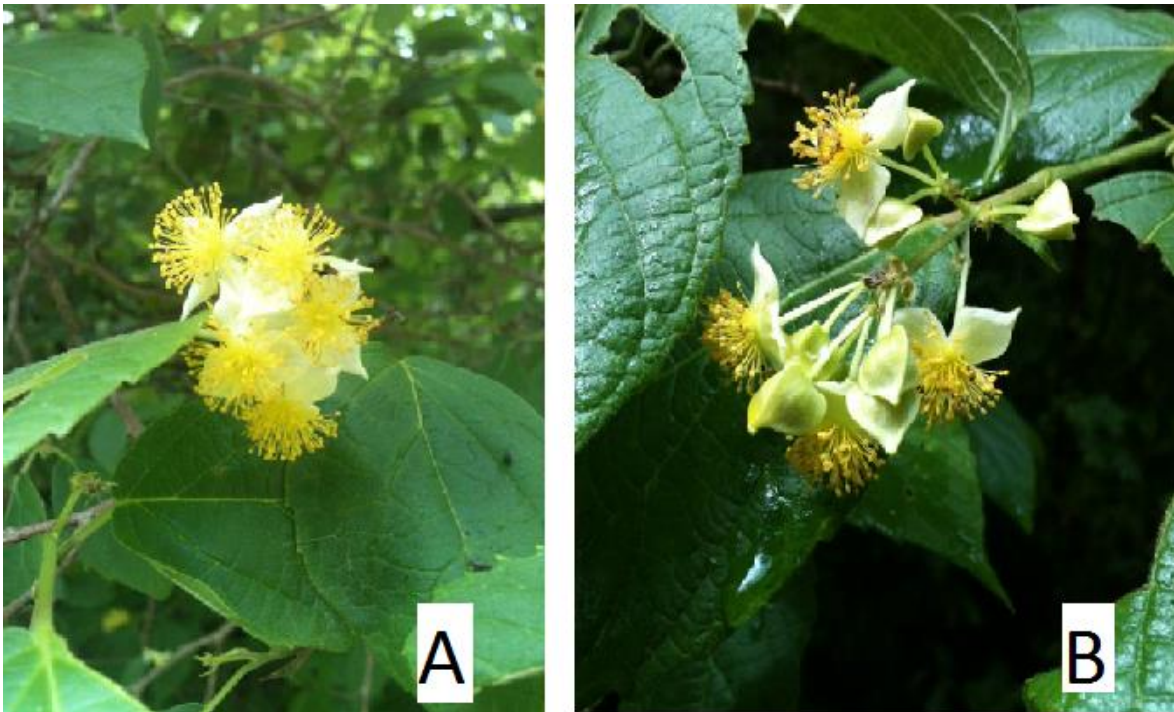


Figura 2. Fotografías de inflorescencias de *Prockia krusei*. A) Flores del morfo masculino. B) Flores del morfo hermafrodita.

JUSTIFICACIÓN

Este trabajo constituye una aportación a la comprensión de la evolución y mantenimiento del androdioicismo, sistema sexual muy escasamente representado en la naturaleza.

OBJETIVO GENERAL

Comparar los componentes de adecuación masculina o atributos de los granos de polen de las flores masculinas y hermafroditas en *Prockia krusei*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el número de estambres presentes en cada morfo.
- Establecer si existen diferencias en el tamaño y número de granos de polen entre los morfos masculino y hermafrodita.
- Establecer la morfología de los granos de polen morfos polínicos que se encuentran en las anteras de las flores masculinas y hermafroditas.
- Determinar el porcentaje de viabilidad de los granos de polen del morfo masculino, y del morfo hermafrodita.
- Cuantificar el porcentaje de germinación de los granos de polen de cada morfo.
- Realizar una descripción palinológica del polen de cada morfo.
- Determinar cualitativamente la cantidad de reservas en los granos de polen de cada morfo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las flores de *Prockia krusei* se obtuvieron a partir de varias visitas durante los años 2010 y 2012 entre los meses de julio-agosto en la comunidad de Tixtla en el estado de Guerrero (coordenadas N 17° 32' 05", W 99° 22' 27") a una altitud de 1370 msnm.

Para su análisis, fueron considerados dos morfos, el primero de ellos (masculino) muestra al gineceo más pequeño con relación al androceo; el segundo (hermafrodita) presenta un gineceo de mayor tamaño que el androceo.

Asimismo, se colectaron al azar, flores de 12 individuos masculinos y de 16 hermafroditas en distintas etapas de desarrollo. Éstas fueron fijadas en campo con FAA (Formaldehído 10%, Alcohol etílico 50%, Ácido acético 5%, agua 35 %).

En el caso de las pruebas de viabilidad y germinación de los granos de polen, se utilizó material fresco.

El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prisma. Se realizaron las pruebas de normalidad de D'Agostino & Pearson y de Shapiro-Wilk, de presentar normalidad, se efectuó una prueba de *t* de student, de lo contrario se realizó una prueba de Mann-Whitney.

Conteo del número de estambres

Se contó el número de estambres en 30 flores del morfo masculino y 35 del morfo hermafrodita de flores en anthesis tomadas al azar, poniendo éstas en una caja Petri con una gota de agua para evitar la deshidratación y usando un microscopio estereoscópico.

Conteo del número de granos de polen

Se seleccionaron 15 anteras indehiscentes de una flor en antesis del morfo masculino con ayuda de un microscopio estereoscópico, las cuales fueron introducidas en un tubo eppendorff con 0.5 ml de agua destilada y un grano de jabón en polvo que fue disuelto. Una vez dentro del tubo, las anteras fueron trituradas con ayuda de una aguja de disección hasta que todo el tejido quedó completamente disgregado, lo cual se corroboraba en el microscopio estereoscópico.

Posteriormente, con una pipeta Pasteur, se colocó una pequeña gota del contenido del tubo eppendorff en una cámara Neubauer o Hematocitómetro, la cual contaba con 2 zonas de conteo, una superior y otra inferior al eje longitudinal de la cámara. Una vez puesta la gota se colocó un cubreobjetos.

La retícula completa mide 3 mm x 3 mm de lado x 0.1 mm de profundidad. Subdividida a su vez en 9 cuadrados de 1mm de lado cada uno.

El cuadrado central se divide en 25 cuadrados medianos de 0,2 mm de lado, y cada uno de estos cuadros se subdivide a su vez en 16 cuadrados pequeños, y fue en estos 16 cuadros que se hizo el conteo. El volumen del cuadrado central es de 0.1 mm³ ó 0.0001 ml (Figura 3).

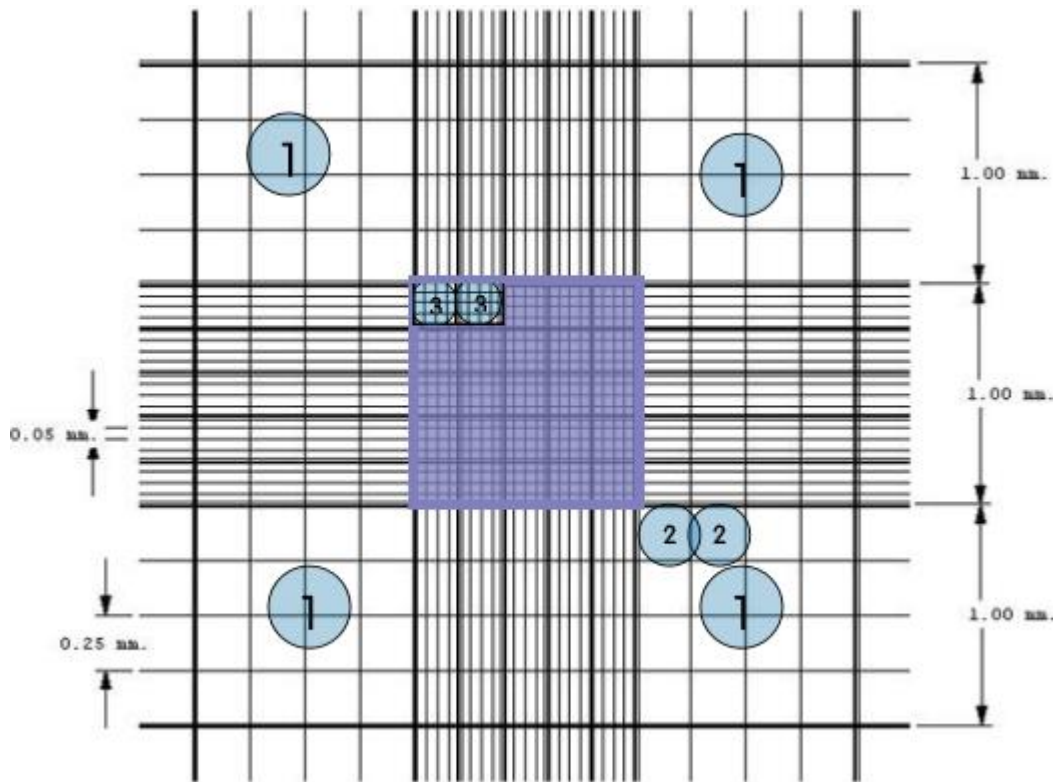


Figura 3. Representación de retícula completa de una cámara Neubauer. El número 1 señala los cuadros de 1 mm x 1 mm. El número 2 marca los cuadros de 0.2 mm de lado. El número 3 señala dos de los 16 cuadros pequeños centrales. La sección de color morado muestra la zona en donde se contaron los granos de polen. Modificada de Celeromics: página en red, 2013.

Se realizaron 3 repeticiones con anteras de flores distintas tomadas al azar, y de cada una de ellas se sacaron 10 muestras hasta tener un total de 30 muestras del morfo masculino.

Para el morfo hermafrodita, se ejecutó el mismo procedimiento.

Por regla de 3 se obtuvo el número de granos de polen por flor y por antera de cada morfo.

Tamaño de granos de polen

Para saber las dimensiones de los granos de polen, fue necesario realizar una acetólisis para eliminar el contenido celular del polen.

Para ello se disectaron anteras de 5 flores en antesis ya secas, se maceraron en seco las anteras en un tubo de vidrio, se agregó la mezcla acetólica [anhídrido acético-ácido sulfúrico. (9:1)], dos veces la cantidad de macerado, se mantuvo el tubo a baño maría alrededor de 65-70°C 12 minutos (la reacción se paró con ácido acético), se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, se decantó y añadió ácido acético, se volvió a centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos, se decantó, se añadió agua y centrifugó de nuevo a 5000 rpm por 5 minutos en dos ocasiones, se tamizó el contenido y se colocó el tamizado en un tubo limpio y etiquetado, se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos para obtener un concentrado, se colocó el concentrado en un portaobjetos y se montó en gelatina.

Posteriormente, mediante el uso del microscópico óptico a un objetivo 100x y el programa Image-Pro Plus 7.0, se les midió a 27 granos de polen del morfo masculino, el diámetro del eje ecuatorial, el diámetro del eje polar y el espesor de la exina. En el morfo hermafrodita se midió únicamente el diámetro y el espesor de la exina de los granos de polen periaperturados.

Adicionalmente, se contó el porcentaje de granos de polen hermafrodita tricolpado y el de polen pericolpado con el uso de la cámara Neubauer, realizando el mismo procedimiento que en el conteo de granos de polen.

Por otro lado, usando el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) se tomaron fotografías para observar el morfo polínico de cada uno de los morfos florales. Para ello se tomaron 15 anteras de tres flores elegidas al azar en pre-antesis, se deshidrataron hasta alcohol absoluto, se disecaron y se cubrieron de oro.

De esta forma, junto con los granos de polen acetolizados, se hizo una descripción morfológica de los caracteres del grano de polen.

Viabilidad de granos de polen

Prueba de Alexander

Para la prueba de viabilidad polínica se realizaron tinciones con el reactivo de Alexander (Anexo 1; Alexander, 1980).

Se recogieron al azar flores pre-antesis de cuatro individuos de cada morfo los cuales se colocaron en 2 frascos con toallas absorbentes húmedas separadas, un morfo por cada frasco.

Inmediatamente después, se tomó un botón floral próximo a la antesis y se seleccionaron 15 anteras, las cuales se montaron en un portaobjetos y fueron trituradas con una aguja de disección. Se colocó una gota del reactivo de Alexander y se mezcló con el polen. Posteriormente se pasó la flama a la preparación en 5 ocasiones de forma rápida.

Para calcular el porcentaje de granos de polen viables, se contaron 10 campos microscópicos a 40 X y se calculó el promedio (López-Curto *et al.*, 2005). El polen no viable toma coloración verde, mientras que el polen viable toma una coloración

fucsia. Esto se hizo dos veces para el morfo masculino en la primera visita, y dos en la segunda. Para así tener un total de 40 campos microscópicos.

En el caso del morfo hermafrodita, se realizaron 3 repeticiones en la primera visita y 2 en la segunda para dar un total de 50 campos microscópicos.

Se obtuvo la probabilidad de que un grano de polen fuera viable teniendo en cuenta el número de granos de polen viables y el número total de granos que se observaron en cada campo microscópico.

Finalmente se hicieron reglas de tres para saber el número de granos de polen viables por flor.

Germinación de grano de polen

Se colectaron al azar flores de cuatro individuos de cada morfo los cuales se colocaron en 2 frascos con toallas absorbentes húmedas separadas por morfos.

Se prepararon 4 medios de germinación que variaban entre los elementos que contenían (agua, sacarosa, agar, ácido bórico, nitrato de calcio, sulfato de magnesio, nitrato de potasio) y la cantidad de los mismos.

El primer medio es el utilizado por Mazer (1987) que para fines prácticos será nombrado como "1", posteriormente el descrito por Brewbaker y Kwack (1963) ya que ha resultado ser un método efectivo para la germinación en una gran cantidad de especies (Miranda-Villalón, 2002) que será nombrado como "2", el siguiente fue un medio al que se nombró "3", era un medio bastante simple. Por último el medio

utilizado por Marini *et al.* (2010) para germinar granos de polen de *Cucurbita máxima*, el cuál será nombrado como 4 (Cuadro 1).

Cuadro 1. Muestra los componentes de los cuatro tratamientos realizados para la germinación de granos de polen.

Medio de germinación	Agua	Agar	Sacarosa	Ácido bórico	Nitrato de Calcio	Sulfato de Magnesio	Nitrato de potasio
1	84 ml	0.7 g	21 g	0.02 g	0.03 g	0.02 g	-
2	100 ml	2 g	0.1 g	0.01 g	0.03 g	0.02 g	0.01 g
3	100 ml	2 g	0.010 g	-	-	-	-
4	100 ml	-	10 g	0.003 g	0.0432	-	-

A 32 portaobjetos se les puso dos capas de masking tape y se cortaron con una navaja marcos de 2 mm aproximadamente, para formar una cavidad en la cual se vertió el medio de cultivo.

Cada medio se vertió en 8 de los portaobjetos con marcos de masking y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Una vez solidificado el medio, se tomó una flor de uno de los morfos en preantesis y se seleccionaron 15 anteras, las cuales se montaron en un portaobjetos y fueron trituradas con una aguja de disección. El contenido triturado se sembró en la superficie de los medios solidificados. Por cada morfo se hicieron 4 repeticiones por medio, lo que daba un total de 32.

Los portaobjetos fueron puestos en cajas de Petri con pañuelos desechables húmedos. Las cajas se taparon y sellaron con parafilm.

Una vez realizado lo anterior, se contó el número de granos germinados (que fueron los que presentaron un tubo polínico mayor al diámetro del polen) y los no germinados, con la ayuda de un microscopio óptico a 40x, después de 48 horas y 72 horas de haber sido puestos a germinar. Por cada portaobjetos fueron contados 10 campos microscópicos. Lo que da un total de 40 campos microscópicos por morfo en uno de los medios.

Se obtuvo la probabilidad de germinación del polen teniendo en cuenta el número de granos germinados y el número total de granos que se observaron en cada campo microscópico. Los porcentajes de germinación fueron calculados de manera manual.

Por último, por regla de 3 se cuantificó el número de granos de polen germinados por flor en los medios que tuvieron diferencias significativas entre los morfos florales.

Análisis cualitativo de reservas en granos de polen

En el caso de la determinación cualitativa de las reservas presentes en los granos de polen, se realizaron pruebas histoquímicas que permitieron observar la presencia de almidón. Para observar si los granos de polen contenían almidón, se disectaron 15 anteras de flores en anthesis de cada uno de los morfos y con ayuda de una aguja de disección y bajo un microscopio estereoscópico, se disgregaron sobre un portaobjetos para que saliera el polen. Inmediatamente después de agregaron 2 gotas de lugol y se cubrió con un cubreobjetos. Se observaron 10 campos

microscópicos con el objetivo 40x. Se determinó que los granos de polen que adquirirían una coloración marrón-negro, eran los que tenían almidón en el citoplasma. Se repitió 2 veces más para dar un total de 30 campos microscópicos y obtener un porcentaje. Se obtuvo la probabilidad de que un grano de polen diera positivo a la prueba y teniendo en cuenta el número que resultaron positivos y el número total de granos que se observaron en cada campo microscópico.

RESULTADOS

Conteo del número de estambres

El morfo masculino presentó en promedio 112.033 ± 12.43 estambres por flor. En cuanto al morfo hermafrodita, el promedio fue de 66.88 ± 15.53 estambres por flor (Figura 4). Las pruebas estadísticas de D'Agostino & Pearson y de Shapiro-Wilk mostraron que los datos se ajustan a una distribución normal. La prueba de t de student arrojó una diferencia significativa entre ambos morfos florales ($p < 0.0001$).

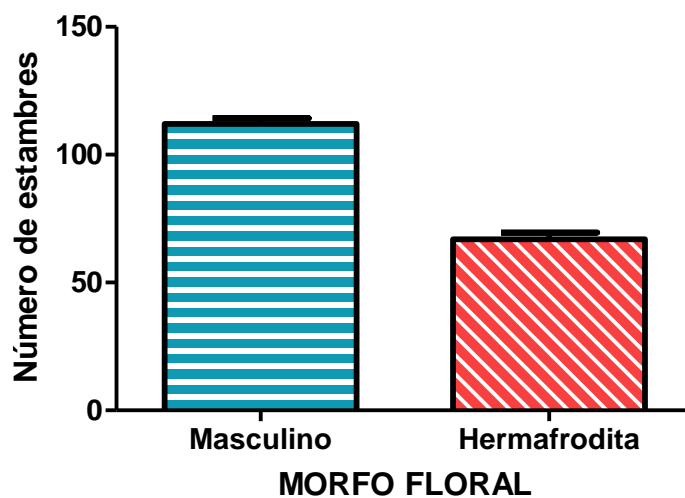


Figura 4. Número de estambres promedio de los morfos masculino y hermafrodita, así como la desviación estándar.

Conteo del número de granos de polen

El promedio para el morfo masculino fue de 29.70 ± 1.717 granos de polen en 0.0001 ml de agua, mientras que el promedio para el morfo hermafrodita es de 6.5 ± 0.5269 granos de polen en 0.0001 ml. Se obtuvieron diferencias significativas entre ambos morfos ($p < 0.0001$; Figura 5).

Para el morfo masculino, el número de granos de polen por antera es de 9,900, el polen en 15 anteras que eran las contenidas en 0.5 ml fue de 148,500; y el número de granos por flor fue de 1,109,097.

En cuanto al morfo hermafrodita, los resultados fueron los siguientes: el número de granos de polen por antera es de 2,166, el polen en 15 anteras fue de 32,500 y el número de granos por flor fue de 144,906.66 (Figuras 6 y 7).

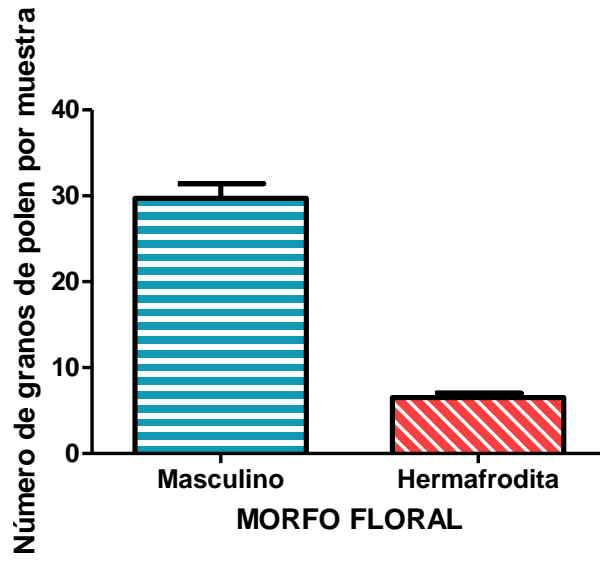


Figura 5. Número de granos de polen por muestra

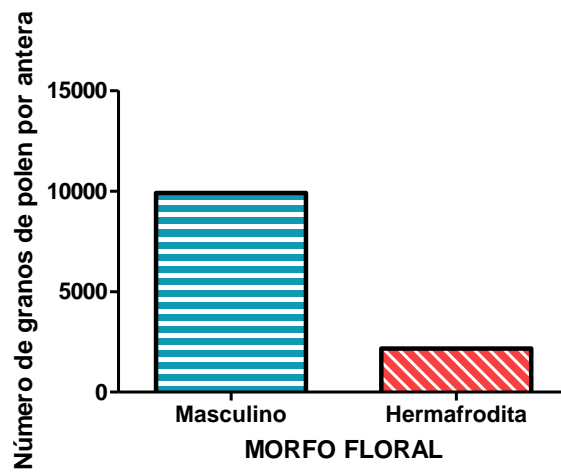


Figura 6. Número de granos de polen por antera de cada morfo floral

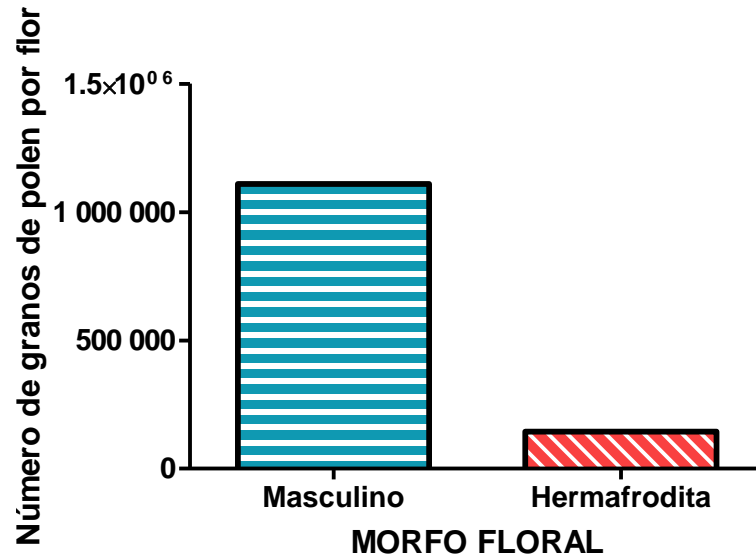


Figura 7. Número de granos de polen por flor de cada morfo floral

Los resultados obtenidos del conteo del número de granos de polen se resumen en el cuadro 2.

Cuadro 2. Muestra los datos obtenidos para el conteo de granos de polen para ambos morfos

	Morfo masculino	Morfo hermafrodita
Promedio de la muestra (0.0001 ml)	29.70 ± 1.717	6.5 ± 0.5269
Granos de polen en 0.5 ml	148,500	32,500
Granos de polen por antera	9,900	2,166
Granos de polen por flor	1,109,097	144,906.66

Morfología de los granos de polen

Mediante acetólisis y con ayuda del MEB se encontraron distintos morfos polínicos.

-POLEN DEL MORFO MASCULINO (FIGURAS 8 Y 9):

Abertura: Tricolpado, tricolporado o tricolporoidado; siendo el tipo tricolporado el más común. Con ornamentación microverrugada.

Exina: Tectada, microrreticulada, heterobrocada, cercano a las aberturas se vuelve psilada. El grosor promedio es de 1.791 μm (1.3 - 3.09 μm).

Asociación, polaridad, simetría y forma: Mónade, isopolar, radiosimétrica. Diámetro ecuatorial: 15.28 μm (11.87 – 18.68 μm). Diámetro polar: 23.71 μm (21.28 – 25.04 μm). Prolato.

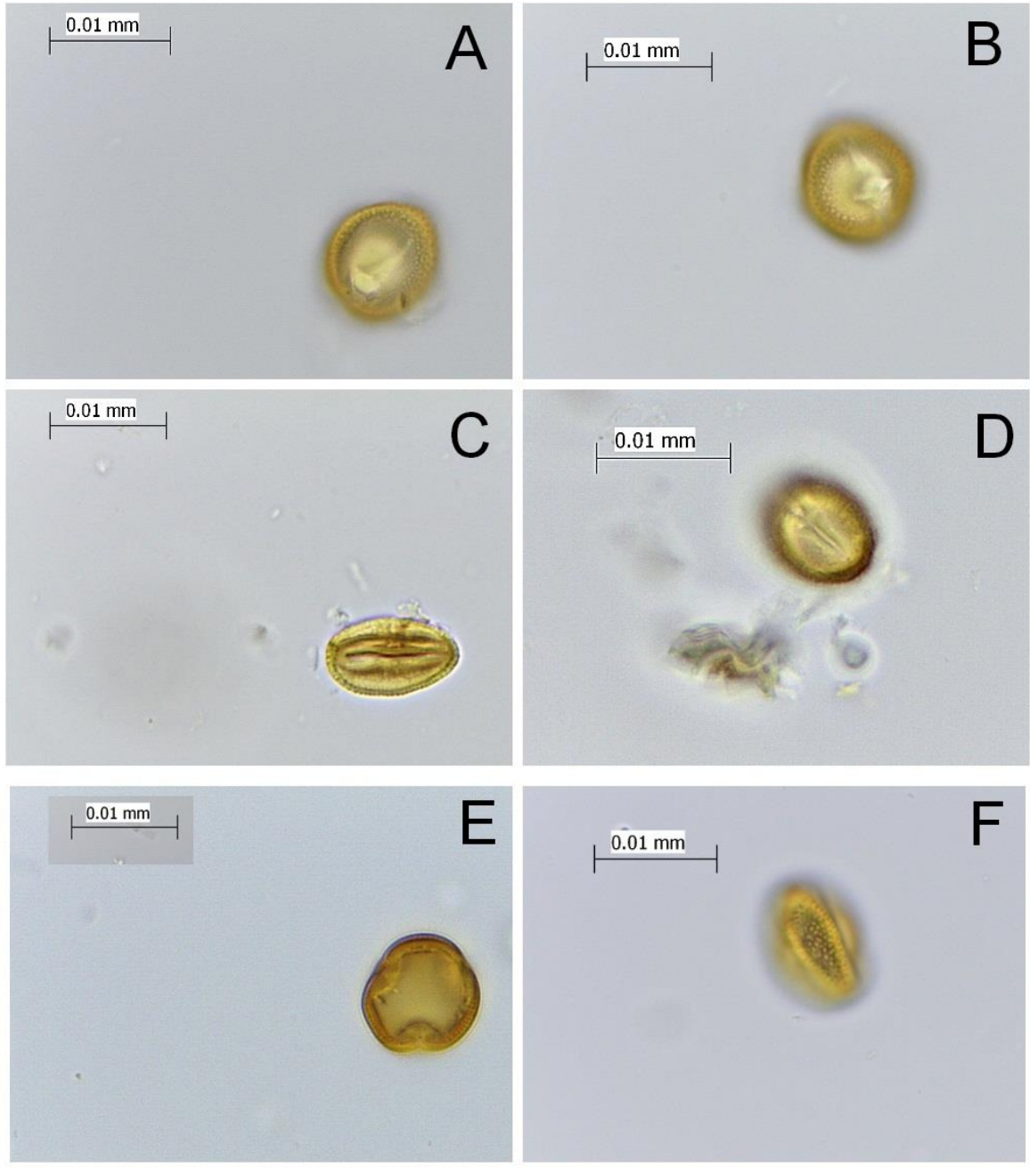


Figura 8. Morfología de los granos de polen acetolizados del morfo masculino. A) Vista ecuatorial del morfo polínico tricolporado. B) Vista ecuatorial del morfo polínico tricolporado. C) Vista ecuatorial del morfo polínico tricolpado. D) Vista ecuatorial del morfo polínico tricolporoidado. E) Vista polar. F) Ornamentación microrreticulada. Objetivo 100x.

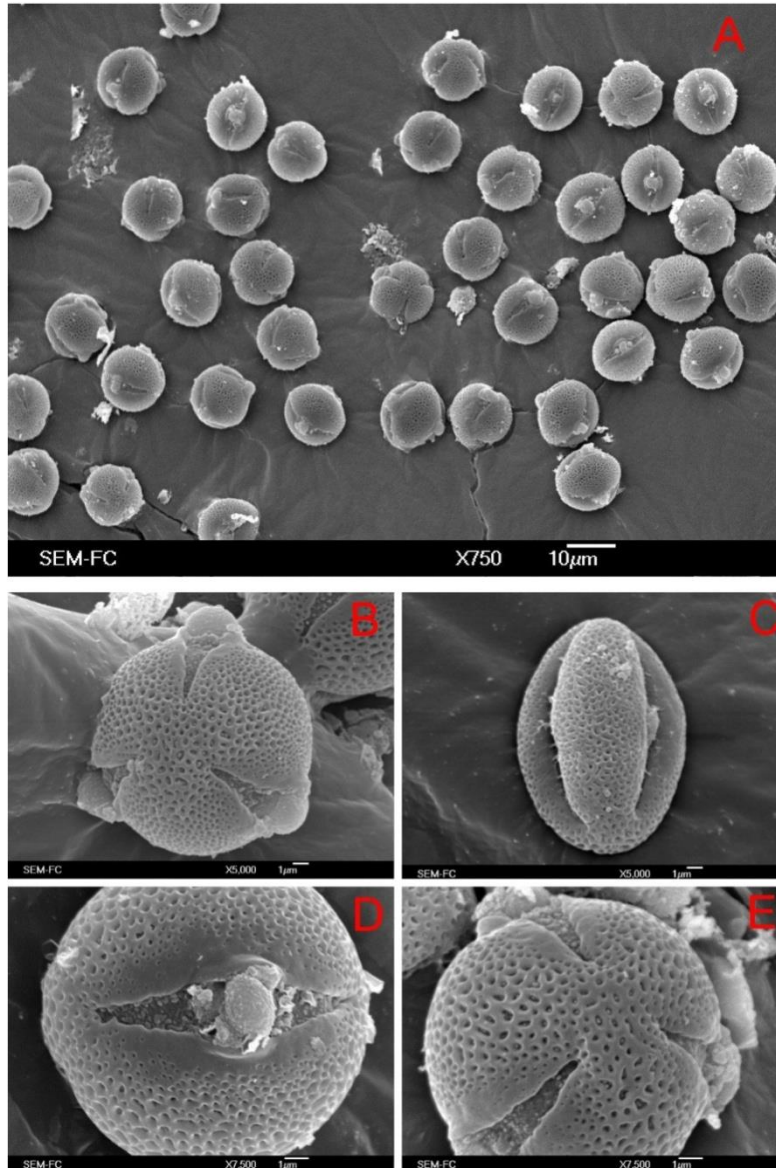


Figura 9. Micromorfología de los granos de polen del morfo masculino. A) Panorámica de los granos de polen. B) Vista polar mostrando las tres aberturas y tapones de pollen kit. C) Vista ecuatorial donde se pueden distinguir 2 colpos así como la ornamentación microrreticulada y heterobrocada. D) Vista ecuatorial de la abertura que presenta ornamentación microverrucada con un tapón de pollen kit hacia el centro de la abertura. Se puede observar que la ornamentación cerca de la abertura, de ser microrreticulada, se vuelve psilada. E) Vista polar en la que se pueden ver las tres aberturas con terminación redondeada.

-POLEN DEL MORFO HERMAFRODITA (FIGURAS 10 Y 11):

Abertura: Tricolporado o pericolpado (~12 aberturas). Ornamentación de la abertura lisa.

Exina: Tectada. Los pericolpados con ornamentación de perforada a psilada. Grosor de la exina es de $3.288 \mu\text{m}$ ($2.11 - 4.620 \mu\text{m}$).

Asociación, polaridad, simetría y forma: Mónade, apolar, radiosimétricos. Diámetro del pericolpado: $32.04 \mu\text{m}$ ($25.99 - 38.6 \mu\text{m}$).

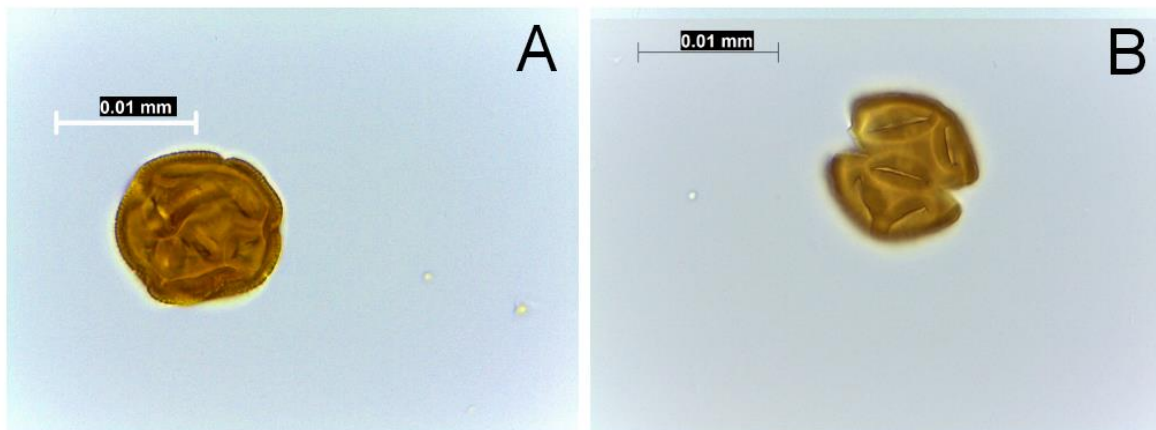


Figura 10. Morfología de los granos de polen acetolizados del morfo hermafrodita. A, B) Granos de polen pericolpados.

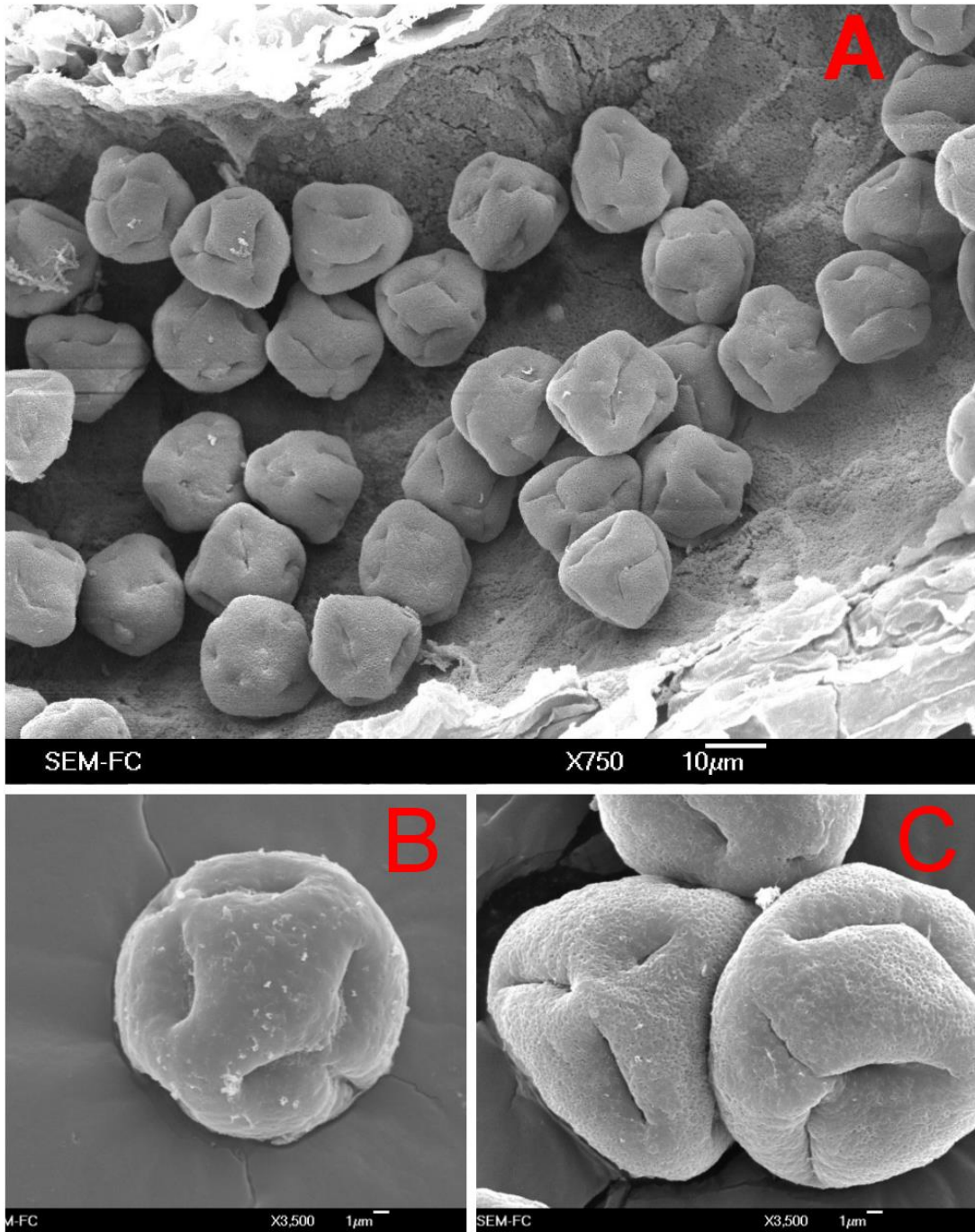


Figura 11. Micromorfología de los granos de polen del morfo hermafrodita. A) Panorámica de los granos de polen en la antera. B) Grano de polen pericollado, 7 aberturas a la vista. C) Granos de polen pericollados con ornamentación psilada.

El porcentaje de granos de polen pericarpados en el morfo hermafrodita fue de 97.3%, mientras que los tricolporados representan el 2.7%.

Tamaño de los granos de polen

En los granos de polen del morfo masculino en vista ecuatorial, el promedio de longitud del eje polar fue de $20.22 \pm 1.874 \mu\text{m}$, para el eje ecuatorial fue de $15.28 \pm 1.622 \mu\text{m}$, y la exina tiene un espesor de $1.791 \pm 0.374 \mu\text{m}$.

El morfo periaperturado del grano de polen de las flores hermafroditas presentó un diámetro de $32.04 \pm 3.616 \mu\text{m}$, y la exina tiene un espesor de $3.28 \pm 0.54 \mu\text{m}$.

Las pruebas estadísticas de D'Agostino & Pearson y de Shapiro-Wilk mostraron que el diámetro polar de los granos de polen del morfo masculino y el diámetro del morfo periaperturado de las flores hermafroditas presentan una distribución normal.

La prueba de t de student, arrojó que éstos caracteres tienen diferencias significativas ($p < 0.0001$). Siendo el morfo hermafrodita periaperturado de las flores hermafroditas el más grande (Figura 12).

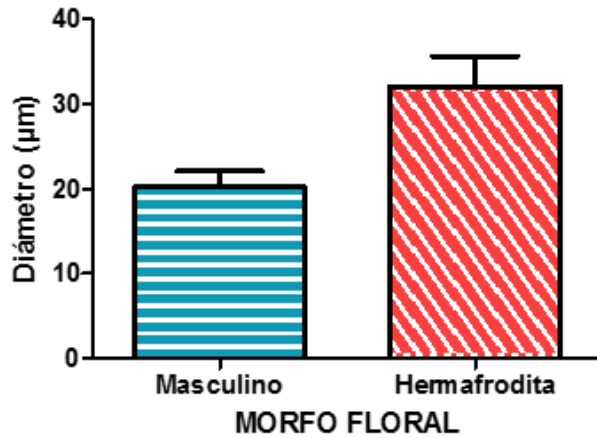


Figura 12. Diámetro polar de los granos de polen presentes en el morfo masculino en el morfo hermafrodita.

Los resultados sobre el espesor de la exina resultaron con una distribución no normal, según las pruebas de D'Agostino & Pearson y de Shapiro-Wilk. La prueba de Mann-Whitney muestra que existe diferencia significativa entre el espesor de la exina ($p < 0.0001$), siendo de mayor tamaño la del morfo hermafrodita (Figura 13).

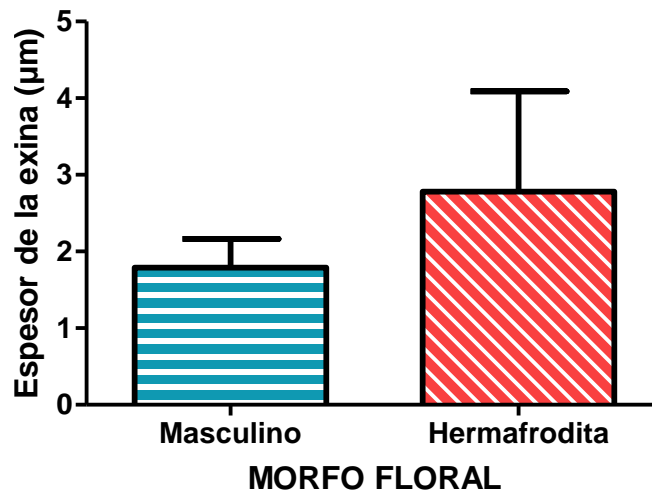


Figura 13. Promedio de espesor de la exina en cada uno de los morfos florales.

Viabilidad de granos de polen

El porcentaje de granos de polen viables para el morfo hermafrodita fue de 64.93%, mientras que el morfo masculino presenta un 89.17% (Cuadro 3).

Cuadro 3. Granos de polen viables, el total de observados y el porcentaje de viabilidad en cada morfo floral.

	Masculino	Hermafrodita
Granos de polen viables	239	100
Granos de polen observados	268	154
Porcentaje de viabilidad	89.17%	64.93%

El promedio de probabilidad de viabilidad masculina es de 0.89 ± 0.22 , mientras que el promedio de probabilidad de viabilidad hermafrodita es de 0.8 ± 0.38 . La prueba de Mann-Whitney no arrojó diferencias significativas ($p=0.91$) (Figura 14).

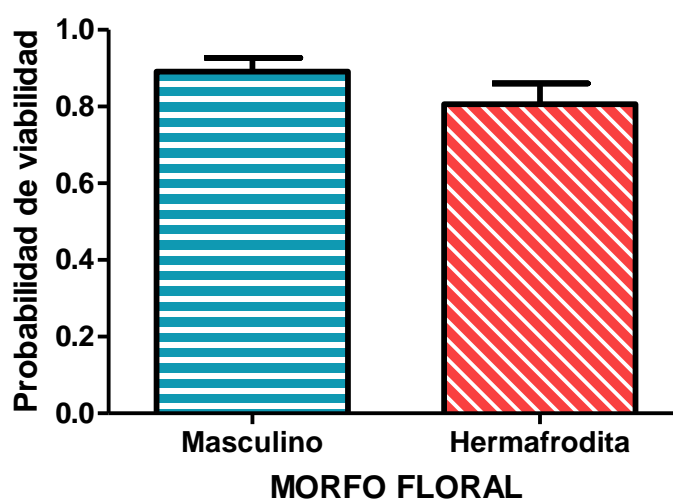


Figura 14. Promedio probabilidad de viabilidad de granos de polen viables por morfo floral.

Al realizar las pruebas D'Agostino & Pearson y la de Shapiro-Wilk, se demostró que los datos obtenidos no presentaban una distribución normal, por lo cual se procedió a realizar la prueba de Mann-Whitney la cual mostró diferencia significativa entre los dos morfos ($p < 0.0001$).

El número de granos de polen viables por flor masculina fue de 45.74 y de la flor hermafrodita fue de 8.9 (Figura 15).

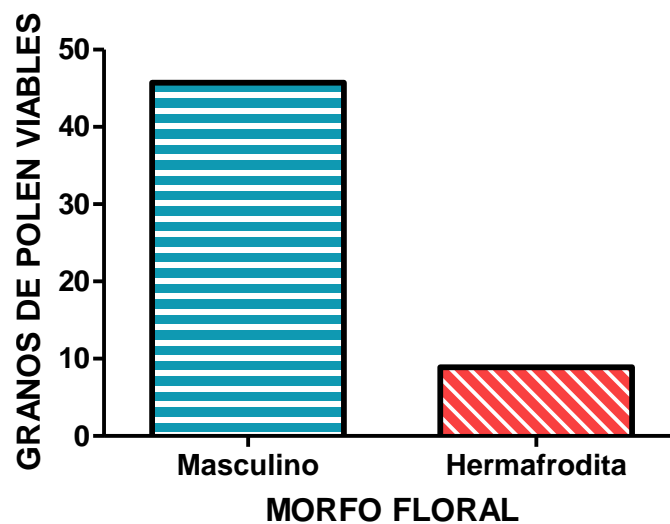


Figura 15. Número de granos de viables por flor en cada morfo floral (Masculino: 45.74; Hermafrodita: 8.9).

Germinación de granos de polen

El medio 1 tuvo un porcentaje de germinación a las 36 horas de 19% para el masculino y de 8.3% para el hermafrodita. En cambio, a las 72 horas, el masculino presentó 7.3% y el hermafrodita 8.6%.

En el medio 2 a las 48 horas, los granos de polen del morfo masculino tuvieron un 6.9% de germinación, los hermafroditas de 2.2%. Después de 48 horas, se obtuvo un porcentaje de germinación de 10.1% para los masculinos y de 3.7% para los hermafroditas.

En el caso del medio 3 a las 48 horas, el morfo masculino obtuvo 0.5% de germinación, mientras que el hermafrodita tuvo 3.6%. A las 72 horas los porcentajes de germinación de 4% para el masculino y de 1% para los hermafroditas.

Por último, el medio 4 a las 48 horas se presentó un 8.2% de germinación para los masculinos y 6.3% para las hermafroditas. En contraste, a las 72 horas se obtuvo un 9% en los masculinos y 8.08% para los hermafroditas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Número de granos de polen germinados y observados, así como el porcentaje de germinación en los dos tiempos evaluados para cada uno de los cuatro medios de cultivo, el morfo floral M se refiere al masculino, y H al hermafrodita.

MEDIO	TIEMPO TRANSCURRIDO	MORFO FLORAL	Granos germinados	Granos observados	Porcentaje %
1	36	M	40	201	19
		H	9	108	8.3
	72	M	23	315	7.3
		H	12	138	8.6
2	48	M	11	158	6.9
		H	2	89	2.2
	72	M	18	178	10.1

		H	4	106	3.7
3	48	M	1	168	0.5
		H	3	83	3.6
	72	M	5	124	4
		H	1	193	1
4	48	M	11	134	8.2
		H	12	190	6.3
	72	M	14	155	9
		H	16	198	8

Con las pruebas de D'Agostino & Pearson y de Shapiro-Wilk se comprobó que los datos no presentaban una distribución normal por lo que se aplicó posteriormente la prueba de significancia de Mann-Whitney.

El medio 1 presentó una diferencia significativa entre los dos morfos a las 36 horas ($p= 0.0200$). Donde la media de probabilidad de germinación para el morfo masculino fue de 0.2089 ± 0.2825 y para el hermafrodita fue de 0.1046 ± 0.2466 (Figura 16).

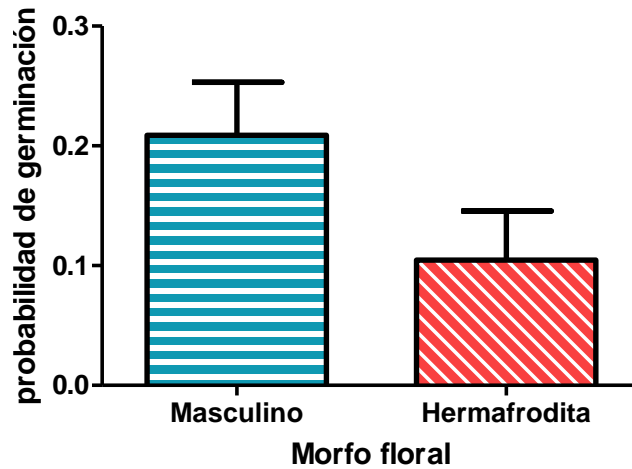


Figura 16. Promedio de probabilidad de germinación de granos de polen por morfo floral en el medio 1 a las 36 horas.

En el medio 2 sólo se obtuvo diferencia significativa entre los morfos florales a las 72 horas de germinados ($p=0.0069$). El promedio para el morfo masculino fue de 0.1324 ± 0.2302 y para el morfo hermafrodita fue de 0.02037 ± 0.06918 (Figura 17).

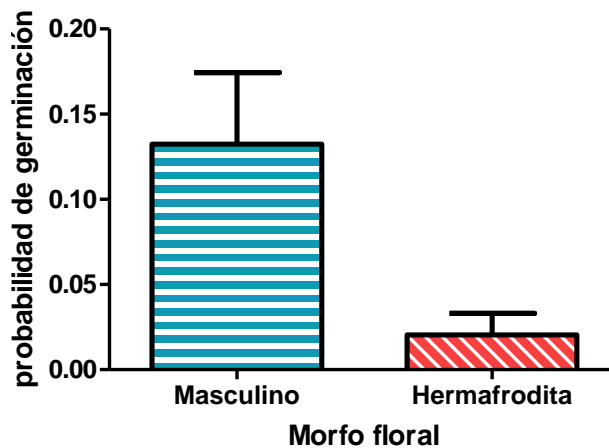


Figura 17. Promedio de probabilidad de germinación de granos de polen por morfo floral en el medio 2 a las 72 horas.

Los medios 3 y 4 no presentan diferencias significativas entre los morfos.

El medio 1 a las 36 horas, el número de granos de polen germinados por flor en el morfo masculino fue de 7.46 mientras que en el morfo hermafrodita fue de 1.003 (Figura 18).

Por otra parte el número de granos de polen germinados por flor en el medio 2 a las 72 horas es de 4.48 para el morfo masculino y de 0.57 para el hermafrodita (Figura 19).

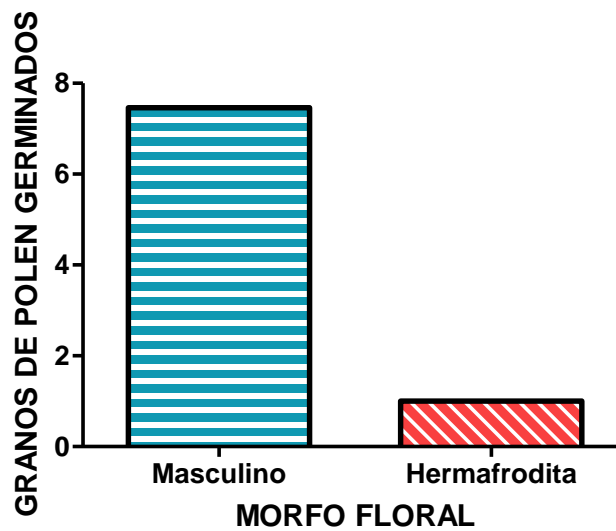


Figura 18. Número de granos de polen germinados por flor en el medio 1 a las 36 horas (Masculino: 7.46; Hermafrodita:1.003).

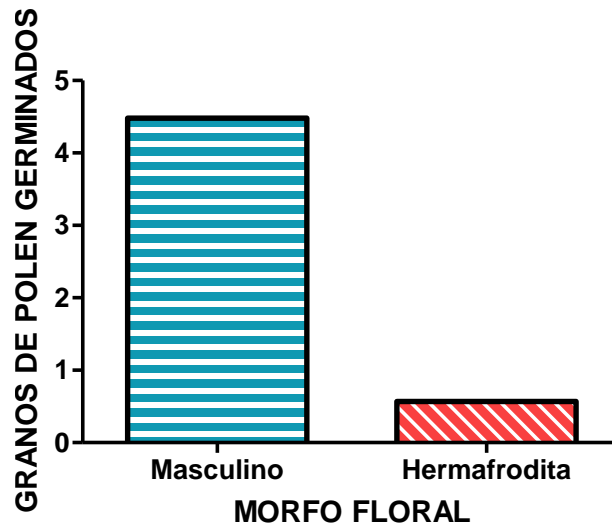


Figura 19. Número de granos de polen germinados por flor en el medio 2 a las 72 horas (Masculino: 4.48; Hermafrodita: 0.57).

Análisis cualitativo de reservas en granos de polen

El 44.8% de los granos de polen del morfo masculino, y 19.49% del morfo hermafrodita dieron positivos para la presencia de almidón.

El promedio de granos de polen con presencia de almidón en el morfo masculino es de 0.5824 ± 0.3050 y de 0.2561 ± 0.2809 .

Los resultados revelan que hay diferencia significativa entre ambos morfos ($p < 0.0001$), siendo mayor el número de granos con almidón en el morfo masculino (Cuadro 5).

Cuadro 5. Detección de almidón mediante la prueba de lugol en los granos de polen de los morfos masculino y hermafrodita, así como el total de granos observados y el porcentaje que representan.

	MASCULINO	HERMAFRODITA
Granos de polen con almidón	266	54
Granos de polen observados	594	277
Porcentaje (%)	44.8	19.49

DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo arrojaron que los individuos masculinos presentaron mayor ventaja en la adecuación de la función masculina en todos los caracteres que fueron medidos, lo que apoya la teoría del mantenimiento de este sistema reproductivo.

Algunos trabajos consideran a la androdioecia como un estado intermedio del hermafroditismo a la dioecia (Willson, 1979; Bawa, 1980; Bawa y Beach, 1981; Ross, 1982). Otros, en cambio, sugieren que la androdioecia es un paso intermedio entre la dioecia y el hermafroditismo (Lloyd, 1975; Charlesworth y Charlesworth, 1978). Charlesworth (1984) inclusive cuestiona la existencia de la androdioecia funcional, ya que los casos mejor estudiados hasta ese año, resultaban en una flor hermafrodita sin ninguna función masculina, como resultado de anteras indehiscentes o polen no funcional. Estudios más recientes (Swensen et al., 1998; Krahenbohl et al., 2002; Wolf y Takebayashi, 2004; Landry y Rathkey) demuestran la existencia de la androdioecia funcional. De igual manera, el presente trabajo representa una prueba de ello.

De acuerdo a la teoría del mantenimiento del androdioicismo, los individuos que presentan esterilidad femenina (masculinos) deben presentar una ventaja de más del doble sobre las hermafroditas, debido que presentan la mitad de la capacidad reproductiva, pues sólo pueden reproducirse por polen, en cambio las hermafroditas lo hacen tanto por polen, como por óvulos. En el caso de presentarse sólo el doble de ventaja masculina del morfo macho, se predice que es una estrategia

evolutivamente estable. Esta alta adecuación ha sido reportada en otras especies androdioicas como *Datisca glomerata* y *Phyllrea angustifolia* (Anexos 2 y 3).

Los resultados de este trabajo apoyan consistentemente el hecho de que el androdioicismo puede ser un estado intermedio entre dioecia y hermafroditismo, sin presentar aún evidencia de cuál es el sentido de la ruta evolutiva.

El caso del mayor número de estambres del morfo masculino es uno de los más notorios a simple vista. Se presentan hasta el doble de estambres.

El número de granos de polen es una de las pruebas que mayor diferencia arrojó entre los morfos. El número de granos de polen por flor es 7.6 veces mayor en el morfo masculino que en el hermafrodita, lo cual es consistente con la diferencia de estambres entre morfos. Pero si queremos una comparación más certera se puede revisar el número de granos de polen por antera, en la cual, el morfo masculino sigue teniendo una ventaja de 4.57 veces sobre el hermafrodita.

De acuerdo a Rieseberg *et al.* (1992) y a Charlesworth (1993) la baja adecuación masculina de los individuos hermafroditas podría deberse a que no han tenido tiempo suficiente de desarrollar la función masculina (*D. glomerata*; Rieseberg *et al.*, 1992; Charlesworth, 1993).

Es claro que estas medidas indirectas de adecuación masculina, no son suficientes para entender el mantenimiento o evolución de la androdioecia, debido a que intervienen muchos más factores en el proceso de polinización y fecundación, por lo cual se buscaron otras formas de medir la adecuación.

Una de ellas es la viabilidad del polen, la cual arrojó resultados que apoyan lo dicho anteriormente: las flores masculinas tienen 5.13 veces más granos de polen viables que las flores del morfo hermafrodita. Y no sólo eso, el porcentaje de viabilidad fue muy alto para este morfo, mientras que en el morfo hermafrodita los granos de polen tuvieron solo un poco más de la mitad de la viabilidad que los del morfo masculino.

La prueba de Alexander ha sido un método bastante utilizado, ya que puede distinguir a los granos de polen abortados en etapas tempranas del desarrollo (no contienen citoplasma o este es muy escaso) de los granos maduros, sin embargo, una de sus limitaciones es que los granos de polen abortados cerca de la maduración son detectados como viables (Pline *et al.*, 2002). Además presenta otras desventajas que han desatado cierto debate acerca de su confiabilidad, como lo es que no reconoce entre granos de polen viejos o muertos (Zietsman, 1991) y no tiene correlación con la germinación (Marcellan y Camadro, 1996). En contraste, otros autores como Werner y Chang (1981), Pearson y Harney (1984) y Parfitt y Ganesahn (1989) reportaron una correlación positiva entre la viabilidad y la germinación del polen.

Además, a pesar de las críticas que ha recibido este método, Miranda-Villalón (2002) encontró que la tinción de Alexander no presenta diferencias significativas en los resultados de la viabilidad, con la tinción de p-fenilendiamina, la cual es capaz de identificar reacciones metabólicas dentro de la célula.

Con respecto a las pruebas de germinación, resultaron tener bajos índices en casi todos los medios de cultivo utilizados, por lo que se sugiere probar otros medios en estudios futuros, con distintas concentraciones, debido a que la tasa de

germinación de una especie, depende de estos factores (Bolat y Pirlak, 1999), así como probar con distintas condiciones de almacenamiento del polen, ya que éstas pueden haber influido en los resultados de la germinación polínica (Stanley y linskens, 1974). Estos bajos niveles de germinación, también podrían interpretarse, según Castro *et al.* (1999), a que el desarrollo del tubo polínico, en condiciones *in vitro*, se verá limitado por el medio de cultivo utilizado, ya que difieren de las encontradas en el estigma de la flor en la naturaleza.

Sólo en dos medios de cultivo los granos de polen germinaron de manera distinta entre los dos morfos: el 1 y el 2, ambos con más del doble de porcentaje de germinación en el morfo masculino.

El mayor porcentaje de germinación en el medio 1 podría deberse a la enorme concentración de glucosa, ya que es lo que lo diferencia de forma notable de los otros medios de cultivo y a que juega un rol osmótico y de nutrición de acuerdo a Miranda-Villalón (2002), quien encontró granos de polen con sacarosa, glucosa o fructosa al momento de la dehiscencia. Un factor que parece jugar un papel importante en la germinación es el Sulfato de Sodio, ya que tanto el medio 1 y 2, lo contenían, que fueron los medios efectivos. También se puede inferir que el ácido bórico y el nitrato de calcio jugaron un papel muy importante en la germinación del polen ya que estuvieron ausentes en el medio 3, que es con el medio donde se obtuvieron cantidades mínimas de germinación.

En cuanto a la adición de boro a los medios de germinación, algunos estudios han encontrado que éste aumenta el porcentaje de germinación y acelera el crecimiento

del tubo polínico, además promueve la absorción y el metabolismo del azúcar formando complejos azúcar-boro, incrementa la captación de oxígeno y está involucrado en la síntesis de materiales pécticos de la pared del tubo polínico que se elonga (Johri y Vasil, 1961).

Por otra parte, con la investigación realizada por Brewbaker y Kwack (1963), se determinó el importante rol del calcio, potasio, magnesio y sodio en la germinación del polen. De igual forma, estos autores determinaron que la adición de agar a los medios de germinación, no incrementa la germinación, sin embargo permite, en algunos tipos de polen, aumentar el largo del tubo.

En cuanto a la morfología polínica, de acuerdo a Valdés *et al.* (1987) el polen de las flores hermafroditas de *P. krusei* se podría clasificar como mediano ya que el diámetro mayor se encuentra en el intervalo de entre 25-50 μm , mientras que el polen del morfo masculino se consideraría pequeño siguiendo esta misma clasificación, con un intervalo de entre 10-25 μm .

Adicionalmente, Blackmore *et al.* (2007) proponen que la estructura de la exina está relacionada con sistemas de incompatibilidad, pero que el posicionamiento de espinas y otras características de la ornamentación del polen no podían estar vinculadas con la disposición de los orgánulos específicos en el citoplasma de microsporas, pero se demostraron fenómenos epigenéticos. Asimismo, enfatiza tres procesos centrales de la generación de la diversidad en granos de polen: 1) el establecimiento de la simetría organizacional, o polaridad, durante la meiosis; 2) la depositación del complejo de la exina multicapa formado por tectum, columnela y

capa de pie y la endexina; 3) el nivel subestructural de organización dentro de los elementos de la exina. Pero en *Prockia krusei* no se han hecho estudios para determinar los procesos en los que incurren los granos de polen que determinan su heteromorfismo.

Núñez y Ludlow-Wiechers (1998) describieron la morfología polínica de 6 especies de Guerrero, México, pertenecientes a la familia Salicaceae y encontraron que *P. simaroa*, presenta polen inaperturado, microverrugado, mientras que las especies pertenecientes al género *Salix*, tienen un polen tricolporado, semitectado, con margo. Lo cual no coincide del todo con lo encontrado en la especie *Prockia krusei*, a pesar de ser de la misma familia y presentar una distribución similar en México. El género *Salix* únicamente coincide con los granos de polen tricolpados presentes en ambos morfos de *Prockia krusei*.

Trabajos anteriores (Wodehouse, 1935; Erdtman, 1952; Hyde y Adams, 1958; Pladalmou, 1961; Markgraf y D'Antoni, 1978) encontraron características similares a las encontradas en este estudio pero para el género *Salix* como lo es polen tricolpado, tricolporado o tricolporoidado, esferoidal o prolado y reticulado.

En contraste con el trabajo de Mayorga (2013), donde se menciona que el morfo masculino de *P. krusei* presenta granos de polen triaperturados, microrreticulados y esféricos, con eje ecuatorial de aproximadamente 12 μm , en el presente estudio, la acetólisis permitió observar que las tres aberturas descritas por Mayorga (2013) corresponden a tres tipos de granos de polen: uno tricolpado, otro tricolporado y otro tricolporoidado. La ornamentación resultó ser la misma, sin embargo, la forma

cambió de ser esferoidal a prolato, es decir que son “más alargados”. Con el presente trabajo también se conoce que la medida del eje ecuatorial es de 15.28 μm , cercano a lo descrito por Mayorga (2013). También la autora describió unas protuberancias en la parte media de las aberturas, las cuales también fueron observadas en este trabajo y se determinaron como tapones pollen kit (Cuadro 6).

En cuanto al morfo hermafrodita, Mayorga menciona que encontró 2 tipos de granos de polen que no coexisten en una misma antera, uno triaberturado y otro que nombró “multicolpado” el cual presentaba exina microrreticulada, de mayor diámetro(16-18 μm). En el presente trabajo, no se pudo observar el morfo tricolpado en el MEB, pero en las pruebas de acetólisis sí fue encontrado. Y debido al bajo porcentaje de éstos (2.7%) es posible que sí se encuentren coexistiendo en una misma antera ambos morfos polínicos. La ornamentación, es distinta a la descrita en ese trabajo ya que aquí se presenta como perforada para el caso de los pericarpados, así mismo, se midió el diámetro de estos granos quedando en 32 μm , número mucho mayor al descrito por Mayorga (2013; Cuadro 7).

Cuadro 6. Comparación de los resultados encontrados por Mayorga (2013) y del presente trabajo para la morfología del polen del morfo masculino.

	Mayorga (2013)	Roldán (2015)
Abertura	Triaberturados	Tricolpados, tricolporados o tricolporoidados
Ornamentación	Microrreticulados	Microrreticulados

Forma	Esféricos	Prolato
Eje Ecuatorial	12 μm	15.28 μm
Notas adicionales	Protuberancias en parte media de la abertura	Tapones de pollen kit

Cuadro 7. Comparación de los resultados encontrados por Mayorga (2013) y del presente trabajo para la morfología del polen del morfo hermafrodita.

	Mayorga (2013)	Roldán (2015)
Abertura	Triaberturado o multicolpado	Tricolpado o pericolpado
Ornamentación del multicolpado/ pericolpado	Microrreticulado	Pericolpado
Diámetro del multicolpado/ pericolpado	16-18 μ	32 μm
Notas adicionales	No coexiste en un mismo morfo	Debido al bajo porcentaje de tricolpados (2.7 %) es posible que se encuentren coexistiendo

Al comparar los porcentajes de viabilidad se puede hacer una predicción utilizando las proporciones de granos de polen hermafrodita, tricolpados y pericolpados: debido a que el porcentaje de viabilidad y la cantidad de granos de polen pericolpados es muy alto (64.93% y 97.3% respectivamente), es de esperar que incluso estos granos de polen pericolpados con exina más gruesa, mayor número de aberturas y de mayor tamaño en comparación con los tricolpados, sean viables. Si se logran aislar los granos de polen pericolpados, se podrían hacer pruebas de germinación, para determinar si son o no viables.

Asimismo, se puede inferir que los granos de polen tricolpados y pericolpados de las hermafroditas se encuentran en una misma antera, ya que los porcentajes de los tricolpados son bastante bajos (2.7 %) y no se encontraron anteras con tan pocos granos de polen, ni que sólo tuvieran granos de polen tricolpados en las flores hermafroditas. Es necesario realizar observaciones minuciosas al respecto.

Por otro lado, el valor de la morfología del polen en el entendimiento de la filogenia de las plantas ha sido altamente reconocido, y los patrones evolutivos de la configuración de las aberturas en particular, es altamente congruente con las recientes filogenias moleculares (APG II, 2003). En la familia Salicaceae generalmente se presentan granos tricolpados, con ello se podría pensar que es el tipo ancestral, a su vez, ambos morfos florales en *Prockia krusei* presentan esta morfología, aunque el hermafrodita en menor proporción, lo que podría sugerir que evolucionaron de un sistema dioico en donde tanto los individuos femeninos como los masculinos presentaban polen tricolpado, y que los otros tipos de aberturas que se presentan (pericolpados, tricolporados y tricolporoidados) son más recientes en la evolución de la especie.

Con respecto a la evolución y mantenimiento de la androdioecia, no es posible hacer generalizaciones debido a las pocas especies caracterizadas como androdioicas funcionales.

Del mismo modo, al haber aparecido en varios taxa distintos y alejados el uno del otro, hace pensar que han existido varias rutas que llevan a la evolución de la androdioecia, por eso es importante ver el caso especial de la familia Salicaceae,

con estudios filogenéticos parecidos a los efectuados en el género *Acer*, donde técnicas de parsimonia fueron usados para inferir el estado de los caracteres ancestrales y tendencias en la evolución de los sistemas de apareamiento. La información de los sistemas de apareamiento fueron obtenidas de la literatura, y las relaciones filogenéticas fueron tomadas de tres filogenias publicadas (Ackerly y Donaghue, 1998; Suh *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2002). Fue así que se encontraron tres diferentes rutas hacia la dioecia en el género *Acer*, la primera a partir de androdioecia heterógama; la segunda a partir de trioecia heterodicoogámica; y la última a partir de subdioecia dicoogámica. Por lo tanto en este caso, los autores proponen que la androdioecia evolucionó hacia la dioecia (Gleiser y Verdú, 2005).

La frecuencia masculina en la población de *P. krusei* de acuerdo a Mayorga (2013), se acerca a 0.5 lo que podría significar, que la población está muy cerca del dioicismo, debido a que las hembras obtienen el mayor éxito reproductivo a partir de la función femenina. En términos de género funcional, el hecho de que el número de individuos masculinos de *Prockia krusei* esté muy cercano al de hermafroditas (12 y 16 respectivamente; Mayorga, 2013) y que las hermafroditas produzcan mucho menos polen que los masculinos, muestran que el morfo hermafrodita está muy sesgado hacia la función femenina (Delph y Wolf, 2005).

También se puede pensar que esta proporción de sexos casi similar de los dos morfos, puede deberse a la gran ventaja en la adecuación que presenta el masculino o que se deba a altos niveles de depresión endogámica que se presentan en el morfo hermafrodita.

Por otro lado, *Phyllyrea angustifolia* (Oleaceae) resulta de particular interés ya que presenta características similares a *P. krusei*, como: plantas morfológicamente masculinas nunca desarrollan semillas, mientras que las hermafroditas producen polen viable, tienen morfos polínicos distintos entre morfos florales, presentan relictos de pistilo en las flores masculinas, lo cual es compatible con la sugerencia de Lepart y Dommée (1992) de la evolución a partir del hermafroditismo. También se interpretó como un género funcional sesgado de las femeninas. Traveset (1994) sugiere, con ayuda de este último carácter, que la androdioecia de *P. angustifolia* puede ser transitoria y reciente, lo que también podría ser una posibilidad para el caso de *P. krusei*.

ESTUDIOS A FUTURO

Será necesario realizar pruebas de polinización, así como pruebas de paternidad y determinar la frecuencia de masculinos en una muestra más grande para tener mayor seguridad de que *P. krusei* es una especie androdioica funcional.

Debido a que la adecuación no sólo incluye el número de descendientes, es importante que se estudien otros componentes de la adecuación relacionados con la supervivencia.

Se propone que en el futuro sean utilizados otros métodos de tinción para determinar la viabilidad del polen como la prueba de X-gal que determina el contenido de β -galactosidasa, la prueba de TTC- (2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio) que mide el contenido de deshidrogenasa, la prueba de azul de anilina para detectar callosa en las paredes del polen y el tubo polínico o bien la reacción fluorocromática

(FCR) que determina la actividad de la esterasa y el estado en el que se encuentra la membrana celular.

De acuerdo al modelo de limitación de polen para la evolución del hermafroditismo a partir del dioicismo (Wolf y Takebayashi, 2004), es posible inferir cómo ha sido la evolución de las especies androdioicas a partir de la revisión de la autocompatibilidad de los individuos hermafroditas y la proporción de sexos. Por ejemplo, de ser menor la frecuencia del morfo masculino y presentarse autoincompatibilidad o al menos una baja tasa de autofecundación en el morfo hermafrodita, se podría casi predecir que la androdioecia es un camino hacia la dioecia. Así, sería de gran importancia que en el futuro se realizaran pruebas de compatibilidad (polinizaciones manuales) en *Prockia krusei* para tener mayores elementos y sugerir una posible ruta evolutiva.

De igual forma se dice que una especie androdioica funcional, debe presentar autoincompatibilidad, sin embargo hay varios casos en los que esto no ocurre, por ello también resultaría necesario hacer estudios para determinar si se presentan mecanismos que favorezcan el entrecruzamiento, ya que como Pannell (1997) observó en *Mercurialis annua*, sistemas como la protoginia pueden favorecer el entrecruzamiento, haciendo menor el papel de la autoincompatibilidad (Anexo 3)

CONCLUSION

Este trabajo arrojó resultados que concuerdan con la teoría del mantenimiento y evolución de la androdioecia, siendo mayor la adecuación de la función masculina por parte del morfo masculino en cuanto al número de estambres, número de granos de polen, porcentaje de viabilidad, en la germinación de los granos de polen y la presencia de almidón.

Por otro lado, los granos de polen del morfo hermafrodita presentan dos tipos distintos: pericarpado y tricarpado. Los del morfo masculino tienen tres tipos: el tricarpado, tricolporado y uno tricolporoidado.

Por otro lado, nos da una muestra de los elementos que deben ser incluidos en futuros experimentos relacionados con la germinación de granos de polen.

REFERENCIAS

Ackerly D.D. y M.J. Donoghue. 1998. Leaf size, sapling allometry, and Corner's rules. Phylogeny and correlated evolution in maples (*Acer*). *The American Naturalist* 152: 767–791.

Akimoto J., T. Fukuhara y K. Kikuzawa. 1999. Sex ratios and genetic variation in a functionally androdioecious species, *Schizopepon bryoniaefolius* (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany* 86: 880-886.

Alexander M.P. 1980. A versatile stain for pollen fungi, yeast and bacteria. *StainTechnology* 55: 13.

APG II. 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 399-436.

Aranha-Filho J. L. M., P. W. Fritsch, F. Almeda y A. B. Martins. 2009. Cryptic dioecy is widespread in South American species of *Symplocos* section *Barberina* (Symplocaceae). *Plant Systematics and Evolution* 227 :99-104.

Barret S. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. *Elsevier Science* 3: 1360-1385.

Barrett S. 2002. The evolution of plant sexual. *Nature Reviews* 3:274:284.

Barret S. 2003. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing–selfing paradigm and beyond. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 358: 991-1004.

Bawa, K. S. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. *Ann.Rev. Ecol. Syst.* 11: 15- 39.

Bawa K.S. y J.H. Beach. 1981. Evolution of sexual systems in flowering plants. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 68: 254-274.

Benítez C., A. Cardozo, L. Hernández, M. Lapp, H. Rodríguez, T. Ruiz y P. Torrecilla. 2006. Botánica sistemática, fundamentos para su estudio. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 242 pp.

Blackmore S., A. H. Wortley, J.J. Skvarla y J.R. Rowley. 2007. Pollen Wall development in flowering plants. *New Phytologist* 174: 483-498.

Brewbaker J.L. y B.H. Kwak. 1963. The essential role of calcium ion in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany* 50:859

Bolat I. y L. Pirlak. 1999. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. *Tr. J. of Agriculture and forestry* 23: 383-388.

Burkhardt A., A. Internicola y G. Bernasconi. 2009. Effects of pollination timing on seed paternity and seed mass in *Silene latifolia* (Caryophyllaceae). *Annals of Botany* 104: 767-773.

Castro J., L. Barrales y I. Peña, 1999. Efecto de la temperatura y tiempo de incubación en la germinación del polen in vitro de cinco cultivares de almendro (*Prunus dulcis* Mill.). *Ciencia e Investigación Agraria (Chile)* 26:61-66.

Celeromics. 2013. <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>. Consultada 16 diciembre 2013.

Charlesworth D. 1984. Androdioecy and the evolution of dioecy. *Biological Journal of the Linnean Society* 22 (4): 333-348.

Charlesworth. 1993. Mating systems—save the male. *Curr Biol* 3:155–157.

Charlesworth D. 2006. Evolution of Plant Breeding Systems. *Current Biology* 16: 72-735.

Charlesworth D. y B. Charlesworth. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *Am. Nat.* 112:975-997.

Charlesworth D. y B. Charlesworth. 1981. Allocation of resources to male functions in hermaphrodites. *Biological Journal of the Linnean Society* 15: 57-74.

Charlesworth D. y V. Laporte. 1998. The male sterility polymorphism of *Silene vulgaris*. I. Analysis of genetic data from two populations, and comparison with *Thymus vulgaris*. *Genetics* 150: 1267-1282.

Charnov E.L. 1982. The theory of sex allocation. Princeton University Press. Princeton. 355 pp.

Cruz-García F. y Y. Cruz González-Zamora. 2013. Interacción polen-pistilo. En: Márquez-Guzmán J., M. Collazo-Ortega, M. Martínez-Gordillo, A. Orozco-Segovia y S. Vázquez-Santana. *Biología de Angiospermas*. Las prensas de Ciencias. México. 622 pp.

Cuevas-García E. y C. A. Abarca-García. 2006. Origen, mantenimiento y evolución del ginodioicismo. *Bol.Soc. Bot. Méx.* 78: 33-42.

Dafni A. y D. Firmage. 2000. Pollen viability and longevity: practical, ecological and evolutionary implications. *Plant Systematics and Evolution* 222:113-132.

Dafni A., M. Hesse y E. Pacini. 2000. Pollen and Pollination. Springer Wien New York. Austria. 336 pp.

Delph L. F. y D.E. Wolf. 2005. Evolutionary consequences of gender plasticity in genetically dimorphic breeding systems. *New Phytologist* 166: 119-128.

Dellaporta S.L. y A. Calderon-Urrea. 1993. Sex Determination in Flowering Plants. *The Plant Cell* 5: 1241-1251.

Dommeé B., A. Geslot, J.D. Thompson, M. Reille y N. Denelle. 1999. Androdioecy in the entomophilous tree *Fraxinus ornus* (Oleaceae). *New Phytologist* 143: 419–426.

Eguiarte L. E., J. Nuñez- Farfán, C. Domínguez y C. Cordero. 1992 Biología evolutiva de la reproducción en plantas. *Ciencias*. (No. especial): 69-86.

Erdtman G. 1943. An introduction to pollen analysis. The Ronald Press Co. Nueva York. 239 pp.

Erdtman G. 1952. Pollen Morphology and Plant Taxonomy. Angiosperms. Almqvist & Wiksell, Estocolmo. 539 pp.

Fahn A. 1982. Plant Anatomy. Pergamon. Oxford. 544 pp.

Futuyma D.J. 2009. Evolution. Sinauer Associates. Nueva York. 633 pp.

Gamerro J.C. y R. H. Fortunato. 2001. Morfología del polen de las especies argentinas de *Bahuhinia* (Cercideae, Caesalpinioideae, Fabaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 88: 144-158.

Gleiser G. y M. Verdú. 2005. Repeated evolution of dioecy from androdioecy in *Acer*. *New Phytologist* 165:633-640

Hanna W.W. y L.E. Towill. 1995. Long-term pollen storage. *Plant Breed. Rev.* 13: 179-2007.

Heslop-Harrison J. 1979. An interpretation of the hydrodynamics of pollen. *Amer. J. Bot.* 66:737- 743

Heslop-Harrison J. S. (1992) Pollen capture, adhesion and hydration. En: Cresti M., A. Tiezzi (eds.) Sexual plant reproduction. Springer, Berlin. 88 pp.

Hipertextos del área de la Biología. 2013. Página en red: <http://www.biologia.edu.ar>. Consultada 10 de agosto 2013.

Hiura T. y K. Ishida. 1994. Reproductive ecology in *Fraxinus lanuginosa*. *Transactions of the Hokkaido Branch of the Japanese Forest Society* 42: 58-60.

Hyde H.A. y K.F. Adams. 1958. An atlas of airborne pollen grains. St. Martin's Press, London. 110 pp.

Ishida K. y T. Hiura. 1998. Pollen fertility and flowering phenology in an androdioecious tree, *Fraxinus lanuginosa* (Oleaceae), in Hokkaido, Japan. *Int J Plant Sci* 159:941–947.

Jaramillo-Platt L. 2006. La flor y otros órganos derivados. Editorial Universidad de Caldas. Colombia. 192 pp.

Jiménez-Ramírez J. y R. Cruz-Durán. 2005. *Prockia krusei* (Salicaceae), una especie nueva del Estado de Guerrero, México. *Galley* 15(2): 297-300.

Johri, B. y I. Vasil. 1961. Factor affecting viability of pollen in storage. En: Stanley y Linskens (eds.). *Pollen Biology, Biochemistry Management*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg. New York. 307 p.

Krahenbuhl M., Y.M. Yuan y P. Kupfer. 2002. Chromosome and breeding system evolution of the genus *Mercurialis* (Euphorbiaceae): implications of ITS molecular phylogeny. *Plant Systematics and Evolution* 234: 155–169

La Porta N. y G. Roselli. 1991. Relationship between pollen germination in vitro and fluochromatic reaction in cherry clone F12/1 (*Prunus avium* L) and some of its mutants. *J. Hort. Sci.* 56:171 175.

Landry C.L. y B. J. Rathcke. 2007. Do inbreeding depression and relative male fitness explain the maintenance of androdioecy in white mangrove, *Laguncularia racemosa* (Combretaceae)? *New Phytologist* 176 (4): 891-901.

Lardon A., S. Georgiev, A. Aghmir, G. Le Merrer e I. Negrutiu. 1999. Sexual dimorphism in White campion: complex control of carpel number is revealed by y chromosome deletions. *Genetics* 151: 1173-1185.

Lemus-Jiménez L.J. y N. Ramírez. 2005. Sistemas reproductivos de las plantas en tres hábitats de la planicie costera de Paraguaná, Venezuela. *Revista de Biología Tropical* 53(3-4): 415-430

Lepart J. y B. Domme'e. 1992. Is *Phillyrea angustifolia* L. (Oleaceae) an androdioecious species? *Bot J Linn Soc* 108:375–387.

Lincoln R. J., G. A., Boxshall y P. F. Clark. 1982. A dictionary of ecology, evolution and systematics. Cambridge University Press. New York. 119 pp.

Liston A., L. Rieseberg y T. Elias. 1990. Functional androdioecy in the flowering plant *Datisca glomerata*. *Nature* 343: 641–642.

Lloyd D. G. 1975. The maintenance of gynodioecy and androdioecy in angiosperm. *Genetica* 45: 325-339.

López-Curto, M. L., J. Márquez-Guzmán y G. Murguía-Sánchez. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Las prensas de ciencias. Facultad de Ciencias. México, D.F. 178 PP.

Marcellan O. N. y E. L. Camadro. 1996. The viability of asparagus pollen after storage at low temperatures. *Sci. Hort.* 67: 101-104.

Marini G.V., R.O. Arenas y L.S. Togno. Efecto de los medios de cultivo sobre la germinación in vitro de granos de polen en poblaciones de *Cucurbita máxima*. *Horticultura Argentina* 29 (70): 18-21

Markgraf V. y H.L. D'Antoni. 1978. Pollen flora of Argentina. University of Arizona Press. 208 pp.

Martínez-Hernández, E., J.I. Cuadriello-Aguilar, O. Téllez-Valdez, E. Ramírez-Arriaga, M.S. Sosa-Nájera, J.E.M. Melchor-Sánchez, M. Medina-Camacho y M. del S. Lozano-García. 1993. Atlas de las plantas y el polen utilizados por las cinco especies principales de abejas productoras de miel en la región del Tacaná, Chiapas, México. Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. 105 pp.

Mayorga-Lizaola K. 2013. Morfología y desarrollo de las estructuras reproductivas masculinas en *Prockia krusei* (Salicaceae): un sistema androdioico. Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 59 pp

Mazer S.J. Parental Effects on Seed Development and Seed Yield in *Raphanus raphanistrum*: Implications for Natural and Sexual Selection. *Evolution* 41:355-371.

Miranda –Villalón J.M. 2002. Determinación de la viabilidad en la carga polínica de insectos, que visitan flores de avellano chileno (*Gevuina avellana* Mol.). Tesis de Licenciatura en Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Agronomía, Universidad Austral de Chile. Chile. 95 pp.

Montenegro, G. 2000. Chile, nuestra flora útil. Guía de usoapícola, alimentario, medicinal folclórica, artesanal y ornamental. Colección en Agricultura Ediciones Universidad Católica de Chile. 267 p.

Núñez P. y B. Ludlow-Wiechers. 1998. Flora palinológica de Guerrero. No. 6. Salicaceae. México. UNAM. 22 pp.

Obbard, D.J., S.A. Harris y J.R. Pannell. 2006. Sexual systems and population genetic structure in an annual plant: testing the metapopulation model. *The American Naturalist* 167: 354-366.

Pannell J. 1997. Widespread functional androdioecy in *Mercurialis annua* L. (Euphorbiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 61: 95–116.

Pannell J. 2000. A hypothesis for the evolution of androdioecy: the joint influence of reproductive assurance and local mate competition in a metapopulation. *Evolutionary Ecology* 14: 195-211.

Pannell J. 2001. A hypothesis for the evolution of androdioecy: the joint influence of reproductive assurance and local mate competition in a metapopulation. *Evol. Ecol.* 14:195-211

Pannell J. 2002a. The evolution and maintenance of androdioecy. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33:397-425

Pannell J. 2002b. What Is Functional Androdioecy? *Functional Ecology* 16:862-865.

Pannell J. y M. Verdú. 2006. The evolution of gender specialization from dimorphic hermaphroditism: paths from heterodichogamy to gynodioecy and androdioecy. *Evolution* 60 (4):660-673

Pannell J.R., M.E. Dorken, Pujol B. y R. Berjano. 2008. Gender Variation and Transitions between Sexual Systems in *Mercurialis annua* (Euphorbiaceae). *International Journal of Plant Sciences* 169: 129-139.

Parfitt D.E. y S. Ganeshan. 1989. Comparison of procedures for estimating viability of *Prunus* pollen. *HortScience* 24 (2): 354–356.

Pearsall D.M. 2000. Paleoethnobotany a Handbook of Procedure. Academic Press. California. 700 pp.

Pearson H.M. y P.M. Harney. 1984. Pollen viability in rosa. *HortScience* 19 (5): 710-711.

Philbrick T.C. y L. H. Rieseberg. 1994. Pollen Production in the Androdioecious *Datisca glomerata* (Datisceae): Implications for Breeding System Equilibrium *Plant Species Biol.* 9:43-46

Pla-Dalmau J.M. 1961. Polen. Talleres gráficos D.C.P. Gerona. 510 pp.

Pline, W.A., K.L. Edmisten, T. Oliver, J.W, Wilcut, R. Wells y N.S. Allen. 2002. Use of digital image analysis, viability stains, and germination assays to estimate conventional and glyphosate resistant cotton pollen viability. *Crop Science* 42: 2193-2200.

Raimúndez E. y N. Ramírez. 1998. Estrategia reproductiva de una hierba perenne: *Hypoxis decumbens* (Hypoxidaceae). *Revista de Biología Tropical* 46(3): 555-565

**Ressayre A., B. Godelle, A. Mignot y P. H. Gouyon. 1998. A morphogenetic model accounting for pollen aperture pattern in flowering plants. *J. theor. Biol.* 193:321-334.

Richards A. J. 1986. Plant Breeding Systems. George Allen and Unwin. Londres. 529 pp.

Rieseberg L.H., M.A. Hanson y C.T. Philbrick. 1992. Androdioecy is derived from dioecy in Datisceae: evidence from restriction site mapping of PCR-Amplified chloroplast DNA fragments. *Systematic Botany* 17 (2):324-336.

Rieseberg L.H., C.T. Philbrick, P.E. Pack y P. Fritsch. 1993. Inbreeding depression in androdioecious populations of *Datisca glomerata* (Datisceae). *Am J Bot* 80:757–762.

Ross, M. D. 1982. Five evolutionary pathways to dioecy. *Amer. Naturalist* 119: 297-318.

Sáenz C. 1978. Polen y Esporas. Blume Ediciones. Madrid. 219 pp.

Saumitou-Laprade P., P. Vernet, C. Vassiliadis, Y. Hoareau, G. de Magny, B. Dommée y J. Lepart. 2010. A Self-Incompatibility System Explains High Male Frequencies in an Androdioecious Plant. *Science* 327 (5973): 1648-1650

Shivanna K. R. y B. M. Johri. 1989. The angiosperm pollen structure and function. Wiley Eastern Limited, New Delhi. 374 pp.

Stanley R. G. y H. F. Linskens. 1974. Pollen: biology, biochemistry and management. Springer, New York. 324 pp.

Stewart A.D. y Phillips P.C. 2002. Selection and Maintenance of Androdioecy in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics Society of America* 160:975-982.

Suh Y., K. Heo y C.W. Park. 2000. Phylogenetic relationships of maples (*Acer* L., Aceraceae) implied by nuclear ribosomal ITS sequences. *Journal of Plant Research* 113: 193–202

Swensen, S. M., J. N. Luthi y L.H. Rieseberg. 1998. Datisceae revisited: monophyly and the sequence of breeding system evolution. *Systematic Botany* 23: 157-169.

Tian X.Z.H., Z.H. Guo y D.Z. Li. 2002. Phylogeny of Aceraceae based on ITS and trnL-F data sets. *Acta Botanica Sinica* 44: 714–724.

Traveset A. 1994. Reproductive biology of *Phillyrea angustifolia* L. and effect of galling insects on its reproductive output. *Botanical Journal of the Linnean Society* 114: 153-166.

Valdés B., M.J. Díez e I. Fernández. 1987. Atlas polínico de Andalucía Occidental. Instituto de Desarrollo Regional de la Universidad de Sevilla y Excma. Diputación de Cádiz. Sevilla.

Valiente-Banuet A., A. Rojas-Martínez, M. del Coro-Arizmendi y P. Davila. 1997. Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalaensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, Central Mexico. *American Journal of Botany* 84: 452–455

Vázquez-Barrón R. 2013. Estructura del gineceo en los morfos florales de *Prokia krusei* (Salicaceae). Tesis de Licenciatura (Biólogo), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 63 pp.

Wallander E. 2001. Evolution of wind pollination in *Fraxinus* (Oleaceae) – an ecophylogenetic approach. Tesis de Doctorado. Göteborg University. Göteborg, Suecia. 129 pp.

Werner D.J. y S. Chang. 1981. Stain testing viability in stored peach pollen. *HortScience* 16 (4): 522–523.

Westergaard M. 1946. Aberrant y chromosomes and sex expression in *Melandrium album*. *Hereditas (Lund)* 32: 419–443.

Willson, M. 1979. Sexual selection in plants. *Amer. Naturalist* 113: 777-790.

Wodehouse R. P. 1935. Pollen Grains: their Structure, Identification and Significance in Science and Medicine. New York. McGraw Hill. 574 pp.

Wolf D.E. y N. Takebayashi. 2004. Pollen limitation and the evolution of androdioecy from dioecy. *The American naturalist* 163:122-137

Ziestsman P. C. 1991. Reproductive biology of *Grevia occidentalis* L (Tiliaceae). *S. Afr. J. Bot.* 57: 348-351.

ANEXOS

Anexo 1. Prueba de Alexander. Se muestra a continuación las soluciones y colorantes para preparar el reactivo de Alexander.

Alcohol etílico 96%	20 mL
Verde de malaquita	20 mg
Agua destilada	50 mL
Glicerol	40 mL
Fucsina ácida	100 mg
Fenol	5 g
Ácido láctico	1 mL

Estos materiales se agitan perfectamente, se filtran y se almacenan en un frasco ámbar a temperatura ambiente.

En un grano viable, el verde malaquita que contiene el reactivo de Alexander permite ver las paredes del grano de polen de color verde, mientras que la fucsina ácida tiñe el citoplasma de color magenta o rosa intenso. Por lo tanto los granos no viables se verán sólo teñidos de color verde.

Las pruebas y las fotografías, deben tomarse de manera casi inmediata ya que los cambios osmóticos harán una coloración más intensa debido a los cambios osmóticos (López-Curto, 2005).

Anexo 2. Cuadro comparativo de especies que evolucionaron a partir del hermafroditismo (PROPUESTA)

Especie	Frecuencia de masculinos	Caracter con ventaja masculina	Compatibilidad de hermafroditas	Otros	Referencias
<i>Sagittaria lancifolia</i> * (Alismataceae)	0.16	-Morfología de la inflorescencia (depredación), resulta en una dispersión del polen 4.5 veces mayor.			Wolf y Takebayashi (2004)
<i>Fraxinus lanuginosa</i> * (Oleaceae)	De 10% a 50%	Germinación de granos de polen (2.8- 3.4 veces más) -	Parcialmente Autoincompatibles	Fenología floral idéntica de ambos morfos, así como la morfología del polen.	Ishida e Hiura (1998) Wallander (2001)
<i>Phyllyrea angustifolia</i> (Oleaceae)	De 20% a 38%	Fertilidad del grano de polen	Parcialmente autoincompatibles	Se sugiere pudo evolucionar a partir del hermafroditismo debido a que presenta autoincompatibilidad. La autoincompatibilidas podría sugerir que surgió a partir del dioicismo en lugar de una evolución hacia la dioecia (Charlesworth, 1995), pero la presencia de relictos de pistilo en las flores masculinas es compatible con la sugerencia de Lepart y Dommée (1992) de la evolución a partir del hermafroditimo. Viabilidad del polen igual.	Lepart y Dommée (1992) Hiura e Ishida (1994) Traveset (1994) Ishida e Hiura (1998)
<i>Fraxinus ornus</i> * (Oleaceae)	Alrededor de 50%		Autocompatible	Poblaciones se caracterizan por alta autogamia	Dommée <i>et al.</i> (1999)
<i>Neobuxbaumia mezcalaensis</i> * (Cactaceae)			Autoincompatibles	Se sugiere pudo evolucionar a partir del hermafroditismo debido a que presenta autoincompatibilidad y por la filogenia.	Valiente-Banuet <i>et al.</i> (1997)

<i>Laguncularia racemosa</i> (Combretaceae)	0.18	-Número de flores por inflorescencia				Landry y Rathcke (2007)
--	------	--------------------------------------	--	--	--	-------------------------

Anexo 3 Cuadro comparativo de especies que evolucionaron a partir del dioicismo (PROPUESTA)

Especie	Frecuencia de masculinos	Proporción de sexos variable	Tasa de autofecundación o de entrecruzamiento	Caracter con ventaja masculina	Compatibilidad de hermafroditas	Otros	Referencias
<i>Datisca glomerata</i> (Datisceae)	Menos de 27%	Presente	Baja tasa de autofecundación /alta tasa de entrecruzamiento	- Crecimiento del tubo polínico - Producción de granos de polen (3.8 veces más)	Autocompatibles	Estudios filogenéticos muestran que en <i>Datisca</i> , la androdioecia evolucionó a partir de un sistema dioico (Rieseberg et al. 1992). Morfo hermafrodita surge como una modificación en el morfo femenino, ya que comienza a producir polen. Recientes estudios han indicado que el género es genéticamente controlado por dos locis, con masculinos homocigos para ambos. Presentan protoginia	Liston et al. (1990) Fritch y Rieseberg (1992) Rieseberg et al. (1992) Rieseberg et al. (1993) Philbrick y Rieseberg (1994) Swensen et al. (1998)

<i>Mercurialis annua</i> (Euphorbiaceae)	Menos de 30%	Presente		- Dispersión de granos de polen (hasta 10 veces más) - Morfología de la inflorescencia	Autocompatibles	Presenta protoginia que favorece efectivamente el entrecruzamiento. Evolución de la androdioecia a partir de poblaciones dioicas, con intermediario hermafrodita	Liston <i>et al.</i> (1990) Pannell (1997) Krahenbohl <i>et al.</i> (2002)
<i>Schizopepon bryoniaefolius</i> (Cucurbitaceae)	Menos del 28%			Más flores por inflorescencia	Autocompatibles		Akimoto <i>et al.</i> (1999)
<i>Castilla elástica*</i> (Moraceae)	Minoría			Más flores por inflorescencia		Hermafroditas y masculinos producen la misma cantidad de polen con igual fertilidad	Wolf y Takebayashi (2004)