



Universidad Nacional Autónoma de México

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

ECOLOGÍA

El valor funcional de la integración floral en *Turnera velutina*
(Passifloraceae)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MANUEL ANTONIO OCHOA SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN ENRIQUE FORNONI AGNELLI, INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. CÉSAR AUGUSTO DOMÍNGUEZ PÉREZ-TEJADA, INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM
DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN, FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F.

ENERO, 2016



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.



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 12 de octubre de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del **OCHOA SÁNCHEZ MANUEL ANTONIO** con número de cuenta **304501292** con la tesis titulada "**EL VALOR FUNCIONAL DE LA INTEGRACIÓN FLORAL EN *Turnera velutina* (PASSIFLORACEAE)**", bajo la dirección del **DR. JUAN ENRIQUE FORNONI AGNELLI**:

Presidente:	DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
Vocal:	DR. MARK EARL OLSON
Secretario:	DR. CÉSAR AUGUSTO DOMÍNGUEZ PÉREZ-TEJADA
Suplente:	DRA. KARINA BOEGE PARÉ
Suplente	DRA. GUADALUPE JUDITH MARQUEZ GUZMÁN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 04 de diciembre de 2015.


DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

Agradecimientos institucionales

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca para la realización de estudios de Maestría y al proyecto CONACyT 132404 por el financiamiento para la realización del trabajo de campo y laboratorio.

Al Dr. Juan Fornoni Agnelli, la Dra. Judith Márquez Guzmán y el Dr. César Augusto Domínguez Pérez-Tejada por el apoyo brindado en la construcción de este proyecto.

Agradecimientos personales

Al Dr. Juan Fornoni Agnelli toda mi gratitud, admiración y respeto por contagiarme el interés por el estudio de la Biología Evolutiva.

Especialmente a la doctora G. Judith Márquez Guzmán por acompañarme en este proceso, compartir su conocimiento y valiosos consejos más allá de lo académico. También los doctores César A. Domínguez Pérez-Tejada, Karina Boege Paré, Mark E. Olson y María del Coro Arizmendi por las recomendaciones y comentarios tan útiles para la redacción final de la tesis.

A las doctoras Paula Sosenski, Fernanda Baena y al M. en C. Rubén Pérez, gracias por todo el apoyo, generosidad, la grata compañía, y conocimiento compartido durante el trabajo de campo.

A los integrantes del Laboratorio Interacción Planta-Animal con quienes compartí parte de este periodo. Gracias Sergio, Sofía, Xóchitl, Luz, Emiliano, Paulina, Brenda, Nora, Ana, Benito, Lupita, Diego, Blanca, Miguel, Fátima, Michelle, Paula, Fer, Juan, Karina y Rubén por construir en conjunto un equipo y ambiente de trabajo realmente valiosos.

Dedicatoria

A los que desde fuera de la Biología,
entre voces cómplices
y compañía firme que no sabe de condiciones,
crecen y caminan a mi lado.

*El viento pasa y al pasar se desdice.
Se lleva el tiempo y desdibuja el mundo.
Somos la piedra a la mitad del torrente:
Siempre igual y distinta a cada segundo,
pulida por las incesantes aguas del cambio.*

JOSÉ EMILIO PACHECO

Siempre Heráclito

Índice

<i>Resumen</i>	<i>I</i>
<i>Abstract</i>	<i>II</i>
<i>Introducción</i>	<i>1</i>
<i>Métodos</i>	<i>5</i>
<i>Resultados</i>	<i>9</i>
<i>Discusión</i>	<i>22</i>
<i>Referencias</i>	<i>31</i>
<i>Anexo</i>	<i>38</i>

Resumen

La integración floral se ha entendido como una adaptación que incrementa el éxito reproductivo mediante el aumento en la efectividad de la polinización. La evidencia sobre el valor adaptativo de este carácter es escasa y los estudios de selección sobre de los sistemas de apareamiento hacen énfasis comúnmente en análisis que abordan los rasgos florales como caracteres aislados. Aunque se ha planteado que la integración floral está involucrada en los patrones de movimiento de polen entre plantas, la evidencia que asocie estos dos caracteres es poco concluyente.

En este estudio se evaluó el papel de la integración floral sobre el sistema de apareamiento y las implicaciones de la cosexualidad en *Turnera velutina* (Passifloraceae) a través de la caracterización del transporte de polen dentro y entre plantas mediante tinción de granos de polen en arreglos experimentales expuestos a los polinizadores, en el Centro de Investigaciones Costeras La Mancha (CICOLMA), Veracruz. Para la caracterización de las proporciones en el flujo polínico se utilizó una base de datos morfométricos obtenidos de clones cultivados en invernadero a partir de una población natural de *T. velutina*. Por medio de modelos aditivos generalizados (GAM) se analizó la correlación y efecto de la variación y covariación de atributos florales (magnitud de la integración, hercogamia, longitud de estilo y estambres, volumen y azúcar total contenido en el néctar floral) sobre los componentes del flujo polínico.

Existe un beneficio de la cosexualidad en lo que respecta al desempeño de las funciones sexuales, lo que podría explicar el sesgo en el patrón de apareamiento observado en esta población. Además, se encontró evidencia que sugiere que la variación en la morfología de los órganos reproductivos, hercogamia, volumen promedio de néctar floral, cantidad total de azúcar y la magnitud de la integración floral en *T. velutina*, influyen en el desempeño de las funciones sexuales durante la polinización y en conjunto modulan los patrones de flujo polínico, lo que podría tener repercusiones importantes sobre el éxito reproductivo y el sistema de apareamiento.

Palabras clave: Integración floral, sistema sexual, sistema de apareamiento, flujo polínico, cosexualidad, autogamia, entrecruza, geitonogamia, hercogamia, covariación.

Abstract

Floral integration has been dimmed an adaptation that enhance pollination and thereby increase fitness. The evidence of adaptive value of this complex trait is scarce and the studies of selection on breeding systems have been mostly centered on floral traits individually. While it has been said that floral integration is involved in pollen-transfer patterns between plants, evidence showing an association of these traits is still controversial.

To evaluate the role of floral integration in terms of pollen transfer, and sexual system implications in *Turnera velutina* (Passifloraceae), we characterize intra- and inter-plant pollen movement by staining and counting pollen grains in experimental arrays exposed to pollinators in Centro de investigaciones Costeras La Mancha (CICOLMA), Veracruz. We used a morphometric dataset of clones and replicates maintained under greenhouse conditions from natural population of *T. velutina*, and general additive models (GAM) to estimate possible correlations and the effect of floral trait variation and covariation on pollen-transfer dynamics. The traits considered in this study were variation in magnitud of floral integration, herkogamy, style and stamen (long), floral nectar volume and total ammount of sugar produced.

We found that there is a benefit of cosexuality in terms of male and female floral functions that could explain the assymmetric mating-system pattern observed in this population.

In addition, this study shows that variation in reproductive organ morphology, herkogamy, floral nectar volume, total sugar content and magnitude of floral integration, exert differential influence on male and female floral functions during pollination, suggesting that these components of floral complex phenotype are involved in pollinator-mediated mating patterns in *T. velutina*, which it could be crucial on fitness and breeding system as well.

Keywords: Floral integration, sexual system, breeding system, pollen transfer, hermaphroditism, selfing, outcrossing, geitonogamy, herkogamy, covariation.

Introducción

La flor puede entenderse como un módulo de desarrollo, morfológico y funcional cuyo valor radica en asegurar la reproducción sexual (Bell, 1985; Murren, 2002). Constituye además uno de los rasgos fenotípicos complejos más estudiados en Angiospermas (Stebbins, 1970; Harder y Barrett 2006). Numerosos estudios han abordado las implicaciones funcionales de este complejo en lo que se refiere a la ecología y evolución de la reproducción sexual y asexual así como en relación con los vectores de polen y el éxito reproductivo de las plantas (Lloyd y Barrett, 1996; Herrera y Pellmyr 2002). Sin embargo, una gran cantidad de estudios ha centrado su análisis en las repercusiones individuales de sus rasgos (Fornoni *et al.*, en prensa), aún cuando se reconoce ampliamente a la flor como un módulo en el que la interacción entre sus rasgos actúa de forma coordinada y de esa manera opera funcionalmente para asegurar la reproducción (Stebbins 1970). Debido al enfoque predominante en el estudio de la flor, que prioriza la relevancia funcional de sus caracteres de forma individual, poco se conoce sobre los mecanismos involucrados en el funcionamiento de esta estructura como carácter fenotípico complejo (Armbruster *et al.* 2014).

En años recientes se ha incrementado el número de estudios que evalúan el papel de la flor como un módulo funcional en el que sus rasgos interactúan para promover la eficiencia de la reproducción sexual (Conner y Lande, 2014). Estos estudios han hecho énfasis en que el valor funcional de muchas de las adaptaciones complejas que han evolucionado, como las flores, radica en la interacción más que en la suma de los efectos individuales de los rasgos que las conforman (Berg, 1960; Ordano *et al.*, 2008; Diggle, 2014). Aún cuando existe evidencia del efecto de ciertos rasgos de la arquitectura floral que actúan en conjunto sobre los patrones de movimiento de polen dentro y entre plantas (Karron *et al.*, 2012), el valor funcional de la intensidad con que dicho conjunto de rasgos se correlacionan ha sido poco entendido a lo largo del tiempo (Fornoni *et al.*, 2008).

Para abordar el estudio de las flores como rasgos complejos, el concepto de integración fenotípica resulta particularmente relevante. Este concepto ha sido utilizado para caracterizar propiedades emergentes de las matrices de correlación de rasgos de los organismos y en particular resulta útil para entender la evolución multivariada de rasgos complejos como las flores (Murren 2002; 2012). En este contexto, dos de las propiedades más estudiadas asociadas con la integración floral son la intensidad de las correlaciones a través de la magnitud de la integración y el patrón de integración que determina cómo se asocian los rasgos (Murren *et al.*, 2002,

Pigliucci y Preston, 2004; Klingenberg 2008). Una estructura que presenta correlaciones relativamente altas entre sus rasgos y tiene relativamente baja asociación con respecto a otras estructuras del organismo, manifiesta una gran integración fenotípica (Murren, 2002). La expresión de la magnitud y el patrón de integración inciden directamente en la evolución de los rasgos fenotípicos (Klingenberg, 2008; Hallgrímsson *et al.*, 2009) debido a que estos factores manifiestan la estructura genética subyacente en el desarrollo y evolución de la composición fenotípica de los organismos.

Las flores constituyen módulos que han evolucionado como un sistema cuyos atributos se asocian, en conjunto, con el éxito reproductivo mediante las funciones sexuales femeninas y masculinas (Stebbins 1950; Bell 1985). La asociación relativa entre conjuntos de rasgos de un organismo, es decir, la modularidad, comprende el desacoplamiento de un conjunto coordinado de caracteres con respecto a otros componentes de un organismo (Wagner *et al.*, 2007). La modularidad en este sentido, permite que se mantengan las asociaciones entre caracteres relacionados funcionalmente e implica que el desarrollo y presiones selectivas a las que están sometidos dichos caracteres se llevan a cabo de forma relativamente independiente de otros módulos (Hallgrímsson *et al.*, 2009). Identificar el valor funcional y el significado adaptativo de los patrones de variación y covariación en caracteres fenotípicos resulta fundamental para entender los procesos que modulan la evolución de los rasgos florales como sistemas fenotípicos (Armbruster *et al.*, 2004; Waites y Agren, 2006).

La primera hipótesis que consideró a la flor como un módulo funcional fue presentada por Berg (1960). A partir de esta hipótesis se propuso que la principal presión de selección que actúa sobre la evolución de la integración floral es la transferencia de polen entre plantas mediada por polinizadores. Concretamente, la precisa correspondencia entre los rasgos florales y la morfología y conducta del polinizador son, según Berg, los principales factores que inciden en la evolución de la integración floral. A partir de esta hipótesis se propusieron refinaciones teóricas posteriores que incluyeron otros factores como parte de la interpretación de la relevancia de este carácter complejo. Armbruster *et al.* (1999) plantearon que las plantas con sistemas especializados de polinización deberían tener niveles más altos de integración en sus flores debido a la presión de selección de un tipo de polinizador. Tal acoplamiento promovería una mayor eficiencia en el transporte de polen entre plantas, reduciendo así el desperdicio (Fornoni *et al.*, en prensa; 2008).

El valor adaptativo de la correlación entre caracteres florales ha sido analizado con base en esas premisas teóricas en los últimos años; sin embargo, no existe evidencia empírica que valide dichas hipótesis. Más aún, la evidencia empírica reciente sugiere que la integración floral podría estar relacionada de forma más estrecha con el sistema de apareamiento (Ferrero, *et al.*, 2010; Rosas-Guerrero *et al.*, 2011) que con el nivel de

especialización del sistema de polinización (Pérez-Barrales *et al.* 2007; Rosas-Guerrero *et al.* 2011; Fornoni *et al.*, en prensa). En términos generales, la evidencia recopilada hasta ahora aún dista de explicar las causas de variación en la integración floral (Ordano *et al.*, 2008; Fornoni *et al.*, 2009; Conner y Lande, 2014).

A partir de una revisión, recientemente se observó que las especies con sistemas de apareamiento sesgado hacia la autogamia presentaron mayor integración en sus órganos sexuales que aquellas con un sistema de apareamiento sesgado hacia el entrecruzamiento (Fornoni *et al.*, en prensa). A diferencia de la propuesta de Berg (1960), este patrón sugiere que la integración floral de los órganos sexuales podría ser un componente del síndrome de la autogamia. De esta forma, la integración floral es un rasgo que podría estar involucrado en el movimiento de polen intra-planta (geitonogamia) y/o intra-flor (autogamia) (Fornoni *et al.*, en prensa). Sin embargo, aún se desconoce el rol que juega la integración en promover ya sea el entrecruzamiento, la autogamia o ambas formas de apareamiento simultáneamente.

Si la integración condiciona el transporte de polen entre y dentro de las plantas es posible que influya también en las interacciones presentes entre verticilos sexuales de plantas hermafroditas. En otras palabras, la integración floral podría influir de alguna manera sobre las implicaciones ecológicas que representa la cosexualidad en especies hermafroditas. La cosexualidad es un sistema que enfrenta de forma antagónica a los verticilos sexuales cuya efectividad, en términos funcionales, se asocia con la remoción y dispersión del polen (estambres) así como con la deposición del mismo sobre la superficie estigmática y con la producción de semillas (pistilo). La influencia recíproca que tienen entre sí los verticilos sexuales en plantas hermafroditas puede resultar desventajosa. Por ejemplo, puede implicar la obstrucción física y/o fisiológica que reduzca el éxito de una o ambas funciones. Este patrón se conoce como interferencia sexual (Barrett, 2002; Routley y Husband, 2006), y ha sido considerado como uno de los principales conflictos funcionales entre los rasgos florales de plantas hermafroditas (Lloyd 1992).

La interferencia sexual puede ejercer una importante fuerza selectiva en la evolución floral (Fetscher, 2001; Rutley y Husband, 2006) y se manifiesta de distintas formas desde lo fisiológico hasta lo ecológico. En términos ecológicos, en lo que respecta al flujo polínico, una función sexual interferiría con otra expresando un conflicto de intereses si su presencia reduce o compromete, en términos generales, la capacidad de la otra de exportar (función masculina) o de recibir polen (función femenina) durante la polinización (Arnqvist y Rowe, 2005; Lankinen y Larsson, 2007; Madjidian y Lankinen, 2009). Esto puede suceder, por ejemplo, cuando la presencia y/o la posición de las anteras reduce la tasa de deposición de polen en los estigmas (Bertin y Newman, 1993), o si el estigma reduce el tiempo de manipulación de la flor y/o la tasa de remoción de polen (Holsinger *et*

al., 1984). Pese a que se han caracterizado estas dinámicas en numerosos estudios, los análisis sobre los efectos que tienen los mecanismos florales sobre la reducción de la interferencia sexual son escasos (Guo *et al.*, 2014).

T. velutina resulta un modelo interesante para analizar los costos de la cosexualidad (interferencia sexual) (Truyens *et al.*, 2005; Obbard *et al.*, 2006; Barrett, 2013) debido a que es una especie hermafrodita autocompatible, actualmente homostífica derivada de un ancestro heterostílico dimórfico (Barrett, 1978) y es poliploide, por lo que la depresión por endogamia no implicaría un costo genético importante. Además, existe evidencia de variación en la integración de los caracteres florales. En este sentido, si la integración promueve el movimiento de polen dentro y/o entre plantas, se espera encontrar una relación entre el flujo de polen de geitonogamia y/o entrecruzamiento con la integración floral de los donadores y/o receptores. Si la integración floral se asocia en algún sentido con una mayor eficiencia en el transporte de polen, este rasgo podría disminuir la interferencia sexual. En este caso, se esperaría que plantas (genotipos) con flores más integradas sean mejores donadores o receptores de polen. Finalmente si la integración floral promueve el entrecruzamiento (Berg, 1960) y la autogamia (Fornoni *et al.*, en prensa) como se ha sugerido, valores altos de integración podrían reducir el costo de la cosexualidad mediante la disminución de la interferencia sexual.

En este estudio se examina el papel de la integración floral (la magnitud y la estructura de covarianzas entre los rasgos florales) sobre el desempeño de *Turnera velutina* en términos de flujo de polen. En primer lugar, se analiza si la cosexualidad ejerce presiones en algún sentido sobre las funciones sexuales en lo que respecta a la exportación y recepción de polen. Posteriormente se evalúa la relación entre la integración floral y los patrones de flujo de polen en la población, haciendo énfasis en el desempeño de las funciones sexuales.

Los objetivos del presente estudio fueron: 1) examinar si existe un costo y/o un beneficio de la cosexualidad en *T. velutina* debido a la interferencia o sinergismo de las funciones sexuales durante el movimiento de polen; 2) cuantificar las probabilidades de flujo de polen asociadas con autocruza, geitonogamia y entrecruzamiento; y 3) determinar si existe alguna relación entre rasgos de la arquitectura floral como la hercogamia, de la recompensa como el volumen promedio o la cantidad total de azúcar en el néctar y la magnitud de la integración floral, sobre el movimiento de polen dentro y entre plantas.

Métodos

Sitio y sistema de estudio

El trabajo experimental se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Costeras La Mancha (CICOLMA), Veracruz (19°31'17"N, 96°13'29"O) durante junio y julio de 2013. Dicha estación biológica se encuentra a 1 km de la población donde se distribuye naturalmente la población utilizada en este estudio, en parches ubicados en las dunas costeras frente al Golfo de México.

Las plantas que se utilizaron corresponden a una población experimental previamente cultivada en invernadero dentro del CICOLMA que ha sido caracterizada en su fenotipo floral. Se cuenta con la información sobre los niveles de variación genética en la hercogamia, la integración fenotípica floral y rasgos morfométricos en 45 clones (ver detalles en Ramos-Castro, 2013).

Turnera velutina Presl. (Passifloraceae) es un arbusto perenne endémico de México que se distribuye desde el nivel del mar hasta los 1300 m de altitud. Las plantas tienen flores hermafroditas, homostílicas, autocompatibles con un periodo de floración y fructificación que ocurre con un pico entre junio y noviembre que coincide con la estación lluviosa (Arbo, 2005). Sus principales polinizadores son abejas (*Apis mellifera* y *Agapostemon sp.*), aunque existe gran diversidad de visitantes florales (Ramos-Castro, 2013). *T. velutina* produce en promedio 5 flores por día (Benítez-Vieyra *et al.*, 2010) y éstas permanecen en antesis 4 horas aproximadamente. No presentan dicogamia, aunque se ha detectado variación genética en los niveles de hercogamia (Ramos-Castro y Fornoni, datos no publicados).

Diseño experimental

El diseño experimental consistió en arreglos (parches) de 4 plantas colocadas en disposición radial con una planta focal (fig. 1). Las plantas elegidas como focales fueron aquellas que contaron con al menos 3 flores abiertas simultáneamente el día de observación.

Se aplicaron los siguientes tratamientos a cada una de las tres flores de las plantas focales:

Flor funcionalmente masculina (fig. 1a). La flor sometida a este tratamiento actuó como donadora de polen únicamente. Es decir, la función femenina se limitó mediante la escisión del estilo. Se realizó tinción de granos de polen.

Flor funcionalmente femenina (fig. 1b). La flor sometida a este tratamiento actuó como receptora de polen

únicamente. Se realizó emasculación previa al inicio de la actividad de los polinizadores.

Flor hermafrodita focal (fig. 1c). Ambas funciones sexuales de la flor se mantuvieron y se realizó tinción de polen con un colorante distinto al utilizado para la planta funcionalmente masculina (Anexo).

Flor periférica (fig. 1d). Se tiñeron los granos de polen con un mismo tinte en todos los casos para cuantificar únicamente el transporte de polen de entrecruza en ambas funciones sexuales (exportación y recepción).

Los tratamientos de remoción de los órganos sexuales se efectuaron al interior del invernadero a partir del momento de antesis (~9:00 hrs). Se realizaron las tinciones una vez que la antera entró en dehiscencia y las plantas permanecieron en el invernadero hasta el secado del tinte para evitar que los polinizadores transportaran el polen aglutinado por la humedad. Posteriormente se colocaron los arreglos distribuidos en las instalaciones del CICOLMA.

Durante el montaje, cada uno de los parches se situó a una distancia mínima aproximada de 50 metros, que impidiera el flujo de polen entre ellos. Se construyeron en total 59 arreglos experimentales a lo largo de los 11 días que duró el experimento. En promedio se trabajó con 5 parches por día, según la floración de las plantas disponibles. Las plantas fueron expuestas a los polinizadores entre las 10:00 y las 13:00 hrs, periodo en el cual las flores permanecen en antesis.

Tinción de polen

Para identificar la fuente de polen durante el transporte se utilizaron colorantes verde rápido, safranina y azul de metileno, con los cuales se tiñeron las anteras de las flores antes de exponerlas a los polinizadores (Anexo). Se alternó el orden de las tinciones en todos los arreglos experimentales para evitar un efecto del color del tinte sobre la dinámica de la polinización.

Mediante el registro del número de granos depositados en cada estigma según el color correspondiente a cada tratamiento, fue posible cuantificar la incidencia de la entrecruza con respecto a la autogamia en sus dos formas (geitonogamia y autocruza). Posteriormente los estigmas de cada flor fueron colectados y se realizó el conteo de los granos de polen depositados en cada una.

Figura 1. Estructura general de arreglos experimentales y direcciones posibles en el transporte de polen

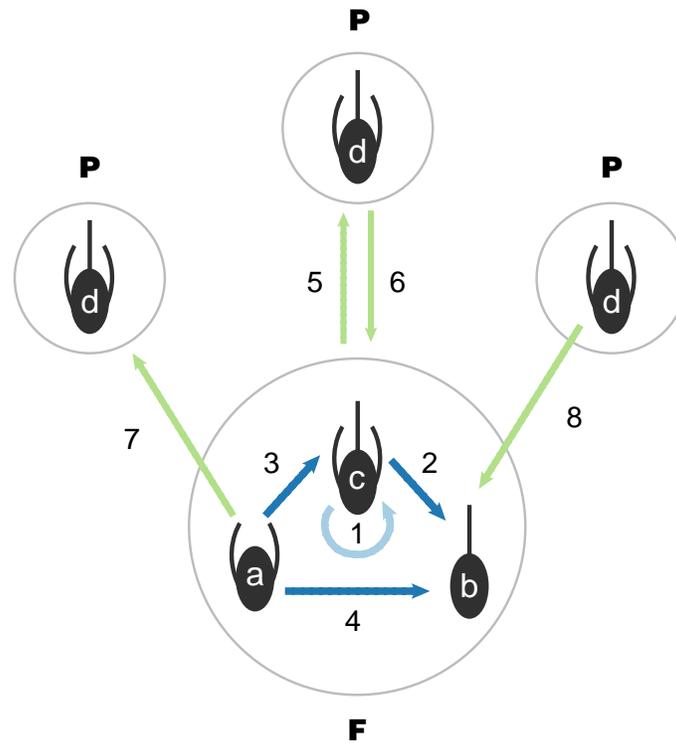


Figura 1. a: flor unisexual masculina, b: flor unisexual femenina, c: flor hermafrodita focal, d: flor hermafrodita periférica. F: planta focal, P: planta periférica. 1: Autocruza; 2, 3, 4: Geitonogamia; 5, 6, 7, 8: Entrecruza.

Conteo de polen y caracterización del flujo polínico

Se colectaron todos los estigmas para cada arreglo experimental y se realizaron preparaciones fijadas con glicerina para observación al microscopio estereoscópico (N= 354 estigmas).

Se realizó el conteo de granos de polen depositados en cada estigma y se determinó la cantidad total y proporción por flujo polínico (autocruza, geitonogamia y entrecruza) asociando el color del grano de polen encontrado con la dirección en la que fue transportado según receptor y exportador. Esta información se cotejó con los datos morfológicos correspondientes a cada clon sometido a los tratamientos.

A partir de la información previamente obtenida para la variación de los rasgos florales de las familias genotípicas, realizado por Ramos-Castro (2013), se caracterizó la asociación entre el patrón encontrado de polen exportado o recibido en el experimento.

Análisis de datos

Los datos considerados en este estudio corresponden a los siguientes rasgos florales: largo del estambre (longitud de la antera + filamento), largo del estilo (longitud del estilo + ovario), hercogamia (separación estambre-estilo) por flor y clon, volumen promedio de néctar por clon y cantidad total de azúcar producido por flor, para cada clon. La información de la integración fenotípica para cada genotipo (clon) se tomó de la estimación de la variación genética de la media y la varianza para un total de 11 caracteres florales (ver detalles en Ramos-Castro, 2013).

Se analizó la variación y covariación entre los valores promedio de caracteres reproductivos (longitud del estilo, longitud de los estambres, hercogamia), el volumen y cantidad total de azúcar del néctar floral, así como la integración floral mediante la función `mgcv` en R 3.1.1 (R Development Core Team, 2014) para Modelos aditivos generalizados (GAM). Estos modelos sintetizan un amplio conjunto de métodos de regresión que permiten analizar la covarianza entre variables que no necesariamente se asocian de una forma lineal y cuyas distribuciones pueden no ser normales (Hastie y Tibshirani, 1990; Wood, 2006). En el modelaje mediante GAM en R, se emplearon ajustes tipo poisson y quasipoisson (función de enlace logarítmica) para datos de conteo o variables continuas, y binomial o quassibinomial (función de enlace logística) para datos de proporciones; ambos corregidos en caso de sobredispersión de datos.

Para la estimación del conflicto sexual se consideró la información del transporte de polen ocurrido en el total de las plantas en cada parche. En el análisis de datos sobre el sistema de apareamiento, así como el de las asociaciones entre variación de rasgos morfométricos e integración floral, se consideraron únicamente aquellas flores que no fueron sometidas a la remoción mecánica de órganos sexuales (N= 236 flores). Se analizó la información antes descrita para individuos pertenecientes a 39 familias genéticas (clones).

Resultados

Costos y beneficios del hermafroditismo. Conflicto sexual

El desempeño de la función masculina en general tuvo dos componentes en este experimento. El de la flor funcionalmente masculina (fig. 1a), en términos de entrecruza, está determinado por la cantidad de granos de polen depositados en los estigmas de las flores periféricas (fig. 1d). De forma similar, el desempeño masculino de la flor hermafrodita focal (fig. 1c) está determinado por la cantidad de granos de polen depositados en los estigmas de las flores periféricas.

La figura 2a muestra el desempeño general de la flor unisexual masculina (FMU) en términos de exportación de polen, mientras que la figura 2b indica el desempeño de la función masculina en las flores hermafroditas (FMC) y corresponde a la función masculina cosexual.

$$FM_U = ad_1 + ad_2 + ad_3$$

$$FM_C = cd_1 + cd_2 + cd_3$$

Es posible estimar si existe interferencia sexual femenina al comparar el desempeño de la función masculina en unisexualidad con respecto al desempeño de ésta en cosexualidad. Para hacerlo, se caracterizó y cuantificó la exportación en la que estuvo involucrado el verticilo sexual masculino en la flor hermafrodita y en la flor funcionalmente masculina. Si $\Sigma FM_U > \Sigma FM_C$, es decir, si el desempeño de la función masculina unisexual es mayor al de la función masculina cosexual, existiría evidencia de interferencia sexual pues el transporte de polen estaría limitado por la función femenina. En el caso de que la flor en cosexualidad exportara mayor cantidad de polen; es decir, si $\Sigma FM_U < \Sigma FM_C$, existiría un sinergismo entre funciones sexuales.

El desempeño de la función sexual femenina puede caracterizarse en términos de la recepción de granos de polen. Es decir, a partir de la cantidad de granos alojados en los estigmas de la flor unisexual (fig. 1b) y en la flor hermafrodita o cosexual (fig. 1c). La estimación de $d_1b + d_2b + d_3b$ (fig. 2b), muestra el desempeño general de la flor unisexual femenina (FFU) en términos de recepción de polen. El desempeño de la función femenina en las flores hermafroditas (FFC) está dado por $d_1c + d_2c + d_3c$ (fig. 2b).

$$FF_U = d_1b + d_2b + d_3b$$

$$FF_C = d_1c + d_2c + d_3c$$

Es posible estimar si existe interferencia sexual masculina al comparar el desempeño de la función femenina en unisexualidad con respecto al desempeño de ésta en cosexualidad. Para hacerlo, se caracterizó y cuantificó la exportación en la que estuvo involucrado el verticilo sexual femenino en la flor hermafrodita y en la flor funcionalmente femenina. Si $\Sigma FF_U > \Sigma FF_C$, es decir, si el desempeño de la función femenina unisexual es mayor al de la función femenina cosexual, habría evidencia de interferencia. En este caso, la recepción de polen estaría limitada por la función masculina. En el caso de que la flor en cosexualidad tuviera un mayor desempeño en términos de exportación de polen contrario; es decir, si $\Sigma FF_U < \Sigma FF_C$, existiría evidencia de un sinergismo entre funciones.

La prueba de χ^2 (tabla 1) muestra que el número de granos de polen exportado y recibido por entrecruza de las flores hermafroditas fue mayor que el de las unisexuales. Las flores hermafroditas (cosexuales)

en ambos casos (exportación, función masculina y recepción, función femenina) tienen un rendimiento entre dos y tres veces mayor con respecto al de las flores unisexuales en términos del flujo de polen (fig. 3). Este resultado indica que existe evidencia de un sinergismo entre las funciones sexuales y por lo tanto un beneficio de la cosexualidad en *Turnera velutina* en lo que se refiere al transporte de polen en términos generales.

Figura 2. Desempeño de las funciones sexuales

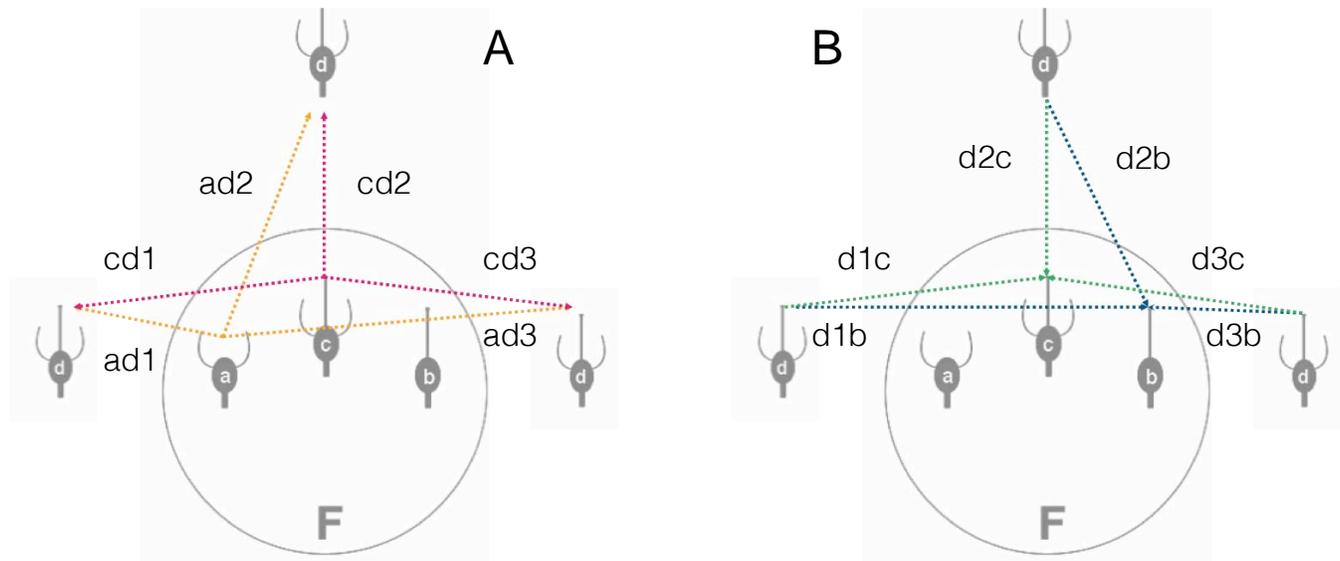


Figura 2. **A: Desempeño sexual masculino (exportación de polen de entrecruza).** ad1: Polen transportado de a al receptor d1; ad2: Polen transportado de a al receptor d2; ad3: Polen transportado de a al receptor d3; cd1: Polen transportado de c al receptor d1; cd2: Polen transportado de c al receptor d2; cd3: Polen transportado de c al receptor d3. **B Desempeño sexual femenino (exportación de polen de entrecruza):** d1b: Polen transportado de d1 al receptor b; d2b: Polen transportado de d2 al receptor b; d3b: Polen transportado de d3 al receptor b; d1c: Polen transportado de d1 al receptor c; d2c: Polen transportado de d2 al receptor c; d3c: Polen transportado de d3 al receptor c.

Tabla 1. Magnitud total de polen transportado según tratamiento y desempeño de las funciones sexuales

	Función en unisexualidad	Función en cosexualidad
Exportación	$\Sigma FM_U = 1545$ (35.2%)	$\Sigma FM_C = 2843$ (64.8%)
	$\Sigma FF_U = 986$ (29.1%)	$\Sigma FF_C = 2408$ (70.9%)
$\chi^2 = 32.793, gl = 1, p < 0.001$		

Tabla 1. FF_U: Función femenina en unisexualidad, FF_C: Función femenina en cosexualidad, FM_U: Función masculina en unisexualidad, FM_C: Función masculina en cosexualidad. FF_U = d1b+d2b+d3b, FF_C = d1c+d2c+d3c, FM_U = ad1+ad2+ad3, FM_C = ad1+ad2+ad3. Las sumas indican el desempeño sexual de las flores de los distintos tratamientos para cada arreglo experimental. N=59 arreglos experimentales.

Figura 3. Desempeño de las funciones sexuales y transporte de polen por tratamiento

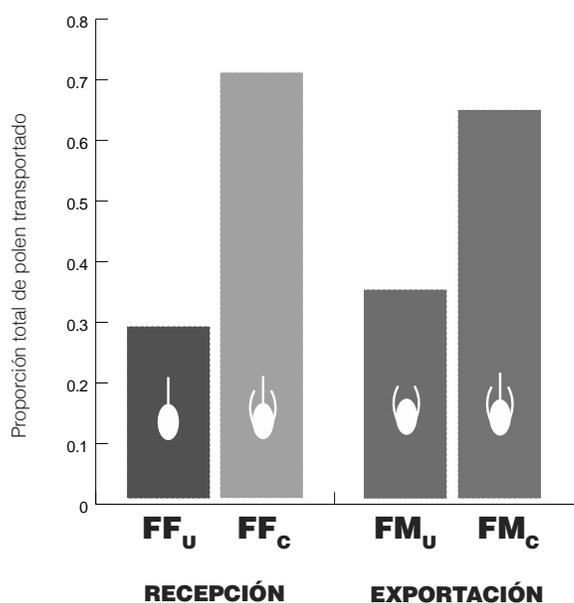


Figura 3. Magnitud del desempeño sexual individual en términos de la cantidad total de granos de polen involucrados en el flujo en cada caso. Se detallan los componentes de la función femenina (recepción) y masculina (exportación) en los arreglos experimentales). FF_U : Función femenina en unisexualidad, FF_C :Función femenina en cosexualidad, FM_U :Función masculina en unisexualidad, FM_C : Función masculina en cosexualidad.

Flujo polínico y sistema de apareamiento

La autogamia es el sistema de apareamiento predominante en *T. velutina* por encima de la entrecruza (0.78 ± 0.3 , 0.22 ± 0.3 respectivamente). Aunque el patrón de transporte de polen sugiere la existencia de un sistema mixto de apareamiento, existe un claro sesgo hacia la autogamia.

Figura 4. *Transferencia de polen y sistema de apareamiento*

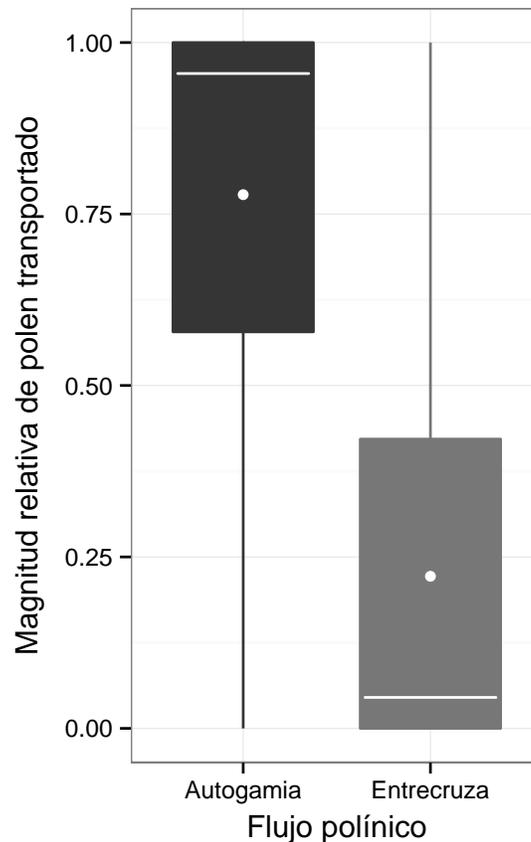


Figura 4. Caracterización del transporte de polen y proporciones del sistema de apareamiento. Los puntos sobre cada caja indican la media. $n=59$.

Variación en los caracteres reproductivos, de recompensa e integración floral

T. velutina mantiene una marcada variación morfológica intrafloral en la que el verticilo femenino tiene un rango de variación más amplio que el masculino en lo que respecta a la longitud promedio de sus órganos ($\mu_{L. ESTAMBRE} = 14.16 \pm 0.63$ mm, $\mu_{L. ESTILO} = 19.5 \pm 1.11$ mm) (Fig. 5). Esta variación incide directamente en el

gradiente de hercogamia que puede encontrarse en la población, en la que existen individuos con una hercogamia desde 3.6 mm hasta los 7.6 mm de separación. La varianza en la longitud de los estambres es menor con respecto a la de la longitud del estilo (Bartlett $K^2=13.05$, $p<0.001$). En términos morfológicos, un aumento de 1 mm en la longitud de los estilos provoca un incremento promedio aproximado de 0.2 mm en la longitud de los estambres en lo que respecta a la variación de dichos rasgos (fig. 5).

Dentro del gradiente de variación morfológica que presentan los verticilos sexuales de la población estudiada, el incremento en las longitudes de los órganos florales está asociado con un incremento en la distancia que los separa (hercogamia). En la figura 5 se muestra una comparación entre la correlación entre la longitud promedio de estambres y estilos por clon (línea sólida) y una línea de referencia con pendiente=1. Esta referencia indica aquellas longitudes de estambres y estilos que provocarían una hercogamia de cero (línea punteada). La diferencia entre esta referencia (línea punteada) y la línea sólida, indica la hercogamia esperada para cada valor en la longitud de los verticilos. Otro punto que cabe destacar es que el valor mínimo observado de la longitud de estambres y estilos se localiza muy cerca del punto donde las predicciones indicarían una hercogamia de cero (*i.e.* la intersección entre líneas), así como de aquellas longitudes que darían como resultado una hercogamia inversa (mayor longitud de estambres que de estilos).

La hercogamia observada no es constante a lo largo del gradiente de variación en longitudes de verticilos entre clones de *T. velutina*. Es decir, el cambio en la variación de las longitudes promedio de estambres y estilos en la población no genera un valor constante en la distancia que los separa. Por el contrario, la diferencia recíproca entre ambos verticilos (hercogamia) se incrementa en el caso de plantas con flores de estilos y estambres más largos. La diferencia entre la línea sólida y la punteada en la figura 5 muestra que las flores con estilos y estambres más largos presentan mayor hercogamia con respecto a la de flores con verticilos cuya longitud promedio es menor. Concretamente, en individuos cuyas flores tienen estambres y estilos cortos existe una mayor probabilidad de que la hercogamia sea menor con respecto a la que se encontraría en individuos de estilos y estambres largos.

En el caso de los rasgos de recompensa, existe variación genética significativa en la media del volumen de néctar ($3.18 \pm 1.88 \mu\text{l}$) y de la cantidad total de azúcar ($1.06 \pm 0.63 \text{ mg}$). La integración floral entre clones tiene un valor medio de $26.46 \pm 12.61 \%$ con un rango de variación que abarca clones con una integración promedio desde el 6.25% hasta un 58.82% (Ramos-Castro, 2013).

Figura 5. Variación en los caracteres sexuales florales y hercogamia

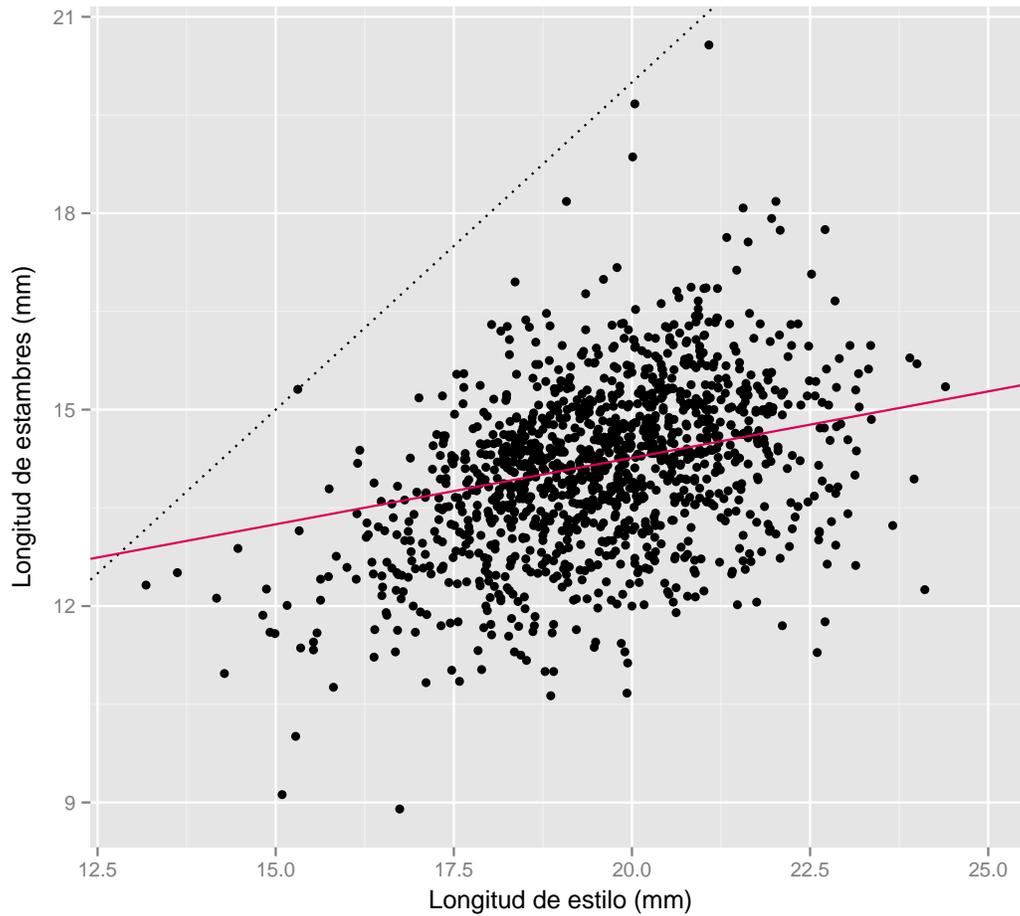


Figura 5. Correlación entre la longitud promedio de estambres y estilo por clon indicada en la línea sólida ($r_L = 0.36$, $F_{1,43} = 6.23$, $p = 0.016$, $n=45$). Pendiente e intervalo de confianza al 95% = 0.20 (0.03-0.37).

Variación esperada en las longitudes de estilo y estambres cuando $m=1$ (*i.e.* hercogamia = 0) indicada en línea punteada. La diferencia entre línea punteada y la sólida indica la hercogamia promedio. Cada punto representa una flor.

Arquitectura floral y flujo polínico. Recepción

Para evaluar las implicaciones funcionales que tienen las asociaciones entre la variación intrafloral en los órganos reproductivos, es útil comparar cómo cambian los patrones de exportación y recepción de polen sobre las flores a lo largo del gradiente morfológico de variación en sus estructuras sexuales y si éstos se asocian de alguna forma. En la tabla 2 se sintetizan los efectos encontrados de los componentes reproductivos de la arquitectura floral de *T. velutina* sobre la polinización en lo que se refiere a la recepción de polen (función femenina). Se encontró que la variación en hercogamia explica las diferencias en la recepción de polen de distintas fuentes. La hercogamia se asocia de forma inversa con la cantidad total de polen que una flor recibe (fig. 6a), así como con la magnitud de polen proveniente de la autogamia, la autocruza (fig. 6 b) y geitonogamia (fig. 6c). Sin embargo, la variación en hercogamia no se asocia con la cantidad de polen recibido de estas dos fuentes en conjunto, es decir, la autogamia, ni con las probabilidades de recepción de polen de entrecruza (Tabla 2).

Con respecto a la morfología de los órganos sexuales, los resultados muestran que en función de la longitud del estilo podría resultar más probable para una planta de estilos cortos que sus flores alojen una mayor proporción de polen de sus propios estigmas (fig. 7c). La longitud del estilo condiciona de forma importante la recepción de polen de autogamia cuyo componente principal es la autocruza. En el caso específico de los componentes que determinan la hercogamia, puede observarse que la variación en la longitud del estilo resulta determinante para la recepción total de polen (fig 7a), así como para la recepción de autogamia (fig. 7b) y de autocruza (fig. 7c). Además, la longitud del estilo influye positivamente de forma significativa en la cantidad de polen proveniente de entrecruza que se aloja en las flores. Es decir, la mayor longitud de los estilos se asocia con una mayor cantidad de polen recibido proveniente de otro individuo (fig. 7d).

En lo que respecta a los órganos sexuales masculinos, la variación en la longitud de los estambres explica únicamente las diferencias en la recepción de polen de geitonogamia (fig. 8). Esto indica que plantas con estambres largos tienen menor probabilidad de recibir polen que proviene de distinta flor de un mismo individuo. Es importante remarcar la fuerte asociación que se muestra en este caso aunque fuera el único componente del movimiento de polen correlacionado. La variación en la longitud de los estambres explica cerca de la mitad ($R^2=0.48$, $p<0.001$) de las diferencias en la cantidad de polen que una flor recibiría cuando el donador pertenece a la misma planta (Tabla 2, fig. 8).

Tabla 2. Asociación y efectos entre los elementos reproductivos de la arquitectura floral y la dinámica de recepción durante el flujo polínico

	Hercogamia	Longitud del estilo	Longitud de estambres	Integración
Recepción total	*(-)	*(-)	ns	ns
Autogamia	ns	*(-)	ns	ns
Autocruza	*(-)	*(-)	ns	ns
Geitonogamia	***(-)	ns	***(-)	*(+)
Entrecruza	ns	**(+)	ns	*(-)

Tabla 2. Modelos aditivos generalizados (GAM). Se muestran las asociaciones de cada interacción. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ns: *no significativa*. Los efectos de las variables sobre los componentes del transporte de polen durante la recepción se indican entre paréntesis: positivo (+) y negativo(-).

Figura 6. Magnitud relativa de polen recibido en función de la hercogamia del receptor

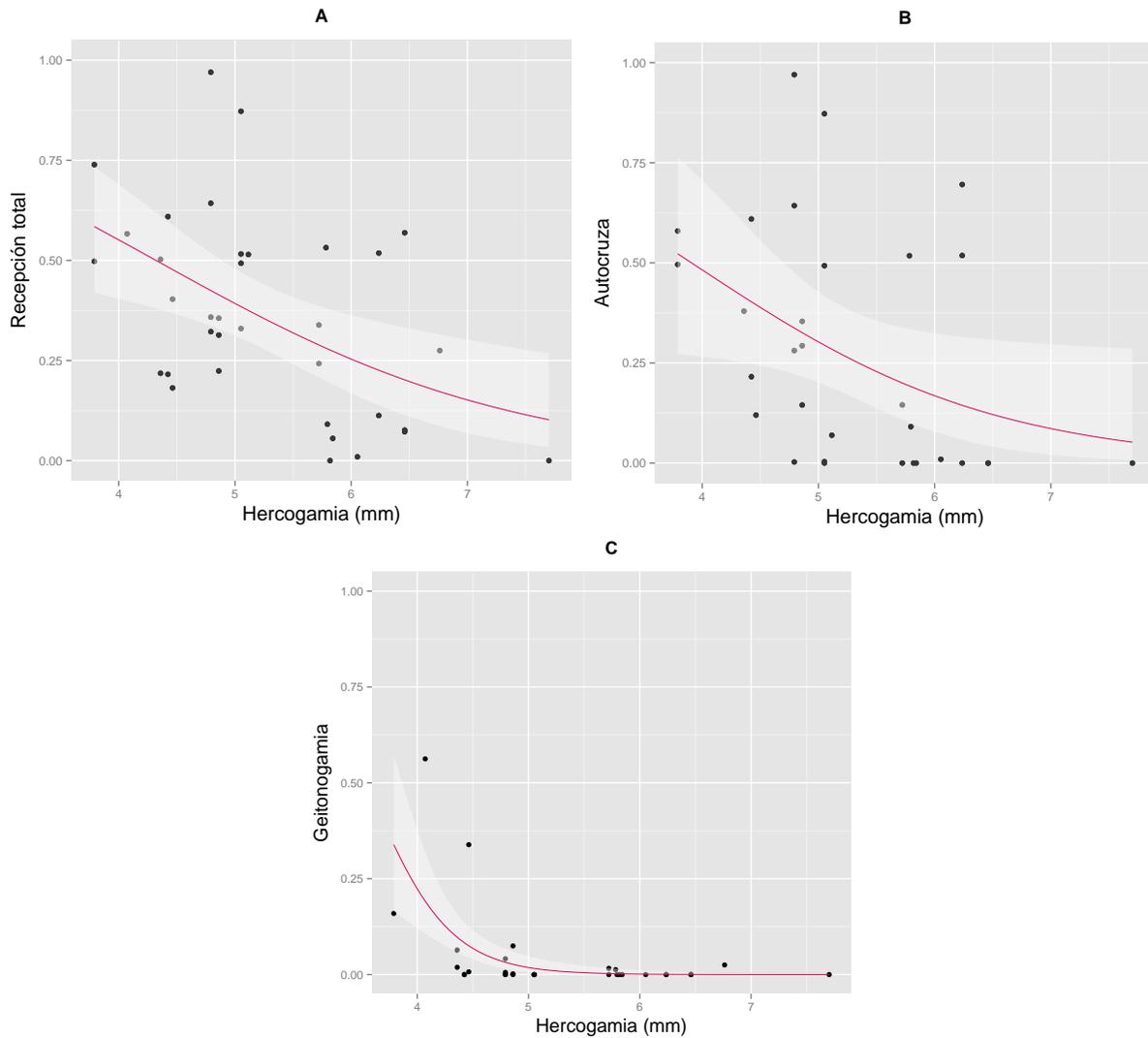


Figura 6. A: Recepción total relativa de polen y variación en hercogamia. $R^2=0.16$, $p=0.034$; B: Recepción relativa de polen proveniente de flores del mismo individuo y de la misma flor, y variación en hercogamia. $R^2=0.15$, $p=0.047$; C: Recepción relativa de polen proveniente de otro individuo y variación en hercogamia. $R^2=0.48$, $p=0.00034$.

Figura 7. Magnitud relativa de polen recibido según la longitud del estilo del receptor

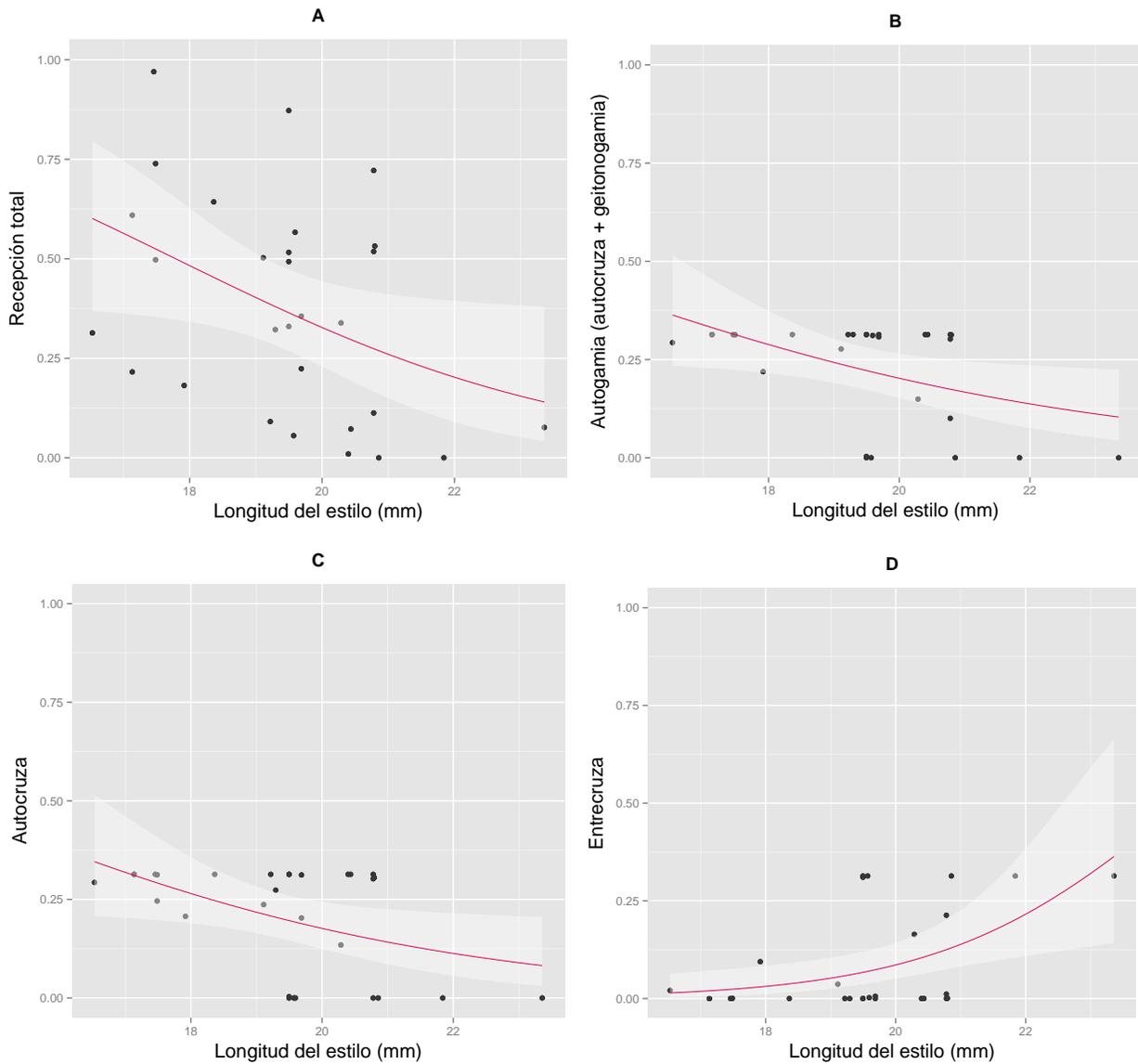


Figura 7. A: Recepción total relativa de polen y variación en la longitud del estilo. $R^2=0,15$, $p=0,046$; B: Recepción relativa de polen proveniente de flores del mismo individuo y de la misma flor, y variación en la longitud del estilo. $R^2=0,16$, $p=0,035$; C: Recepción relativa de polen proveniente de la misma flor y variación en la longitud del estilo. $R^2=0,15$, $p=0,040$; D: Recepción relativa de polen proveniente de otro individuo y variación en la longitud del estilo. $R^2=0,24$, $p=0,009$.

Figura 8. Magnitud relativa de polen recibido según la longitud de estambres del receptor

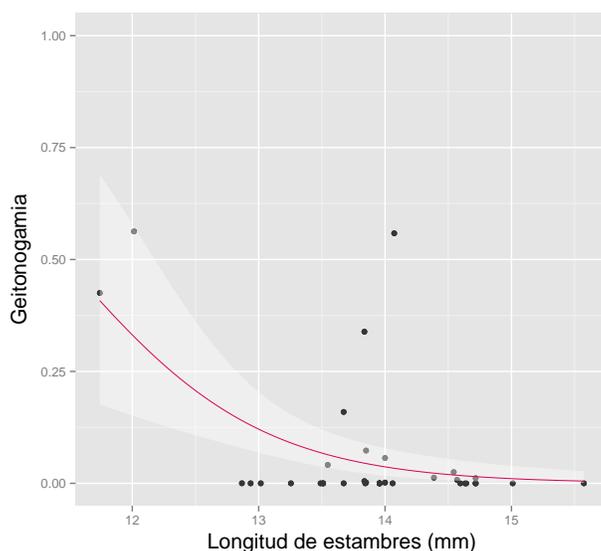


Figura 8. Recepción relativa de polen procedente del mismo individuo y variación en la longitud de estambres. $R^2=0.29$, $p=0.00073$.

Arquitectura floral y flujo polínico. Exportación

La tabla 3 ofrece una síntesis en lo que respecta a los efectos de la variación y covariación de los órganos reproductivos sobre los patrones de exportación de polen. En este caso, se observa que la variación en la longitud promedio de los estambres explica las diferencias en el flujo polínico de entrecruza únicamente. La mayor longitud de los estambres limita la exportación de polen hacia otras plantas.

Tabla 3. Asociación y efectos entre los elementos reproductivos de la arquitectura floral y la dinámica de exportación durante el flujo polínico

	Hercogamia	Longitud del estilo	Longitud de estambres	Integración
Recepción total	ns	ns	ns	ns
Autogamia	ns	ns	ns	ns
Autocruza	ns	ns	ns	ns
Geitonogamia	ns	ns	ns	*(-)
Entrecruza	ns	ns	*(-)	**(+)

Tabla 3. Modelos aditivos generalizados (GAM). Se muestran las asociaciones de cada interacción. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, ns: *no significativa*. Los efectos de las variables sobre la recepción se indican entre paréntesis: positivo (+) y negativo(-).

Figura 10. Variación en componentes de la recompensa floral e integración

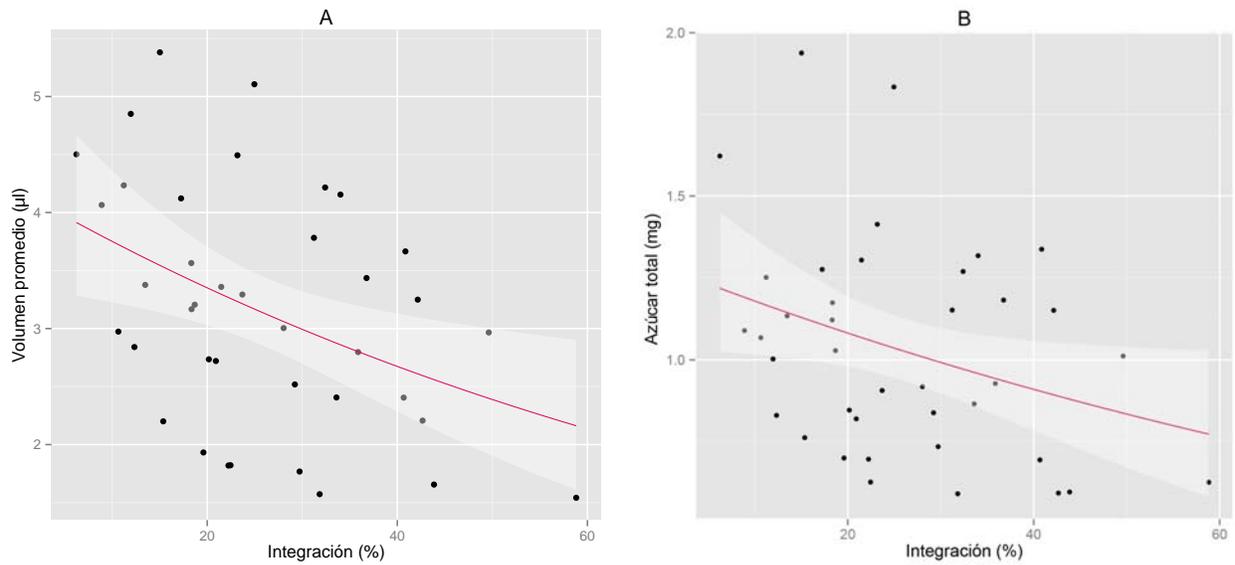


Figura 10. Asociación entre la integración floral y algunos componentes de recompensa en las flores. A: Variación en la integración floral y variación en el volumen promedio de néctar. $R^2=0.10$, $p=0.043$. B: Variación en la integración floral y variación en la cantidad total de azúcar en el néctar. $R^2=0.11$, $p=0.040$.

Integración floral y sistema de apareamiento

La integración floral se asocia con el desempeño de las funciones sexuales durante el transporte de polen (fig. 11). Por un lado, existe una correlación positiva entre la integración y la exportación de polen de entrecruza, e inversa en lo que se refiere a geitonogamia. Es decir, la integración influye en el desempeño sexual masculino disminuyendo la probabilidad de que el transporte de polen ocurra entre flores de la misma planta y favorece el flujo de polen entre plantas. Por otro lado, la integración está involucrada también en el desempeño de la función femenina pero en un patrón opuesto; es decir, la intensa covariación entre rasgos florales incrementa la probabilidad de que el polen recibido por las flores provenga de la misma planta (geitonogamia) y disminuye la probabilidad de que el polen recibido provenga de otro individuo (entrecruza). La integración incrementa el entrecruzamiento y podría reducir el costo de la cosexualidad mediante la disminución de la geitonogamia vía la función masculina. Asimismo, las pendientes de las curvas sugieren que la integración influye de forma más intensa sobre el componente masculino del desempeño sexual (exportación) que sobre el femenino (recepción).

Figura 11. El valor funcional de la integración floral sobre el sistema de apareamiento

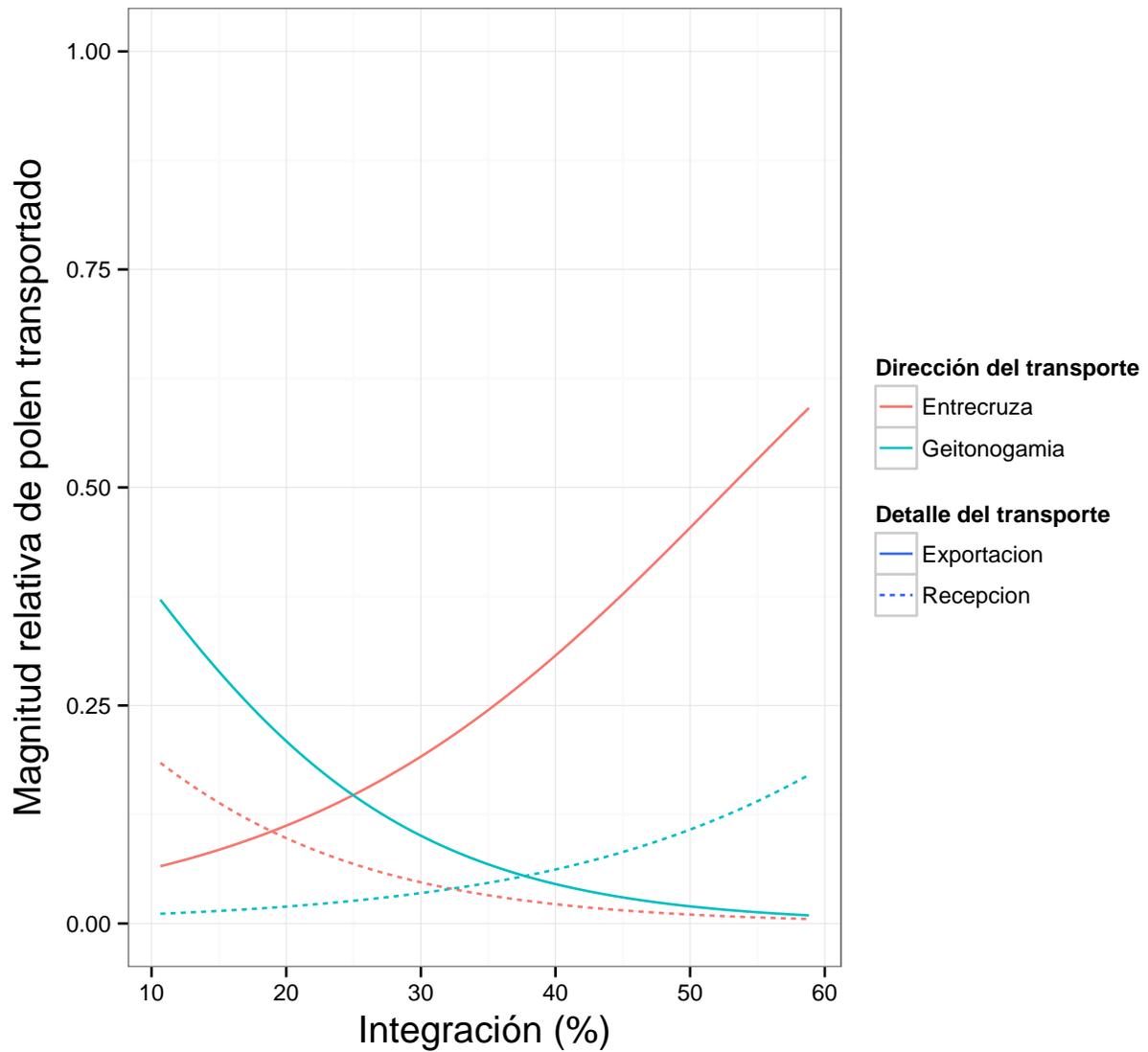


Figura 11. Efecto de la integración floral sobre el transporte de polen en *T. velutina*. **Exportación de entrecruza**, $R^2=0.21$, $p=0.0008$. **Exportación de geitonogamia**, $R^2=0.22$, $p=0.016$. **Recepción de entrecruza**, $R^2=0.21$, $p=0.026$. **Recepción de geitonogamia**, $R^2=0.14$, $p=0.043$.

Discusión

Aunque en los últimos años se ha incrementado el número de estudios que abordan la integración floral como un carácter adaptativo en Angiospermas, la evidencia de los mecanismos que determinan las asociaciones entre rasgos, así como su valor adaptativo y funcional, resultan aún controversiales (Murren *et al.*, 2002; Tucić *et al.*, 2013). La principal dificultad para dilucidar tales mecanismos radica en la complejidad de interacciones que la integración floral comprende en una escala ecológica. Las circunstancias en las que tales interacciones ocurren pueden cambiar drásticamente (Ishii y Harder, 2012) y presentarse a distintos niveles, desde lo relacionado con la composición de los polinizadores, hasta aspectos propios de la ontología de las plantas como la cantidad de flores producidas por cada individuo (Diggle, 2014). En el caso de plantas polinizadas por animales se ha entendido, al menos teóricamente, que los patrones e intensidad de covariación entre los rasgos responden principalmente a la selección mediada por polinizadores (Berg, 1960; Stebbins, 1974). Sin embargo, aunque se ha reportado variación entre poblaciones en términos de la integración y el sistema de apareamiento (Ferrero *et al.*, 2010; Rosas-Guerrero *et al.*, 2011), no se tiene evidencia clara de su covariación ni de los mecanismos que podrían estar involucrados en dichas asociaciones (Fornoni *et al.*, en prensa).

En este estudio se analizó, en primer lugar, si debido a la cosexualidad las funciones sexuales ejercen interferencia recíproca sobre los patrones de flujo de polen en términos de la cantidad de polen exportado y recibido. Los resultados indican que no parece existir un costo importante del hermafroditismo sobre los componentes de las funciones sexuales en ese sentido y que el principal patrón de transporte de polen corresponde a autogamia en esta población. Posteriormente se examinó el papel de la covariación entre rasgos florales (integración) sobre el desempeño sexual de *T. velutina* en términos del sistema de apareamiento. En este sentido, la integración está asociada con la variación en la morfología de los órganos reproductivos y el volumen promedio del néctar producido por las flores, así como con la cantidad total de azúcar que éste contiene. Estos rasgos, en conjunto, actúan de formas específicas sobre distintos componentes del sistema de apareamiento mediado por los polinizadores durante el flujo polínico y modifican las proporciones en las que el transporte de polen se lleva a cabo.

El sesgo del sistema de apareamiento en *T. velutina* hacia la autogamia (fig. 4) sugiere que el transporte de polen ocurre en mayor medida al interior del mismo individuo ya sea entre flores de la misma planta o al

interior de cada flor. Pese a la cosexualidad, los verticilos sexuales no ejercen un efecto negativo recíproco en términos del transporte de polen. Además, como se muestra en la tabla 1 y la figura 3, sería poco probable que una variante floral unisexual invada la población hermafrodita debido a su bajo desempeño en términos del sistema de apareamiento. Por esa razón el hermafroditismo podría ser una estrategia evolutivamente estable en esta población. Aunque esta hipótesis requiere de un diseño experimental particular para ser puesta a prueba, los resultados aquí mostrados permiten considerar esa posibilidad.

Una vez determinado que las funciones sexuales parecen no ejercer presiones recíprocas que comprometan su desempeño durante el flujo polínico, otro tipo de análisis centrado en el desempeño sexual de los verticilos podrían refinar la interpretación funcional de la sinergia sexual. La caracterización del desempeño sexual durante el flujo polínico precisa no sólo de las magnitudes totales de polen transportado en los arreglos sino también de aspectos ecológicos que permitan explicar del desperdicio de polen (Ashman *et al.*, 2004; Sletvold y Agren, 2014) o la incidencia de presiones selectivas asociadas con los polinizadores. El análisis de la variación en hercogamia y de la covariación entre los rasgos reproductivos de las flores puede ser útil para determinar dos aspectos importantes. En primer lugar permitiría mostrar qué mecanismos influyen en que el desempeño de los verticilos sexuales se incremente y por otra parte si ese incremento se asocia con la eficiencia en el transporte y responde a la variación en los rasgos presentes en la población.

La longitud del estilo influye en la cantidad de polen recibido proveniente de flores de otro individuo (fig. 7d). La arquitectura del verticilo femenino y el comportamiento del polinizador podrían mostrar que las plantas con estilos más largos se exponen de forma tal a los polinizadores que éstos, al llegar a la flor, entran en contacto con el estilo en primera instancia. Este patrón de forrajeo es particularmente común en plantas con flores que presentan hercogamia de aproximación (Luo y Widmer, 2013), como *T. velutina*.

Con respecto a los caracteres sexuales masculinos, la variación en la longitud de los estambres influyó de forma significativa únicamente sobre las diferencias encontradas en la recepción de polen intra-individual (geitonogamia). Debido a que en este caso la disposición de los estambres implica (en longitudes cortas) mayor proximidad con los estigmas (menor hercogamia), es de esperarse que un aumento en la longitud de éste limite el contacto del polinizador con el verticilo sexual femenino (Barrett, 1998; 2002; Medrano *et al.*, 2005; 2012). Según los resultados la variación en la morfología de los verticilos sexuales, por sí mismos, explica parte de la dinámica del flujo polínico.

Además del efecto de la variación en los rasgos sexuales individuales indicado anteriormente, la covariación entre éstos tiene a su vez un efecto sobre los patrones de transporte de polen. En este sentido la hercogamia, caracterizada típicamente como un mecanismo que condiciona la recepción de polen de autogamia (Luo y Widmer, 2013) y que reduce los costos de la cosexualidad disminuyendo la autocruza o aumentando la entrecruza (Webb y Lloyd, 1986; Barrett, 2003; Takebayashi *et al.* 2006; Herlihy y Eckert, 2007; Medrano *et al.*, 2012), ejerce efectos sobre los patrones en los que se lleva a cabo el flujo de polen mediado por polinizadores. En plantas en las que la variación en hercogamia depende primordialmente del estilo, como se muestra en el caso de *T. velutina*, la proporción de polen de entrecruza que es recibido aumenta en la medida que los polinizadores entran en contacto con el estigma en flores cuyos estilos tienen mayor longitud (Herlihy y Eckert, 2007; Forrest *et al.*, 2011; Medrano *et al.*, 2012). En términos evolutivos, la selección sobre la variación en hercogamia representa un mecanismo asociado con el ajuste de las poblaciones de Angiospermas en relación con los patrones de apareamiento (Medrano *et al.*, 2005). Aunque el valor funcional de la hercogamia para promover la entrecruza no siempre resulta tan claro, los resultados de este estudio en ese sentido coinciden con lo reportado para otros géneros con patrones de variación en estilo y hercogamia similares, como *Narcissus* (Medrano *et al.*, 2005).

En términos de la función femenina los resultados aquí mostrados son consistentes con la hipótesis funcional clásica sobre el efecto de la hercogamia que establece que la distancia que separa a los órganos sexuales (en el patrón particular de la hercogamia de aproximación) opera en contra de la autopolinización y de una posible endogamia (Luo y Widmer, 2013). Tal asociación implica que flores poco hercógamas presentan una mayor proporción de polen transportado de autocruza, como se muestra en la figura 6b. En otras especies del género *Turnera* y en familias distintas a Passifloraceae (Karron *et al.*, 1997; Brunet y Eckert, 1998; Motten y Stone, 2000) se han reportado evidencias de que existe relación entre la separación de los verticilos sexuales y el flujo polínico (Bellaousoff y Shore, 1995). En este sentido *T. velutina* cumple con las condiciones ideales (*sensu* Luo y Widmer, 2013) para manifestar tal asociación entre la hercogamia y el transporte de polen por tratarse de una especie que presenta los rasgos típicos del síndrome de la autogamia. Esto es, plantas autocompatibles con gran incidencia de autocruza, marcada variación en hercogamia y despliegues florales relativamente pequeños.

Aunque idealmente la hercogamia se asocia con el efectivo transporte de polen entre plantas (Luo y Widmer, 2013) y en términos más generales la hercogamia pueda derivar en el establecimiento de poblaciones

heteromórficas (de Vos *et al.*, 2014), en el presente estudio no se encontró correlación entre la hercogamia y la entrecruza directamente. Los resultados aquí mostrados no sustentan la hipótesis planteada de que en plantas con mayor hercogamia se favorece la entrecruza (tabla 2, 3). El mecanismo de separación espacial de las funciones sexuales parece operar sobre la función femenina en términos de la recepción de polen total, así como en la de autogamia únicamente. Con respecto a la exportación (función masculina), no se manifiesta un efecto directo de la hercogamia ni de la longitud del estilo sobre el patrón de transporte de polen (tabla 3).

El efecto completo de la integración floral sobre el sistema de apareamiento de *T. velutina* (figura 11) muestra que los resultados de este estudio son consistentes con la hipótesis que predice que la integración floral favorecería el intercambio de polen entre plantas (Berg, 1960). Es decir, la integración floral se asocia positivamente con la exportación de polen de manera que las plantas con flores cuya covariación entre rasgos es más intensa, son más efectivas para la exportación de polen hacia otras plantas (entrecruza). Además, los niveles altos de integración parecen contribuir también a que se reduzca la geitonogamia mediante la función masculina. Las plantas con niveles bajos de integración presentan un patrón de transporte de polen opuesto al descrito anteriormente; esto es, reciben poca cantidad de polen proveniente de otras flores de la misma planta e incrementan la recepción del polen que llega de otras plantas.

Los resultados mostrados en la figura 11 sustentan la hipótesis de que la variación en la integración floral pudiera ser parte importante del síndrome de la autogamia (Fornoni *et al.*, en prensa). Como se mencionó anteriormente, las plantas caracterizadas con este síndrome presentan niveles elevados de autogamia. Según muestran los resultados, las flores menos integradas tienden a exportar polen en mayor proporción hacia otras flores de la misma planta (geitonogamia) con respecto al que se dirige, mediante el polinizador, a otros individuos (entrecruza). Los valores bajos de integración favorecen la autogamia vía la función masculina (exportación) mientras que los valores altos de integración floral en la población están presentes en flores involucradas en mayores proporciones relativas de autogamia vía la función femenina (recepción). La incidencia de la autogamia en la población, entonces, puede ser favorecida a partir de individuos cuya integración floral sea baja o alta.

Si la selección favorece la autogamia como sistema de apareamiento, como parece ocurrir en esta población, la integración floral baja (*i.e.* covariación poco intensa entre rasgos) resultaría ventajosa debido a que ésta contribuye a incrementar la exportación hacia flores del mismo individuo. Así, la selección mediada

por polinizadores podría promover el desacoplamiento de los órganos florales, lo que finalmente se manifieste en una integración floral menos intensa (Fornoni *et al.*, en prensa). A ese respecto, los resultados de este estudio son consistentes con esa predicción y con lo obtenido por Anderson y Busch (2006) para especies autocompatibles de *Leavenworthia*. En ese estudio se muestra que las especies autocompatibles mantienen valores bajos de integración con respecto a los de las especies autoincompatibles del género. Esto sugeriría que la presión de selección asociada con la autogamia influye en mantener la covariación de los rasgos sexuales florales en niveles relativamente bajos.

Si la selección favoreciera el entrecruzamiento, un aumento en la integración sería favorecido de igual manera. Esto situaría a las plantas ante dos escenarios que pueden resultar ventajosos. En un primer escenario, dentro del gradiente de variación en que los valores promedio de integración floral pueden observarse, la intensidad de covariación entre rasgos puede provocar que las plantas sean más efectivas en lo que se refiere a la función masculina (exportación) si se favorece el transporte de polen entre plantas. Asimismo, considerando la proporción de autocruza presente en la población de *T. velutina*, altos niveles de integración podrían resultar ventajosos específicamente sobre el componente sexual femenino (recepción) si el transporte intraindividual (geitonogamia) se incrementa. En otro escenario, las plantas con niveles bajos de integración incrementan la entrecruza y disminuyen la geitonogamia en términos de la función femenina (recepción), mientras que su patrón de exportación (función masculina) favorece el flujo polínico entre flores de la misma planta.

Como se muestra en la figura 11, la integración floral podría implicar para las plantas disminuir el costo del desperdicio de polen mediante una reducción en la probabilidad de que cierta fracción del polen exportado se dirija hacia flores de la misma planta. De esta forma las flores más integradas disminuyen su exportación en lo que se refiere a la geitonogamia (línea verde sólida) y podrían reducir mediante la integración floral el desperdicio de polen, una de las principales desventajas que implica este patrón de apareamiento (Harder *et al.*, 2000, Liao y Harder, 2014). Si la selección favorece un sesgo fuerte en el sistema de apareamiento hacia la autogamia, resultaría ventajoso tener una baja integración floral que incremente la geitonogamia. Dicho de otra forma, en plantas como *T. velutina*, al considerar su sistema de apareamiento y el bajo costo de la cosexualidad, la poca integración floral resulta favorable. Por otra parte, si la selección actúa de forma intensa para incrementar la entrecruza en esta población, se favorecería un aumento en la integración floral.

Uno de los grandes retos al caracterizar el valor de la integración floral consiste en identificar los mecanismos a través de los cuales se condiciona el movimiento de polen (Alcantara *et al.*, 2013). Al respecto se ha planteado históricamente que la correspondencia morfológica entre el cuerpo de los polinizadores y las partes florales pudieran ser determinantes sobre la manera en la que éstos remueven el polen de las anteras y posteriormente lo depositan sobre los estigmas (Berg 1960). Otros estudios han explorado la posibilidad de que la integración se asocie con la composición y diversidad de polinizadores, visitantes florales o bien, que influya de alguna forma en el patrón de forrajeo por parte del polinizador y el subsecuente intercambio polínico (Anderson y Busch, 2006; González *et al.*, 2014). Considerando la gran proporción de autogamia en esta población, es posible que los polinizadores habituales de *T. velutina* manipulen a las flores por un tiempo suficiente que le permita a la planta, dada su arquitectura, depositar mayor cantidad de polen sobre el cuerpo del insecto y así incrementar la probabilidad de exportación y/o recepción subsecuente.

En este estudio se observó que plantas con valores altos de integración invirtieron menor cantidad de recursos en la producción de néctar (fig. 10a, b). Es posible que la integración, al incrementar la eficiencia en el transporte, permita a las plantas reducir la inversión en recompensa ya que con menor tiempo de manipulación de la flor se lograría la exportación exitosa del polen. Esta explicación coincide con lo reportado para *Alstroemeria lightu*, donde los polinizadores invierten menor tiempo manipulando las flores en poblaciones con mayor integración floral (González *et al.*, 2014). Asimismo, una mayor integración asociada con menor cantidad de recompensa promovería que los polinizadores incrementaran sus tasas de visita. Ésta es una posibilidad interesante si se considera que tal patrón de forrajeo en abejas es común (Waddington y Gottlieb, 1992; Cnaani *et al.*, 2006), de tal forma que la atracción de polinizadores junto con la ventaja que confieren los mecanismos al promover la eficiencia en el transporte de polen resulten importantes en el éxito reproductivo (Kulbaba y Worley, 2012).

La integración floral puede no ser un mecanismo asociado necesariamente con la cantidad total de polen que se transporta sino con su dirección; es decir, con el patrón en el que los polinizadores mueven los gametos entre flores. De esa forma, como predice la hipótesis de Berg (1960) y se observa en este estudio, la integración floral sería un rasgo relacionado con el sistema de apareamiento. Específicamente, las correlaciones lábiles entre rasgos florales (bajos niveles de integración) podrían estar presentes en aquellas plantas cuya proporción de autogamia es mayor (Anderson y Busch, 2006). Los resultados obtenidos en este estudio

sugieren que las flores más integradas están involucradas en una mayor exportación de polen entre plantas (entrecruza). Para determinar el mecanismo que influye en esta asociación podría ser útil la caracterización del comportamiento del polinizador durante el forrajeo.

Los resultados mostrados en la figura 11 que indican que la exportación de polen de geitonogamia se incrementa en función de la mayor integración floral, podrían corroborarse a partir de un diseño experimental que considere el comportamiento de forrajeo del polinizador y arroje información valiosa sobre los mecanismos subyacentes en la dinámica de la polinización en asociación con la integración floral. El patrón de forrajeo suele depender de la evaluación del menor costo posible para el polinizador (Waddington y Gottlieb, 1990). En este sentido, se ha observado que el volumen de néctar en una flor influye de forma importante en el tiempo de forrajeo en abejas. Si existe en *T. velutina* un patrón similar al encontrado por González et al. (2014) en el que las flores más integradas reciben visitas menos prolongadas por parte de los polinizadores, se podría poner a prueba la hipótesis funcional que relacione la integración floral con el comportamiento de forrajeo del polinizador. Según el razonamiento anterior, las plantas poco integradas de *T. velutina*, que producen a su vez abundante néctar, recibirían a polinizadores cuya elección de forrajeo podría sesgarse a mantenerse en la misma planta, entre flores que ofrecen un volumen y cantidad total de azúcar similares.

El claro sesgo del sistema de apareamiento que presenta *T. velutina* sugiere que las presiones de selección impuestas hasta ahora han favorecido la autogamia. Una explicación posible para este resultado es la ventaja que la poliploidía, derivada de la historia evolutiva de *T. velutina* desde poblaciones ancestrales heteromórficas (Barrett, 1978, Truyens et al., 2005), confiere al reducir los costos de este sistema de apareamiento (Charlesworth y Charlesworth, 1987). Ecológicamente, como se mencionó anteriormente, la variación en la integración floral podría ser un mecanismo que favorezca la autogamia de forma indirecta.

Los patrones de comportamiento del polinizador al manipular las flores pueden modular la evolución de las estructuras florales mediante la efectividad de transporte que corresponda al sistema de apareamiento o según las implicaciones de dicho comportamiento sobre el flujo polínico (Sletvold y Agren, 2014). Por ejemplo, si el sesgo conductual de la abeja se relaciona con tiempos cortos de manipulación de las flores (Sanderson et al., 2006), podría existir una presión intensa a favor de una mayor integración floral (González et al., 2014). Si por el contrario la selección actuara a favor del aumento en el volumen y azúcar del néctar floral o sobre el

transporte de polen intraindividual que incremente la autogamia, los valores bajos de integración floral serían ventajosos. Los resultados mostrados aquí no son suficientes para ahondar en esa hipótesis por el momento.

Sin duda, estudios que aborden la conducta de los polinizadores durante el forrajeo y manipulación de las flores podrían dar luz sobre cómo se conforman las presiones selectivas a las que finalmente estarán sometidos los rasgos florales y la intensidad de sus asociaciones, así como sobre la variedad de interacciones en las que se lleva a cabo la polinización y sus mecanismos (Armbruster *et al.*, 2009). Una vez mostrado que la integración influye en el sistema de apareamiento se podría avanzar en el estudio de una posible asociación entre la variación en la recompensa y su efecto en el transporte de polen. Esto permitiría conocer con mayor detalle los mecanismos que pueden dar cuenta de la asociación entre la integración floral y el patrón en el que se mueve el polen en la población.

La integración floral es un carácter complejo cuyo valor funcional tiene dos aristas que apuntan hacia el transporte de polen así como a la magnitud de las correlaciones que la conforman. Por un lado la baja correlación entre atributos florales permite, mediante una recompensa atractiva para el polinizador como es la cantidad total de azúcar contenido en un gran volumen de néctar, afinar la función femenina (recepción) e incrementar el transporte de polen intraindividual. La alta correlación entre rasgos florales, por otro lado, parecería tener un rol más importante sobre la función masculina, ajustando la exportación de tal manera que se incremente el transporte de polen entre plantas. De este modo, mediante variación en la recompensa y la covariación en la morfología de los órganos florales, *T. velutina* podría sesgar el comportamiento del polinizador, incidir en su patrón de forrajeo y finalmente promover un patrón particular de transporte de polen que le resulte beneficioso en determinados contextos ecológicos.

La integración floral no implica que exista necesariamente una morfología característica asociada a valores altos o bajos de este carácter en lo particular. En otras palabras, plantas con alta o baja hercogamia, de estilos y estambres largos o cortos, podrían resultar más o menos integrados de forma indistinta. Esto se debe a que no existe asociación entre la hercogamia y la integración floral o entre ésta y la variación en la longitud de los caracteres sexuales (estilos y estambres). La incidencia y relevancia de la integración floral radica en que dentro de las poblaciones, al existir variación suficiente en algunos de sus rasgos, la integración opera para estructurar dicha variación en patrones determinados debido a que distintos elementos fenotípicos pueden estar regulados por los mismos genes (Hallgrímsson *et al.*, 2009; Smith, 2015).

En términos generales y como se muestra en este estudio, los patrones de covariación entre atributos florales pueden incidir en última instancia sobre la forma en la que se transporta el polen entre las flores, con mediación de los polinizadores. Esto podría ocurrir mediante su patrón de forrajeo impulsado por las diferencias en el volumen de néctar y cantidad total de azúcar en éste. Así, el polen es depositado sobre el cuerpo del insecto y posteriormente transportado de una forma que podría ser ventajosa para la planta. Como se ha mostrado en numerosos estudios, un gran número de factores como la morfología, densidad floral, estructura de la recompensa y otros, inciden en el comportamiento de los polinizadores (Benitez-Vieyra *et al.*, 2006; Ishii y Harder, 2006; Liu *et al.*, 2007; Makino *et al.*, 2007).

En conjunto, los resultados de este estudio sugieren que el movimiento de polen mediado por polinizadores, específicamente en lo que corresponde a exportación de polen, es un factor que incide de forma importante sobre la integración floral y viceversa. Las presiones selectivas que promuevan la integración podrían incrementar a su vez la proporción de entrecruza presente en la población vía la función sexual masculina (exportación). De esta manera la función masculina podría influir de forma más intensa en la integración floral en la población mediante un mecanismo que involucre por un lado la variación en algunos componentes de la recompensa floral y por otro, en términos más generales, el comportamiento del polinizador durante el transporte de polen. La integración floral podría ejercer un efecto sobre el sistema de apareamiento mediante distintas vías. Primero la variación en la recompensa, luego las implicaciones que la magnitud de ésta tiene sobre el comportamiento del polinizador durante el forrajeo, y la arquitectura floral que determine finalmente los patrones de transporte de polen y el éxito reproductivo a este nivel. En conjunto, dichos factores podrían operar de forma coordinada para modular la variación y covariación en los rasgos florales, y este mecanismo a su vez, influir sobre el sistema de apareamiento.

Referencias

- Alcantara S, de Oliveira FB y Lohmann LG. 2013. Phenotypic integration in flowers of neotropical lianas: Diversification of form with stasis of underlying patterns. *Journal of Evolutionary Biology* 26(10): 2283-2296.
- Anderson I y Busch JW. 2006. Pollinator - Mediated Selection Weakens Floral Integration in Self-compatible taxa of *Leavenworthia* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 93(6): 860-867.
- Arbo, M. M. 2005. Estudios sistemáticos en *Turnera* (Turneraceae). III. Series. *Anomalae y Turnera*. *Bonplandia* 14(3-4): 115-318.
- Armbruster WS, Di Stilio VS, Tuxill JD, Flores TC y Velasquez Runk JL. 1999. Covariance and decoupling of floral and vegetative traits in nine neotropical plants: a re-evaluation of Berg's correlation-pleiades concept. *American Journal of Botany* 86:39-55.
- Armbruster WS, Pelabon C, Hansen TF y Mulder CPH. 2004. Floral integration, modularity, and accuracy: distinguishing complex adaptations from genetic constraints. Pp. 23-49 en M Pigliucci, y K Preston, eds. *Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes*. Oxford University Press, Oxford.
- Armbruster WS, Hansen TF, Pelabon C, Perez-Barrales R y Maad J. 2009. The adaptive accuracy of flowers: measurement and microevolutionary patterns. *Annals of Botany* 103(9): 1529-1545.
- Armbruster WS, Pélabon C, Bilstad GH y Hansen TF. 2014. Integrated phenotypes: understanding trait covariation in plants and animals. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B* 369.
- Arnqvist G y Rowe L. 2005. *Sexual conflict: monographs in behavior and ecology*. Princeton University Press, Princeton.
- Ashman T-L y Morgan MT. 2004. Explaining phenotypic selection on plant attractive characters: male function, gender balance or ecological context? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271(1539): 553-559.
- Barrett SCH 1978. Heterostyly in a tropical weed: the reproductive biology of *Turnera ulmifolia* complex (Turneraceae). *Canadian Journal of Botany* 56: 1713-1725.
- Barrett SCH. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in Plant Science* 3(9): 335-341.

- Barrett SCH. 2002.** Sexual interference of the floral kind. *Heredity* **88**(2): 154-159.
- Barrett SCH. 2003.** Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B* **358**(1434): 991-1004.
- Barrett SCH. 2013.** The evolution of plant reproductive systems: how often are transitions irreversible? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**(1765): 20130913.
- Belaoussoff S y Shore JS. 1995.** Floral correlates and fitness consequences of mating system variation in *Turnera ulmifolia*. *Evolution* **49**: 545–556.
- Bell G. 1985.** On the function of flowers. *Proceedings of the Royal Society London Series B* **224**: 223-265.
- Benítez-Vieyra S, Medina AM, Glinos E y Cocucci AA 2006.** Pollinator-mediated selection on floral traits and size of floral display in *Cyclopogon elatus*, a sweat bee-pollinated orchid. *Functional Ecology*, **20**:948-957.
- Benítez-Vieyra S, Ordano M, Fornoni J, Boege K, y Domínguez CA. 2010.** Selection on signal-reward correlation: Limits and opportunities to the evolution of deceit in *Turnera ulmifolia* L. *Journal of Evolutionary Biology* **23**(12): 2760-2767.
- Berg RL. 1960.** The Ecological Significance of Correlation Pleiades. *Evolution* **14**(2): 171-180.
- Bertin RI y Newman CM. 1993.** Dichogamy in angiosperms. *The Botanical Review* **59**(2): 112-152.
- Brunet J y Eckert CG. 1998.** Effects of floral morphology and display on outcrossing in Blue Columbine, *Aquilegia caerulea* (Ranunculaceae). *Functional Ecology* **12**: 596–606.
- Charlesworth D y Charlesworth B. 1987.** Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**:237– 268.
- Cnaani J, Thomson JD y Papaj DR. 2006.** Flower choice and learning in foraging bumblebees: Effects of variation in nectar volume and concentration. *Ethology* **112**(3): 278-285.
- Conner JK y Lande R. 2014.** Raissa L. Berg's contributions to the study of phenotypic integration, with a professional biographical sketch. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B* **369**(1649): 1-4.

- De Vos JM, Wüest RO y Conti E. 2014. Small and Ugly? Phylogenetic Analyses of the «Selfing Syndrome» Reveal Complex Evolutionary Fates of Monomorphic Primrose Flowers. *Evolution* 68(4): 1042-1057.
- Diggle PK. 2014. Modularity and intra-floral integration in metameric organisms: plants are more than the sum of their parts. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B* 369(1649): 20130253.
- Ferrero V, Arroyo J, Vargas P, Thompson JD, y Navarro L. 2010. Evolutionary transitions of style polymorphisms in *Lithodora* (Boraginaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 11(2): 111-125.
- Fetscher AE. 2001. Resolution of male-female conflict in an hermaphroditic flower. *Proceedings of the Royal Society London Series B* 268(1466): 525-529.
- Fornoni J, Boege K, Domínguez CA y Ordano M. 2008. How little is too little? The adaptive value of floral integration. *Communicative and Integrative Biology* 1(1): 56-58.
- Fornoni J, Ordano M, Boege K y Domínguez CA. 2009. Phenotypic integration: between zero and how much is too much. *New Phytologist* 183: 248-250.
- Forrest JRK, Ogilvie JE, Goriscek AM y Thomson JD. 2011. Seasonal change in a pollinator community and the maintenance of style length variation in *Mertensia fusiformis* (Boraginaceae). *Annals of Botany* 108(1): 1-12.
- González A V., Murúa MM y Pérez F. 2014. Floral integration and pollinator diversity in the generalized plant-pollinator system of *Alstroemeria ligta* (Alstroemeriaceae). *Evolutionary Ecology* 29(1): 63-75.
- Guo W, Wang L-L, Sun S, Yang Y-P y Duan Y-W. 2014. Sexual interference in two *Chamerion* species with contrasting modes of movement herkogamy. *Journal of Systematics and Evolution* 52(3): 355-362.
- Hallgrímsson B, Jamniczky H, Young NM, Rolian C, Trish E, Boughner JC y Marcucio RS. 2009. Deciphering the Palimpsest: Studying the Relationship Between Morphological Integration and Phenotypic Covariation. *Evolutionary Biology* 36(4): 355-376.
- Harder LD, Barrett SCH y Cole WW. 2000. The mating consequences of sexual segregation within inflorescences of flowering plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 267(1441): 315-320.

- Harder D y Barrett SCH. 2006. Ecology and evolution of flowers. Oxford University Press, New York. 392 pp.
- Hastie T y Tibshirani R. 1990. **Generalized Additive Models**. London: Chapman and Hall.
- Herlihy CR y Eckert CG. 2002. Genetic cost of reproductive assurance in a self-fertilizing plant. *Nature* 416(6878): 320-323.
- Herrera CM y Pellmyr O. Eds. 2002. Plant-Animal Interactions. An Evolutionary Approach. Blackwell Science, Oxford.
- Holsinger KE, Feldman MW y Christiansen FB. 1984. The evolution of self-fertilization in plants: a population genetic model. *American Naturalist* 124:446–453.
- Ishii HS y Harder LD. 2012. Phenological associations of within- and among-plant variation in gender with floral morphology and integration in protandrous *Delphinium glaucum*. *Journal of Ecology* 100(4): 1029-1038.
- Karron JD, Ivey CT, Mitchell RJ, Whitehead MR, Peakall R y Case AL. 2012. New perspectives on the evolution of plant mating systems. *Annals of Botany* 109(3): 493-503.
- Klingerberg CP. 2008. Morphological integration and developmental modularity. *Annual Reviews of Ecology, Evolution and Systematics* 39: 115- 132 .
- Kulbaba MW y Worley AC. 2014. Patterns of pollen removal and deposition in *Polemonium brandegeei* (Polemoniaceae): the role of floral visitors, floral design and sexual interference. *Plant Biology* 16: 1087-1095.
- Lankinen A y Larsson MC. 2007. Conflicting selection pressures on reproductive functions and speciation in plants. *Evolutionary Ecology* 23: 147-157.
- Liao W-J y Harder LD. 2014. Consequences of Multiple Inflorescences and Clonality for Pollinator Behavior and Plant Mating. *The American Naturalist* 184(5): 580-592.
- Liu F, Chen J, Chai J, Zhang X, Bai X, He D y Roubik DW. 2007. Adaptive functions of defensive plant phenolics and a non-linear bee response to nectar components. *Functional Ecology* 21: 96–100.
- Lloyd DG. 1992. Self-fertilization and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences* 153:370–380.

- Lloyd DG y Barrett SCH. Eds. 1996. *Floral Biology: Studies on Floral Evolution in Animal-Pollinated Plants*. Chapman & Hall, New York.
- Luo Y y Widmer A. 2013. Herkogamy and Its Effects on Mating Patterns in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 8(2).
- Madjidian JA y Lankinen A. 2009. A next-generation approach to the characterization of a non-model plant transcriptome. *PLoS ONE* 4(5): e5477.
- Makino TT, Ohashi K y Sakai S. 2007. How do floral display size and the density of surrounding flowers influence the likelihood of bumble bee revisitation to a plant? *Functional Ecology* 21: 87–95
- Medrano M, Herrera CM y Barrett SCH. 2005. Herkogamy and mating patterns in the self-compatible daffodil *Narcissus longispathus*. *Annals of Botany* 95(7): 1105-1111.
- Medrano M, Requerey R, Karron JD y Herrera CM. 2012. Herkogamy and mate diversity in the wild daffodil *Narcissus longispathus*: Beyond the selfing-outcrossing paradigm in the evolution of mixed mating. *Plant Biology* 14(5): 801-810.
- Motten AF y Stone JL. 2000. Heritability of stigma position and the effect of stigma–anther separation on outcrossing in a predominantly self-fertilizing weed, *Datura stramonium* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 87: 339–347.
- Murren CJ, Pendleton N y Pigliucci M. 2002. Evolution of phenotypic integration in *Brassica* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 89(4): 655-663.
- Murren CJ. 2012. The integrated phenotype. *Integrative and Comparative Biology* 52(1): 64-76.
- Obbard DJ, Harris SA, Buggs RJA y Pannell JR. 2006. Hybridization, polyploidy, and the evolution of sexual systems in *Mercurialis* (Euphorbiaceae). *Evolution* 60(9): 1801-1815.
- Ordano M, Fornoni J, Boege K y Domínguez CA. 2008. The adaptive value of phenotypic floral integration. *New Phytologist* 179(4): 1183-1192.
- Pigliucci M y Preston K. 2004. *Phenotypic integration. Studying the ecology and evolution of complex phenotypes*. New York: Oxford University Press.

- R Core Team. 2014.** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Ramos-Castro SE. 2013.** Determinación del componente genético de la media y la varianza en las señales y recompensas de las plantas a sus polinizadores. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología, UNAM, México. 45 p.
- Rosas-Guerrero V, Quesada M, Armbruster WS, Pérez-Barrales R y Smith SD. 2011.** Influence of pollination specialization and breeding system on floral integration and phenotypic variation in *Ipomoea*. *Evolution* **65**: 350-364.
- Routley MB y Husband BC. 2006.** Sexual interference within flowers of *Chamerion angustifolium*. *Evolutionary Ecology* **20**(4): 331-343.
- Sanderson CE, Orozco BS, Hill PSM y Wells H. 2006.** Honeybee (*Apis mellifera ligustica*) Response to Differences in Handling Time, Rewards and Flower Colours. *Ethology* **112**(10): 937-946.
- Smith SD. 2015.** Pleiotropy and the evolution of floral integration. *New Phytologist* doi:10.1111/nph.13583.
- Stebbins GL. 1950.** *Variation and evolution in plants*. Columbia University Press, New York.
- Stebbins GL. 1970.** Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I: Pollination mechanisms. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* **1**:307–26.
- Stebbins GL. 1974.** Flowering Plants: Evolution Above the Species Level. Belknap Press, Cambridge, UK.
- Sletvold N y Agren J. 2014.** There Is More To Pollinator-Mediated selection than pollen limitation. *Evolution* **68**(7): 1907-1918.
- Takebayashi N, Wolf DE y Delph LF. 2006.** Effect of variation in herkogamy on outcrossing within a population of *Gilia achilleifolia*. *Heredity* **96**(2): 159-165.
- Truyens S, Arbo MM y Shore JS. 2005.** Phylogenetic relationships, chromosome and breeding system evolution in *Turnera* (Turneraceae): Inferences from its sequence data. *American Journal of Botany* **92**(10): 1749-1758.

- Tucić B, Vuleta A y Manitašević-Jovanović S. 2013.** Exploring phenotypic floral integration in *Iris pumila* L.: A common-garden experiment. *Archives of Biological Sciences* **65**(2): 781-794.
- Waddington KD y Gottlieb N. 1990:** Actual vs perceived profitability. A study of floral choice of honeybees. *Journal of Insect Behaviour* **3**:429—441.
- Wagner GP, Pavlicev M y Cheverud J. 2007.** The road to modularity. *Nature Genetics* **8**: 921–931.
- Webb CJ y Lloyd DG. 1986.** The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany* **24**(1): 163-178.
- Winn AA, Elle E, Kalisz S, Cheptou P-O, Eckert CG, Goodwillie C, Johnston MO, Moeller DA, Ree RH, Sargent RD y Vallejo-Marín M. 2011.** Analysis of Inbreeding Depression in Mixed-Mating Plants Provides Evidence for Selective Interference and Stable Mixed Mating. *Evolution* **65**(12): 3339-3359.
- Wood S. 2006.** Generalized Additive Models: an introduction with R. Boca Raton, Florida: Chapman and Hall.

Anexo

Protocolo de tinción de granos de polen de T. velutina

Material

- *Colorantes en polvo:*
 - Safranina (C.I. 50240)*
 - Verde rápido (C.I. 42053)*
 - Azul de metileno (C.I. 52015)*
- *Etanol 95°*
- *Agua destilada*
- *Probeta 25 ml*
- *Balanza*
- *Agitador magnético*
- *Vaso de precipitado 100 ml*
- *Pipeta Pasteur*

Método

1. Preparación de colorantes

COLORANTE ROJO

Solución madre

Safranina, 1g

Agua destilada, 15.5 ml

Mezclar la solución madre con etanol 95° (1:1)

COLORANTE VERDE

Solución madre

Verde rápido, 1g

Agua destilada, 15.5 ml

Mezclar la solución madre con etanol 70° (1:1)

COLORANTE AZUL

Solución madre

Azul de metileno, 1g

Agua destilada, 15.5 ml

Mezclar la solución madre con etanol 70° (1:1)

2. *Tinción de polen*

Comenzar el procedimiento después de la dehiscencia de las anteras.

- Tomar tinte preparado con una pipeta.
- Presionar ligeramente hasta que parte de la gota del colorante salga por la boca de la pipeta.
- Colocar la boca de la pipeta sobre una antera sin verter la gota, intentando embeberla con el tinte sin gotearlo sobre ésta.
- Limpiar la pipeta completamente al repetir el procedimiento con el resto de las anteras.

NOTAS:

- Dejar secar por completo antes de exponer a los polinizadores (una hora aproximadamente) para evitar conglomerados de polen teñido.
- Evitar teñir el filamento o cualquier otro órgano floral.

Figura 12. Tinción de granos de polen en *T. velutina*

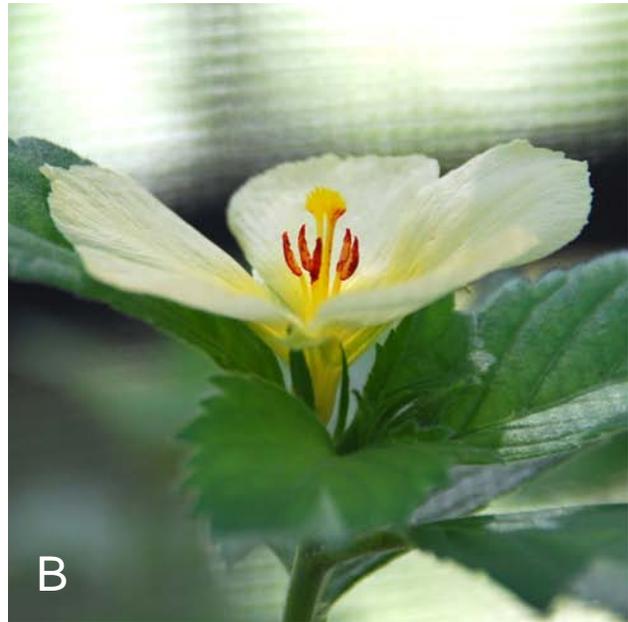
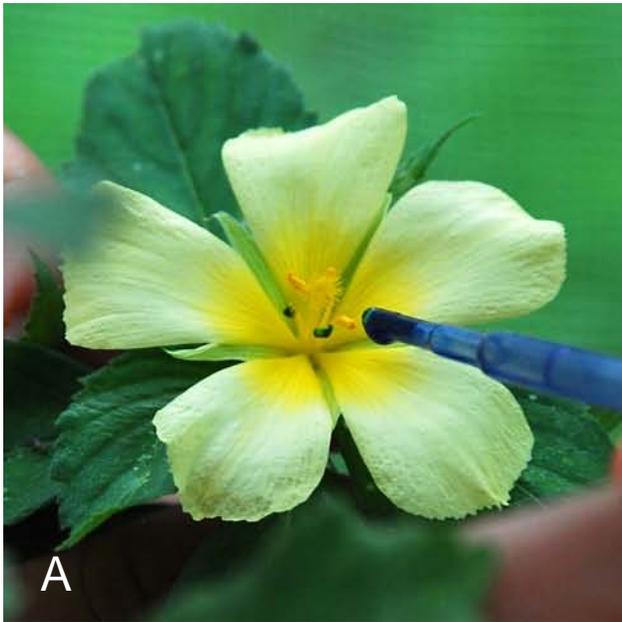


Figura 12. Tinción de polen en *T. velutina*. A: Procedimiento general de tinción. B: Anteras teñidas con safranina. C: Anteras teñidas con azul de metileno. D: Anteras teñidas con verde rápido.