



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**POLINIZACIÓN EN *DESMODIUM GRAHAMII*
A. GRAY (FABACEAE)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
BIÓLOGA**

P R E S E N T A:

ARA NADXIELLI MIGUEL PEÑALOZA



**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS:
DRA. KARINA JIMÉNEZ DURÁN**

**COTUTOR DE TESIS:
DR. ALFONSO OCTAVIO DELGADO SALINAS**

2016

Ciudad Universitaria, CD. MX.



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Miguel
Peñaloza
Ara Nadxielli
55 54 54 64 81
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309580823

2. Datos del tutor

Dra,
Karina
Jiménez
Durán

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Guadalupe Judith
Márquez
Guzmán

4. Datos del sinodal 2

Dr.
Juan Servando
Núñez
Farfán

5. Datos del sinodal 3

Dr.
César Antonio
Abarca
García

6. Datos del sinodal 4 (Co-Tutor)

Dr.
Alfonso Octavio
Delgado
Salinas

7. Datos del trabajo escrito

Polinización en *Desmodium grahamii* A. Gray (Fabaceae)
90 p.
2016

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la SEREPSA y a la administración del Jardín Botánico del IB-UNAM, quienes otorgaron la autorización para trabajar con poblaciones de *Desmodium grahamii* en ambos sitios y brindaron apoyo durante la realización del trabajo en campo.

Al Dr. Ismael Hinojoza del IB-UNAM y al M. en C. Armando Luis Martínez del Museo de Zoología de la Facultad de Ciencias UNAM, quienes brindaron apoyo para la identificación de los ejemplares de abejas Megachilidae.

Al Biól. J. Alfredo Wong León del IB-UNAM quien apoyó en la toma de las fotografías con filtro UV de las flores.

A la M. en C. M. Berenit Mendoza Garfias quien apoyó para el procesamiento y observación de las muestras en MEB.

A Iván Puente Lee quien proporcionó las facilidades para la utilización del MEB.

A la M. en C. Mónica K. Pérez quien brindó su asesoría en la realización de las pruebas histológicas.

A la M. en C. María Eugenia Muñiz quien brindó asesoría en las técnicas de aclarado e histoquímicas para la detección de osmóforos.

Al M. en C. J. G. Ricardo Wong quien me ha brindado ánimos y que con su ayuda permitió que se capturaran escenas como las de la interacción de las *M. zapoteca* con las flores.

A las profesoras del taller (la Dra. Judith, Mague, Sony, Paty y Ana Laura) quienes con sus observaciones y enseñanzas contribuyeron en la continua mejora de esta tesis y en mi crecimiento personal.

A los integrantes del jurado la Dra. Judith, el Dr. Juan y el Dr. César, por la revisión y comentarios que aportaron a la mejora de la presente tesis.

A mi cotutor el Dr. Alfonso Delgado quien durante la realización de la presente tesis me demostró su continuo apoyo, que con su vasto conocimiento y claridad al explicar, ha contribuido tanto al enriquecimiento de esta tesis como al de mi bagaje intelectual.

A mi tutora la Dra. Karina Jiménez (Kary) quien me ha acompañado durante toda la aventura que ha resultado ser la realización de esta tesis. Quien en varias ocasiones me ha dado el impulso necesario para no rendirme tanto en este como en futuros proyectos de vida. Agradezco además la gran calidez que me ha demostrado y su amistad.

A mis amigos de la carrera: Ana, Anita, Rosa, Mariana, Alicia, Esther, Kevin y Fernando, a quienes conocí en diferentes momentos de la carrera y con quienes llegué a compartir tanto anécdotas afortunadas como desafortunadas, y que en numerosas ocasiones tuvieron el infortunio de tener que escuchar mis quejas y que a pesar de ello me mostraron su paciencia y me brindaron ánimos y esperanza. Gracias por hacer de este ciclo, grato y memorable.

A mi familia que siempre me ha mostrado su cariño, su apoyo incondicional y su confianza en mí. Quienes de la misma manera me acompañaron durante el peculiar ciclo que constituyó el estudio de mi carrera y que cuando lo necesité tuvieron por mí, la confianza y paciencia que yo fui incapaz de generar.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	7
2. INTRODUCCIÓN.....	8
3. ANTECEDENTES.....	9
a) Recompensas florales.....	9
b) Familia Fabaceae.....	10
c) Mecanismos de polinización	12
d) Género <i>Desmodium</i>	16
4. OBJETIVO GENERAL.....	18
5. OBJETIVOS PARTICULARES	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
e) Sitio de observación y recolecta.....	19
f) Descripción de <i>Desmodium grahamii</i> A. Gray	20
g) Caracterización del ciclo floral.....	22
h) Polinizadores.....	25
i) Tratamientos de polinización controlada.....	26
j) Observación de las estructuras reproductivas durante el desarrollo floral	28
k) Tipo de recompensa	29

l) Preparación de material para microscopía de barrido.....	30
m) Preparación de material para cortes histológicos	30
n) Pruebas histoquímicas	31
7. RESULTADOS	32
o) Ciclo Floral	32
p) Polinizadores.....	42
q) Polinizaciones controladas.....	52
r) Estructuras reproductivas durante el desarrollo floral	55
s) Tipo de recompensa	60
8. DISCUSIÓN.....	68
t) Ciclo floral	68
u) Polinizadores.....	70
v) Polinizaciones controladas.....	73
w) Estructuras reproductivas durante el desarrollo floral	74
x) Tipo de recompensa	77
9. CONCLUSIONES	80
10. PERSPECTIVAS	81
11. BIBLIOGRAFÍA.....	81

RESUMEN

La polinización explosiva es un mecanismo especializado de polinización poco representado en las angiospermas. *Desmodium grahamii* es una Papilionoideae (Fabaceae) que presenta este tipo de polinización. Para aumentar el conocimiento sobre esta polinización en la familia, el presente trabajo tiene por objetivo estudiar la polinización explosiva en *D. grahamii*. El estudio se realizó en dos poblaciones, una ubicada en la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (REPSA) y la otra, en el Jardín Botánico del IB-UNAM. Se encontró que a lo largo del ciclo floral, *D. grahamii* experimenta cambios en la coloración e inclinación de sus flores respecto del eje de la inflorescencia y entre el estandarte y la quilla. Sus polinizadores son abejas, las cuales son indispensables para su polinización. Puede producir semillas tanto por autocruza como por entrecruza. A pesar de poder autopolinizarse, se produce mayor cantidad de semillas cuando intervienen sus polinizadores. Su estigma es húmedo y en él no se depositan granos de polen antes de que se active el mecanismo de polinización explosiva. La recompensa que ofrece es el polen.

INTRODUCCIÓN

Las angiospermas presentan modificaciones estructurales en sus flores que participan en el proceso de la polinización (Simpson, 2006). Estas modificaciones dan lugar a mecanismos de polinización especializados, como es el caso de la polinización explosiva, la cual se caracteriza por el fuerte movimiento de los estambres al ser liberados de la tensión que ejercen los pétalos sobre ellos. Una de las 13 familias en las que se presenta la polinización explosiva, es la familia Fabaceae (Aluri y Reddi, 1995).

La familia Fabaceae es una de las familias más grandes de las angiospermas con gran importancia económica, puesto que muchos de sus miembros son fundamentales en la alimentación (Fralish y Franklin, 2002; Pooja, 2004; Reedy *et al.*, 2004; Verma, 2011). El género *Desmodium*, que pertenece a la subfamilia Papilionoideae (Fabaceae), presenta una arquitectura floral papilionácea y para algunas de sus especies está reportado el mecanismo de polinización explosiva. No obstante, dicho mecanismo aún no se ha explicado en su totalidad (Torres-Colín y Delgado-Salinas, 2008; Cullen *et al.*, 2011; Alemán *et al.*, 2014).

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la polinización explosiva en *D. grahamii* con la finalidad de describir el evento de polinización, esclarecer aspectos sobre la participación de los polinizadores en éste, sobre las características de las estructuras reproductivas a lo largo del mismo y sobre el tipo de recompensa que ofrece.

ANTECEDENTES

La polinización es la transferencia de polen desde las anteras hasta el estigma. En muchas especies de angiospermas han evolucionado mecanismos especializados de polinización, en los que las modificaciones estructurales se encuentran correlacionadas con un agente específico de transferencia del polen. De tal manera que el conocimiento acerca del agente provee un mejor entendimiento sobre la función, la homología y la evolución de las estructuras florales asociadas (Tcherkez, 2004; Simpson, 2006).

Recompensas florales

Los visitantes florales van a las flores en busca de una recompensa, que generalmente es de tipo alimenticio. Las plantas anuncian estas recompensas a través de distintos atributos como: el color, el aroma, la forma o el tamaño (Willmer, 2011; Abrol, 2012). El polen y el néctar son las dos principales recompensas. Aunque en el sentido evolutivo, el polen constituye la recompensa más importante; en la actualidad tiende a ser de importancia secundaria a la del néctar, ya que la producción de este último, es menos costosa para la planta y su manejo es sencillo para los animales. Otras recompensas incluyen aceites, resinas y gomas, exudados estigmáticos, esencias, tejidos florales comestibles y la provisión de sitios de anidamiento y de microclimas (Willmer, 2011).

Familia Fabaceae

La familia Fabaceae es la tercera familia más grande de las angiospermas y la segunda más grande de las dicotiledóneas (Fralish y Franklin, 2002; Pooja, 2004; Lewis *et al.*, 2005, Verma, 2011). Incluye 727 géneros que comprenden 19,325 especies (Lewis *et al.*, 2005). Presenta una distribución cosmopolita y sus especies son mayoritariamente pantropicales o subtropicales. Tradicionalmente se reconocen tres subfamilias: Mimosoideae, Cesalpinoideae y Papilionoideae. La subfamilia Papilionoideae es la más grande (Fralish y Franklin, 2002; Pooja, 2004; Lewis *et al.*, 2005; Verma, 2011), con entre 420 y 440 géneros (Fralish y Franklin, 2002) que comprenden 13,800 especies (Lewis *et al.*, 2005). Se encuentran distribuidas alrededor del mundo, mayoritariamente en regiones templadas. La mayoría de las plantas son herbáceas, sin embargo; también hay arbustos, árboles y trepadoras. En general, presentan inflorescencias de flores zigomórficas cuya corola está compuesta por cinco pétalos y que presentan arquitectura papilionácea; habiendo excepciones en algunos taxa de las tribus Sophoreae y Swartzieae (Fralish y Franklin, 2002; Tucker, 2003; Pooja, 2004; Reedy *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2005; Verma, 2011). En las flores con arquitectura papilionácea, la parte abaxial de la corola, se denomina quilla y está formada por dos pétalos fusionados; el pétalo superior recibe el nombre de estandarte, presenta en su cara interna a la mácula (patrón de coloración que contrasta con el del resto del pétalo); y los dos pétalos laterales que se encuentran adheridos a la quilla reciben el nombre de alas (Figura 1). En flores con esta arquitectura, el androceo y gineceo están contenidos dentro de la quilla; y en el caso del

androceo, los estambres pueden tener sus filamentos fusionados y formar un tubo estaminal, en el cual queda contenido el gineceo (Reedy *et al.*, 2004; Tcherkez, 2004; Verma, 2011). En las Papilionoideae, el androceo consiste en (9-)10 estambres que en la mayoría de los géneros se encuentran dispuestos en dos alturas distintas. Se presentan cuatro tipos de androceo: diadelfo, monadelfo, pseudomonadelfo y de estambres libres; de los cuales, el diadelfo y el monadelfo son los más frecuentes. En el diadelfo, los filamentos de nueve estambres se encuentran fusionados formando el tubo estaminal, mientras que el décimo se encuentra libre y opuesto al estandarte; en el monadelfo, los filamentos de los 10 estambres se encuentran fusionados formando al tubo estaminal; en el pseudomonadelfo, la fusión de los estambres es similar a la de un androceo diadelfo, pero el filamento del estambre libre se fusiona en etapas finales del desarrollo, pudiendo dejar o no orificios en la base (con o sin fenestras); y, en el de estambres libres, los estambres permanecen libres al final del desarrollo. Las anteras tienen dehiscencia longitudinal. El gineceo es monocarpelar con ovario unilocular y de placentación marginal; los óvulos se presentan en dos filas y en algunos géneros sólo hay un óvulo. El fruto es una legumbre. Su importancia económica radica en que varias de sus plantas son de consumo humano; algunas se usan para la producción de medicamentos, aceites, tintes, fibra, madera y gomas; otras son de uso ornamental y las semillas de determinadas especies pueden usarse para la producción de biocombustibles (Rodríguez-Riaño *et al.*, 1999b; Pooja, 2004; Reedy *et al.*, 2004; Levi *et al.*, 2005; Verma, 2011).

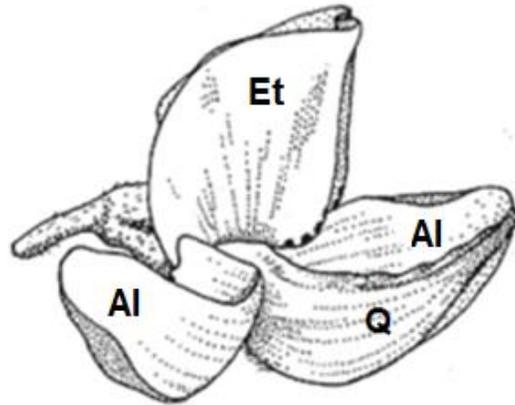


Figura 1. Arquitectura papilionácea. Dentro de la quilla se encuentra la columna estaminal que cubre al gineceo. Al=Alas, Et=Estandarte y Q=Quilla. Modificada de Tcherkez (2004).

Mecanismos de polinización

En la mayoría de las Papilionoideae, la polinización es entomófila y tradicionalmente se presentan cuatro mecanismos: valvular, explosivo, de pistón y de cepillo estilar (Arroyo, 1981; Pooja, 2004; Etcheverry *et al.*, 2012; Alemán *et al.*, 2014). Para el mecanismo valvular, el de pistón y el explosivo, Yeo (1993) ha atribuido presentación secundaria de polen, en la que el polen es transferido a alguna otra estructura distinta de las tecas de las anteras previo a la antesis. Nuevos mecanismos se han propuesto para géneros con flores de características particulares, como son el de túnel y montura en *Crotalaria* (Le Roux y Van Wyk, 2012).

En el mecanismo valvular, los estambres y el estigma emergen de la quilla mientras persiste la presión del polinizador y las alas se desplazan hacia abajo,

facilitando al polinizador la búsqueda del nectario intraestaminal en la base del ovario; los verticilos florales retoman su posición original y el polen se adhiere a la parte ventral o dorsal del insecto. Este mecanismo se presenta en especies de *Cytisus*, *Melilotus* y *Trifolium* (Arroyo, 1981; Endress, 1994; Small, 1988).

En el mecanismo de pistón, los extremos de los filamentos están engrosados apicalmente y van expulsando el polen de sus anteras en pequeñas cantidades hacia el ápice de la quilla, en el cual los márgenes se encuentran soldados a excepción de un pequeño orificio en la parte superior. En este mecanismo, el polen se adhiere al abdomen del insecto; está presente en *Lotus*, *Lupinus* y *Coronilla* (Arroyo, 1981; Endress, 1994).

En el mecanismo de cepillo estilar, en el estilo se presenta un cepillo de tricomas que barre pequeñas cantidades del polen en el ápice de la quilla; se ha observado que la dehiscencia de las anteras ocurre cerca de la antesis y el polen queda atrapado en el cepillo polínico. Este mecanismo se puede encontrar en *Phaseolus*, *Vicia* y *Pisum* (Arroyo, 1981; Endress, 1994; Lavin y Delgado, 1990; Etcheverry *et al.*, 2008).

Finalmente, en el mecanismo explosivo, que ocurre como consecuencia del violento movimiento de los estambres solos o junto con los pétalos que les retienen; los estambres y el pistilo se hallan sometidos a gran tensión bajo la quilla y son expulsados violentamente cuando el polinizador ejerce presión sobre las alas y la quilla. Dependiendo de la estructura de la flor, el polen se adhiere a la parte dorsal o a la ventral del insecto. Tras la fuerte expulsión del gineceo y del androceo, por lo general los verticilos no retoman su posición. No obstante, en algunos casos pueden retomarla parcialmente pero el estigma siempre queda

expuesto (Arroyo, 1981; Endress, 1994; Aluri y Reddi, 1995; López *et al.*, 1999; Rodríguez-Riaño *et al.*, 1999a; Galloni y Cristofolini, 2003). Ejemplos de Fabaceae con dicho mecanismo son *Medicago*, *Apios*, *Desmodium*, *Genista* y *Cytisus* (Figura 2; Bruneau y Anderson, 1988; López *et al.*, 1999; Willmer *et al.*, 2009; Willmer, 2011; Alemán *et al.*, 2014).

En especies como *Medicago sativa* (alfalfa), la abeja se instala en la flor para coleccionar el néctar y en el proceso empuja las alas; como consecuencia, se libera el tubo estaminal y el estigma, y las anteras golpean a la abeja depositando el polen; al golpearla, el estigma probablemente recoge el polen (Small, 2011). Las flores de *M. sativa* presentan membrana estigmática (una capa de cutícula que cubre la superficie estigmática y que debe romperse para que el polen pueda germinar), la cual se sugiere que se rompe cuando se activa el mecanismo explosivo, sin embargo, se ha observado la producción de semillas en flores donde el mecanismo no ha sido activado (Brink y Cooper, 1936; Endress, 1994).

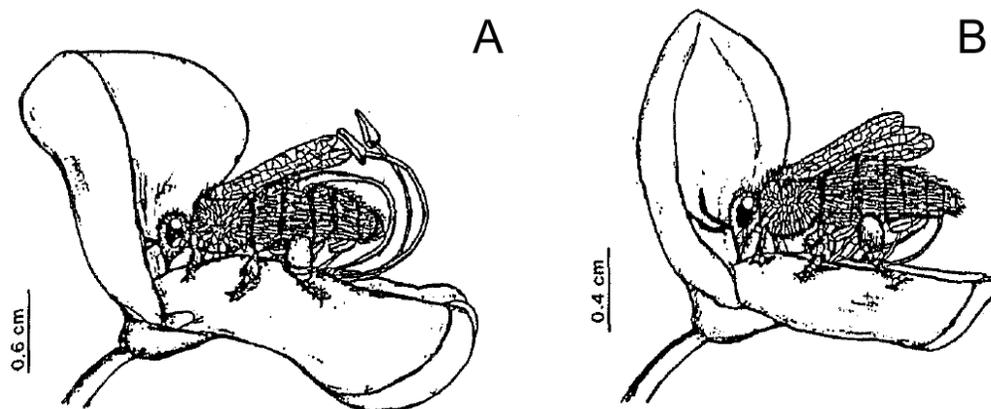


Figura 2. Flores de *Cytisus* con polinización explosiva. A. En *C. striatus* se deposita el polen en la parte dorsal y ventral del polinizador. B. En *C. multiflorus* en la parte ventral. Tomado de López *et al.* (1999).

Además de la familia Fabaceae, el mecanismo de polinización explosivo se presenta en otras 12 familias: Acanthaceae, Cornaceae, Ericaceae, Fumariaceae, Lamiaceae, Loranthaceae, Marantaceae, Musaceae, Onagraceae, Orchidaceae, Rhizophoraceae y Urticaceae. Como vectores de polinización asociados a este mecanismo se han descrito abejas, colibríes, nectarinas (pájaros de sol), murciélagos, moscas, avispas, mariposas, polillas y al viento (Aluri y Reddi, 1995; Agostini *et al.*, 2006).

En flores de *Hyptis* (Lamiaceae), el mecanismo consiste en que ante la acción de los colibríes, los estambres se liberan de la quilla, esto ocasiona que los filamentos se mezan hacia arriba y se libere una nube de polen que coloca los granos de polen en la barbilla de los colibríes. Después de la liberación del polen, el estilo se alarga y debe ser nuevamente visitado para ser polinizado. En estas flores se encontró que poco antes de su apertura natural, los filamentos se alargan, con lo que las anteras pasan el margen de la quilla y generan una gran tensión en el sistema, que bajo un disturbio mínimo puede desencadenar el mecanismo explosivo (Brantjes y De Vos, 1981). En *Eriope crassipes*, otra Lamiaceae, el labio inferior se encuentra comprimido lateralmente y en su interior retiene a las anteras que se hallan dobladas bajo tensión. Posteriormente el labio se desplaza hacia abajo generando tensión en los filamentos de los estambres. Cuando el polinizador llega, que generalmente son abejas, en búsqueda de néctar, el labio gira hacia atrás y libera a las anteras que depositan el polen en el abdomen de las abejas. Durante este proceso, el estigma permanece pequeño, pero una vez ocurrida la liberación de las anteras, comienza a crecer y los estambres se doblan (Harley, 1971).

Género *Desmodium*

El género *Desmodium* incluye 275 especies (Lewis *et al.*, 2005). Se distribuyen en los trópicos y subtropicos. Son hierbas anuales o perennes, o arbustos. Sus flores son rosadas, moradas o blancas en racimos, pseudoracimos o panículas; su corola está compuesta por un estandarte, alas generalmente unidas a la quilla y una quilla con pétalos parcialmente fusionados en la porción distal; su androceo es diadelfo, monadelfo o pseudomonadelfo. Algunas especies presentan una membrana o cutícula estigmática (Rodríguez-Riaño *et al.*, 1999a; Torres-Colín y Delgado-Salinas, 2008; Huang y Ohashi, 2010; Cullen *et al.*, 2011; Alemán *et al.*, 2014). Muchas especies se emplean con fines medicinales (Austin, 2004; Kurian y Asha, 2007) y algunas como forraje (León, 1968). Algunas especies estudiadas presentan el mecanismo de polinización explosivo (Willmer *et al.*, 2009; Alemán *et al.*, 2014).

En un trabajo previo sobre biología reproductiva, se estudió el cambio de coloración en la corola de *Desmodium setigerum* asociado a su mecanismo de polinización explosiva (Willmer *et al.*, 2009). En el mismo trabajo se describe brevemente el mecanismo y se atribuye la capacidad de activarlo a abejas con tamaños que varían desde pequeñas Megachilidae hasta grandes *Xylocopa* sp. Posteriormente, Alemán *et al.* (2014) estudiaron la biología reproductiva de tres especies de *Desmodium* con mecanismo de polinización explosiva, para lo cual analizaron la biología floral y los visitantes de las especies. Probaron si el mecanismo permanecía desactivado debido a algún cambio en la posición relativa de las partes florales y encontraron que al aterrizar los polinizadores en la quilla,

éstos ejercen presión en las alas y en la quilla, siendo que en su conjunto se mueven hacia abajo debido a la fusión superficial que existe entre estos verticilos.

De tal manera que las uñas de la quilla (parte basal de los pétalos de la quilla) se separan y se doblan, exponiendo así a la columna estaminal y al gineceo.

Si bien se han estudiado distintos aspectos asociados al mecanismo de polinización explosiva en *Desmodium*, es aún relevante estudiar la variedad de polinizadores que puede presentar, así como su efectividad al polinizar. Es igualmente importante definir las recompensas que ofrece a sus polinizadores. Por estos motivos se pretende estudiar la polinización explosiva en *D. grahamii*.

OBJETIVO GENERAL

Describir la polinización explosiva en *Desmodium grahamii*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar el ciclo floral en *D. grahamii*.
- Describir a los polinizadores y su participación en el mecanismo de polinización explosiva de *D. grahamii*.
- Describir la morfología del estigma y de las anteras durante la polinización.
- Identificar el tipo de recompensa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de observación y recolecta

Las observaciones y la recolecta se realizaron, previa autorización, en el periodo del mes de julio a octubre de los años 2014 y 2015 en el Jardín Botánico Exterior del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IB-UNAM) y en la Zona de Amortiguamiento A10 (Jardín Botánico) de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de Ciudad Universitaria (REPSA; Figura 3).

El Jardín Botánico se localiza en el tercer circuito exterior de Ciudad Universitaria, Coyoacán, México. El Jardín tiene una superficie de 12.6 ha del Pedregal de San Ángel, en donde colindan las colecciones de plantas vivas y la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel (Vovides *et al.*, 2010).

La REPSA cubre una superficie de 237.3 ha. Su vegetación característica es el matorral xerófilo de alta elevación y su clima es templado subhúmedo. La zona A10 tiene una superficie de 12 ha y 6,423 m², y corresponde al área de colecciones del Jardín Botánico (UNAM, 2006; Castillo *et al.*, 2007).



Figura 3. Ubicación de los sitios de estudio (círculo amarillo). Mapa de UNAM (2006) modificado.

Descripción de *Desmodium grahamii* A. Gray

Son hierbas perennes, erectas o procumbentes de 30 a 60 cm de alto. Su forma de vida es hemcriptofita. Tienen tallos sulcados, uncinados, puberulentos a pilosos. Sus hojas son trifoliadas con folíolos que miden entre 1.5-3.0 cm de largo

y entre 1.2-1.8 cm de ancho. Los foliolos son ovados a elípticos, su haz es verde oscuro y su envés, verde pálido; ambas superficies son estrigosas. Sus inflorescencias son axilares y terminales en pseudoracimos densos de 15-25 cm de largo. Presentan dos flores (rosadas a morado claro) por nudo. Su cáliz mide entre 5-6 mm de largo, mientras que su corola mide 1.0 cm de largo, con el estandarte que mide 9.4 mm de largo, 6.8 mm de ancho y es oblanceolado; las alas que miden 8.2-8.5 mm de largo, 2.5-2.8 mm de ancho y son oblongas; y la quilla que mide 9.5 mm de largo. Su ovario es corto-estipitado y tiene 6 óvulos. Los frutos son lomentos estípidos de 5.5-6.4 mm de largo y 4.5 mm de ancho; tienen de 4 a 6 artículos, son indehiscentes y son orbiculares a oblongos. Las semillas son oblongas, miden 2.8-3.0 mm de largo y 2.4-2.6 mm de ancho y se dispersan por acantocoria. *D. grahamii* presenta su periodo de floración entre junio y octubre y el de fructificación entre junio y noviembre (Castillo *et al.*, 2007; Torres-Colín y Delgado-Salinas, 2008).

La especie se distribuye en el suroeste de Estados Unidos y México. En México se encuentra en la Ciudad de México y los estados de Aguascalientes, Baja California Sur, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala y Zacatecas. Se encuentra asociada a bosque de *Pinus-Quercus*, bosque de *Quercus*, bosque espinoso, ecotono entre el bosque tropical caducifolio y el bosque de *Quercus*, y vegetación secundaria; en elevaciones de 2,000 a 2,800 msnm (Torres-Colín y Delgado-Salinas, 2008).

Caracterización del ciclo floral

Se seleccionaron tres parches de 1 m² c/u dentro de la población de *D. grahamii* del Jardín Botánico (19°19'5.57"N; 99°11'34.09"O), en los que se realizaron observaciones en la mañana-tarde (9:00-16:00 h) entre los meses de agosto y septiembre de 2014. Se observaron 30 flores por parche y se realizaron 10 repeticiones, en cada una de las cuales se observó sólo un parche; de tal manera que la n= 300 flores. Los aspectos que se observaron fueron: la coloración de los pétalos asociados a cada etapa de desarrollo de la flor y la posición de los verticilos florales en botones florales, flores en pre-antesis, antesis y post-antesis; ambos con la finalidad de reconocer en el campo las flores en sus diferentes estadios de desarrollo. También se hicieron observaciones de flores que no fueran visitadas, para lo cual se seleccionaron 30 flores (2 repeticiones obteniendo una n= 60) en antesis, se les embolsó con bolsas de tul blanco y se observaron cada hora.

Una vez diferenciados los distintos estadios de las flores en campo, se tomaron fotografías en blanco y negro y con un filtro UV de flores en antesis y en post-antesis con una cámara. Esto con la finalidad de detectar diferencias en los patrones de absorción y reflexión de la luz entre estas etapas florales.

Debido a que los cambios en la posición de los verticilos florales pueden interpretarse como señales para los polinizadores (Alemán *et al.*, 2014); se determinó si existían diferencias entre los ángulos de inclinación de los botones y de las flores en pre-antesis, antesis y post-antesis, para lo cual, se tomaron fotografías con una cámara Canon PowerShot SX50-HS para evidenciar su

inclinación con respecto al eje de la inflorescencia. También se tomaron fotografías para medir el ángulo de apertura entre el estandarte y la quilla de flores en antesis y post-antesis. Las fotografías se tomaron de 30 individuos de las poblaciones del Jardín Botánico y de la REPSA. Con el programa ImageJ v.1.48 se midió el ángulo de inclinación de botones, de flores en pre-antesis, en antesis y en post-antesis respecto del eje de la inflorescencia. Para la medición se trazó una línea perpendicular al eje de la inflorescencia respecto del punto de inserción del pedúnculo al eje y la apertura del ángulo estuvo en función de la punta del botón y la zona apical de la columna estaminal para flores en antesis o post-antesis. Para poder comparar los ángulos medidos con las observaciones realizadas, se restó su valor a 90° si la apertura del ángulo era sobre la línea perpendicular trazada respecto del eje; por el contrario, si la apertura era por debajo de la línea, su valor se sumó a 90° . También se midió el ángulo de apertura entre el estandarte y la quilla en flores en antesis y post-antesis (se tomó como vértice del ángulo el punto de inserción del pedicelo con la flor). Las mediciones se realizaron en 30 botones o flores por categoría de etapa. Las etapas se definieron de acuerdo a las características de los botones o flores que se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de botones y flores en diferentes etapas de desarrollo.

Etapa	Tamaño (mm)	Descripción
1	2.15-2.39	Botón cubierto en su totalidad por el cáliz
2	2.78-3.57	Botón donde la punta del estandarte sobresale del cáliz.
3	3.75-4.33	Botón en que sobresalen del cáliz, la punta del estandarte y quilla.
4	4.40-5.22	Botón donde la punta del estandarte, quilla y alas sobresalen del cáliz.
5	5.41-5.81	Botón en que el cáliz solo cubre las bases del estandarte, quilla y alas.
6	6.76-7.40	Botón pre-antesis.
7	7.85-9.57	Flor en antesis.
8	*	Flor post-antesis, recién activada
9	*	Flor en post-antesis, 2-3 h después de activada.
10	*	Flor en post-antesis, 3-4 h después de activada.
11	*	Flor en post-antesis, 1 d después de activada.

* Tamaño igual a Etapa 7

Las mediciones de los ángulos se procesaron con el programa Microsoft Office Excel 2007 y su análisis estadístico se realizó con el programa Prism5 para Windows v.5. Se analizaron de forma independiente las mediciones de inclinación de las flores respecto del eje y de la apertura entre el estandarte y la quilla. Para el análisis se obtuvo la estadística descriptiva y se aplicó la prueba de D'Agostino y Pearson para determinar si la distribución de los datos era normal, en cuyo caso se aplicó una ANOVA y la prueba post-hoc de Tukey. En el caso contrario, se

aplicó la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba post-hoc de Dunn. Todas las pruebas se aplicaron con $\alpha = 0.05$.

Polinizadores

Una vez que se determinaron las características de las flores en pre-antesis y en antesis, se seleccionaron individuos con flores próximas a abrirse y se les grabó con una cámara de video Panasonic HDC-SD60. También se realizaron observaciones de los visitantes florales y se tomaron fotografías con una cámara Canon PowerShot SX50-HS y LG-P714. De acuerdo a las observaciones en campo y la evidencia fotográfica, se identificó a los probables polinizadores. Para determinar si se trataban de polinizadores, se observó que entraran en contacto con los verticilos sexuales, que su comportamiento evidenciara su capacidad de transportar polen entre flores y que portaran polen en su cuerpo.

A partir de las observaciones, de las fotografías y de las grabaciones, se determinó si los polinizadores eran frecuentes u ocasionales, la etapa floral que visitaban (pre-antesis, antesis y/o post-antesis) y cómo interactuaban con las flores. Durante las observaciones en campo se contabilizó el número de flores que cada tipo de polinizador visitaba en un minuto, para lo cual se usó un cronómetro y un contador manual. Adicionalmente, se colectaron polinizadores que hubieron visitado las flores para identificarlos, comprobar que llevaran polen de la especie y determinar en qué parte corporal lo transportaban.

Se llevaron a cabo observaciones de la adhesión de los granos de polen en flores activadas manualmente y activadas por abejas. La activación manual de las flores

se hizo ejerciendo presión en la quilla con los dedos y, de ser necesario, entre el estandarte y la quilla, se les etiquetó, se les dejó expuestas y se esperó 0.5, 1, 2, 3 y 4 h. Para cada tiempo se recolectaron cinco flores, mismas que se fijaron en una solución de etanol:ácido acético (3:1 v/v). Para las activadas por abejas, se identificaron flores que hubieran sido accionadas por abejas, se les etiquetó y se les dejó expuestas. Se colectaron cinco flores para los mismos tiempos que en la polinización manual y para un día. Se disectaron los pistilos de las flores en un microscopio estereoscópico Olympus S2X7, éstos se lavaron y suavizaron en una solución de Na_2SO_3 al 10%. Posteriormente, se realizó la tinción de los mismos con azul de anilina (1 g/L azul de anilina en K_3PO_4 , 0.1M). Finalmente, se les colocó sobre portaobjetos, se realizó un aplastado del tejido y se les observó en microscopio de fluorescencia Olympus BX51. Cuando se realizó la disección de los pistilos, se contó el número de óvulos en 30 de ellos.

Tratamientos de polinización controlada

Con el objetivo de determinar la eficiencia de los polinizadores, se realizaron polinizaciones controladas en octubre de 2014 y durante los meses de agosto y septiembre de 2015. Se hicieron 6 tratamientos: (1) “control positivo”: se seleccionaron y etiquetaron flores en pre-antesis (que estarían en antesis ese día) y se dejaron expuestas; (2) “control negativo”: se seleccionaron flores en pre-antesis (que estarían en antesis ese día) y se les embolsó; (3) “autocruza”: se seleccionaron flores en antesis, mismas que fueron activadas sosteniendo la quilla de la flor con los dedos e introduciendo la punta de un lápiz entre el estandarte y la

quilla, las flores se embolsaron, se limpió cuidadosamente el lápiz antes de activar cada flor; (4) “entrecruza”: se colectó el polen de una muestra amplia de flores de la población y posteriormente se le depositó con pincel sobre los estigmas de flores en anthesis, éstas fueron activadas manualmente haciendo presión sobre la quilla, las flores fueron embolsadas; (5) “activada por abeja abierto”: se identificaron flores recientemente activadas por abeja, se les etiquetó (haciendo distinción entre especies de abeja) y se les dejó expuestas; (6) “activada por abeja embolsada”: similar al tratamiento anterior pero las flores se embolsaron inmediatamente después de que fueron activadas. Después de aplicar los tratamientos, se esperó 14 días para colectar los frutos y contar las semillas. En los tratamientos 2, 3, 4 y 6 se retiraron las flores (con pedicelo) cercanas a las seleccionadas para el tratamiento y se cortó el ápice de la inflorescencia. En los tratamientos que se embolsó, se usaron bolsas de tul blanco. En los tratamientos se usaron 30 flores que pertenecieran a varios individuos.

Se comparó el número de semillas y de óvulos con una prueba de Mann-Whitney ($\alpha = 0.05$). En las polinizaciones controladas se buscaron diferencias significativas ($\alpha = 0.05$) entre la cantidad de semillas por fruto producidas por tratamiento, realizando el análisis de igual manera a cómo se describe para las mediciones de ángulos de inclinación y de apertura.

Observación de las estructuras reproductivas durante el desarrollo floral

Con la finalidad de observar la posición del estigma respecto a la de las anteras en etapas previas a la antesis, se hizo el aclarado de botones correspondientes a 6 etapas (3 botones por etapa). Para ello, se colocaron los botones en una solución de NaOH al 10%, por una semana. Después se sustituyó la solución de aclarado por una solución de NaClO al 10% y se expusieron a luz solar hasta obtener la transparencia adecuada. Una vez que se transparentaron, se realizó su observación y la toma de microfotografías en un microscopio estereoscópico Olympus S2X7.

Aunado a esto, se realizaron observaciones en microscopia electrónica de barrido (MEB; microscopios JEOL JSM-5900-LV y Hitachi SU1510) de las superficies estigmáticas de flores en pre-antesis, antesis y post-antesis (6 flores por etapa). Esto con la finalidad de observar si las características de la superficie estigmática sugerían que los estigmas se encontraran receptivos previo a la antesis; así como para comprobar la presencia o la ausencia de polen. También se observaron anteras de flores en etapa 5 y pre-antesis (3 flores por etapa) para identificar si estaban dehiscentes.

Tipo de recompensa

Para comprobar que el polen constituye una recompensa, aunado a las observaciones en campo, se observaron en microscopio estereoscópico Olympus S2X7 los ejemplares de polinizadores colectados. Se ubicó el sitio corporal en que almacenaban el polen y se tomó una muestra de este polen. El polen se observó en MEB y se comparó con el polen de las anteras de flores en antesis.

Por otra parte, se realizaron observaciones en MEB de los pétalos (estandarte, quilla y alas), receptáculo, columna estaminal y gineceo de flores en pre-antesis, antesis y post-antesis (9 flores por etapa) para identificar la presencia de alguna estructura que pudiera funcionar como nectario.

Adicionalmente, se procesaron flores (9 flores por etapa) en pre-antesis, antesis y post-antesis para realizar cortes histológicos de receptáculo, de columna estaminal y gineceo, para identificar zonas con características anatómicas que pudieran estar funcionando como nectarios. Se aplicaron pruebas histoquímicas para detectar la presencia de almidón y polisacáridos.

Finalmente, para comprobar la presencia de osmóforos se sumergieron 30 flores en antesis en una solución de rojo neutro (1:10,000 mg/ml) durante una hora. Después de lo cual se les observó en microscopio estereoscópico Olympus S2X7 para identificar zonas con cambio de coloración (Marinho *et al.*, 2014).

Preparación de material para microscopía de barrido

El material se fijó en FAA (formol, ácido acético, alcohol etílico y agua, en una proporción 1:0.5:5:3.5) por al menos 24 h a temperatura ambiente.

Posteriormente, se deshidrató en una serie gradual de etanol (30, 50, 70, 85, 96, 100, 100, 100%), dejando como mínimo 1 h en cada etanol (López *et al.*, 2005).

Una vez que se terminó la deshidratación, se procedió a secar el material en punto crítico con CO₂. Finalmente, se montaron las muestras y se cubrieron con oro para su observación en MEB.

Preparación de material para cortes histológicos

Se fijó el material en FAA. Después se deshidrató en una serie gradual de alcohol etílico (30, 50, 70, 85, 96, 100, 100, 100%), dejando el material en cada uno al menos 1 h.

Para la infiltración, se hicieron cambios graduales con LR-White-etanol absoluto (1:3, 1:1 y 3:1) de 1 h cada uno. Posteriormente, se hicieron 2 cambios de 1 h cada uno con LR-White puro y un último cambio de 24 h. La inclusión se hizo en cápsulas de gelatina y se dejaron polimerizar a 50 °C (López *et al.*, 2005). Los cortes se realizaron en un micrótopo MRC MR3 a un grosor de 1.5 µm y se tiñeron con azul de toluidina. Los cortes se observaron y se tomaron fotomicrográficas en un microscopio Olympus BX51.

Pruebas histoquímicas

Para la identificación de almidón se aplicó lugol (KI 2% y I 0.5% m/v) y se calentaron las preparaciones durante 2 min, evitando que se secaran (López *et al.*, 2005).

Para la identificación de polisacáridos no solubles, se aplicó ácido peryódico al 0.6% durante 1 min, se lavó con agua, se aplicó el reactivo de Schiff ($C_{20}H_{19}N_3 \cdot HCl$ 0.1%; $Na_2S_2O_5$ 2% m/v y CH_3COOH 2% v/v) y se esperó hasta que adquiriese una coloración magenta, y finalmente, se lavó con ácido acético al 2%. Las preparaciones se mantuvieron en calentamiento durante el proceso (López *et al.*, 2005).

Para ambas pruebas se tomaron microfotografías.

RESULTADOS

Ciclo Floral

Desmodium grahamii presenta inflorescencias tipo racimo compuesto. Las flores están unidas a un eje principal y maduran de la base hacia el ápice. Este eje se ramifica dando lugar a nuevas inflorescencias. Esto implica que en la parte apical de las inflorescencias se tienen fases florales más jóvenes que en la parte inferior, de tal manera que avanzada la temporada de floración, es posible observar una gradación de frutos a botones de manera ascendente.

A lo largo del ciclo floral, las flores tienen cambios que permiten distinguir la fase floral en la que se encuentran. Como previamente se mencionó, los botones más jóvenes se encuentran en la parte apical de la inflorescencia (Figura 4A). En un inicio se encuentran agrupados y conforme van madurando, se van separando debido al crecimiento de los entrenudos del eje de la inflorescencia. Cuando son jóvenes, los botones se encuentran en una posición casi paralela a la del eje de la inflorescencia y conforme van madurando, van adquiriendo una posición perpendicular (Figura 4B). En estos botones, las alas se encuentran englobando a la quilla y ésta al androceo y al gineceo. El estandarte se encuentra cubriendo al resto de los verticilos florales. Cuando las flores se encuentran en pre-antesis, se observan más grandes que los botones, hay un cambio de color y se encuentran perpendiculares al eje de la inflorescencia. En estas flores, el estandarte continúa cubriendo a las alas y a la quilla, pero se le puede observar ligeramente plegado

(Figuras 4A y C). Las flores que se observan en pre-antesis despliegan su estandarte el mismo día, lo que implica que el estandarte se flexione hacia el eje de la inflorescencia hasta que queda perpendicular a las alas y a la quilla. Cuando las flores tienen el estandarte desplegado, se considera que están en antesis; en ellas es posible observar la mácula, la cual se encuentra en el centro de la cara interna del estandarte (Figuras 4A y D). Una vez que los polinizadores accionan el mecanismo explosivo, se considera que la flor está en post-antesis y se le distingue puesto que la quilla se flexiona y la columna estaminal, junto con el gineceo, queda expuesta (Figura 4E). Finalmente, las flores en post-antesis presentan cambios con el transcurso de las horas, de tal manera que la flor se va inclinando hasta adquirir una posición casi paralela al eje de la inflorescencia (entre 2 y 3 h después de la polinización), pero a diferencia de los botones que están direccionados hacia arriba, las flores se direccionan hacia la base de la inflorescencia. En este proceso, el estandarte se repliega entre 1 y 2 h después de polinización y cubre a la columna estaminal. Finalmente la flor manifiesta una decoloración primero del estandarte (entre 2 y 3h después de la polinización) y posteriormente de la quilla (entre 3 y 4 h después de la polinización; Figuras 4A, F, G y Figura 5).

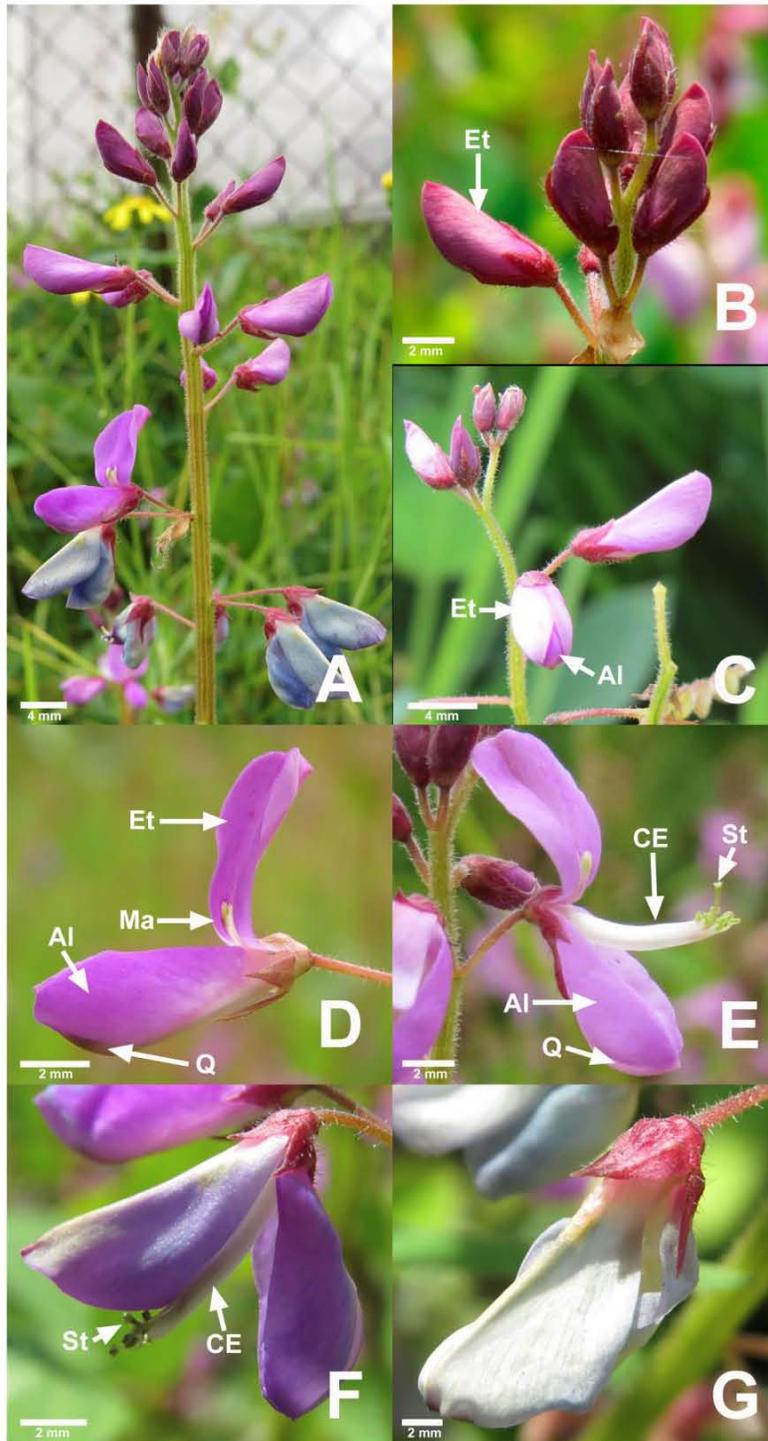


Figura 4. Desarrollo de la inflorescencia de *Desmodium grahamii*. A. Inflorescencia. B. Botones florales de color fucsia. C. Flores en pre-antesis. D. Flores en antesis. E. Flor que ya llevó a cabo la polinización explosiva y sus órganos se encuentran expuestos. F. Flor con 3-4 h de haber sido polinizadas. G. Flor de 1 día de polinización. Al=Ala, CE= Columna Estaminal, Et=Estandarte, Ma=Mácula, Q= Quilla y St=Estigma.

Los botones y las flores tienen un cambio de coloración a lo largo de las fases del ciclo floral. Las coloraciones observadas en las flores en diferentes estadios del ciclo floral, se compararon con la carta de colores de la Royal Horticulture Society (1966), el color presenta su clave correspondiente entre paréntesis. De tal manera que los botones se observan de un color bordó (59B-C), las flores en pre-antesis y antesis de un color rosado (77B), y las flores en post-antesis de un tono que va de lila (91B-C) (el mismo día que la antesis) a blanco-celeste (108C) (el día siguiente al de antesis) (Figuras 4 y 5).

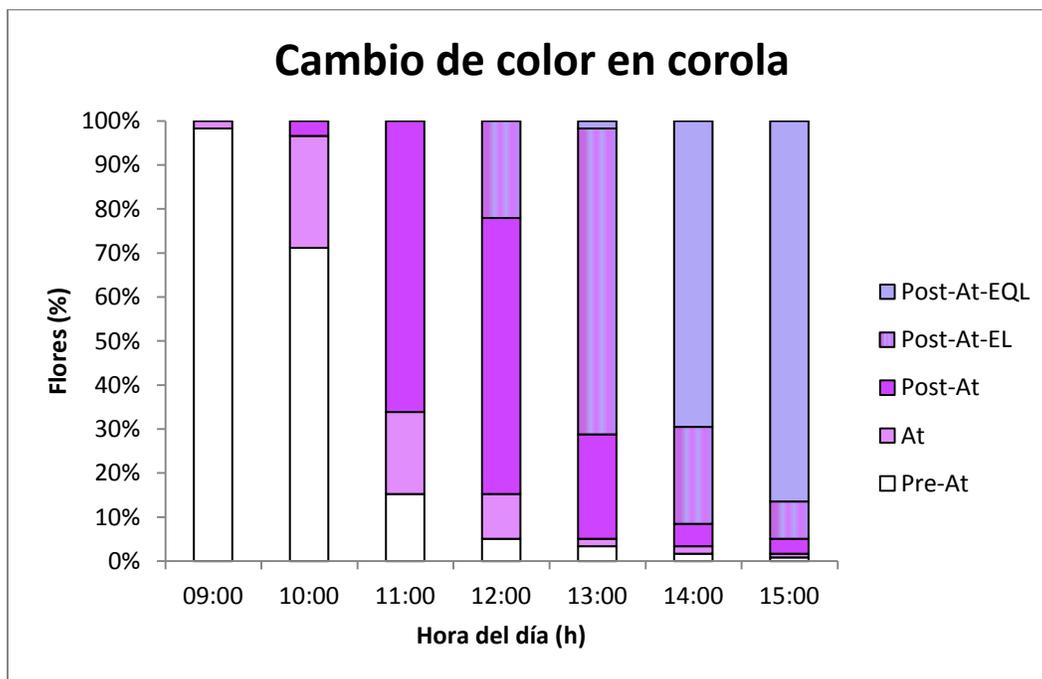


Figura 5. Cambio de coloración en la corola a lo largo del día (n= 300). Pre-At= Flores en pre-antesis, At= Flores en antesis, Post-At= Flores en post-antesis recién activadas, Post-At-EL= Flores en post-antesis con el estandarte lila y Post-At-EQL= Flores en post antesis con estandarte y quilla lilas.

Dependiendo del tiempo, en la población se observaron flores en antesis entre las 09:00 y 10:00 horas del día. Sin embargo, la mayoría de las flores se encontraban en antesis entre las 10:20 y 10:50 horas (Figura 5).

Para determinar si las flores que no eran visitadas presentaban los mismos cambios de coloración que el resto de las flores de la población se hicieron dos observaciones de 30 flores cada una ($n= 60$). Se encontró que cuando no son visitadas, las flores permanecen en antesis mayor tiempo. De tal manera que para las 14:00 horas el 96.55% de las flores permanecía en antesis y la fracción restante (3.45%) ya se encontraba en post-antesis, a pesar de que las flores no habían sido manipuladas. Hacia las 16:00 horas se observó que del total de flores, la gran mayoría (77.59%) aún se encontraba sin activar (la columna estaminal y gineceo no habían sido liberados de la quilla) pero su estandarte se había replegado y decolorado; se podía notar que la quilla se encontraba bajo gran tensión. El resto de las flores se observaba principalmente en post-antesis (17.24%).

El tiempo que tarda en desplegarse el estandarte, una vez que comienza el proceso es cercano a 1 min (Figura 6), y el tiempo requerido para que el estandarte se repliegue después de la polinización es de 1-2 h.

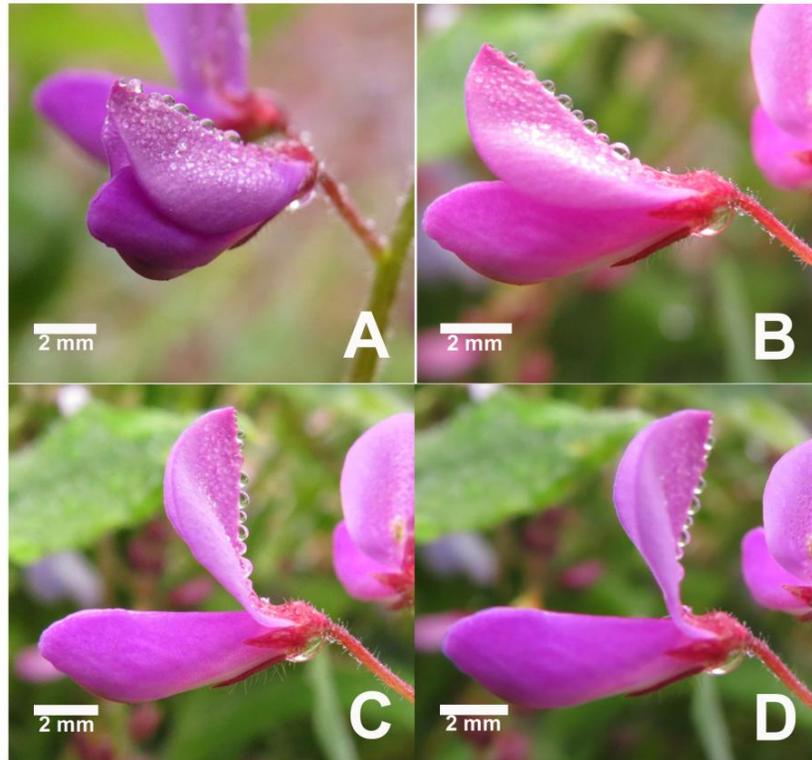


Figura 6. Despliegue de estandarte en 1 minuto en flores en pre-antesis. A. Entre 0 a 5 s. B. Entre 20-25 s. C. Entre 50-55 s. D. Cerca del minuto.

Una vez que comienza a replegarse, el estandarte tarda cerca de 4 min hasta cubrir la columna estaminal completamente (Figura 7). Después de 2-3 h el estandarte de las flores post-antesis se torna a color lila y después de 3-4 h podía observarse tanto la quilla como el estandarte con esa coloración (Figura 4F y Figura 5).

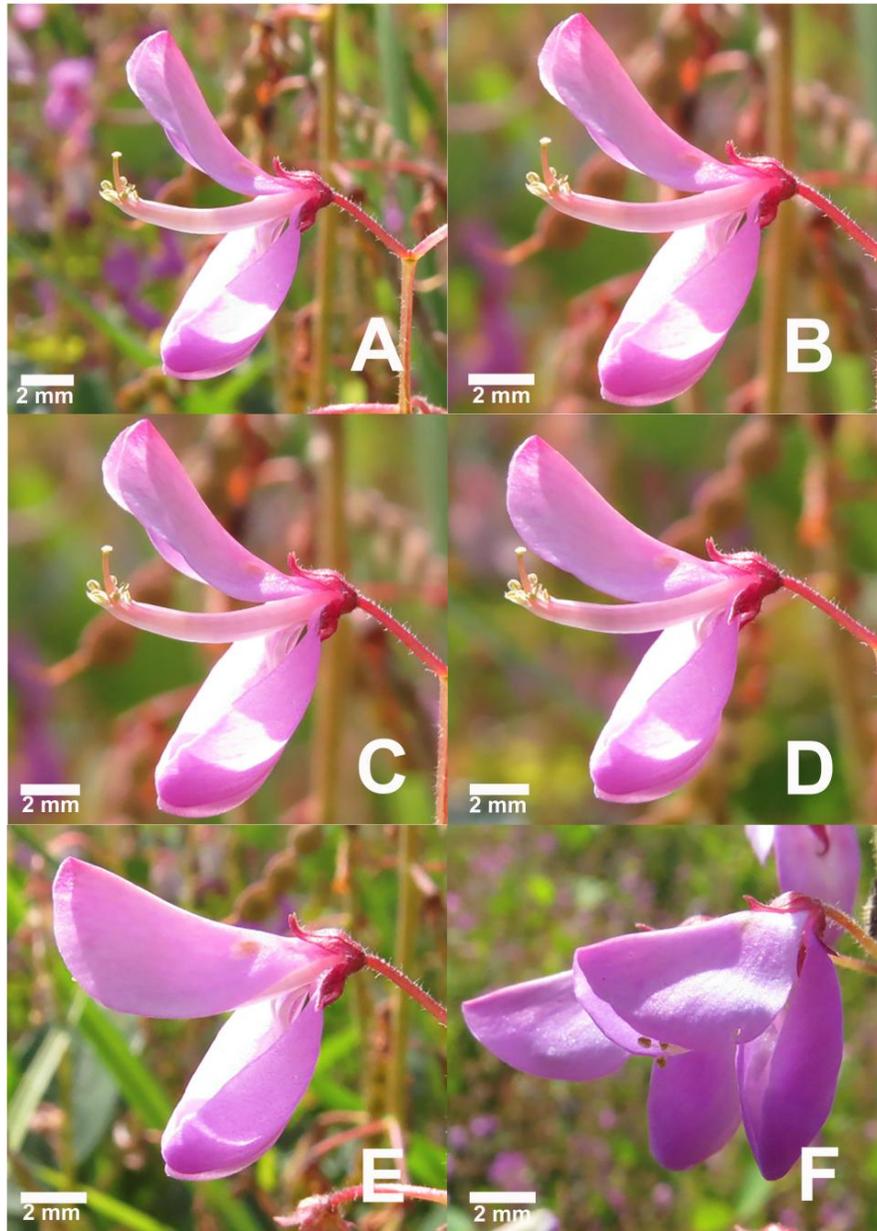


Figura 7. Repliegue del estandarte en alrededor de 4 minutos. A-E. Transcurridas entre 1-2 h después de la polinización el estandarte cubre las estructuras reproductivas. F. La flor se inclina hacia abajo. Nótese en A-D, la posición del estigma expuesto por encima de su androceo.

A lo largo del ciclo floral, los botones y las flores presentan distinta inclinación respecto del eje de la inflorescencia, debido a que podría participar como señal para la atracción de polinizadores, se midió esta inclinación para las diferentes

etapas (Tabla 1). Tomando en consideración el ajuste descrito en la metodología, la interpretación de $\theta = 0^\circ$ corresponde a que el botón o flor se encuentra paralelo al eje de la inflorescencia con el ápice del botón hacia arriba (Figura 4B); de $\theta = 90^\circ$ a que se encuentra perpendicular (como en Figura 4E); y de $\theta = 180^\circ$ a que se encuentra paralelo pero en dirección al suelo (como en Figura 4F). De tal manera que en etapas de botón y pre-antesis las flores se encontraban inclinadas con dirección hacia arriba. Las flores en etapas de pre-antesis, antesis, y post-antesis (etapas 8-10; Tabla 1) se podían encontrar casi perpendiculares al eje; donde la diferencia era que las flores en pre-antesis tendían a estar más inclinadas hacia el ápice de la inflorescencia, mientras que las flores en antesis y post-antesis, a estar más inclinadas hacia la base de la inflorescencia. Las flores en post-antesis que habían sido activadas el día anterior, tenían una inclinación hacia abajo. La inclinación de cada etapa fue similar ($p < 0.05$) a la inclinación de su etapa anterior y posterior inmediatas (Figura 8).

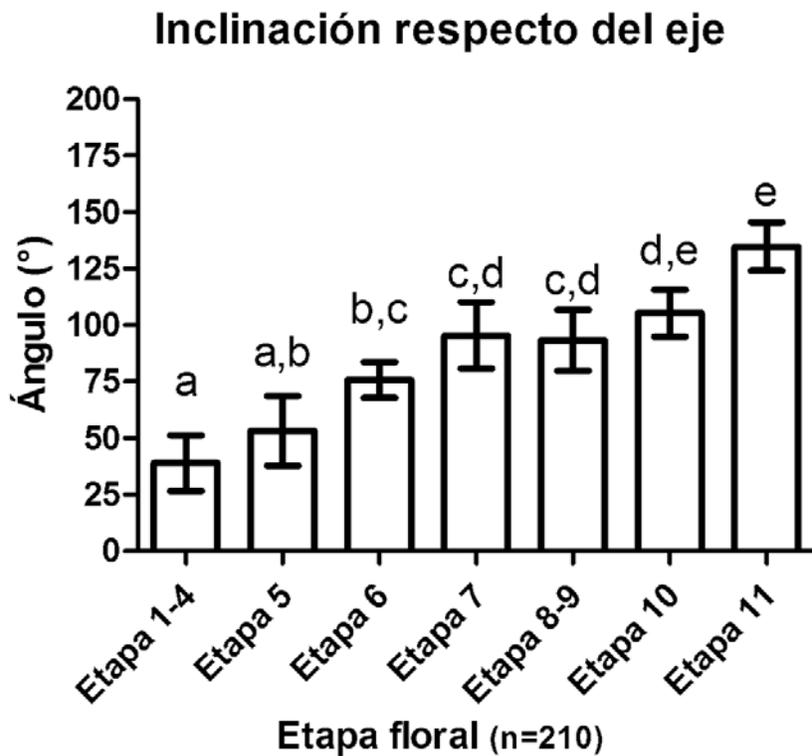


Figura 8. Inclinación de las flores respecto del eje de la inflorescencia. Existen diferencias significativas entre las etapas ($H=180$; $g.l.=6$; $p<0.0001$). Las letras distintas indican diferencias significativas ($p<0.05$) entre las etapas.

Debido a que se observó que la apertura del estandarte varió respecto de la quilla y puesto que esto podría intervenir en la atracción de los polinizadores, se midió el ángulo de apertura de flores correspondientes a 5 etapas del ciclo floral (etapas 7-11; Tabla 1). El ángulo de las flores recién activadas supera al de las flores en antesis. El ángulo de apertura de las flores en post-antesis disminuye conforme transcurre el tiempo desde que fueron activadas, siendo inferior en las flores que tienen 3-4 h de haber sido activadas que en las recién accionadas; y de igual manera en las activadas el día anterior respecto de las que tienen 3-4 h de haber sido accionadas (Figura 9).

Apertura entre el estandarte y quilla

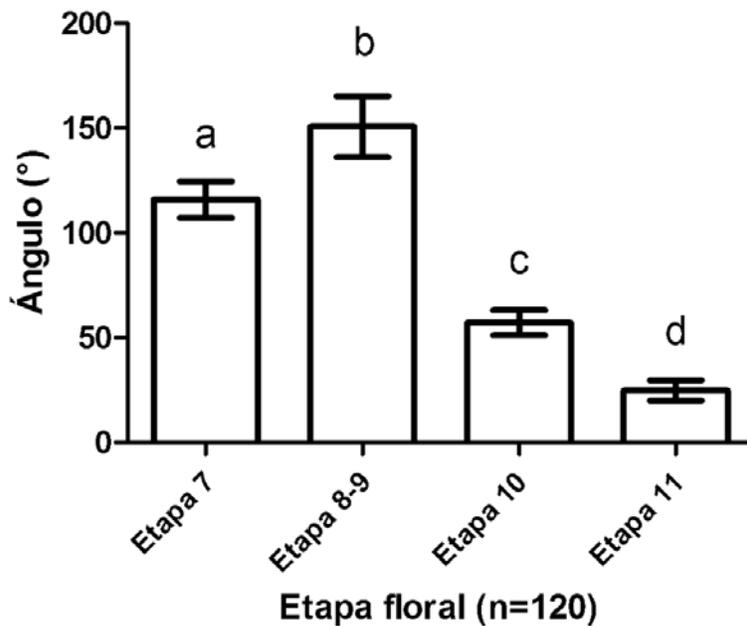


Figura 9. Ángulo de apertura entre el pétalo del estandarte y la punta de la quilla. Existen diferencias significativas entre las etapas ($F=1120$; $g.l.=3$; $p<0.0001$). Cada letra indica diferencias significativas ($\alpha=0.05$).

Debido a que entre las flores en antesis y en post-antesis recién visitadas se observó que el cambio más evidente radicaba en el incremento en el ángulo de apertura entre el estandarte y la quilla como resultado de la exposición de la columna estaminal y gineceo, se tomaron fotografías con filtro UV para detectar posibles cambios en el patrón de absorción y reflexión de la luz. Se encontró que la mayoría de la corola absorbe luz a excepción del surco central en el estandarte, que se bifurca cerca de la sección donde conecta con las alas (Figuras 10C y F), y del margen de las alas (Figura 10C). A su vez, se observó que una vez que las flores son activadas y se exhibe la columna estaminal, ésta también refleja la luz (Figura 10I).

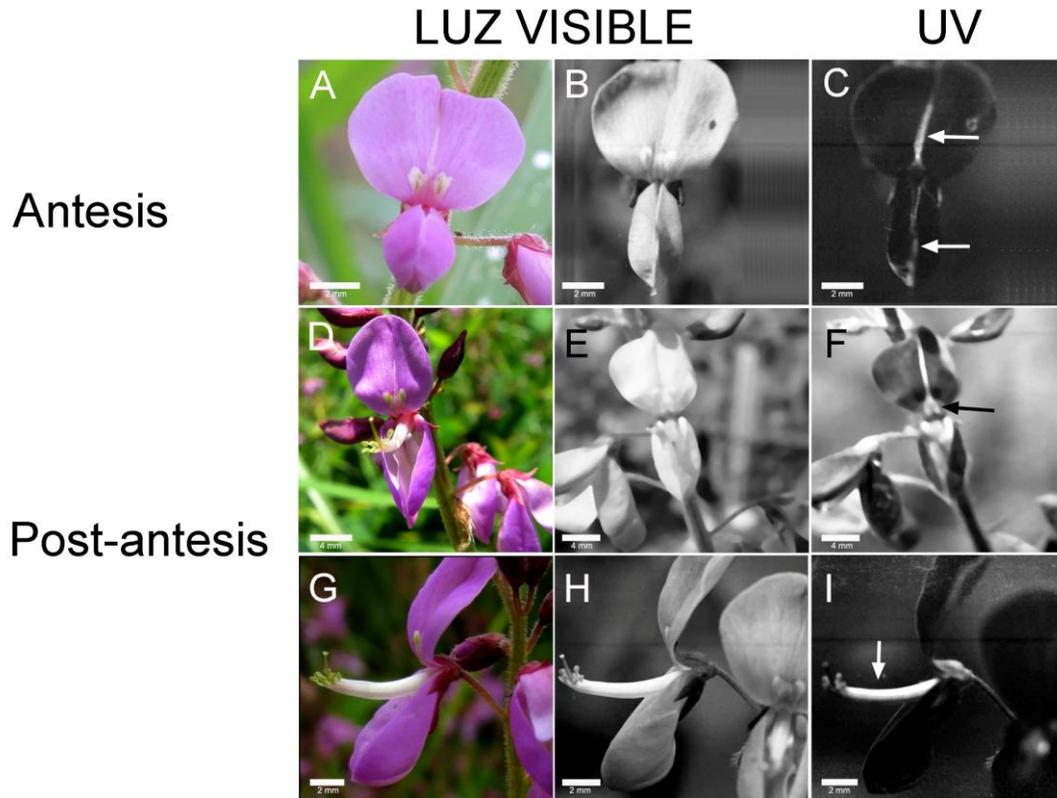


Figura 10. Patrón UV en flores en antesis y post-antesis. A-C. Flores en antesis. D-I. Flores en post-antesis. Flechas indican zonas que reflejan la luz.

Polinizadores

Se identificaron 8 visitantes florales en las 10 repeticiones de observación, siendo en su mayoría abejas. De acuerdo a la cantidad de días en que se les observó se clasificaron en frecuentes y ocasionales.

Hubo dos visitantes frecuentes que correspondieron a dos especies de abejas una de ellas es *Megachile zapoteca* y la otra, *Apis mellifera*. Respecto a las *M. zapoteca*, se observó que visitaban tanto flores en antesis como en pre-antesis, aunque preferían las que estuvieran en antesis. Cuando había flores en antesis, estas abejas las ubicaban y activaban el mecanismo explosivo, acto seguido se

marchaban de la flor para continuar activando a otras. Para activar el mecanismo, llegaban a la flor y se posicionaban sobre las alas-quilla. Posteriormente, acomodaban las patas delanteras en la parte basal de las alas-quilla y, finalmente, insertaban su probóscide en el espacio en que colindan el estandarte y la quilla. Mientras se trasladaban de una flor a otra, se acomodaban el polen llevándolo al metasoma (abdomen sin primer segmento; Figura 11). En algunas ocasiones, en las cuales llegaban a la población floral antes de que hubiera flores en antesis, estas abejas introducían su cabeza en el pliegue que genera el estandarte y se metían bajo el estandarte hasta activar el mecanismo explosivo; a pesar de poder activar a las flores en pre-antesis, tenían preferencia por las flores en antesis. Las *M. zapoteca* llegaban a la población floral entre las 09:40 y 10:40 horas dependiendo del estado del tiempo (en días nublados llegaban más tarde, mientras que en días soleados lo hacían más temprano), y se las observó de manera intermitente hasta las 16:00 horas. En algunos periodos se les podía observar en las hojas de *D. grahamii* acomodándose el polen en sus escopas. Se determinó que eran capaces de activar alrededor de 17 flores por minuto, cuando había varias flores en antesis; las flores podían encontrarse alejadas entre sí (Tabla 2).

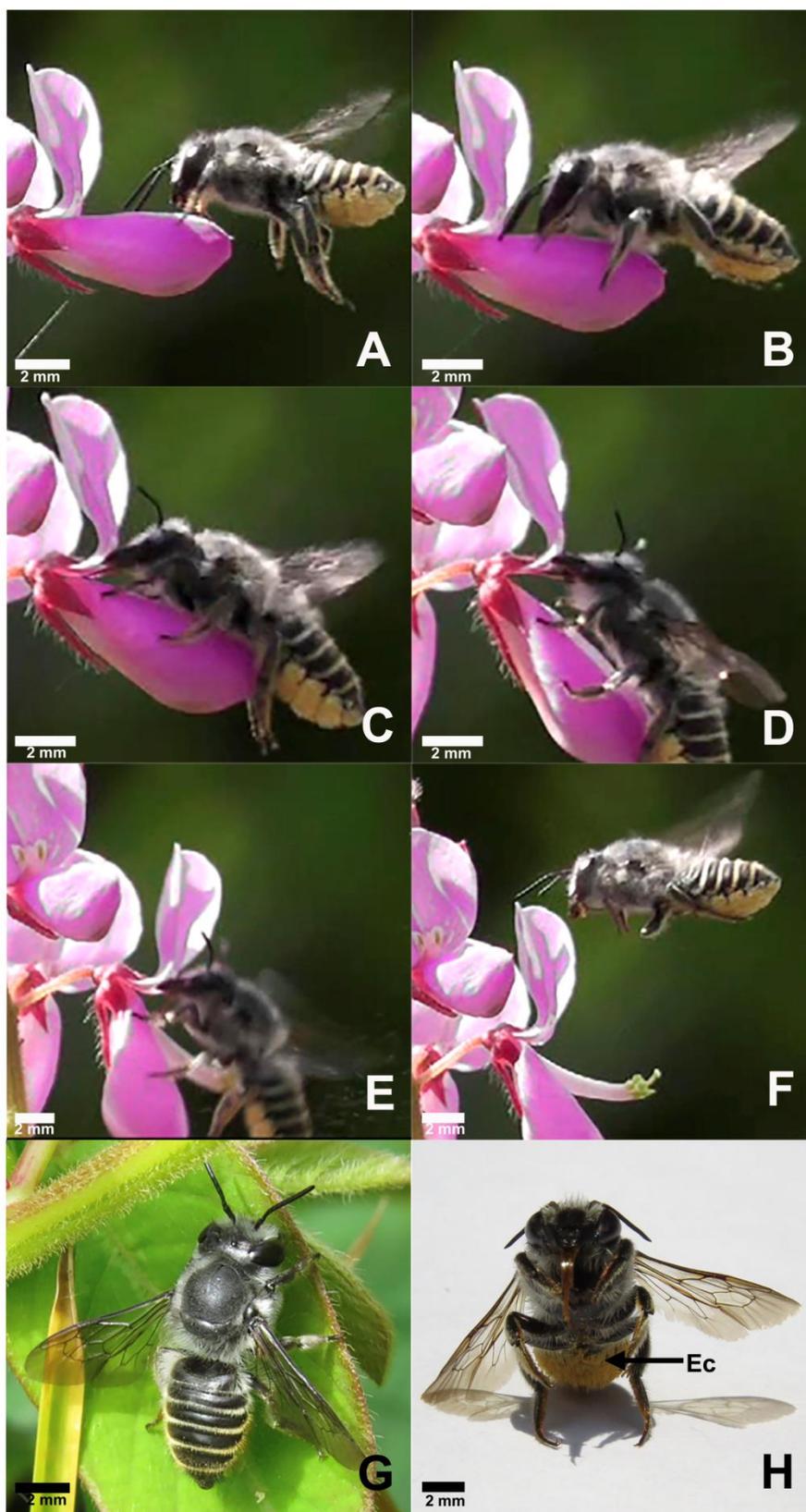


Figura 11. Polinización de *D. grahamii* por *Megachile zapoteca*.

A-F. Activando la polinización explosiva. A. Aterrizando en el conjunto alas-quilla. B. Posicionándose. C. Introduciendo su probóscide en el punto de inserción entre el estandarte y quilla. D-E. Expulsión explosiva de la columna estaminal y gineceo, que golpean la parte ventral de la abeja. F. Retirándose después de haber activado la polinización explosiva. G. Individuo en hojas de *D. grahamii* acomodándose el polen.

H. Individuo colectado con polen en las escopas ubicadas en la parte ventral. Ec= Escopas.

El segundo tipo de abeja más frecuente correspondió a *Apis mellifera*, la cual a diferencia de las *M. zapoteca*, visitaba tanto flores en antesis como en pre-antesis y en post-antesis (Figuras 12 A-E). Se observó que de acuerdo a las condiciones climáticas (soleado o nublado) llegaban a la población entre las 09:00 y las 10:50 horas; y se las llegó a observar hasta las 16:00 horas, siendo que estaban presentes de forma intermitente. En el caso de las flores en pre-antesis, si bien eran capaces de forzar su apertura, requerían que el estandarte ya se encontrara levemente desplegado. Como las *M. zapoteca*, llegaban a las flores y se acomodaban sobre la quilla, posicionaban sus patas delanteras en la parte basal de la quilla e introducían la probóscide en el punto de unión entre el estandarte y la quilla. A diferencia de las *M. zapoteca*, tardaban más en activar el mecanismo y, una vez liberada la columna estaminal, recolectaban el polen y lo acomodaban en sus corbículas (Figura 12D). Las flores en post-antesis las visitaban cuando había menor cantidad de flores en antesis; cabe mencionar que también visitaban las del día anterior. Se determinó que visitaban alrededor de 12 flores por minuto y podían activar en promedio 11.25 ± 3.12 flores por minuto, pero estas flores solían encontrarse dentro de un área limitada, puesto que estas abejas tendían a permanecer en una zona por largos periodos (Tabla 2). Un aspecto que resulta de gran importancia es que si bien *A. mellifera* visitaba a *D. grahamii*, cerca de mediodía enfocaba su atención en otras flores que tenían como recompensa el néctar y que se encontraban frente a la población de *D. grahamii* (Figuras 12 F-H).

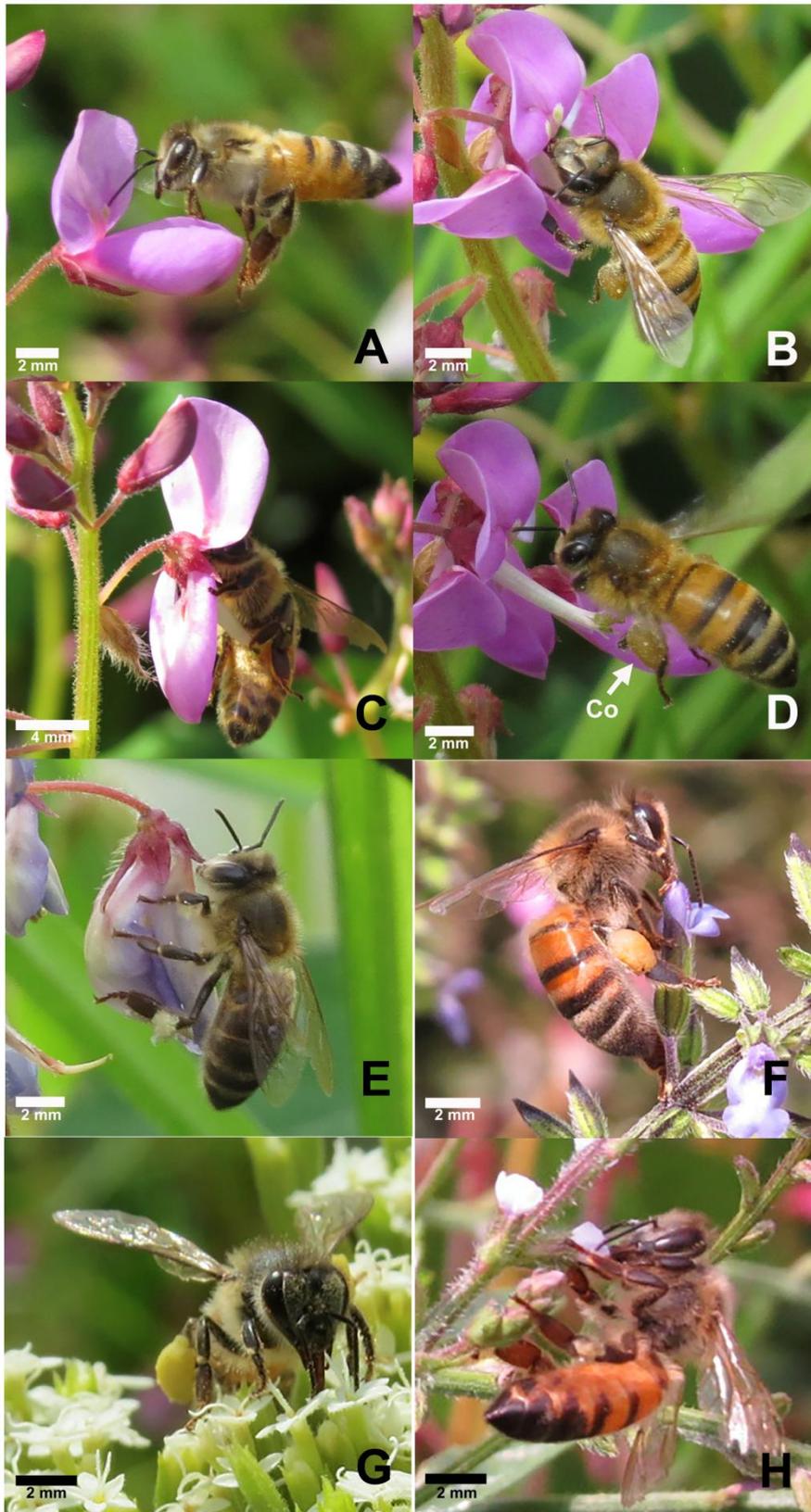


Figura 12. Polinización de *D. grahamii* por *Apis mellifera*. A-D. Visitando flores en antesis y llevando a cabo la polinización. D. Se observa el polen colectado en las corbículas. E. Colectando polen de flores en post-antesis. F-H. *A. mellifera* visitando flores de otras especies. Co= Corbículas.

Dentro de los visitantes ocasionales se observaron 2 especies de *Xylocopa* (una de ellas *Xylocopa tabaniformis ssp. azteca*), *Centris mexicana*, *Melissodes tepaneca* y 2 especies de moscas *Allograpta* (*A. obliqua* y *A. exotica*). *C. mexicana* (Figuras 13A y B) y *M. tepaneca* (Figuras 13C y D) visitaron la población desde la última semana de agosto y en el mes de septiembre. *M. tepaneca* se observó con mayor frecuencia que *C. mexicana*, siendo que se la encontró desde las 09:00 y hasta las 12:30 horas. *C. mexicana* se observó desde las 10:00 hasta las 15:30 horas; sin embargo, tendía a permanecer cortos periodos. Se calculó que *M. tepaneca* visitaba alrededor de 18 flores por minuto, sólo activaba unas pocas por zona y se desplazaba a lo largo de la población. *C. mexicana* activaba cerca de 19 flores por minuto, y éstas se encontraban cercanas entre sí. Ambas únicamente visitaban flores en antesis y llegaban a la flor de forma similar a las *M. zapoteca* (Tabla 2).

Respecto a las *Xylocopa* sp. (Figura 13E), se observó que eran capaces de activar el mecanismo y visitaban pocas flores. Acto seguido se marchaban, para después regresar y activar otras. Estas abejas sólo visitaban flores en antesis, no necesitaban colocarse completamente sobre la quilla e introducían su probóscide en el punto de unión estandarte-quilla. En conjunto se les observó únicamente en cuatro ocasiones, entre las 09:00 y las 10:30 horas. Se contabilizó que en un minuto *Xylocopa tabaniformis ssp. azteca* podía activar 12 flores; no obstante, se observó que interrumpía la actividad para visitar las flores de *Phaseolus leptostachyus* que se encontraba entre la población de *D. grahamii*.

En el caso de las *Allograpta* (Figuras 13 F-H) se observó que únicamente visitaban flores en post-antesis, siendo que se dedicaban a limpiar el polen que hubiese quedado en las anteras, en dicho proceso entraban constantemente en contacto con el estigma. Estas moscas visitaban varias flores, pero permanecían largo tiempo en cada una; se las observó en cuatro ocasiones entre las 09:00 y las 11:00 horas.

Tabla 2. Polinizadores y visitantes florales: características de su visita

Polinizador o visitante (no. especies, frecuencia)	Flores visitadas / minuto \pm d.e.	n*	Horario	Etapas Florales
<i>M. zapoteca</i> P (2, F)	16.9 \pm 3.24	9	09:40-16:00	Pre y At
<i>Apis mellifera</i> P (F)	11.6 \pm 2.74	8	09:00-16:00	Pre, At y Pt
<i>C. mexicana</i> P (O)	18.5 \pm 2.12	2	10:00-15:30	At
<i>M. tepaneca</i> P (O)	17.6 \pm 10.18	3	09:00-12:30	At
<i>Xylocopa</i> P (2, O)	11.7 \pm 4.73**	3	09:00-10:30	At
<i>Allograpta</i> V (2, O)	-***	-	09:00-11:00	Pt

P= polinizador, V=visitante, F= frecuente, O= ocasional, Pre= pre-antesis, At= antesis y Pt= post-antesis.

*Número de conteos de visitas por minuto

**Datos para *Xylocopa tabaniformis ssp. azteca*.

***Permanecen largo tiempo en cada flor.

El máximo número de individuos de abejas observado en la población en un momento dado fue de 13, incluyendo *M. zapoteca*, *A. mellifera*, *M. tepaneca* y *C. mexicana*. A pesar de ello, de manera más frecuente, el número de abejas máximo fue de entre 5 y 6. Se cuantificó la cantidad de flores activadas en 88.8% (n= 90) por día, sugiriendo que la mayoría de las flores en antesis eran activadas

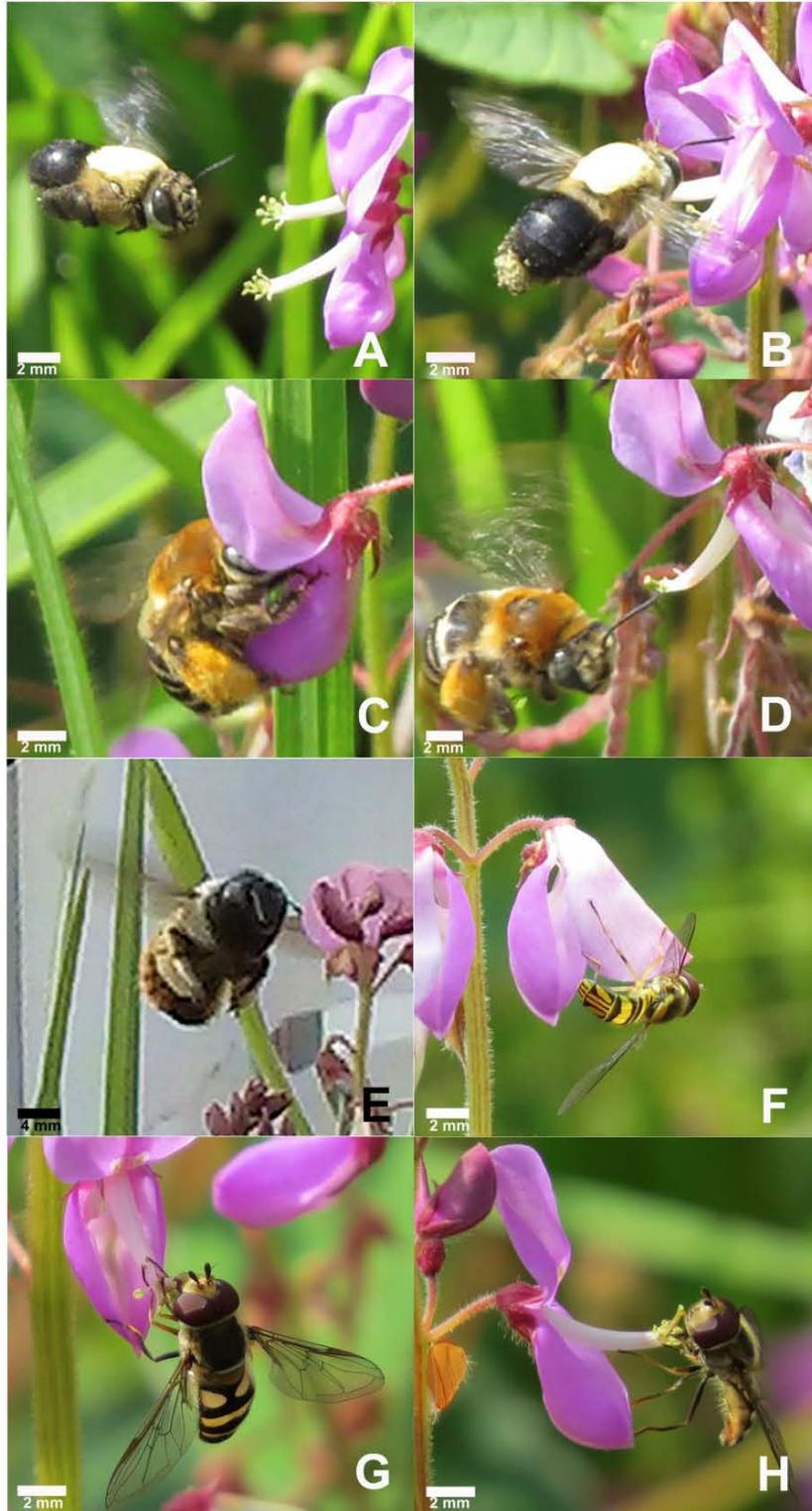


Figura 13. Polinizadores y visitantes ocasionales de *D. grahamii*. A-B. *Centris mexicana*. C-D. *Melissodes tepaneca*. E. *Xylocopa tabaniformis* ssp. *azteca*. F. *Allograpta obliqua*. G-H. *Allograpta* sp.

Con la finalidad de determinar la eficiencia del polinizador se realizaron observaciones de estigmas de pistilos de flores activadas por abejas y activadas manualmente. Para ambos tratamientos se colectaron flores correspondientes a 0.5, 1, 2, 3 y 4 h (24 h para activadas por abejas) después de ser activadas. En los pistilos correspondientes a 4 h después de activado el mecanismo (por abeja o manualmente) no se observaron tubos polínicos, ni tampoco en los de flores post-antesis de 1 día activadas por abejas. Los estigmas de las flores activadas por abejas presentaban mayor cantidad de polen (habiendo sólo dos estigmas sin polen de los 22 observados) que los de flores activadas manualmente, donde la cantidad de polen era nula o muy cercana a nula (Tabla 3 y Figura 14).

Tabla 3. Porcentaje de polen en estigmas de flores activadas.

Tiempo después de activar	Mecanismo activado (estigmas con polen / n)			
	Por abejas		Manualmente	
1 h	★★	(5/5)	○	(2/5)
3 h	★★	(5/6)	○	(1/5)
4 h	★★	(4/5)	○	(0/5)
24 h	★★★	(6/6)	-	

Donde el porcentaje promedio de polen observado en los estigmas es ★= superior a 25%, ★★=superior a 50%, ★★★=superior a 75%. y ○= 0% o casi 0%. Los porcentajes se determinaron comparando visualmente con el máximo observado.

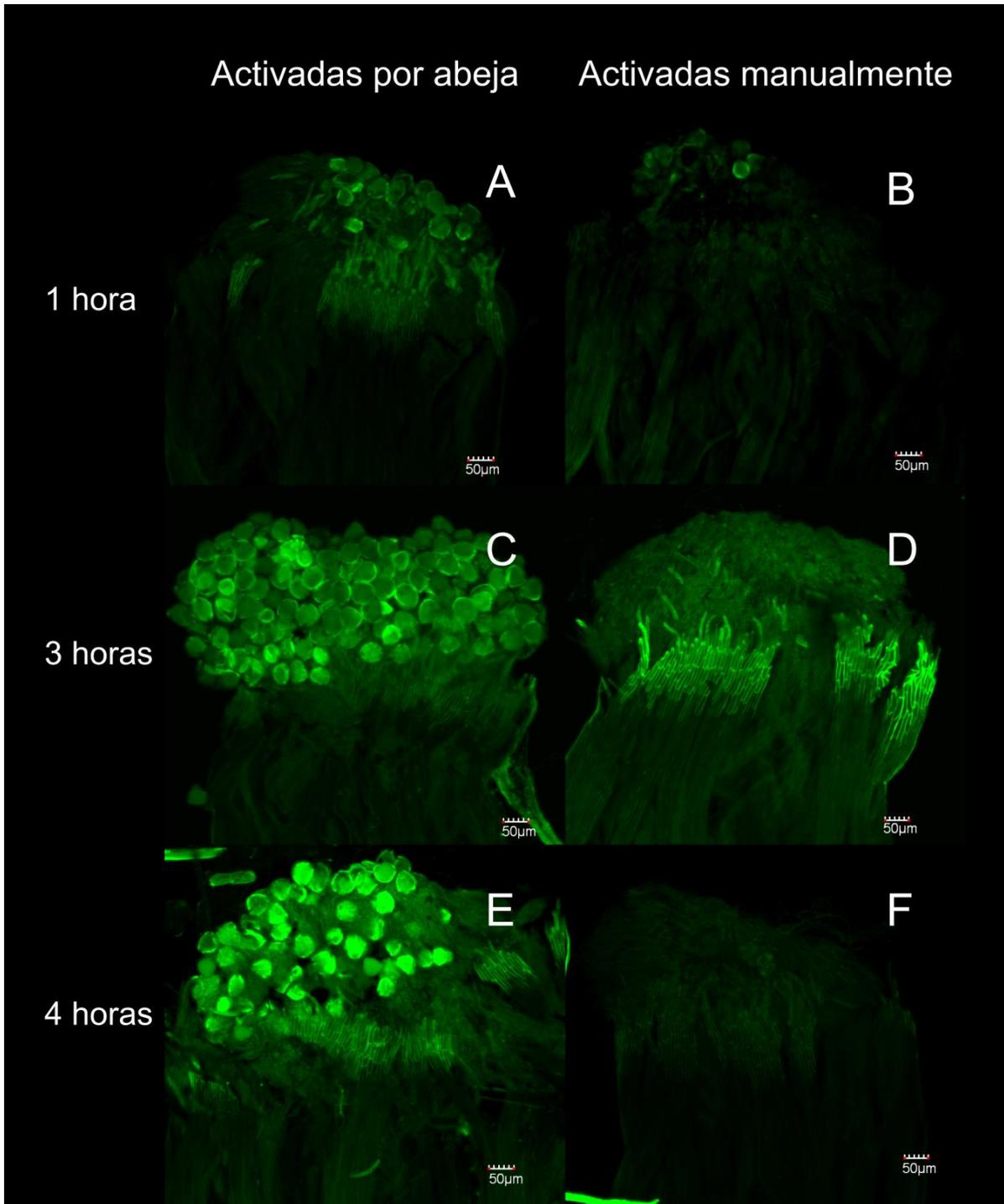


Figura 14. Adhesión de los granos de polen. A, C y E. Estigmas de flores activadas por abejas. B, D y F. Estigmas de flores activadas manualmente. A y B. 1 h después de activadas. C y D. 3 h después de activadas. E y F. 4 h después de activadas.

Polinizaciones controladas

Se contó el número de óvulos en las flores ($n= 30$) y se comparó con el número de semillas por fruto ($n= 30$) producidos de manera natural. El número promedio de óvulos fue de 8.43 ± 0.626 , siendo 7 la menor cantidad y 10 la mayor, encontrada por ovario. En el caso de las semillas, se encontró que en promedio se producían 7.23 ± 1.19 , siendo la menor cantidad 3 y la mayor 9 por fruto. El número de óvulos fue significativamente mayor ($U= 157$; $p < 0.0001$) que el de semillas producidas de manera natural.

Para evaluar la eficiencia de los polinizadores, se realizó el conteo de semillas formadas por fruto (tienen gineceo monocarpelar con ovario unilocular) para cada tipo de polinizador. Durante la realización de las polinizaciones controladas únicamente se encontraron presentes abejas *Megachile zapoteca* y *Xylocopa tabaniformis ssp. azteca*, motivo por el cual se hicieron 7 tratamientos: (1) Control positivo; (2) Control negativo; (3) Autocruza; (4) Entrecruza; (5) activada por *Megachile* abierto; (6) activada por *Megachile* embolsada; (7) activada por *Xylocopa* embolsada. Las especificaciones de cada tratamiento se describen detalladamente en el método; para el tratamiento (5) activada por *Megachile* abierto referir a “activada por abeja abierto” y para los tratamientos (6 y 7) activada por *Megachile/Xylocopa* embolsada, referir a “activada por abeja embolsada”. Los resultados del tratamiento (4) entrecruza ($n= 60$) se excluyeron debido a que demostraron que la técnica fue insuficiente para equiparar la función de los polinizadores.

Tabla 4. Producción de semillas en tratamientos de polinización controlada

	Tratamiento	Individuos	Frutos / Flores totales (n)	Proporción de Frutos/ Flores	Semillas promedio±d.e.
1	Control positivo	20	38 / 51	0.74	3.27±2.51
2	Control negativo	10	22 / 72	0.30	1.33±2.21
3	Autocruza	12	10 / 49	0.20	0.92±1.96
5	<i>Megachile</i> abierto	32	30 / 51	0.59	3.51±3.38
6	<i>Megachile</i> embolsada	26	40 / 57	0.70	3.82±3.07
7	<i>Xylocopa</i> embolsada	10	18 / 21	0.86	5.76±3.36

*El tratamiento (4) Entrecruza fue excluido

Se encontró que la proporción frutos/flores fue mayor para las flores expuestas (tratamiento 1: control positivo) y para las activadas por abejas *Megachile* o *Xylocopa* (tratamientos 5, 6 y 7) que para las flores activadas manualmente (tratamiento 3: autocruza) y las que no fueron manipuladas (tratamiento 2: control negativo; Tabla 4). El número de semillas producidas por fruto fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en el control positivo y en las flores activadas por abejas (*Xylocopa* o *Megachile*) respecto de las activadas manualmente o no manipuladas (Figura 15).

Semillas en polinizaciones controladas

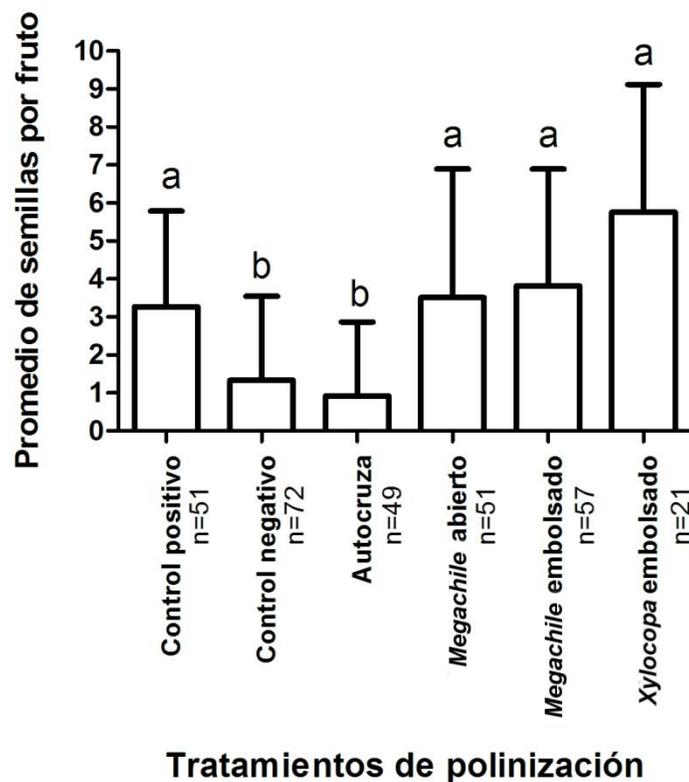


Figura 15. Promedio de semillas producidas por fruto \pm d. e. en 6 tratamientos de polinización. Existen diferencias entre los tratamientos ($H= 66.4$; $g.l. 5$; $p < 0.0001$). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

Se comparó el porcentaje de semillas producidas por fruto entre los distintos tratamientos y se encontró que tanto el control negativo como la autocruza presentan el mayor porcentaje de flores que no producen fruto. De igual manera se observó que en los tratamientos con abejas, es en los que se produce mayor porcentaje de frutos con seis o más semillas (Figura 16).

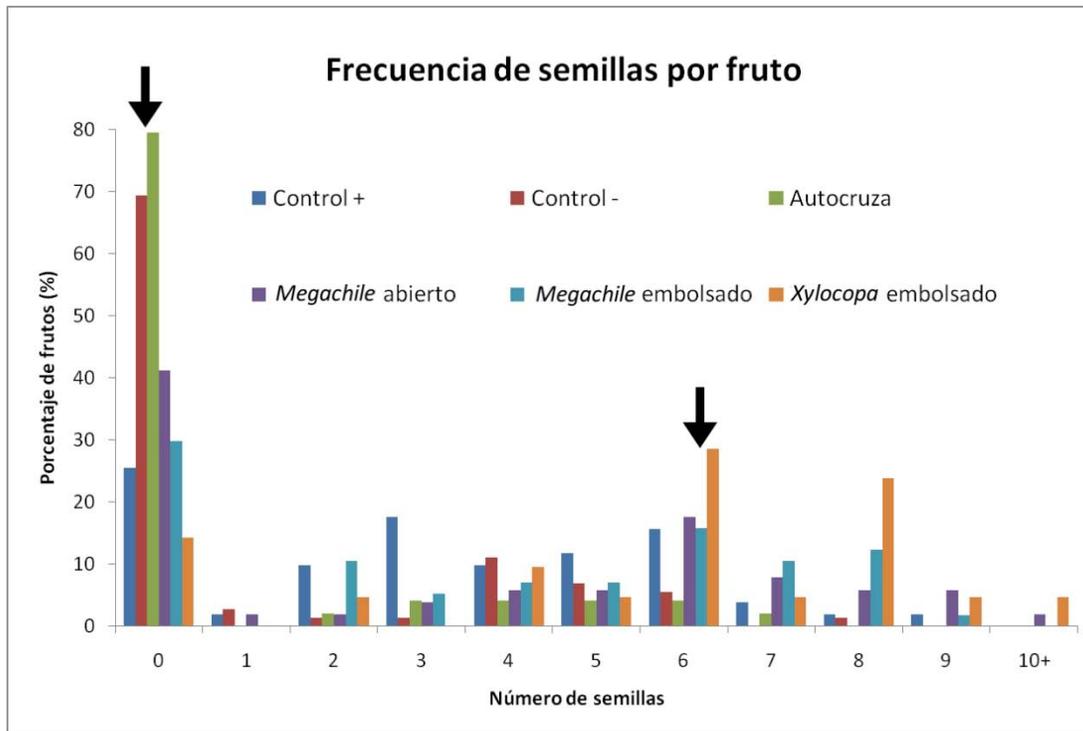


Figura 16. Frecuencia de número de semillas producidas por tratamiento de polinización. Los tratamientos de Control – y Autocruza presentan la menor producción de semillas.

Estructuras reproductivas durante el desarrollo floral

Con la finalidad de tener evidencia sobre la posición de las estructuras reproductivas dentro de la quilla durante el desarrollo y en las flores en pre-antesis, se aclararon botones florales. Desde etapas tempranas se presenta hercogamia. Inicialmente el estigma se encuentra dirigido hacia las anteras pero en flores pre-antesis está direccionado hacia el estandarte. Se observó que desde los botones más pequeños se pueden observar dos niveles de anteras. Conforme avanza la etapa de botón, la columna estaminal junto con el estigma se acercan al margen adaxial de la quilla; sin embargo, en etapas más tardías el crecimiento en los verticilos florales, aleja al estigma del margen superior de la quilla (Figura 17).

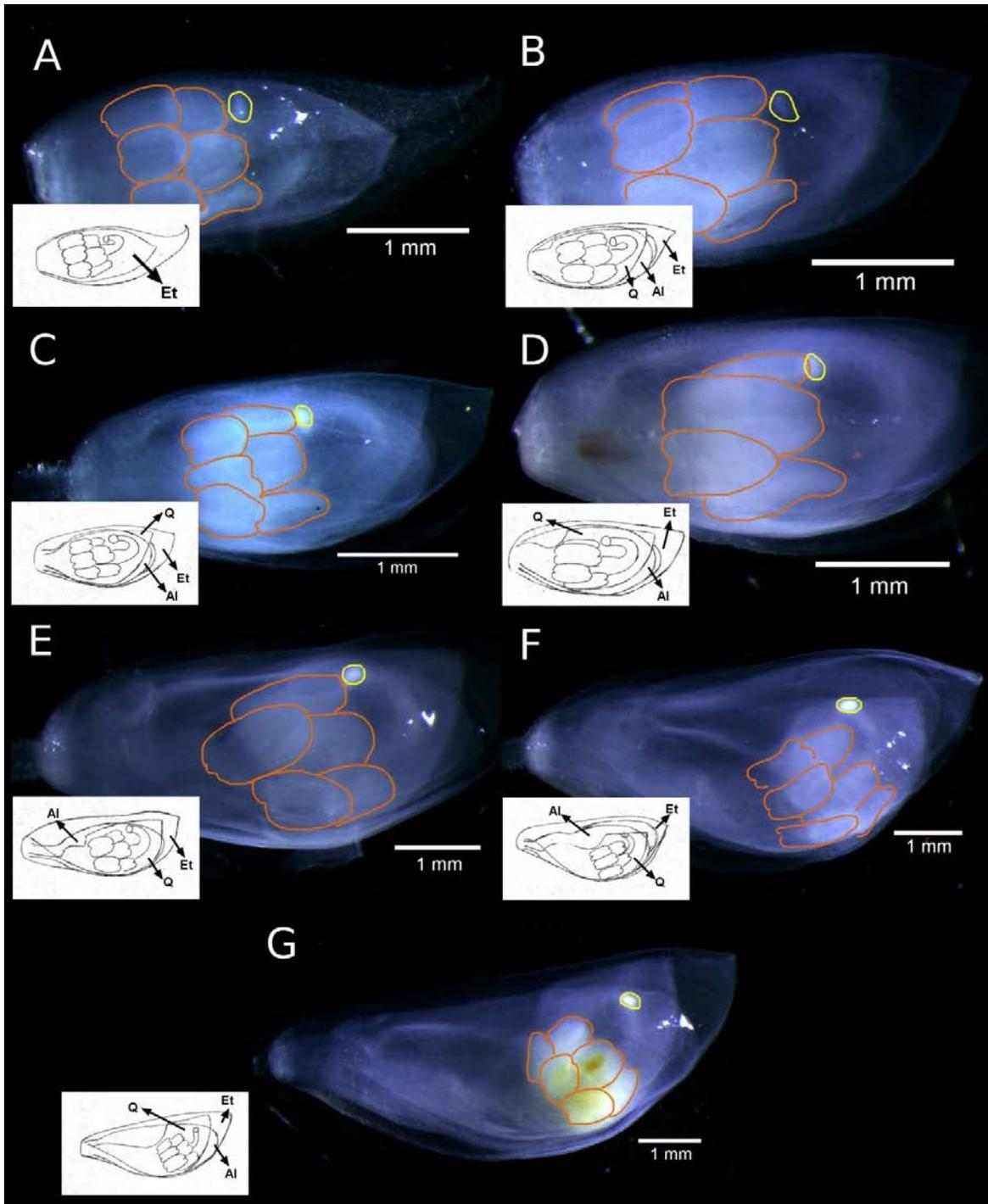


Figura 17. Posición de anteras y pistilo en flores correspondientes a botones en siete etapas. A. Botón en etapa 1. B. Botón en etapa 2. C. Botón en etapa 3. D. Botón en etapa 4. E. Botón en etapa 5. F y G. Botones en etapa 7 (G de mayor tamaño). Con color anaranjado se presenta el contorno de las anteras y con color amarillo, el del estigma. En esquina inferior izquierda representación esquemática. Al=Ala, Et= Estandarte y Q=Quilla.

Para determinar el tiempo de receptividad del estigma y la dehiscencia de las anteras, se hicieron observaciones al MEB de pistilos y de anteras en pre-antesis. También se observaron, al microscopio óptico, cortes de anteras en pre-antesis y en antesis; así como, de estigmas en pre-antesis, antesis y post-antesis. Los pistilos de *D. grahamii* están compuestos por un ovario que presenta gran cantidad de tricomas en su superficie; un estilo hueco y curvo, que exhibe un canalículo en su cara interna; y un estigma que está rodeado por cilios (Figura 18).

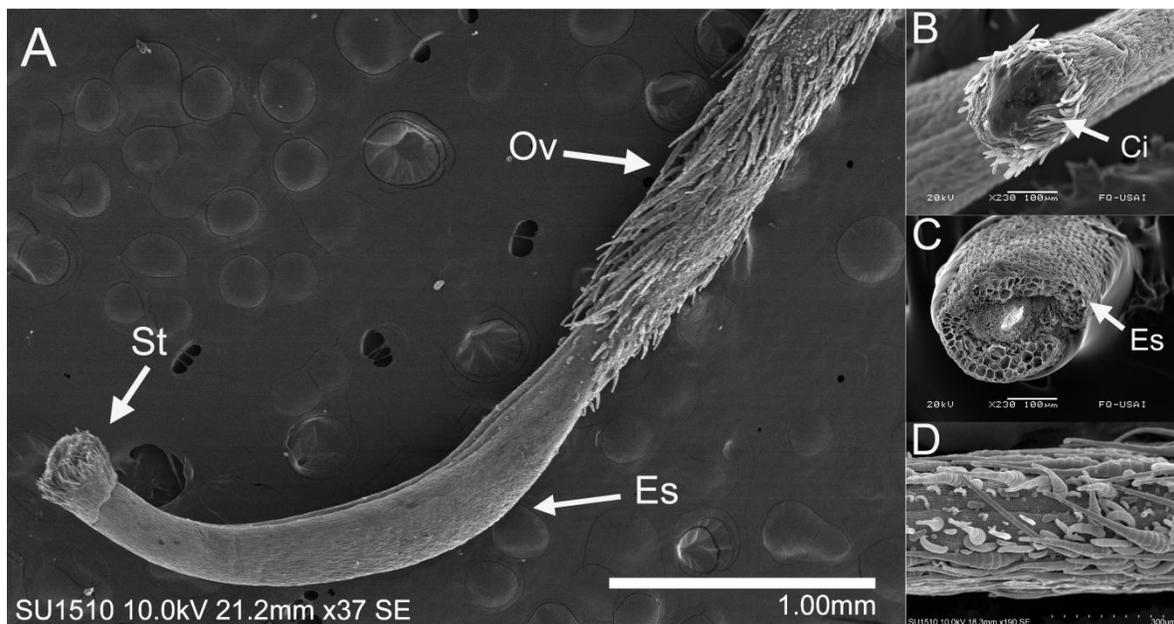


Figura 18. Pistilo de *Desmodium grahamii*. A. Ovario, estilo y estigma. B. Acercamiento del estigma. C. Acercamiento del estilo. D. Superficie del Ovario. Ci= Cilios, Es=Estilo, Ov=Ovario y St=Estigma.

El estigma de *D. grahamii* corresponde a un estigma húmedo. Tanto en flores en pre-antesis como en antesis se presenta una secreción; sin embargo, no se observó polen adherido a su superficie (Figuras 19 A-F). La secreción aumenta en los estigmas en antesis (Figuras 19D y E). A nivel celular, se observó que varias

de las células epidérmicas y de algunos estratos inferiores perdieron su integridad, indicando una mayor acumulación de secreción (Figura 19F). En los estigmas de flores post-antesis son los únicos en los que se observaron granos de polen adheridos a su superficie (Figuras 19 G-I). En estos la secreción fue mayor y a nivel celular, pudo observarse que las células epidérmicas y de estratos inferiores han colapsado y en el proceso han liberado gran cantidad de secreción (Figura 19i).

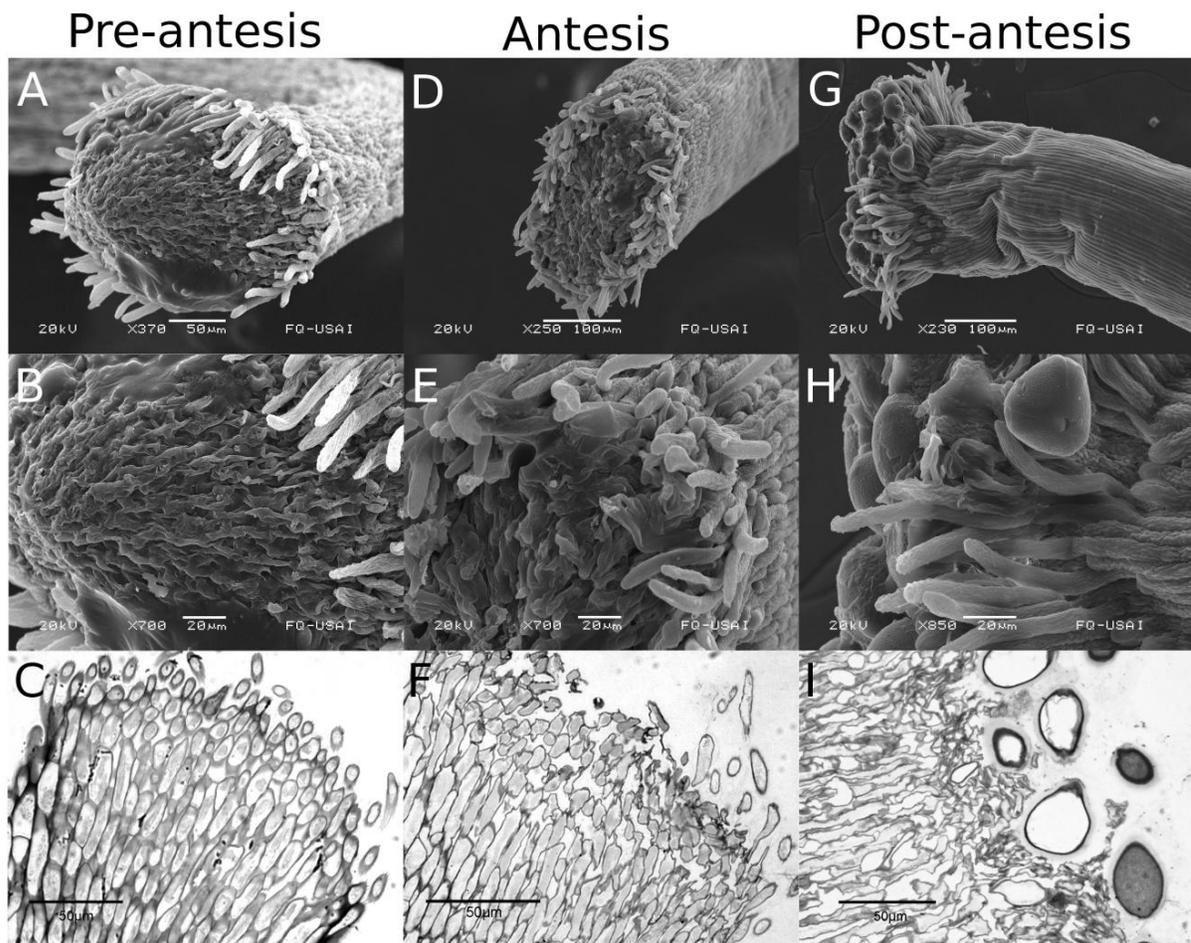


Figura 19. Estigmas de flores de *D. grahamii*. A-C. Pre-antesis, D-F. Antesis y G-I. Post-antesis. Nótese la ausencia de granos de polen en A-F y su abundancia en G-I.

Se encontró que las anteras están dispuestas en dos niveles, son bilobulares y cada lóbulo está formado por 2 microscoporangios (Figuras 20 y 21 A-B). Presentan dehiscencia longitudinal. En etapa pre-antesis (etapa 6) no se observaron dehiscentes, se pudieron observar granos de polen ya formados y engrosamientos en el endotecio (Figuras 20 C-D y 21 A-B). En las anteras de flores en antesis, se observó la fusión de ambos microsporangios, mayor engrosamiento del endotecio y que el estomio se encuentra muy adelgazado (Figuras 21 C-D).

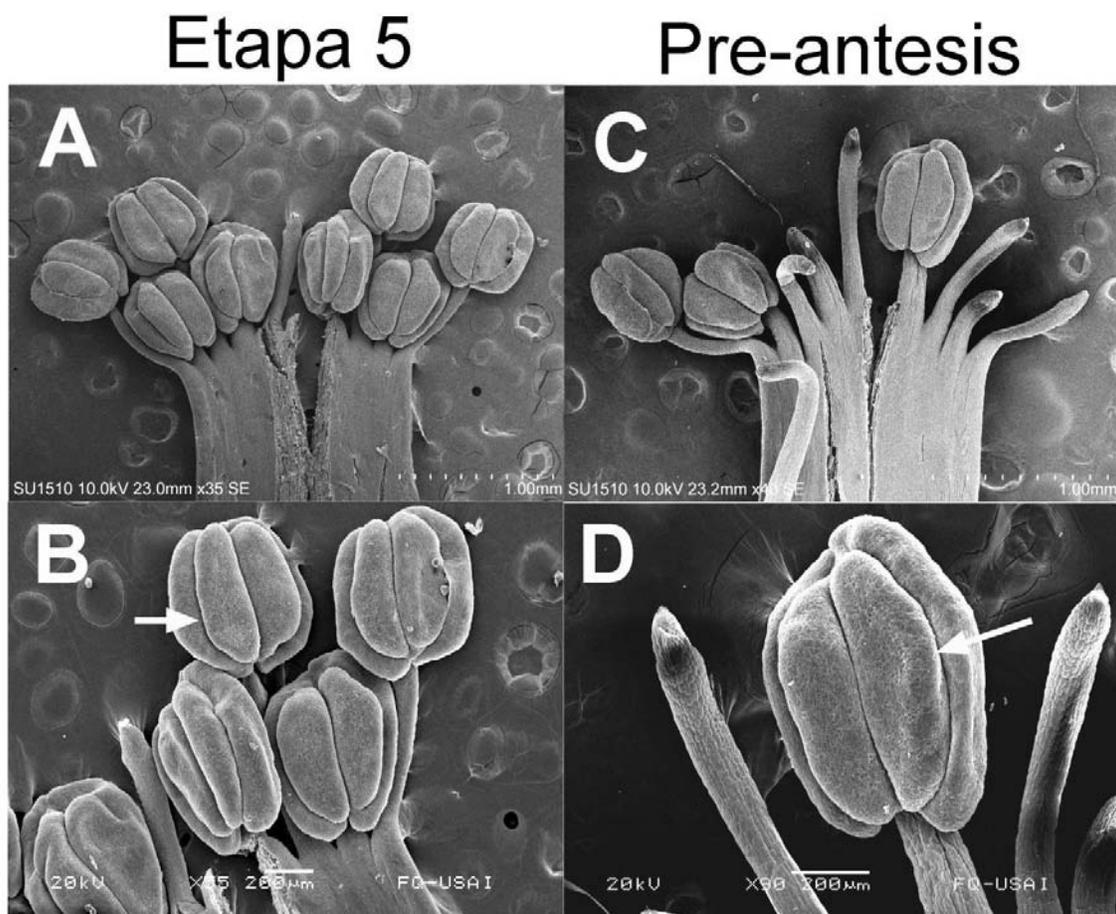


Figura 20. Anteras de flores de *D. grahamii*. A-B. Etapa 5. C-D. Pre-antesis. Las flechas blancas señalan líneas de dehiscencia longitudinal. Nota: Algunos de los filamentos han perdido su antera.

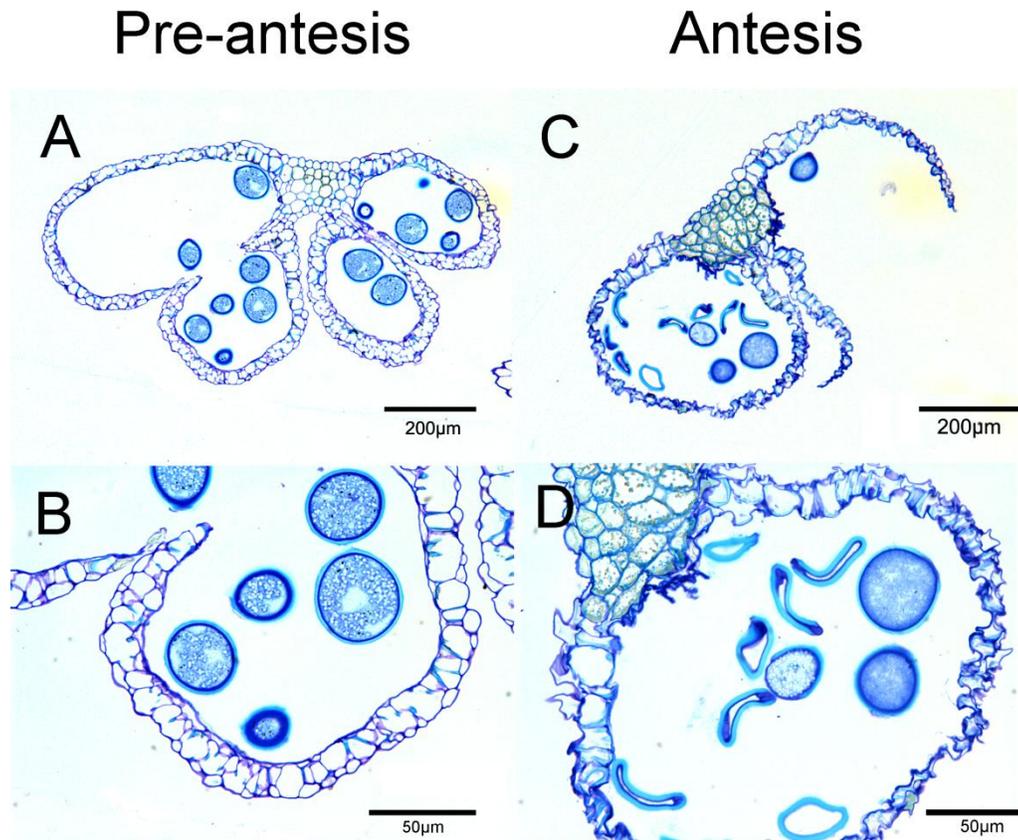


Figura 21. Corte transversal de anteras de flores de *D. grahamii*. A-B. Pre-antesis. C-D. Antesis. En ambas se observan granos de polen formados.

Tipo de recompensa

En campo se observó que los polinizadores descritos colectaban polen de las flores. Se colectaron ejemplares de *Megachile zapoteca* y *Apis mellifera*, y al observarlos en microscopio estereoscópico se identificó que las *M. zapoteca* acumulan el polen en escopas situadas en la parte ventral del metasoma y que *A. mellifera* lo acumula en las corbículas ubicadas en sus patas (Figura 22).

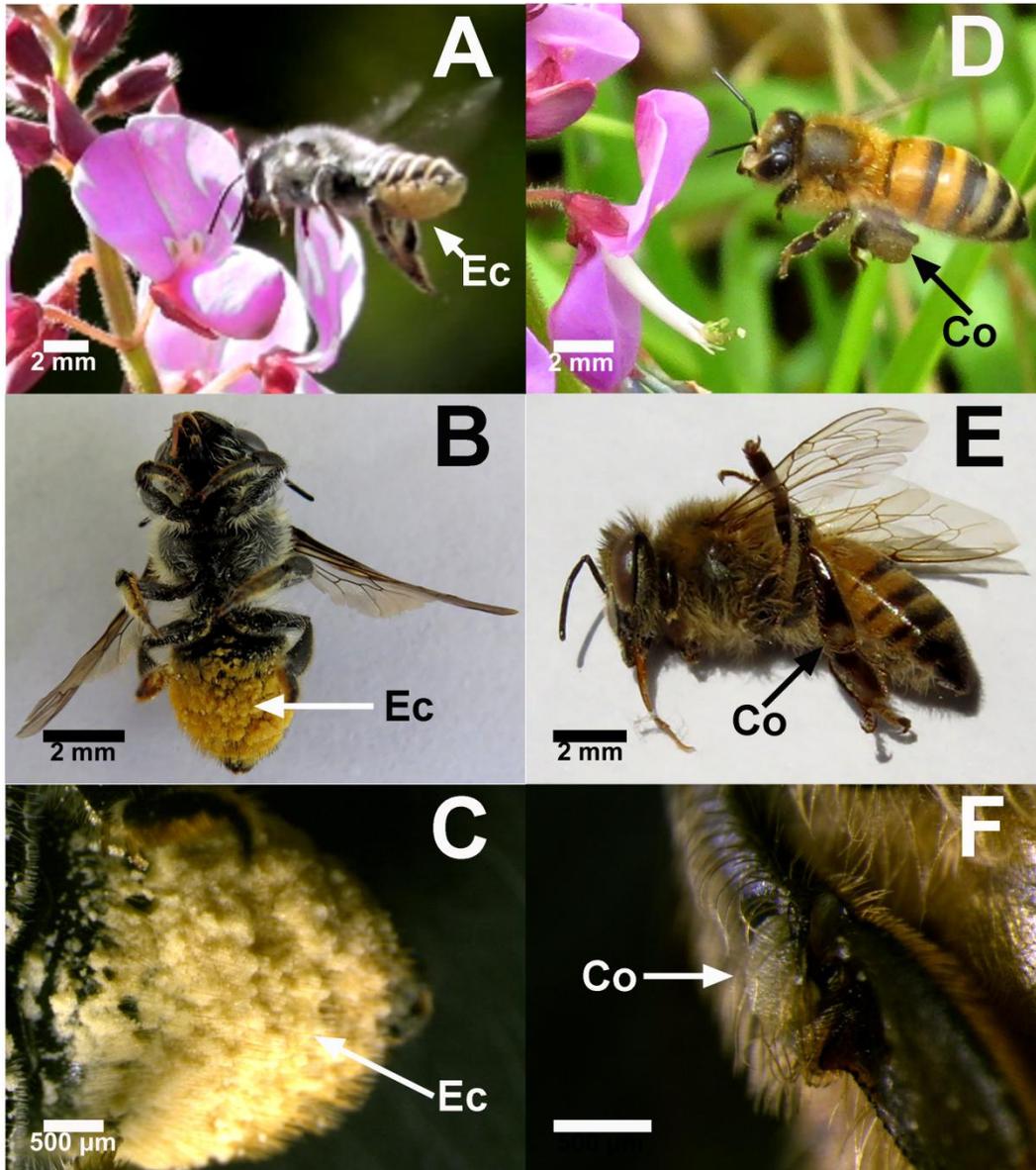


Figura 22. Ubicación del polen en abejas. A-C. *Megachile zapoteca*. D-F. *Apis mellifera*. Co= Corbícula y Ec= Escopa.

Se colectó el polen de los ejemplares de abejas y se observó bajo el MEB para determinar si el polen que portaban pertenecía a *D. grahamii*. Se evidenció que el polen en las escopas de *M. zapoteca* correspondió en su totalidad a *D. grahamii* (Figuras 23 C-D). En el caso del polen en las corbículas de *A. mellifera*, se

observó que se encontraba embebido en una sustancia que no permite su clara identificación, pudiendo algunos corresponder al de *D. grahamii* (Figuras 23 E-F).

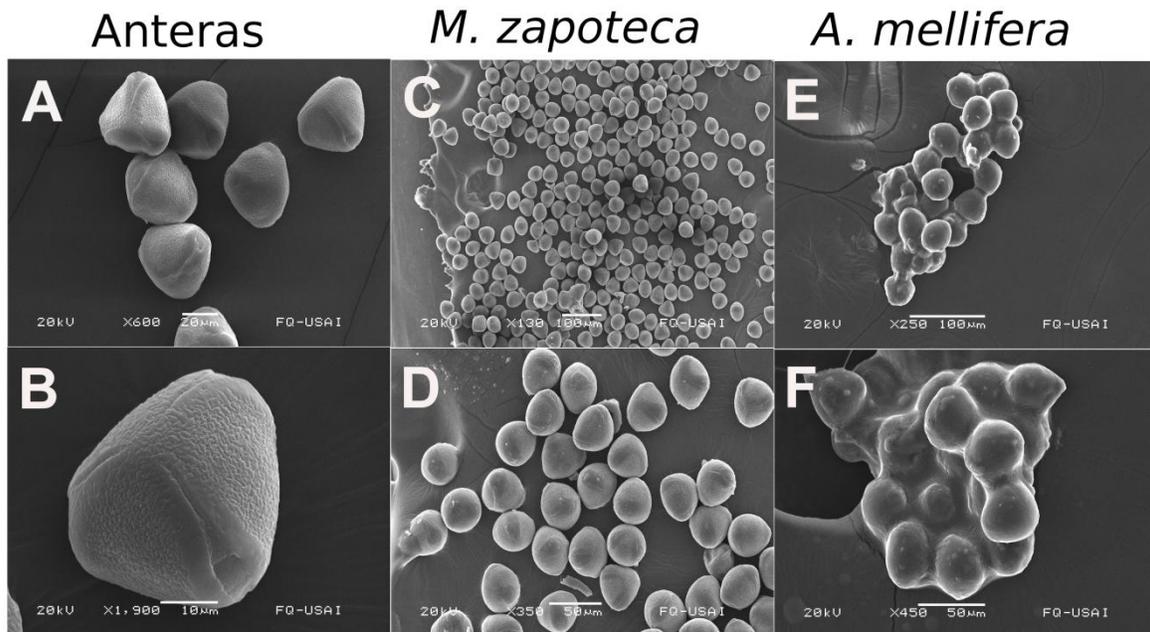


Figura 23. Granos de polen colectados de anteras de *D.grahamii* y de abejas. A-B. Anteras de flores en antesis. C-D. Escopas de ejemplar de *Megachile zapoteca*. E-F. Corbículas de ejemplar de *Apis mellifera*.

Una vez que se comprobó que el polen constituye una de las recompensas, se procedió a la observación en el MEB de las columnas estaminales y receptáculos de flores en pre-antesis, antesis y post-antesis con la finalidad de ubicar estructuras que pudieran ser nectarios. En una primera observación, se identificó una estructura globular ubicada sobre la columna estaminal, cerca de la inserción del estandarte; no obstante, posteriores observaciones comprobaron que no era una estructura constante. En general, no se observó sobre la columna estaminal en la zona de intersección con el estandarte, una estructura que pudiera indicar la presencia de nectarios (Figura 24).

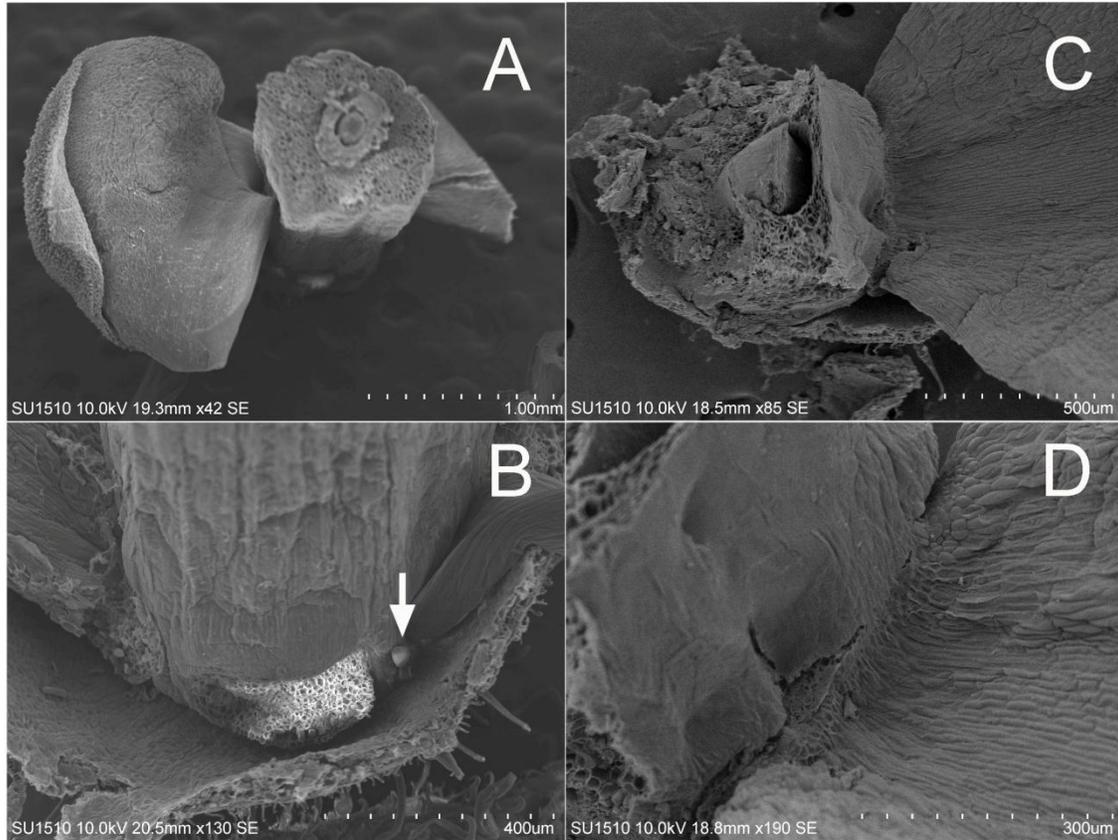


Figura 24. Superficie de la columna estaminal en la zona de intersección con el estandarte. A-B. Estructura globular en columna. C-D. No se observa estructura globular.

Para comprobar la ausencia de estructuras que pudieran funcionar como nectarios, se hicieron cortes y pruebas histoquímicas, para identificar la presencia de polisacáridos y almidón, del receptáculo de flores en pre-antesis y de las columnas estaminales de flores en pre-antesis y post-antesis. Los cortes y las pruebas histoquímicas no mostraron alguna estructura que pudiera funcionar como nectario tanto en el receptáculo como en la columna estaminal (Figura 25).

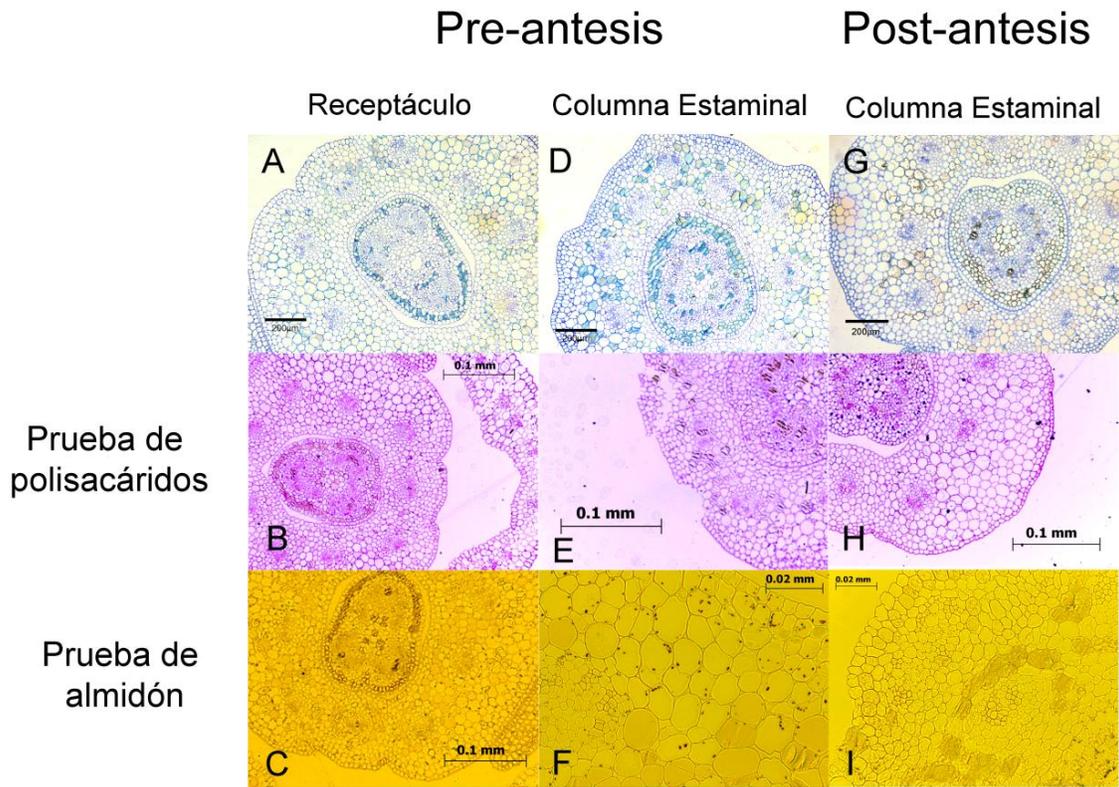


Figura 25. Corte transversal de receptáculo y columna estaminal de flores de *D. grahamii*. A-C. Receptáculo de flores en pre-antesis. D-F. Columna estaminal de flores en pre-antesis. G-I. Columna estaminal de flores en post-antesis.

De igual manera se realizó la observación de los ovarios de flores en pre-antesis, en antesis y en post-antesis. Fue evidente la presencia de una gran cantidad de tricomas sobre la superficie de los mismos (Figura 26).

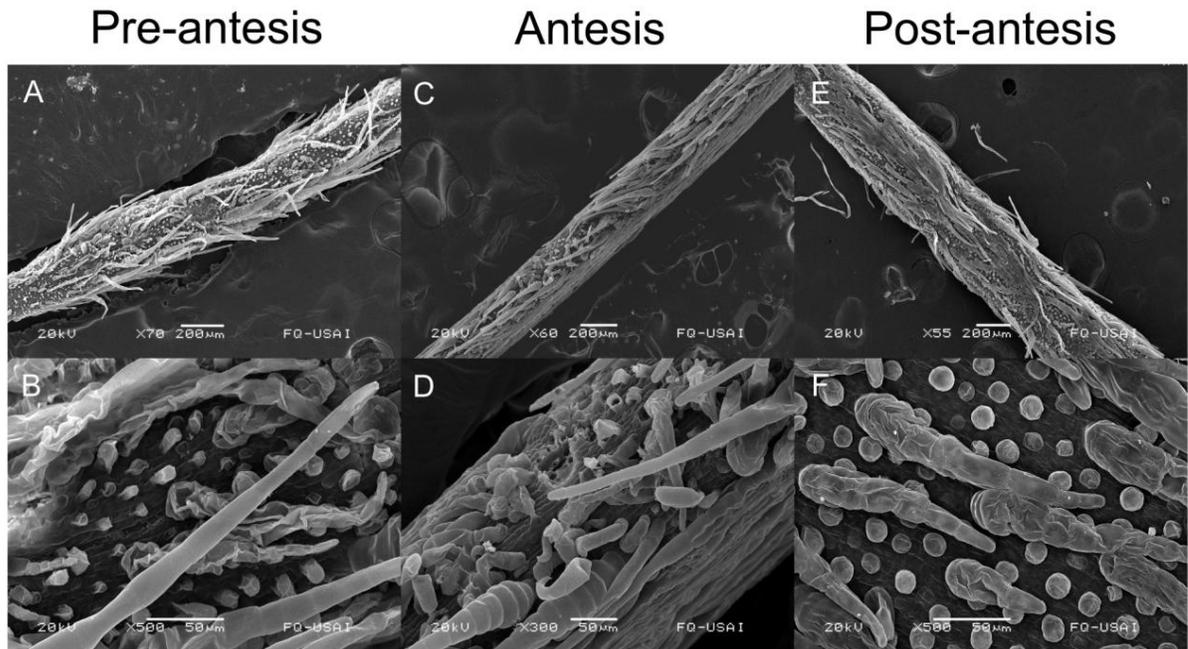


Figura 26. Superficie de ovarios de flores de *D. grahamii*. A-B. Pre-antesis, C-D. Antesis. E-F. Post-antesis. Se observa alta cantidad de tricomas.

Debido a que algunos de los tricomas podrían producir alguna sustancia que sirviera de recompensa a los polinizadores, se hicieron cortes histológicos de ovarios, a los que se aplicaron pruebas histoquímicas para detectar almidón y polisacáridos insolubles. Se observó que la prueba de polisacáridos no indicó presencia de los mismos en los tricomas (Figura 27), descartando que pudieran participar en la formación de néctar.

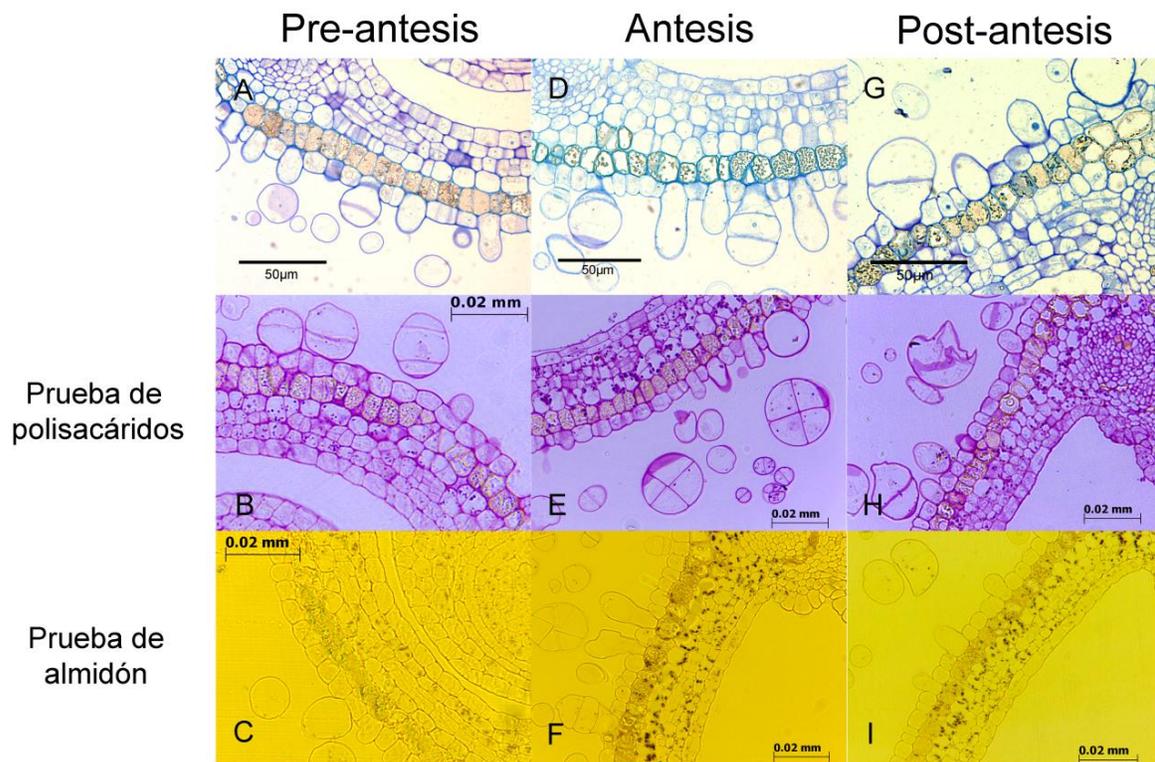


Figura 27. Corte transversal de ovarios de flores de *D. grahamii*. A-C. Pre-antesis, D-F. Antesis. G-I. Post-antesis. No se observa la presencia de polisacáridos y almidón en las células epidérmicas y tricomas.

Por otra parte, para descartar la presencia de osmóforos se sumergieron flores en antesis en una solución de rojo neutro y se encontró que tanto el estandarte como las alas y la quilla se colorearon de color rojo sugiriendo la presencia de osmóforos (Figura 28). A diferencia del estandarte (Figuras 28B y C) y los pétalos de las alas (Figuras 28A y B), los pétalos de la quilla adquirieron una coloración menos intensa (Figuras 28B y D).

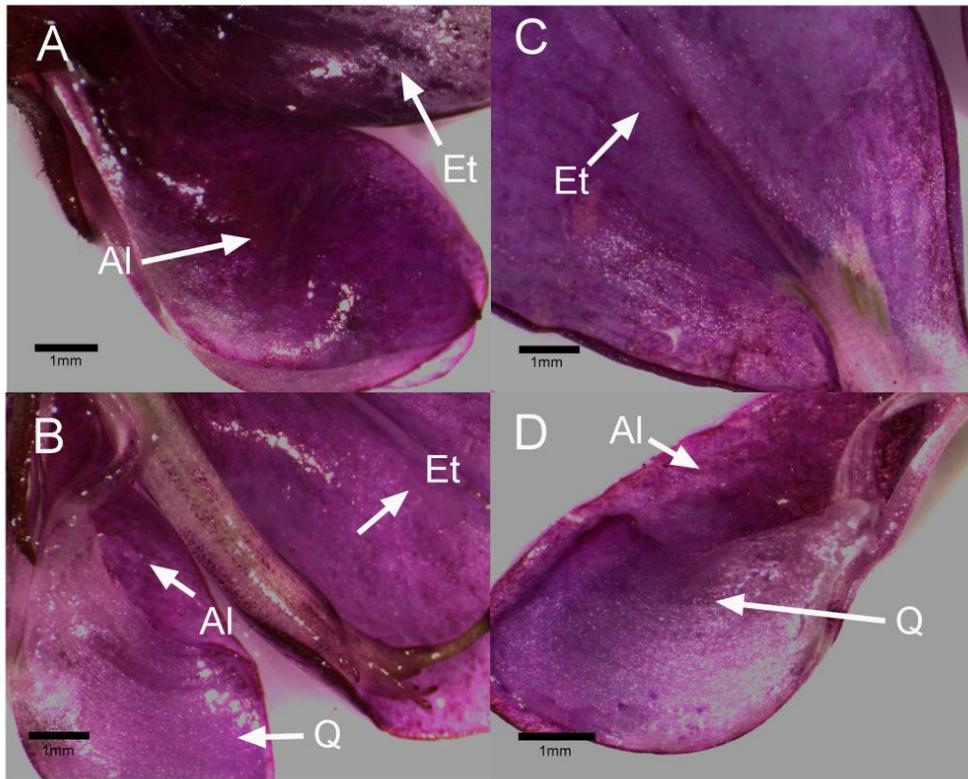


Figura 28. Prueba para detectar osmóforos con rojo neutro. Se observa que el estandarte, quilla y alas presentan coloración rojiza. Al= Alas, Et= Estandarte y Q= Quilla.

Finalmente, se realizó la observación en el MEB de los pétalos (estandarte, quilla y alas) de flores en pre-antesis, antesis y post-antesis. En todos se observaron zonas que presentan una alta cantidad de papilas (Figura 29).

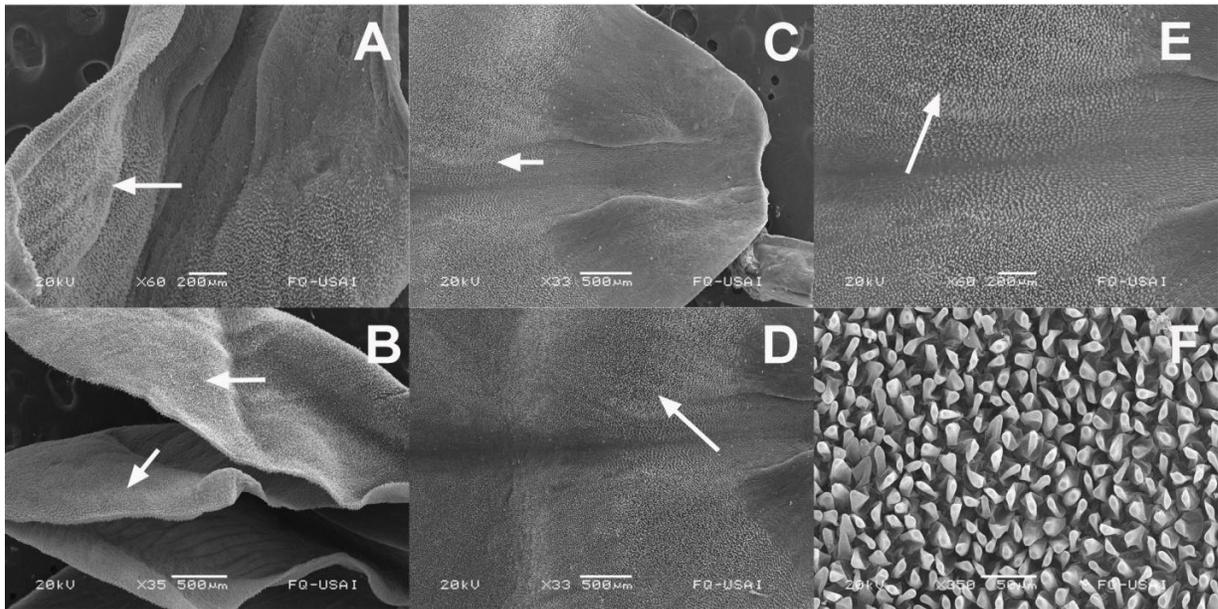


Figura 29. Papilas en superficie de pétalos de *D. grahamii*. A. Estandarte. B. Alas y quilla. C-F. Acercamiento de papilas en el estandarte. Las flechas blancas señalan algunas zonas con papilas.

DISCUSIÓN

Ciclo floral

En lo que refiere al ciclo floral, se observó un cambio de coloración que iba de bordó (en los botones florales) a lila-blanco (en flores en post-antesis). Este cambio es similar al descrito para tres especies de *Desmodium* (Alemán *et al.*, 2014) y para *D. setigerum* (Willmer *et al.*, 2009). Alemán *et al.* (2014) reportan el cambio del tono fucsia en las flores en pre-antesis a turquesa-blanco en las post-antesis el mismo día; en *D. grahamii* las flores cambian de rosa (pre-antesis) a lila (post-antesis) en el mismo día y a blanco (post-antesis) el día siguiente (Figura 4).

En *D. setigerum* se ha reportado reversión de color y reapertura parcial (Willmer *et al.*, 2009); en *D. grahamii* no se observaron estos eventos.

El cambio en los ángulos de apertura entre el estandarte y la punta de la quilla que se observa entre las flores en antesis y las distintas etapas post-antesis (Figura 8), es similar al de otras especies de *Desmodium* (Alemán *et al.*, 2014). Este cambio en el ángulo de apertura así como el cambio de coloración, pueden estar involucrados en la atracción a corta distancia. De tal forma que en las flores ya activadas (etapa 8), el incremento en su ángulo de apertura que está asociado a la exposición de la columna estaminal y del gineceo, cuyo color contrasta con la corola, puede indicar que la flor ha sido visitada y que hay poca o nula recompensa en ella, de manera análoga a *Weigela middendorffiana* (Caprifoliaceae), arbusto de flores campanulares que presentan un cambio de coloración de amarillo a rojo en el centro de su corola, mismo que evita la visita de polinizadores (Weiss y Lamont, 1997; Ida y Kudo, 2003).

Si bien en su trabajo Alemán *et al.* (2014) sugieren que a determinadas horas del día las flores se encuentran de manera sincrónica en pre-antesis, antesis, post-antesis o cambiaban de color, en *D. grahamii* las observaciones demuestran que el cambio de una etapa floral a otra (pre-antesis, antesis, post-antesis) ocurre varias veces a lo largo del día; no obstante, la mayoría de las flores se encuentran en determinada etapa en un horario del día (Figura 5), mismo que varía dependiendo del estado del tiempo (en general, los días nublados la mayoría de las flores se encontraban en antesis más tarde a comparación de los días soleados).

Las fotografías con filtro UV de flores en antesis y post-antesis demostraron que la corola de *D. grahamii* principalmente absorbe luz (Figura 10). Esto es congruente con la baja probabilidad de reflejar que Guldberg y Atsatt (1975) reportan para la familia Fabaceae. Concuerta, de igual manera, con lo que se reporta para varias especies de Papilionoideae (Kay, 1987). Por otra parte, se observó que en la zona que corresponde a la mácula, se presentan dos zonas con mayor absorción que el resto de la corola (Figura 10F). Esta característica es similar a lo que se observa en *Lupinus texensis* (Schaal y Leverich, 1980) y lo que reporta Kay (1987) para algunas Papilionoideae. Finalmente, análogo a lo que se ha sugerido sobre la presencia de patrones y de zonas que reflejan UV (Koski y Ashman, 2014; Papiorek *et al.*, 2016); las pequeñas regiones que reflejan en la corola de *D. grahamii* (Figuras 10C y F), probablemente tienen la función de incrementar la atracción hacia el sitio de unión entre el estandarte y el conjunto alas-quilla. A su vez, debido a que en flores post-antesis la columna estaminal refleja UV (Figura 10I), se puede inferir que de forma parecida a lo que reportan Hoc *et al.* (1993) para *Vigna longifolia*, se trate de una señal que disuada la visita a estas flores por parte de los polinizadores.

Polinizadores

Para el mecanismo de polinización explosiva, en las distintas familias que lo presentan se han descrito como polinizadores además de abejas; aves, moscas, avispas, mariposas, polillas, murciélagos y al viento (Aluri y Reddi, 1995; Agostini *et al.*, 2006). A pesar de esta diversidad de vectores, en *D. grahamii* únicamente

se observaron abejas (Tabla 2). De los polinizadores observados, *Apis mellifera*, las *Megachile* y *Xylocopa* coinciden con lo reportado previamente para especies con polinización explosiva (Aluri y Reddi, 1995). De igual forma es consistente con los polinizadores reportados para *Cytisus scoparius* (Fabaceae) (Suzuki, 2003). En lo que refiere a *Centris* es congruente con lo reportado por Locatelli *et al.* (2004) para *Sarantia klotzschiana* (Marantaceae); en lo que respecta a las *Xylocopa* a lo reportado para *Hyptis suaveolens* (Aluri y Reddi, 1996) y *Thalia geniculata* (Davis, 1987); y en el caso de *A. mellifera* (Alemán *et al.*, 2014), las *Megachile* y *Melissodes* (Leif y Belt, 2013; Alemán *et al.*, 2014), con lo reportado para otras especies de *Desmodium*. Cabe mencionar que algunos de los comportamientos registrados para *A. mellifera* y las *M. zapoteca* no habían sido reportados, como la posibilidad de que *A. mellifera* active flores en pre-antesis o el forzamiento de las flores en pre-antesis por parte de *M. zapoteca*.

En el presente trabajo se observaron moscas *Allograpta* (Syrphidae) que forrajearon las anteras de flores en post-antesis en búsqueda de polen y que en el proceso entraban en contacto con el estigma (Figuras 13 F-H). De igual manera, se observó que forrajearon varias flores consecutivamente. En la literatura, a estas moscas se les ha descrito como polinizadores o se ha determinado que no contribuyen a la polinización, pudiendo en su lugar actuar como robadores de polen. Así tenemos por ejemplo que para *Salvia bogotensis*, Zamora (2010) consideró que no eran polinizadoras porque no podían activar la palanca estaminal, su cuerpo tenía contacto mínimo con las anteras y las flores visitadas por estas moscas no formaban fruto. En cambio Bischoff *et al.* (2013) encontraron que en *Ourisia glandulosa* (Plantaginaceae) y *Wahlenbergia albomarginata*

(Campanulaceae), a pesar de ser en gran medida menos eficientes que las abejas, eran capaces de transportar polen conspecifico a los estigmas de las flores. Por otra parte, Shi *et al.* (2009) reportaron que otra especie de Syrphidae era responsable de la polinización de la orquídea *Paphiopedilum barbigerum* que presenta polinización por engaño alimenticio y sugieren que en otras poblaciones, especies de *Allograpta* podrían ser el polinizador principal. Existe a su vez el particular caso de *Apios americana* (Papilionoidae con mecanismo de polinización explosiva) de la cual se hipotetizó que el síndrome floral correspondía a miofilia (Westerkamp y Paul, 1993); pero sólo se observaron como polinizadores: *A. mellifera*, *Bombus* sp., *Vespula* sp., *Megachile* sp. y miembros de Halictidae (Bruneau y Anderson, 1994). En el caso de *D. grahamii*, si bien las observaciones en campo podrían sugerir que estas moscas contribuyen a su polinización; los resultados de los tratamientos de polinización controlada demuestran lo contrario. De tal forma que la falta de diferencias significativas entre la cantidad de semillas producidas en el tratamiento control positivo (flores expuestas) y los tratamientos de flores activadas por abeja (Figura 15), demuestran que estas moscas no contribuyen a la formación de mayor cantidad de semillas para *D. grahamii*. Por este motivo, se les clasificó como visitantes florales.

A partir de la observación de los estigmas de flores activadas manualmente y por abejas correspondientes a 4 tiempos (1 h, 3 h, 4 h y 24 h) después de ser activadas, se observó que las flores activadas manualmente presentan nulo o casi nulo polen en los estigmas, a diferencia de las activadas por abeja donde en general se observó gran cantidad de polen. Estos resultados sugieren que antes de que se active el mecanismo explosivo, el polen de las anteras no llega al

estigma (Tabla 3, Figura 14). La ausencia de granos de polen en los estigmas de las flores difiere de lo previamente reportado para tres especies de *Desmodium* (Alemán *et al.*, 2014), en las que se observaron granos de polen rodeando el estigma de las flores en antesis. Por otra parte, para ninguna de las polinizaciones se observó el crecimiento de tubos polínicos (Figura 14). Para otras Papilionoideae se ha observado el crecimiento de tubos polínicos en los pistilos de flores 2-3 h (*Vigna minima*; Gopinathan y Babu, 1987) y 6 h (*Coronilla emerus* y *Collutea arborescens*; Galloni *et al.*, 2007) después de la polinización, e *in vitro* después de transcurridas 1-2 h (*Coronilla varia* y *Lotus corniculatus*; Pădureanu, 2012) y 12 h (*Crotalaria micans*; Etcheverry *et al.*, 2003). Con base en estos reportes y tomando en consideración que la observación del crecimiento de tubos polínicos con microscopía de fluorescencia es una técnica que se ha demostrado tiene alta confiabilidad (Ortega y Dicenta, 2004); se considera recomendable repetir estas observaciones para confirmar si la ausencia de tubos polínicos en *D. grahamii* puede o no, atribuirse a que su crecimiento ocurre posterior a los tiempos observados.

Polinizaciones controladas

La diferencia entre el número de óvulos y la cantidad de semillas producidas por ovario sugieren que en la población estudiada de *D. grahamii*, no todos los óvulos de una flor darán lugar a una semilla. A partir de las polinizaciones controladas se puede mencionar que *D. grahamii* es una especie autocompatible, siendo que, tanto en flores activadas manualmente como en las no activadas hubo producción

de frutos (Figura 15; Tabla 4). Las observaciones del ciclo floral de flores no activadas, ofrecen una explicación para la formación de frutos en estas flores, donde para el periodo observado (09:00 a 16:00), se registró que hasta 17.24% de las flores se encontraban en post-antesis, porcentaje que se acerca al 30% de frutos producidos que se registró en las polinizaciones controladas. La formación de frutos en flores sin activar es consistente con lo que se reportó para una población de alfalfa (Brink y Cooper, 1936). En *D. grahamii* las flores que son expuestas a sus polinizadores (*Megachile zapoteca* o *Xylocopa tabaniformis* ssp. *azteca*) producen mayor cantidad de frutos y semillas que las flores que no son activadas o las que son activadas manualmente (Figuras 15 y 16). Se infiere que debido a que el número de flores observadas para los tratamientos de abejas era muy pequeño, las diferencias podrán verse con mayor claridad si se aumenta dicho número (Figuras 15 y 16; Tabla 4).

Estructuras reproductivas durante el desarrollo floral

La observación de los botones aclarados denota que desde etapas tempranas el estigma se encuentra en un nivel superior al de las anteras; que conforme avanza el desarrollo, el estigma cambia de dirección (estigma hacia el estandarte) y que si bien en una etapa se le puede observar cercano al margen superior de la quilla, ésta experimenta un posterior crecimiento que le distancia del mismo (Figura 17). A diferencia de *Hyptis*, en la que se ha reportado el crecimiento de los filamentos previo a la antesis, siendo que las anteras sobresalen de la quilla (Brantjes y De Vos, 1981), en *D. grahamii* no se observó tal crecimiento. Como se mencionó, a lo

largo de las etapas se observa un momento en el que el estigma queda en contacto con el margen superior de la quilla (Figura 17F) lo que es congruente con la atribución que se hace a la tensión que ejerce la quilla sobre el pistilo y anteras como responsable del mecanismo explosivo (Rodríguez-Riaño *et al.*, 1999a); no obstante, esta tensión no es evidente en la última etapa observada (Figura 17G), en la que el crecimiento de los verticilos florales, ha resultado en el distanciamiento del estigma y anteras respecto del margen de la quilla.

Las observaciones en MEB y de cortes de los estigmas de flores en pre-antesis, antesis y post-antesis demuestran que *D. grahamii* presenta un estigma húmedo. Bortolin *et al.* (2014) describen para *D. incanum* que la superficie del estigma está cubierta por células papilosas y que el estigma está rodeado por tricomas simples (cilios); características que presenta *D. grahamii* (Figura 18). A su vez, corroboran lo observado en cuanto a adhesión de granos de polen en los estigmas de flores activadas manualmente y por abeja (Figura 14; Tabla 3); puesto que no se observa polen en estigmas de flores en pre-antesis y en antesis (Figura 19).

Por otra parte, la menor proporción de secreción en estigmas de flores en pre-antesis que en antesis, se debe a que en pre-antesis casi no se observan células epidérmicas que demuestren algún grado de colapso y que por tanto hayan liberado su exudado, mientras que en antesis varias de las células epidérmicas y algunas de estratos inferiores se observa que han perdido su integridad (Figura 19); esto es similar a lo que ocurre en *Hedysarum glomeratum* (Fabaceae), en la que se ha reportado mayor acumulación de secreción de acuerdo a la cercanía de la antesis (De las Heras *et al.*, 2001). A su vez, este incremento en la secreción es relacionable con las observaciones de receptividad del estigma en las que se

reporta un incremento en tiempos más cercanos a los de antesis en las poblaciones de flores (Alemán *et al.*, 2014). Estas observaciones discrepan con la observación de que la cutícula estigmática permanece continua hasta el momento de antesis que se ha reportado para *D. incanum* (Bortolin *et al.*, 2014).

La observación de las anteras de flores en etapa 5 y en pre-antesis evidencia que las anteras poseen dehiscencia longitudinal y que para la etapa de pre-antesis aún no están dehiscentes (Figuras 20 y 21). Por el contrario, para *D. incanum*, *D. subcericium* y *D. uncinatum*, Alemán *et al.* (2014) describen que en flores dos horas antes de la antesis, ya se observan anteras dehiscentes; de igual manera, Solomon y Purnachandra (2006) reportan para *Pongamia pinnata* (Papilionoidae), anteras dehiscentes tres horas antes de la antesis.

Los cortes de anteras de flores en antesis (Figura 21C y D) demuestran que las anteras se encuentran listas para la liberación de polen, en ellas el estomio se encuentra adelgazado, siendo posible que algunas se encuentren dehiscentes. A pesar de esto, la ausencia de granos de polen observada en estigmas de flores en antesis (Figura 19), sugiere que es necesaria la aplicación de presión por parte del polinizador para que el polen se libere.

Estas observaciones junto con la ausencia de polen depositado en los estigmas de flores activadas manualmente, sugieren que a diferencia de lo que se ha reportado para otras Fabaceae (Yeo, 1993) y otras especies de *Desmodium* (Alemán *et al.*, 2014) con polinización explosiva, *D. grahamii* no exhibe presentación secundaria de polen.

Tipo de recompensa

Las observaciones en campo y en microscopio (estereoscópico y MEB) denotan que los polinizadores únicamente obtienen polen como recompensa. En los casos particulares de *M. zapoteca* y *A. mellifera* se observa que la primera lo acumula en sus escopas y la segunda en sus corbículas (Figura 22). El polen en las corbículas de *A. mellifera* se observó embebido en una sustancia viscosa, a diferencia del polen en las escopas de *M. zapoteca* (Figura 23). Esto se explica en la forma de transferencia del polen donde *M. zapoteca* transfiere el polen a las patas intermedias y de ahí hacia las escopas; en cambio *A. mellifera* cepilla el polen hacia sus partes bucales donde lo humedece con néctar o miel regurgitada y posteriormente lo transfiere a las corbículas (Michener, 1974).

En las Fabaceae, por lo general los nectarios son mesenquemáticos, receptaculares e intraestaminales (Bernadello, 2007). A pesar de que en taxa con androceo fusionado (monadelfo) se ha atribuido la ausencia de néctar, existe evidencia de lo contrario, como en *Retama*, *Cytisophyllum*, *Spartium* y *Genista* (López *et al.*, 1999; Galloni y Cristofolini, 2003). En *D. grahamii*, que es pseudomonadelfa, no se encontraron estructuras a nivel de receptáculo y de columna estaminal que pudiesen ser nectarios.

En *Pongamia pinnata*, que es diadelfa, se reporta secreción de néctar en la base de la columna estaminal (Solomon y Purnachandra, 2006). En *Medicago sativa*, que también es diadelfa, se presenta un nectario anular ubicado en la base de la columna estaminal y sobre el receptáculo. Éste se caracteriza por células más pequeñas y por la presencia de estomas nectaríferos (Teuber *et al.*, 1980). En

especies con androceo monadelfo de los géneros *Retama*, *Cytisophyllum*, *Spartium* y *Genista* se ha colectado secreción entre la columna estaminal y el estandarte y se ha atribuido a nectarios extraestaminales (López *et al.*, 1999). En *D. grahamii* no se observaron estructuras fuera de la columna estaminal que pudieran ser nectarios (Figura 24); de igual manera, los cortes histológicos de receptáculo y de la base de la columna estaminal, aunado a pruebas histoquímicas para detectar polisacáridos y almidón (Figura 25), no demostraron células que participaran en la formación de néctar en estas estructuras.

En las observaciones al MEB de los ovarios de *D. grahamii* se notó la presencia de gran cantidad de tricomas (Figura 26), mismos que podrían participar en la formación de néctar. En las Fabaceae se han reportado tricomas glandulares como nectarios extraflorales (NEF) como ocurre en *Senna* spp, *Erythrina* spp. y *Mucuna* spp.; estos NEF se encuentran localizados en estípulas (Lersten y Brubaker, 1987; Melo *et al.*, 2010). Para *Erythrina speciosa*, se han reportado NEF que consisten en tricomas de cabezas multicelulares ubicados en el exocarpo (Sousa, 2009). De acuerdo a la revisión de Weber y Keeler (2013) sobre la distribución filogenética de los NEF, en el orden de las Fabales se concentran cerca del 26% del total de reportes de especies con NEF; en particular, la familia Fabaceae es la que presenta el mayor número de especies con NEF, donde los géneros *Inga* y *Acacia* exhiben la mayor abundancia. No obstante, los cortes histológicos de ovarios y las pruebas histoquímicas (Figura 27), demostraron que los tricomas glandulares en el ovario de *D. grahamii* no participan en la producción de néctar. Estos tricomas glandulares podrían estar participando en otras funciones como ocurre en *Chamaecrista dentata* (Fabaceae) y *Zeyheria montana*

(Bignoniaceae) en las que producen compuestos que sirven para la defensa (Rodrigues *et al.*, 2006; Meira *et al.*, 2014) o como en *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae), en la que participan en la producción de aroma (Swanson *et al.*, 1980). La ausencia de néctar en *D. grahamii* es congruente con lo que reporta Yeo (1993) para *Desmodium canadense*.

A pesar de que *D. grahamii* únicamente ofrece polen como recompensa, se observó que los polinizadores visitaban varias de sus flores en sucesión y que para acceder al polen, introducían su probóscide entre el estandarte y la quilla. Tomando en consideración que se ha demostrado que las abejas son capaces de asociar características florales con una recompensa que consista puramente en polen (Muth *et al.*, 2016) y de distinguir si una señal está asociada a una recompensa genuina (Knauer y Schiestl, 2015); se puede proponer que la recompensa asociada a las señales que *D. grahamii* ofrece a sus polinizadores, es el polen.

Las pruebas histoquímicas con rojo neutro demostraron la presencia de osmóforos en la corola de *D. grahamii* (Figura 28). Esto es similar a lo que Marinho *et al.* (2014) reportaron para *Mucuna urens*, que también posee mecanismo de polinización explosiva; en la que observaron la presencia de osmóforos, principalmente en la corola, distribuidos en forma localizada o difusa. De igual manera las papilas observadas en la corola de *D. grahamii* (Figura 29) son semejantes a los osmóforos que reportan Marinho *et al.* (2014) para *Caesalpinia pulcherrima*. En el presente estudio, se considera que el aroma secretado por los osmóforos en la corola de *D. grahamii* puede participar en la atracción de los polinizadores (abejas).

CONCLUSIONES

1. Las flores de *D. grahamii* cambian de color y de inclinación respecto del eje de la inflorescencia a lo largo del ciclo floral. Las flores pre-antesis se observan rosadas y casi perpendiculares al eje de la inflorescencia. El día de antesis, las flores despliegan y repliegan su estandarte, alcanzando la mayor apertura entre los pétalos del estandarte y la quilla cuando acaban de ser activadas.
2. *Desmodium grahamii* presenta 6 polinizadores que son abejas. Los polinizadores más frecuentes son *Megachile zapoteca* y *Apis mellifera*.
3. Las flores de *D. grahamii* que son activadas por abejas presentan mayor cantidad de polen depositado en sus estigmas.
4. *Desmodium grahamii* es una especie autocompatible, ya que produce semillas tanto por autocruza como por entrecruza. No obstante, las flores expuestas a sus polinizadores producen más semillas que las que son activadas manualmente o las que no son activadas.
5. El estigma de *D. grahamii* es húmedo, su secreción incrementa cercana a la antesis y no se depositan granos de polen en su superficie antes de que el mecanismo de polinización sea activado.
6. El polen es la recompensa que *D. grahamii* ofrece a sus polinizadores.

PERSPECTIVAS

A partir de los resultados obtenidos en la presente tesis, como enfoques a considerar se propone en primera instancia, el análisis de la evolución de la especialización que han desarrollado este tipo de plantas en cuanto al tipo de polinización y su relación con los polinizadores y su estructura floral. Como un segundo enfoque se plantea que es necesario comprender la mecánica que interviene en la polinización explosiva de la especie.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrol D. 2012. Pollination Biology: Biodiversity conservation and agricultural production. Springer Netherlands. 821 pp.
- Agostini K., M. Sazima e I. Sazima. 2006. Bird pollination of explosive flowers while foraging for nectar and caterpillars. *Biotropica* 38 (5): 674-678.
- Alemán M., T. Figueroa-Fleming, A. Etcheverry, S. Sühring y P. Ortega-Baes. 2014. Explosive pollination mechanism in Papilionoideae (Leguminosae): an analysis with three *Desmodium* species. *Plant Systematics and Evolution* 300: 177-186.
- Aluri R. y C. Reddi. 1995. Explosive pollen release and pollination in flowering plants. *Proceedings of the Indian National Science Academy part B*61 (4): 323-332.
- Aluri R. y C. Reddi. 1996. The explosive floral-mechanism and pollination in the genus *Hyptis* (Lamiaceae). *Proceedings of the Indian National Science Academy B*62 (2): 117-124.

- Arroyo M. 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. En: Polhill R. y P. Raven (Eds.). *Advances in Legume Systematics Part 2*. Royal Botanic Gardens, Kew. Reino Unido. p: 723-770.
- Austin D. F. 2004. *Florida ethnobotany*. CRC Press. E.U.A. 952 pp.
- Bernadello G. 2007. A systematic survey of floral nectarines p: 19-128. En: Nicolson S., M. Nepi y E. Pacini (Eds.). *Nectaries and nectar*. Springer. Holanda.
- Bischoff M., D. Campbell, J. Lord y A. Robertson. 2013. The relative importance of solitary bees and syrphid flies as pollinators of two outcrossing plant species in the New Zealand alpine. *Austral Ecology* 38 (2): 169-176.
- Bortolin M., J. Villela, C. Ribeiro, V. Goncalves, G. Donizete y S. Pádua. 2014. Stigma diversity in tropical legumes with considerations on stigma classification. *The Botanical Review* 80 (1): 1-29.
- Brantjes N. y O. De Vos. 1981. The explosive release of pollen in flowers of *Hyptis* (Lamiaceae). *New Phytologists* 87 (2): 425-430.
- Brink R. y D. Cooper. 1936. The mechanism of pollination in alfalfa (*Medicago sativa*). *American Journal of Botany* 23 (10): 678-683.
- Bruneau A. y G. Anderson. 1988. Reproductive biology of diploid and triploid *Apios americana* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 75 (12): 1876-1883.
- Bruneau A. y G. Anderson. 1994. To bee or not to bee?: the pollination biology of *Apios americana* (Leguminosae). *Plant Systematics and Evolution* 192: 147-149.
- Castillo S., Y. Martínez, M. Romero, P. Guadarrama, O. Núñez, I. Sánchez y J. Meave. 2007. La reserva ecológica del Pedregal de San Ángel. *Aspectos*

- florísticos y ecológicos. Universidad Nacional Autónoma de México. México. p: 156.
- Cullen J., S. Knees y H. Cubey. 2011. The european garden flora flowering plants. Cambridge University Press. Reino Unido. 640 pp.
- Davis M. 1987. The role of flower visitors in the explosive pollination of *Thalia geniculata* (Marantaceae), a Costan Rican marsh plant. Bulletin of the Torrey Botanical Club 114 (2): 134-138.
- De las Heras M., P. Hidalgo y J. Ubera. 2001. Stigmatic cuticle in *Hedysarum glomeratum*: structure and function. International Journal of Developmental Biology 45 (S1): S41-S42.
- Endress P. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press. Reino Unido. 511 pp.
- Etcheverry A., J. Protomastro y C. Westerkamp. 2003. Delayed autonomous self-pollination in the colonizer *Crotalaria micans* (Fabaceae: Papilionoidae): Structural and functional aspects. Plant Systematics and Evolution 239: 15-28.
- Etcheverry A., M. Alemán y T. Figueroa. 2008. Flower morphology, pollination biology and mating systems of the complex flower of *Vigna caracalla* (Fabaceae: Papilionoidae). Annals of Botany 102: 305-316.
- Etcheverry A., M. Alemán, T. Figueroa-Fleming, D. López-Sphar, C. Gómez, C. Yáñez, D. Figueroa-Castro y P. Ortega-Baes. 2012. Pollen: ovule ratio and its relationship with other floral traits in Papilionoideae (Leguminosae): an evaluation with Argentine species. Plant Biology 14: 171-178.

- Fralish J. y S. Franklin. 2002. Taxonomy and ecology of woody plants in North American forests: (excluding Mexico and subtropical Florida). John Wiley & Sons. Nueva York, E.U.A. 612 pp.
- Galloni M. y G. Cristofolini. 2003. Floral rewards and pollination in *Cytiseae* (Fabaceae). *Plant Systematics and Evolution* 238: 127-137.
- Galloni M., L. Podda D. Vivarelli y G. Cristofolini. 2007. Pollen presentation, pollen-ovule ratios, and other reproductive traits in Mediterrean Legumes (Fam. Fabaceae - Subfam. Faboideae). *Plant Systematics and Evolution* 266: 147-164.
- Gopinathan M. y C. Babu. 1987. Breeding systems and pollination in *Vigna minima* (Leguminosae: Papilionoideae). *Plant Systematics and Evolution* 156: 117-126.
- Guldberg L. y P. Atsatt. 1975. Frequency of reflection and absorption of ultraviolet light in flowering plants. *The American Midland Naturalist* 93 (1): 35-43.
- Harley R. 1971. An explosive pollination mechanism in *Eriope crassipes*, a Brazilian Labiate. *Biological Journal of the Linnean Society* 3: 159-164.
- Hoc P., V. Di Stilio, M. Agullo, M. Brizuela y R. Palacios. 1993. Biología floral de *Vigna longifolia* (Leguminosae, Phaseoleae). *Darwiniana* 32 (1-4): 27-39.
- Huang P. y H. Ohashi. 2010. *Desmodium*. *Flora of China* 10: 268-278.
- Ida T. y G. Kudo. 2003. Floral color change in *Weigela middendorffiana* (Caprifoliaceae): reduction of geitonogamous pollination by bumble bees. *American Journal of Botany* 90 (12): 1751-1757.

- Kay Q. 1987. Ultraviolet patterning and ultraviolet-absorbing pigments in flowers of the Leguminosae. En: Stirton C. (Ed.). *Advances in Legume Systematics, Part 3*. Royal Botanic Gardens, Kew. Reino Unido. p: 317-354.
- Knauer A. y F. Schiestl. 2015. Bee use honest floral signals as indicators of rewards when visiting flowers. *Ecology Letters* 18:135-143.
- Koski M. y T.-L. Ashman. 2014. Dissecting pollinator response to a ubiquitous ultraviolet floral pattern in the wild. *Functional Ecology* 28: 868-877.
- Kurian A. y M. Asha. 2007. *Medicinal plants*. New India Publishing. India. 356 pp.
- Lavin M. y A. Delgado. 1990. Pollen brush of Papilionoideae (Leguminosae): Morphological variation and systematic utility. *American Journal of Botany* 77 (10): 1294-1312.
- Le Roux M. y B. Van Wyk. 2012. The systematic value of flower structure in *Crotalaria* and related genera of the tribe Crotalarieae (Fabaceae). *Flora* 207: 414-426.
- Lersten N. y C. Brubaker. 1987. Extrafloral nectaries in Leguminosae: Review and original observations in *Erythrina* and *Mucuna* (Papilionoideae; Phaseoleae). *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 114 (4): 437-447.
- Leif J. y S. Belt. 2013. Plant guide for Panicleleaf ticktrefoil (*Desmodium paniculatum*). USDA-Natural Resources Conservation Service. E.U.A. 3 pp.
- León J. 1968. *Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales*. IICA. Perú. p: 322.
- Lewis G., B. Schrire, B. MacKinder y M. Lock. (Eds.). 2005. *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens, Kew. Reino Unido. 577 pp.

- Locatelli E., I. Machado y P. Medeiros. 2004. *Saranthe klotzschiana* (Koer.) Eichl. (Marantaceae) e seu mecanismo explosivo de polinização. *Revista Brasileira de Botânica* 27 (4): 757-765.
- López J., T. Rodríguez-Riaño, A. Ortega-Olivencia, J. Devesa y T. Ruiz. 1999. Pollination mechanisms and pollen-ovule ratios in some *Genistae* (*Fabaceae*) from Southwestern Europe. *Plant Systematics and Evolution* 216: 23-47.
- López M., J. Márquez y G. Murguía. 2005. Técnicas para el estudio del desarrollo en angiospermas. Libro de laboratorio. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 178 pp.
- Marinho C., C. Souza, T. Barros y S. Teixeira. 2014. Scent glands in legume flowers. *Plant Biology* 16: 215-226.
- Meira R., D. Francino y L. Ascensão. 2014. Oleoresin trichomes of *Chamaecrista dentata* (Leguminosae): structure, function, and secretory products. *International Journal of Plant Sciences* 175 (3): 336-345.
- Melo Y., S. Machado y M. Alves. 2010. Anatomy of extrafloral nectaries in *Fabaceae* from dry-seasonal forest in Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society* 163: 87-98.
- Michener C. 1974. The social behavior of the bees. Harvard University Press. E.U.A. 418 pp.
- Muth F., D. Papaj y A. Leonard. 2016. Bees remember flowers for more than one reason: pollen mediates associative learning. *Animal Behaviour* 111: 93-100.

- Ortega E. y F. Dicenta. 2004. Suitability of four different methods to identify self-compatible seedlings in an almond breeding programme. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79 (5): 747-753.
- Pădureanu S. 2012. The cytology of pollen germination process at *Lotus corniculatus* L. and *Coronilla varia* L. *Lucrari Stiintifice seria Agronomie* 55 (2): 125-130.
- Papiorek S., R. Junker. I. Alves-dos-Santos, G. Melo, L. Amaral-Neto, M. Sazima, M. Wolowski, L. Freitas y K. Lunau. 2016. Bees, birds and yellow flowers: pollinator-dependent convergent evolution of UV patterns. *Plant Biology* 18: 46-55.
- Pooja. 2004. Angiosperms. Discovery Publishing House. Nueva Delhi, India. p: 265, 266.
- Reddy S., M. Madhusudana, A. Srinivas, M. Mehender y S. Janardhana. 2004. *University Botany-3*. New Age International. Nueva Delhi, India. p: 59-65.
- Rodrigues S., E. Gregório y E. Guimarães. 2006. Ovary peltate trichomes of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae): Developmental ultrastructure and secretion in relation to function. *Annals of Botany* 97: 357-369.
- Rodríguez-Riaño T., A. Ortega y J. Devesa. 1999a. *Biología floral en Fabaceae*. CSIC. Madrid, España. 176 pp.
- Rodríguez-Riaño T., A. Ortega-Olivencia y J. Devesa. 1999b. Types of androecium in the Fabaceae of SW Europe. *Annals of Botany* 83: 109-116.
- Royal Horticultural Society. 1966. *Royal Horticultural Society colour chart*. Royal Horticultural Society. Londres, Reino Unido.

- Schaal B. y W. Leverich. 1980. Pollination and banner markings in *Lupinus texensis* (Leguminosae). *The Southwestern Naturalists* 25 (2): 280-282.
- Shi J., Y. Luo, P. Bernhardt, J. Ran, Z. Liu y Q. Zhou. 2009. Pollination by deceit in *Paphiopedilum barbigerum* (Orchidaceae): a staminode exploits the innate colour preferences of hoverflies (Syrphidae). *Plant Biology* 11: 17-28.
- Small E. 1988. Pollen-ovule patterns in tribe *Trifolieae* (Leguminosae). *Plant Systematics and Evolution* 160: 195-205.
- Small E. 2011. Alfalfa and relatives: evolution and classification of *Medicago*. NCR Research Press. Canadá. 727 pp.
- Simpson M. 2006. *Plant Systematics*. Elsevier Academic Press. Canadá. p: 466.
- Solomon R. y S. Purnachandra. 2006. Explosive pollen release and pollination as a function of nectar-feeding activity of certain bees in the biodiesel plant, *Pongamia pinnata* (L.) Pierre (Fabaceae). *Current Science* 90 (7): 960-967.
- Sousa E. 2009. Ultrastructure and post-floral secretion of the pericarpial nectaries of *Erythrina speciosa* (Fabaceae). *Annals of Botany* 104 (5): 937-944.
- Suzuki N. 2003. Significance of flower exploding pollination on the reproduction of the Scotch broom, *Cytisus scoparius* (Leguminosae). *Ecological Research* 18: 523-532.
- Swanson E., W. Cunningham y R. Holman. 1980. Ultrastructure of glandular ovarian trichomes of *Cypripedium calceolus* and *C. reginae* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 67(5): 784-789.
- Tcherkez, G. 2004. *Flowers: Evolution of the floral architecture of angiosperms*. Science Publishers. India. p: 93, 126, 127.

- Torres-Colín L. y A. Delgado-Salinas. 2008. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fasc. 59. Fabaceae Tribu Desmodieae. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. p: 13-15.
- Tucker S. 2003. Floral Development in Legumes. *Plant Physiology* 131 (3): 911-926.
- Teuber L., M. Albertsen, D. Barnes y G. Heichel. 1980. Structure of floral nectaries of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in relation to nectar production. *American Journal of Botany* 67(4): 433-439.
- Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 2006. Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de Ciudad Universitaria. Lineamientos para el desarrollo de actividades dentro de la Reserva Ecológica. Acuerdo 2005. Secretaría Ejecutiva de la Reserva Ecológica del Pedregal de San Ángel de Ciudad Universitaria (SEREPSA), Coordinación de la Investigación Científica (CIC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). México. 29 pp.
- Verma B. 2011. Introduction to taxonomy of angiosperms. PHI Learning Private Limited. Nueva Delhi, India. p: 202-206, 210-213.
- Vovides A., E. Linares y R. Bye. 2010. Jardines Botánicos de México: historia y perspectivas. Secretaría de Educación de Veracruz. México. p: 138.
- Weber M. y K. Keeler. 2013. The phylogenetic distribution of extrafloral nectaries in plants. *Annals of Botany* 111: 125-1261.
- Weiss M. y B. Lamont. 1997. Floral color change and insect pollination: A dynamic relationship. *Israel Journal of Plant Sciences* 45: 185-199.

- Westerkamp C. y H. Paul. 1993. *Apios americana*, a fly pollinated papilionaceous flower?. *Plant Systematics and Evolution* 187: 135-144.
- Willmer P. 2011. *Pollination and floral ecology*. Princeton University Press. E.UA. 828 pp.
- Willmer P., D. Stanley, K. Steivjven, I. Mathews y C. Nuttman. 2009. Bidirectional flower color and shape changes allow a second opportunity for pollination. *Current Biology* 19: 919-923.
- Yeo P. 1993. *Secondary pollen presentation. Form, function and evolution*. Springer-Verlag. Nueva York, E.U.A. 269 pp.
- Zamora M. 2010. *Estudio de las visitas de las moscas de las flores (Diptera: Syrphidae) a *Salvia bogotensis* (Lamiales: Lamiaceae) en el Jardín Botánico "José Celestino Mutis" (Bogotá, D.C.)*. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias (Entomología), Posgrado en Ciencias Agrarias, Facultad de Agronomía, Universidad de Colombia. Colombia. 86 pp.