



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“Patrones de flujo de polen y su importancia en la
evolución de la distilia a partir de la tristilia en Oxalis
alpina”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

FERNANDA SOFÍA BAENA DÍAZ

TUTOR:

DR. CÉSAR A. DOMÍNGUEZ PÉREZ-TEJADA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

MARZO, 2007



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.

1. Datos del alumno

Baena

Díaz

Fernanda Sofía

56065779

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Carrera

Número de cuenta

2. Datos del tutor

Dr.

César Augusto

Domínguez

Pérez-Tejada

2. Datos del sinodal 1

Dr.

Juan Enrique

Fornoni

Agnelli

3. Datos del sinodal 2

Dra.

Guadalupe Judith

Márquez

Guzmán

3. Datos del sinodal 3

Dr.

Francisco Elizandro

Molina

Freaner

4. Datos del sinodal 4

M. en C.

Irene

Pisanty

Baruch

AGRADECIMIENTOS

A César, por la calidad y el tiempo dedicado

A Rubén Pérez por todo el apoyo en el laboratorio y en el campo

A Steve Weller, Paula Sosenski, Jessica Pérez y Adriana López por la ayuda en el campo.

A Juan Fornoni y Francisco Molina, por toda la ayuda en este trabajo tanto en el campo como en la ciudad.

A Judith Márquez e Irene Pisanty por sus comentarios

A CONACYT y al proyecto de *Oxalis alpina*

A todos en el laboratorio de interacción planta-animal

A mi familia por todo el amor y el apoyo Fernando, Claudia y Paty

A mi otra familia Anayari, Gracia, Carlos, Damián , Quim y Laura

A Daniel por todo el apoyo y la compañía

Índice

Resumen	1
Introducción	2
Hipótesis	6
Objetivos	7
Metodología	8
Resultados	
A. Tasa de visita de polinizadores	15
B. Patrones de flujo de polen	15
C. Modelo Genético	22
Discusión y Conclusiones	27
Bibliografía	33
Anexo 1	39
Anexo 2	40

Palabras Clave: Heterostilia, Flujo de polen, Tristilia, *Oxalis alpina*, Sky Islands.

Resumen

Los sistemas heterostílicos son polimorfismos florales asociados a un sistema de incompatibilidad. Este polimorfismo ha sido interpretado como un mecanismo que evita la autofecundación y/o promueve el entrecruzamiento legítimo. *Oxalis alpina* es una especie heterostílica que tiene poblaciones tristílicas isopléticas (morfo representados en frecuencias iguales), tristílicas anisopléticas, y distílicas (pérdida del morfo intermedio); y ofrece la oportunidad de estudiar el papel evolutivo del flujo de polen en la transición de la tristilia a la distilia. En este trabajo se estimaron las tasas de flujo de polen legítimo e ilegítimo por medio de polvos fluorescentes en tres poblaciones tristílicas y una distílica de *O. alpina*. Los resultados indican que los flujos legítimos son más frecuentes que los ilegítimos, aunque la proporción de flujos ilegítimos, así como las diferencias entre los morfos florales fueron muy marcadas. Utilizando un modelo genético se evaluó la influencia de los flujos y se encontró que además de las modificaciones en el sistema de incompatibilidad, se requiere una modificación en los patrones de flujo de polen para que evolucione la distilia.

Introducción

Las Angiospermas, con aproximadamente 250,000 especies, son por mucho el grupo de plantas más diverso. Esta riqueza de especies está acompañada por una gran variedad de sistemas reproductivos que incluye desde plantas donde las funciones sexuales se encuentran en individuos diferentes (dioicos), hasta plantas con las dos funciones en la misma flor (hermafroditas). Estas últimas son las más abundantes y se presentan en aproximadamente 80% de las especies (Dumas, et al., 1985; Fetcher, 2000; Friedman y Floyd, 2001). Dentro de la variedad de sistemas reproductivos que presentan flores hermafroditas destacan los sistemas heterostílicos por su particular combinación de atributos. Los sistemas heterostílicos se caracterizan por presentar un polimorfismo en la longitud de los estilos y los estambres, asociado con un sistema de incompatibilidad heteromórfico. Este polimorfismo se expresa en las poblaciones a través de dos o tres morfos florales (Weller, 1992). La variación en el tamaño de los estilos y las anteras es recíproca, de manera que la altura de los estigmas de un morfo corresponde a la de las anteras de los otros morfos (Ganders, 1979). Los nombres de los distintos morfos hacen referencia a la longitud del estilo. Se ha sugerido que la heterostilia es un mecanismo que promueve las cruza legítimas entre flores de distintos morfos (flujos legítimos de polen) (Darwin, 1877), como un mecanismo que evita la autofecundación, los efectos nocivos de la depresión por endogamia (Fetcher, 2000), así como la interferencia física entre los sexos dentro de la misma flor (Loyd y Webb, 1986; Cesaro, et al., 2004). Finalmente, también Además del polimorfismo floral, el sistema de incompatibilidad es el otro componente que caracteriza a la heterostilia. Los sistemas de incompatibilidad consisten en la inhabilidad de una planta hermafrodita fértil de producir cigotos después de la auto-polinización, la geitonogamia y las cruza intra-morfo (De Nettancourt, 2000). Existen dos tipos de incompatibilidad: el sistema gametofítico y el esporofítico. En el primero el reconocimiento de la compatibilidad depende de sustancias producidas por el gametofito (tubo polínico), mientras que en el sistema esporofítico el reconocimiento depende de sustancias producidas por el esporofito (sustancias del tapete en el polen). Ambos sistemas impiden que el tubo polínico alcance a los óvulos. En el primero, el crecimiento del tubo polínico es inhibido por el reconocimiento de proteínas del gametofito en algún punto a lo largo del estilo. En el sistema esporofítico se evita la germinación del grano de polen al reconocer proteínas del esporofito producidas por el tapete o tejido nutricio del grano de

polen, por lo que no se observa la presencia del tubo polínico (Richards, 1986). Las plantas de especies heterostílicas se encuentran asociadas generalmente a un sistema de incompatibilidad de tipo esporofítico (Fig 1).

Sistemas de Incompatibilidad

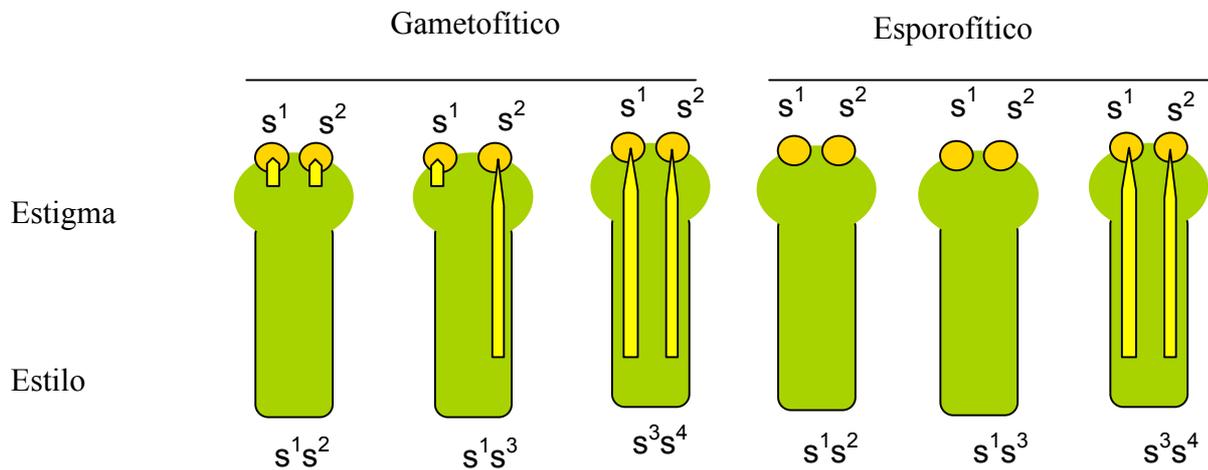


Fig. 1 Sistemas de incompatibilidad. Las letras (S^1 , S^2) indican el genotipo del grano de polen y del estigma. Se encuentra representado el grado de reconocimiento y el sitio de inhibición del tubo polínico para ambos sistemas.

Asociado a los sistemas heterostílicos se encuentran además distintos atributos accesorios que diferencian a los morfos florales. Estas diferencias se encuentran en el tamaño y producción de granos de polen, el tamaño de los estigmas y el número de papilas estigmáticas (Barrett, 1988).

Existen dos tipos de sistemas heterostílicos, la distilia y la tristilia (Hildebrand, 1867; Darwin, 1877). La distilia presenta dos morfos florales, un morfo con estilos cortos y anteras largas, llamado “Thrum”; y un morfo con estilos largos y anteras cortas, llamado “Pin” (Fig. 2). El segundo tipo, conocido como tristilia, es mucho menos común en la naturaleza y se caracteriza por la presencia de tres morfos florales: Largo, Intermedio, y Corto, con dos niveles de anteras cada uno. El morfo corto tiene anteras intermedias y largas; el morfo intermedio tiene anteras cortas y largas, y el morfo largo tiene anteras cortas e intermedias (Charlesworth, 1979) (Fig. 2). Estos órganos están arreglados de modo que los estigmas de un nivel puedan ser fecundados con éxito por el polen de anteras del

mismo nivel (Charlesworth, 1979). Esto es lo que Darwin llamó cruzas legítimas. Las cruzas legítimas son mediadas por los insectos polinizadores y por el sistema de incompatibilidad. Las cruzas que ocurren entre niveles de anteras y estilos de distintos tamaños se conocen como ilegítimas.

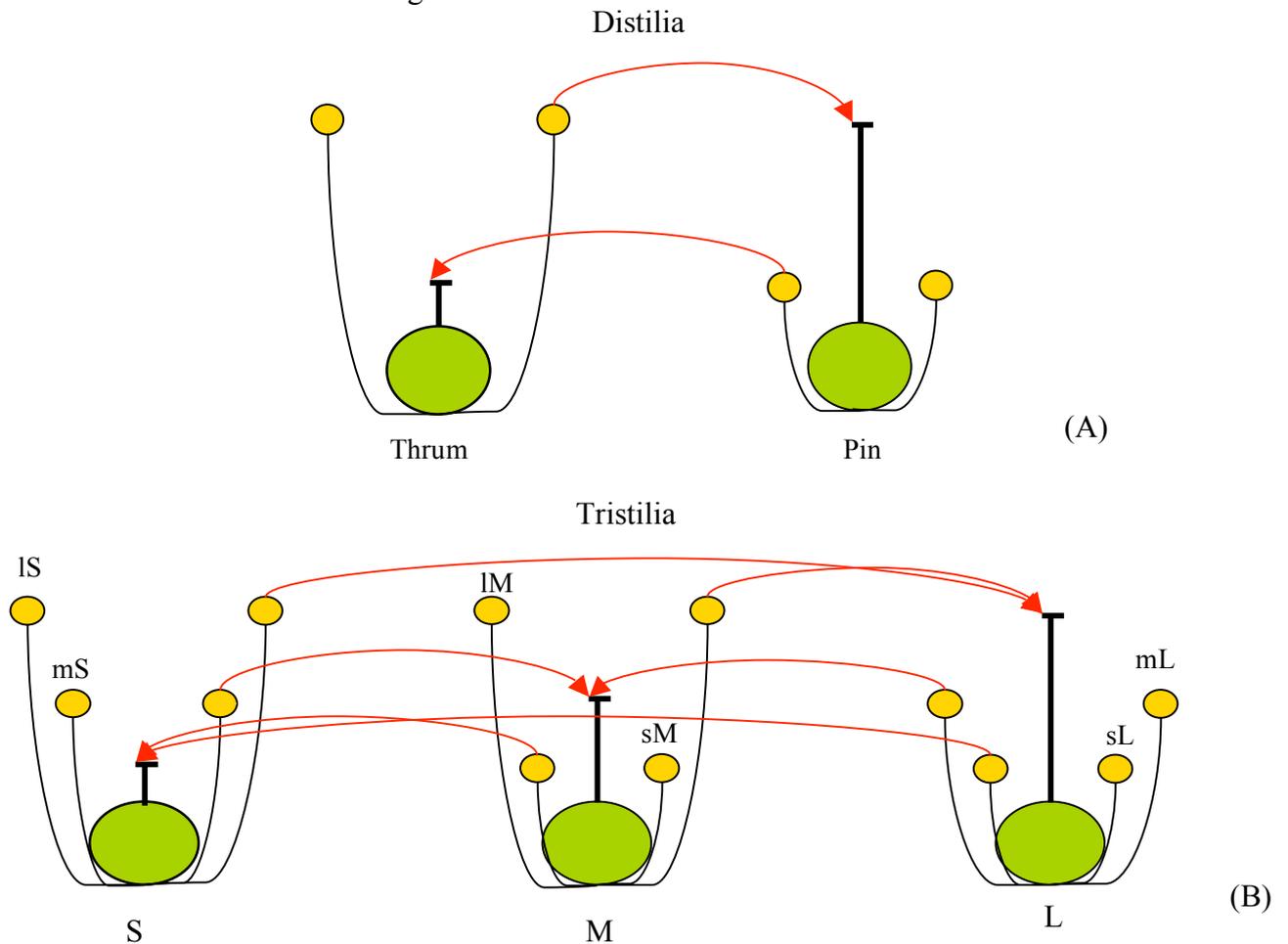


Fig. 2. Distilia con un morfo Pin de anteras cortas y estigma largo, y morfo Thrum con estigma corto y anteras largas (A); Tristilia con tres morfos: L, con estilo largo y niveles de anteras por debajo, M, con estilo entre los dos niveles de antera y S, con estilo por debajo de los dos niveles de anteras (B). Las flechas indican las cruzas legítimas entre los morfos.

Los sistemas distílicos están representados en 24 familias de Angiospermas, mientras que la tristilia está presente únicamente en 6 familias (Pontederiaceae, Oxalidaceae, Lythraceae, Amarillidaceae, Linaceae y Connaraceae) (Baker, 1962; Barrett, 1993). Se ha sugerido que la heterostilia es un sistema reproductivo evolutivamente inestable (Domínguez et al., 1997; Cuevas et al., 2005), ya que hay muchos ejemplos que

muestran la transición de la tristilia hacia la distilia, o incluso la homostilia (estructuras florales al mismo nivel). Este proceso involucra la pérdida de uno de los morfos (usualmente el morfo intermedio) en poblaciones que originalmente eran tristílicas. Por ejemplo, en las familias Oxalidaceae y Lythraceae pueden encontrarse especies tristílicas y distílicas (Barrett, 1993), y prácticamente en todos los casos, existen poblaciones homostílicas derivadas. (Weller y Denton, 1976). En las familias que incluyen especies distílicas y tristílicas se ha propuesto a la tristilia como el tipo ancestral del cual evolucionó la distilia (Weller y Denton, 1976).

Existen distintas hipótesis y modelos teóricos que pretenden explicar la transición evolutiva de la tristilia a la distilia (Charlesworth, 1979; Lloyd y Web, 1992; Weller y Denton 1976). Los modelos se han enfocado en determinar cuáles son las fuerzas selectivas más importantes involucradas en la disolución evolutiva de la tristilia. En general se propone que las fuerzas más importantes son las modificaciones en el sistema de incompatibilidad, diferencias en la adecuación entre los morfos (posiblemente por flujos asimétricos de polen), y/o la deriva génica (Charlesworth, 1979; Lloyd y Web, 1992; Weller y Denton 1976). Tomando en cuenta la hipótesis de Darwin (1877) que propone a la heterostilia como un mecanismo que promueve el entrecruzamiento legítimo, suponemos que la probabilidad de que ocurran flujos ilegítimos (entre estambres y estilos de diferente nivel) debería ser muy baja. Si esto fuera así, sería de poca importancia la presencia de un sistema de incompatibilidad. Por el contrario, si el sistema de incompatibilidad es el que mantiene el polimorfismo y sólo las cruza legítimas producen semillas, entonces no importaría que hubiera flujos ilegítimos o asimétricos de polen en las poblaciones. Entonces, para que evolucione la distilia es necesario que ocurran cambios tanto en el flujo de polen como en el sistema de incompatibilidad.

Existen estudios que muestran que el sistema de incompatibilidad de las especies heterostílicas puede sufrir modificaciones importantes (*Amsinckia douglasiana*, *A. vernicosa*, *Hedyotis caerulea*, *Pontederia sagittata*, *Bouvardia ternifolia* y *Oxalis alpina* (Ganders, 1979; Ornduff, 1980; Scribailo y Barrett, 1991; Faivre, 2002; Weller et al. 2007). Sin embargo, para que un cambio en el sistema de incompatibilidad pueda afectar el equilibrio evolutivo en las frecuencias de los morfos florales es necesario que los flujos de polen permitan la producción de semillas. Por lo tanto también son necesarias las

modificaciones en los patrones de flujo de polen. Se sabe que el flujo de polen en especies heterostílicas no es completamente legítimo, es decir entre anteras y estigmas al mismo nivel (Ornduff, 1978; Weller, 1980; Ornduff, 1980; Swamy y Bahadur, 1984; Glover y Barrett, 1986; O'Neil, 1992; Ree, 1997; Nishihiro y Washitani, 1998; Nishihiro et al., 2000, Lau y Bosque, 2003). Por esta razón resulta fundamental tomar en cuenta el efecto conjunto de los patrones de flujo de polen y las modificaciones en el sistema de incompatibilidad para entender la disolución evolutiva de la tristilia.

En este contexto, *Oxalis alpina* (Rose) Knuth es una especie muy interesante, ya que presenta poblaciones tristílicas isopléticas (frecuencias iguales de cada morfo, Heutch, 1979), poblaciones tristílicas anisopléticas (frecuencias diferentes de los morfos), y poblaciones distílicas con pérdida del morfo intermedio (Weller, et al. 2007) (Fig. 4). Esta variación parece reflejar la trayectoria evolutiva desde la tristilia hacia la distilia y ofrece la oportunidad de estudiar si los patrones de flujo de polen son la causa de este proceso. Weller et al. (2007) han demostrado que existen dos cruzas ilegítimas (S x mL y L x mS)¹ cuya compatibilidad se encuentra modificada y que esta modificación se encuentra asociada a la pérdida del morfo intermedio (Fig. 3). Por lo anterior se esperaría que la evolución de la distilia a partir de la tristilia esté acompañada por un incremento en la magnitud de los flujos ilegítimos. Existen dos maneras por las cuales puede dar una modificación en los patrones de flujo de polen. La primera se relaciona con la conducta de forrajeo de los polinizadores, o con diferencias en la composición del gremio de polinizadores entre las poblaciones. La segunda posibilidad es que la variación en los flujos de polen no se deba a los polinizadores, sino a variaciones en la morfología de las flores.

¹ La forma de leer las cruzas es la siguiente: La primera letra (mayúscula) corresponde al morfo receptor, la segunda letra (minúscula) corresponde al nivel de antera y la tercera letra en mayúscula corresponde al morfo al que pertenece el nivel de antera del donador (ver Fig. 2 B).

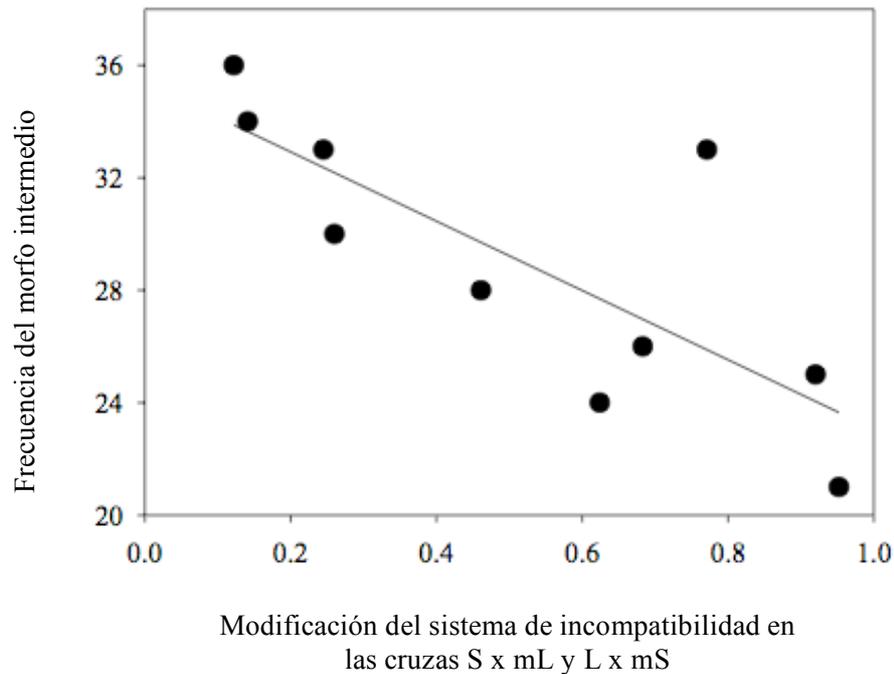


Fig. 3 Correlación negativa entre la modificación en el sistema de incompatibilidad (variación en la producción de semillas) en las cruces S x mL y L x mS y la frecuencia del morfo intermedio en *O. alpina* en las Sky Islands (Weller et al. 2007).

Objetivo General

Describir los patrones de flujo de polen de cuatro poblaciones de *Oxalis alpina* que representan un gradiente en la transición evolutiva de la tristilia a la distilia.

Objetivos Particulares

- Estimar las diferencias en las tasas de visita de los polinizadores entre morfos y poblaciones de *O. alpina*.
- Estimar los patrones de flujo de polen legítimo e ilegítimo en cuatro poblaciones contrastantes de *O. alpina*.
- Evaluar el efecto del flujo de polen en la transición tristilia-distilia por medio de un modelo genético.

Metodología General

Especie de estudio

Oxalis alpina (Rose) Knuth, sección *Ionoxalis* (Oxalidaceae) es una especie heterostílica, herbácea, perenne, que vive asociada a los bosques de coníferas (Cronquist, 1981). En la región de las “Sky Islands” (Islas del cielo, sureste de Arizona, suroeste de Nuevo México, E.U.; y noreste del estado de Sonora, México) es posible encontrar poblaciones tristílicas isopléticas, poblaciones tristílicas anisopléticas, y poblaciones distílicas en las que se ha perdido el morfo intermedio (Weller et al. 2007) (Fig. 4).

En la sección *Ionoxalis*, dos locus aparentemente ligados, uno epistático sobre el otro, son los responsables del polimorfismo floral (Weller, 1976). Estos locus son llamados S y M. Cuando al menos uno de los alelos S se encuentra en condición dominante (Ssmm) se genera una planta de morfo corto. Al ser epistático sobre el locus M, es necesario que el locus S se encuentre en condición recesiva y que haya un alelo dominante M para producir una planta con morfo intermedio. El morfo largo se presenta cuando la condición es doble recesiva para ambos locus. De este modo existen 6 posibles genotipos para el morfo corto (Ssmm, SsMm, SsMM, SSmm, SSMm y SSMM), dos para el intermedio (ssMm ó ssMM) y uno para el morfo largo (ssmm) (Weller, 1976; Charlesworth, 1979). A pesar de que el morfo corto presenta seis posibles genotipos, en la naturaleza sólo se encuentran tres, que corresponden a los genotipos heterocigos en el locus S. Los genotipos SS aparecerían si ocurren flujos asimétricos (flujos no legítimos) y existe una modificación del sistema de incompatibilidad que permita la producción de semillas entre individuos del morfo corto (Charlesworth, 1979).

Durante las glaciaciones del Pleistoceno (hace 10, 000 años aprox.) las partes altas de las montañas de la región de las Sky Islands, mantenían temperaturas de congelación, por lo que muchas especies que ahora habitan en esos sitios tenían una distribución continua en altitudes menores (Masta, 2000; Knowles, 2000). *Oxalis alpina* era una de esas especies y se supone que durante el Pleistoceno ocupaba una gran porción de los fríos y húmedos valles intermontanos. Una vez que los hielos se retiraron al término de las glaciaciones y produjeron un clima más cálido y seco, las poblaciones

En este estudio trabajé en cuatro poblaciones de *Oxalis alpina* de la región de las “Sky Islands”. Estos estudios se realizaron durante los meses de agosto del 2004 y 2005. Estas cuatro poblaciones fueron seleccionadas porque representan diferentes fases (frecuencia del morfo intermedio) de la transición de la tristilia a la distilia en *O. alpina*.

Tres de las poblaciones estudiadas son tristílicas y una es distílica. Entre las poblaciones tristílicas encontramos una, La Mariquita (MAR) (Sonora, Méx.), en condición isoplética. Dos poblaciones, La Púrica (PUR) (Sonora, Mex.) y Morse Canyon (MC) (Arizona, EUA) son anisopléticas y muestran un déficit en la frecuencia del morfo intermedio. Finalmente, Pinery Canyon (PC) (Arizona, EUA) es una población distílica que ha perdido completamente el morfo intermedio y presenta los dos morfos restantes en condición isoplética (Fig. 5). Para fines prácticos nos referiremos a las poblaciones Mariquita, Púrica, Morse Canyon y Pinery Canyon como MAR, PUR, MC y PC respectivamente.

Tasas de visita

Para saber si existen diferencias entre morfos y entre poblaciones en la tasas de visita de los polinizadores, se hicieron censos de las visitas por morfo de polinizadores en las cuatro poblaciones de *O. alpina*. Para esto se seleccionaron 6 parches con flores de *O. alpina* que incluyeran individuos de los tres morfos (2 en Pinery Canyon). Cada parche fue muestreado durante 2 h. por una persona ubicada a una distancia que no interfiriera con la actividad de los polinizadores. En cada parche se realizaron 12 períodos de observación de cinco minutos cada uno y separados por intervalos de cinco minutos. Estas observaciones se realizaron entre las 11 y 14 h, cuando los polinizadores se encontraron más activos. Durante cada período de observación se registró el número de visitas que recibió cada morfo, así como la identidad del polinizador (Orden ó Género). Estas observaciones fueron realizadas en los mismos años en los que se estimó el flujo de polen.

Estimación del flujo de polen

Oxalis alpina al igual que otras especies heterostílicas presenta variación en el tamaño de los granos de polen entre morfos. Sin embargo, no es posible estimar los flujos de polen con base en las cargas de polen del estigma debido a que el tamaño de los granos de polen de anteras largas, intermedias y cortas, a pesar de ser diferente, presentan un

alto solapamiento y no es fácil diferenciarlo (Weller, 1979). Por esta razón en este estudio se utilizaron polvos fluorescentes de diferentes colores (Arco Colores S.A. de C.V.). Se ha demostrado que los polvos fluorescentes pueden ser un buen análogo del polen (O'Neil, 1992, Castillo et al. 2002; Adler e Irwin, 2006.).

Se utilizaron polvos fluorescentes industriales de 6 colores distintos, uno para cada nivel de antera y morfo (mL, sL, sM, lM, mS, lS) (Fig. 2). El criterio de selección de los polvos se basó en la facilidad para distinguir cada color bajo la luz UV y evitar confusiones al momento de revisar las flores. En cada población se eligieron al azar 30 flores de cada morfo. Las flores de un morfo dado fueron divididas en dos grupos, y a las flores de cada grupo se les aplicó un color de polvo fluorescente. El color del polvo y el nivel de antera seleccionado para la aplicación fueron definidos con anterioridad. De esta manera cada flor recibió un solo color de polvo en sólo uno de los niveles de anteras. La aplicación de los polvos se realizó por medio de pequeñas varitas de madera para evitar contaminar los estigmas y el otro nivel de anteras. Cada planta fue marcada con un palito de madera con el fin de localizarla al final del experimento. Para fines prácticos nos referiremos a las flores marcadas como “flores focales”.

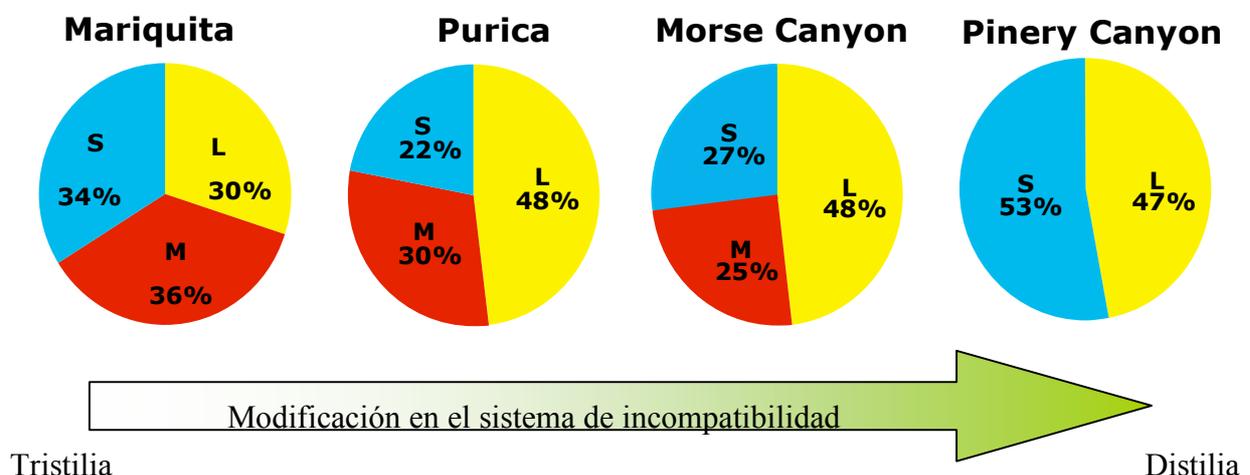


Fig. 5. Poblaciones donde se realizó la estimación de flujo de polen. Las gráficas representan las frecuencias por morfo. La flecha indica el aumento en la modificación del sistema de incompatibilidad.

Las flores focales estuvieron accesibles a los polinizadores por aproximadamente 5 h. Los ensayos se realizaron alrededor del medio día, cuando los polinizadores se encuentran más activos y las flores abiertas. Una vez transcurrido este

periodo se colectaron las flores focales, así como las todas flores de las 5 plantas más cercanas a la planta focal con el propósito de ver hacia dónde se movieron los polvos. Las flores colectadas fueron disectadas con mucho cuidado para dejar expuestos los estigmas. Los estigmas de todas las flores se observaron con luz UV para determinar la presencia polvos y su color. Esta metodología fue realizada de la misma manera para las cuatro poblaciones.

Análisis de datos

Tasas de visita de polinizadores. Se realizaron pruebas de G (Sokal y Rohlf, 1981) para comparar la intensidad de las visitas entre poblaciones. Los valores esperados se calcularon suponiendo que las visitas son proporcionales al número de flores observadas en cada población. Así mismo Se realizaron pruebas de G independientes para cada población con el fin de comprobar que no hubieran diferencias entre los morfos en las tasas de visita de polinizadores. Nuevamente los valores esperados tomaron en cuenta la frecuencia de los morfos en las flores observadas.

Magnitud de los patrones de flujo entre poblaciones y morfos. Los patrones de flujo de polen se caracterizaron usando dos aproximaciones de análisis. En primer caso, se describieron las diferencias generales entre morfos y poblaciones sin considerar el tipo de cruce. Es decir, se analizó si una flor recibió polvo o no. Para esto se realizó un análisis logístico nominal con diseño anidado (CATMOD, SAS Institute, 1988), así como pruebas de ji-cuadrada a posteriori (Sokal y Rohlf, 1981). En segundo lugar, se realizó un análisis de ji-cuadrada para comprobar que existen diferencias entre la cantidad de cruces legítimas vs. ilegítimas en las poblaciones tomando en cuenta que existe mayor número de cruces ilegítimas que legítimas (proporción de 3:1). Finalmente se utilizó un análisis logístico nominal con un diseño anidado (CATMOD, SAS Institute, 1988) para evaluar si la distribución de los tipos de cruce difiere entre las poblaciones y los morfos. Los tipos de cruce se definieron como legítimo (LEG) (Fig. 2), Ilegítimo heteromórfico (ILHE, entre morfos diferentes), e Ilegítimo homomórfico (ILHO, entre morfos iguales). Un análisis de ji cuadrada probó las diferencias entre la proporción de cruces legítimas vs. Ilegítimas

Diferencias de los tipos de cruza por población y morfos. Con el fin de evaluar si hay una asociación entre la pérdida del morfo intermedio y la probabilidad de ocurrencia de cada uno de los tipos de cruza se usaron modelos logísticos nominales (CATMOD, SAS Institute, 1988) para comparar el efecto de las poblaciones y los morfos (variables independientes). Se hicieron análisis independientes por cada tipo de cruza (LEG, ILHE y ILHO) y cada tipo fue codificado como presencia (1) ó ausencia (0) de polvo en una flor. En todos los casos se usó un diseño factorial con el efecto de población, morfo y su interacción. Dos tipos de análisis se realizaron para cada tipo de cruza. En el primero se compararon únicamente las poblaciones tristílicas; esto con el fin de evitar los errores que surgen de la falta del morfo intermedio en la población distílica. El segundo análisis comparó las cuatro poblaciones eliminando el morfo intermedio. De esta manera se pudo analizar el efecto de la presencia/ausencia del morfo intermedio, y de los otros morfos en los patrones de flujo de polen

Modelo Genético.

La estimación de las probabilidades de flujo de polen observados fueron utilizados para evaluar sus posibles consecuencias en el equilibrio evolutivo de la frecuencia de los morfos florales mediante un análisis teórico. El modelo genético recursivo predice los valores en el equilibrio de las frecuencias fenotípicas y genotípicas en una población tristílica (Fornoni et al., Datos no publicados). Este modelo calcula las frecuencias en el equilibrio a partir de las frecuencias iniciales, considerando los valores de flujo de polen, y la probabilidad de compatibilidad por cruza a partir de estudios previos (Weller et al. 2007) (Apéndice 1).

Se realizaron simulaciones para cada una de las poblaciones estudiadas. Todas las simulaciones se iniciaron a partir de una situación de equilibrio, es decir con frecuencias fenotípicas en 0.33 para cada morfo, y frecuencias genotípicas predichas por Fisher (1949) y confirmadas por nuestro modelo (0.17 (Ssmm), 0.13 (SsMm), 0.023 (Ssmm), 0.3 (ssMm), 0.02 (ssMM) y 0.333 (ssmm) (condición isoplética). Se plantearon dos escenarios para evaluar las posibles consecuencias de los patrones de flujo de polen, el primero con la intención de predecir lo que ocurriría en las poblaciones si los valores de flujo (Apéndice 2) e incompatibilidad observados (producción de semillas) se mantuvieran constantes. El segundo escenario se planteó a

partir del resultado del primer escenario. Los valores de flujo e incompatibilidad usados fueron diferentes para cada población.

Los valores de compatibilidad se obtuvieron de un extensivo programa de cruzas experimentales (Weller et al. 2007) en el que se calculó la producción de semillas de todas las cruzas posibles en poblaciones tristílicas y distílicas. En las simulaciones se introdujeron los valores de dos cruzas legítimas y los valores de las cruzas ilegítimas (S x mL y L x mS), ya que previamente se había demostrado que la modificación en éstas cruzas se relaciona con la frecuencia del morfo intermedio (Fig. 3) (Weller et al. 2007).

RESULTADOS

Tasas de visita de polinizadores

Los análisis de las poblaciones tristílicas Mariquita y Púrica mostraron que no existen diferencias significativas en el número de visitas que recibe cada morfo (MAR: $G_{(2)}=3.49$, $P=0.174$; PUR $G_{(2)}=4.81$, $P=0.09$) Tampoco se encontraron diferencias en la población distílica (PC: $G_{(1)}=3.39$, $P=0.19$). En la población Morse Canyon no se observaron suficientes polinizadores para detectar diferencias entre morfos, a pesar de que se encontró gran variedad de polinizadores los más comunes fueron las abejas *Heterosaurus bakeri* y *Heterosaurus neomexicanus*, especies reportadas como las más comunes por Weller (1981).

Diferencias de los tipos de cruce por población y morfos.

De la observación de 4106 flores en las cuatro poblaciones el 20.24% (842) recibió algún tipo de polvo. Entre las poblaciones tristílicas MAR obtuvo el porcentaje más alto de flores con polvo (23.8%), seguido de PUR (17.7%) y MC (9.6%). Sin embargo la población distílica PC es en la que se observó el porcentaje más alto de flores con polvo (49.8%). Las diferencias entre poblaciones fueron significativas ($\chi^2_{(3)}=276.75$, $P<0.0001$). La proporción de flujos proporción de flujos legítimos vs. ilegítimos que ocurrieron en cada población resultó significativamente diferente. La tabla 1 indica que en general hay mayor frecuencia de cruza legítimas y menor frecuencia de cruza ilegítimas que lo esperado.

		Obs.	Esp.	χ^2	Prob.
MAR	Leg	216	103	97.5	<0.0001
	Ileg	196	309		
PUR	Leg	77	45	27.5	<0.0001
	Ileg	102	134		
MC	Leg	41	21	20.5	<0.0001
	Ileg	45	65		
PC	Leg	89	41	62.7	<0.0001
	Ileg	76	124		

Tabla 1. Diferencias entre las cruza legítimas e ilegítimas en cuatro poblaciones de *O. alpina*.

La probabilidad de recibir algún tipo de polvo (flujo) difirió entre los morfos de las poblaciones tristílicas (MAR: $\chi^2_{(1)}=20.6$ $P<0.0001$; PUR: $\chi^2_{(1)}=28.35$ $P<0.0001$; MC: $\chi^2_{(1)}=51.63$ $P<0.0001$). En todos los casos el morfo L es el que tuvo la mayor

probabilidad de recibir polen, seguido del M y luego del S ($\chi^2_{(1)}=20.6 P < 0.0001$). En la población distílica no se observaron diferencias significativas entre los morfos (PC: $\chi^2_{(1)} = 0.15 P=0.69$).

El análisis logístico nominal anidado (JMP, 2005) mostró que la distribución de los tipos de cruce difiere entre las poblaciones y los morfos dentro de las poblaciones (POB: $\chi^2_{(9)}=223.706 P < 0.0001$; morfo (POB) $\chi^2_{(21)}=109.19 P < 0.0001$). Por otra parte los análisis donde se valoraron las diferencias entre las poblaciones y los morfos en la probabilidad de que ocurran cruces legítimas difiere significativamente entre las poblaciones tristílicas y entre los morfos dentro de las poblaciones (Tabla 1). La población MAR presentó la mayor probabilidad de que ocurran cruces legítimas, seguida por PUR y MC respectivamente (Fig. 6 A). En relación al morfo las plantas M tienen la menor probabilidad de recibir flujo legítimo, mientras que el morfo L tiene la mayor probabilidad. El morfo S presentó valores intermedios (Fig. 7 A).

La probabilidad de recibir flujos ilegítimos heteromórficos en las poblaciones tristílicas difirió entre morfos pero no entre poblaciones (Tabla 1). Al igual que en las cruces legítimas, el morfo L tuvo la mayor probabilidad de recibir flujo ILHE, seguido del S y del M quien recibió la menor proporción. Estas probabilidades sin embargo, son mucho más bajas que las probabilidades de recibir flujos legítimos (Fig 6 B). La probabilidad de recibir un flujo ilegítimo homomórfico varió entre poblaciones y entre morfos (Tabla 1). Esta probabilidad va disminuyendo en las poblaciones mientras la frecuencia del morfo M va decreciendo y sus valores son de casi la mitad que los legítimos (Fig 5 B). El morfo intermedio es el que presenta la mayor probabilidad de ocurrencia de flujos homomórficos (Fig. 6 C).

En general los flujos legítimos tienen una mayor probabilidad de ocurrencia en poblaciones tristílicas, sobre todo en la población isoplética. El morfo intermedio tuvo una menor probabilidad de recibir flujos legítimos e ilegítimos heteromórficos que los morfos L y S. En contraste, las plantas del morfo M presentaron la mayor probabilidad de ocurrencia de flujos homomórficos.

El segundo grupo de análisis, que comparó las cuatro poblaciones excluyendo al morfo intermedio, mostró que existen diferencias entre poblaciones y entre morfos en la probabilidad de ocurrencia de flujos legítimos (Tabla1). La población tristílica MC

presentó la menor probabilidad y la población distílica PC la mayor (Fig. 7 A). Las diferencias entre morfos pueden ser explicadas por la pequeña ventaja que presenta el morfo L sobre el S en las poblaciones tristílicas, aunque en la población PC esta ventaja la presenta el morfo S.

Cuando se analizó la probabilidad de recibir un flujo ilegítimo heteromórfico, se encontró un efecto de población más no de morfo (Tabla 1). La diferencia más marcada entre poblaciones se encuentra en la población distílica cuya probabilidad de recibir flujo ilegítimo heteromórfico es significativamente mayor que la de poblaciones tristílicas (Fig. 7 B). Este resultado confirma la predicción de un aumento en las cruzas ilegítimas heteromórficas (S x mL y L x mS) con el aumento de la modificación en la incompatibilidad.

El análisis de los flujos ilegítimos homomórficos mostró un efecto de población pero no del morfo ni de la interacción. Las diferencias entre poblaciones mostraron el mismo patrón que el de los flujos ilegítimos heteromórficos. Es decir, las poblaciones tristílicas en conjunto tienen una probabilidad menor de recibir flujos ilegítimos homomórficos que la población distílica. Las poblaciones tristílicas PUR y MC tuvieron probabilidades iguales de recibir flujos ilegítimos homomórfico pero menores que las de MAR (Fig. 7 C).

La población distílica PC tuvo una mayor probabilidad de recibir flujo de cualquier tipo que las de las poblaciones tristílicas. Este incremento es más marcado en las cruzas legítimas e ilegítimas heteromórficas. La falta de un efecto significativo del morfo, indicó que no existen diferencias entre las plantas L y S en la probabilidad de recibir algún tipo de flujo. Por lo tanto, el efecto de morfo en el análisis de las poblaciones tristílicas, que incluye al morfo intermedio, indicó que las diferencias entre morfos se deben a éste último. En resumen, el morfo intermedio tuvo una menor probabilidad de recibir flujos legítimos e ilegítimos heteromórficos y una mayor probabilidad de recibir flujos homomórficos que los morfos L y S.

Tabla1. Resultados de los análisis de regresión logística nominal evaluando las diferencias en las probabilidades de flujos legítimos, ilegítimos heteromórficos y legítimos homomórficos entre morfos y poblaciones. El contraste de L y S incluye la comparación entre poblaciones tristílicas y distílicas. Los valores significativos se encuentran señalados por un asterisco. * $p < 0.05$, ** < 0.001 y *** < 0.0001 .

Tipo de cruza	Poblaciones Tristílicas			Contraste entre L y S		
	morfo	población	Morfo x población	morfo	población	morfo x población
Legítimas	34.23***	34.66***	19.80***	5.93*	53.02***	13.74*
Ilegítimas Heteromórficas	13.33**	4.42	----	3.50	115.88***	----
Ilegítimas Homomórficas	9.49*	34.07***	9.61*	1.79	42.34***	6.95

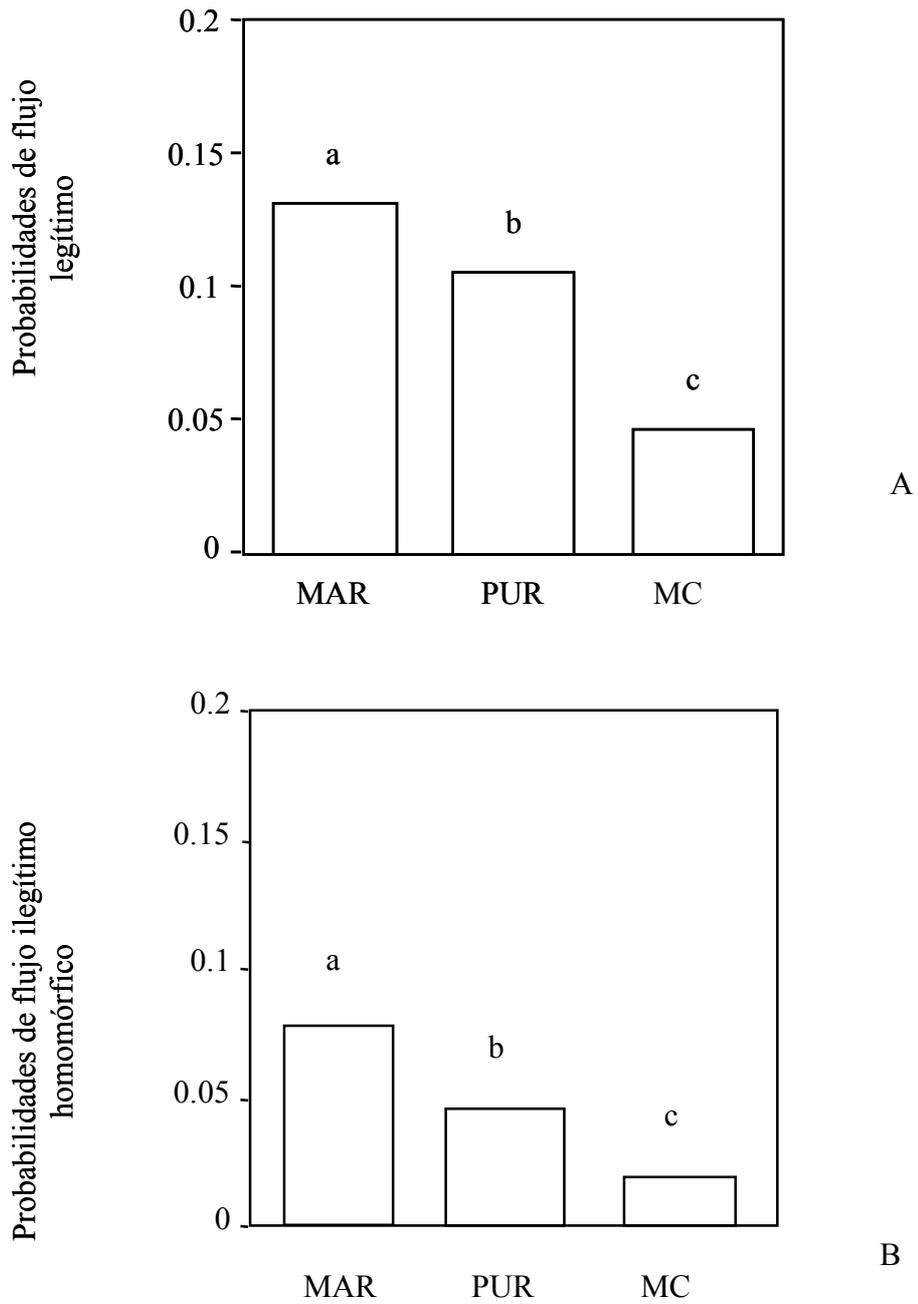


Fig. 6. Probabilidades de ocurrencia de flujos legítimos (A) e ilegítimos homomórficos (B) en poblaciones tristílicas. No se muestra el gráfico para los flujos ilegítimos heteromórficos porque no se encontraron diferencias significativas entre poblaciones. En las gráficas los valores corresponden a las probabilidades observadas.

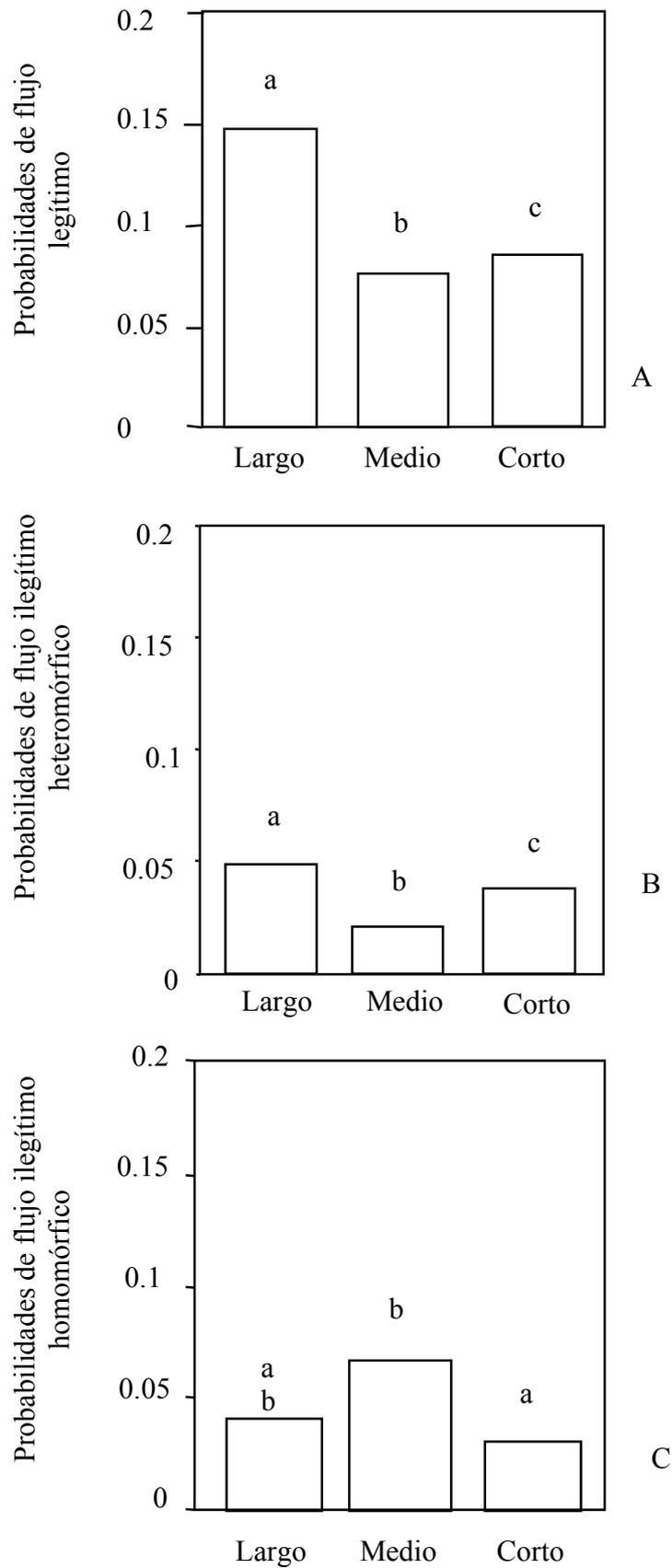


Fig. 7. Probabilidad de ocurrencia de flujos legítimos (A), ilegítimos heteromórficos (B) e ilegítimos homomórficos (C), entre morfos de poblaciones tristílicas.

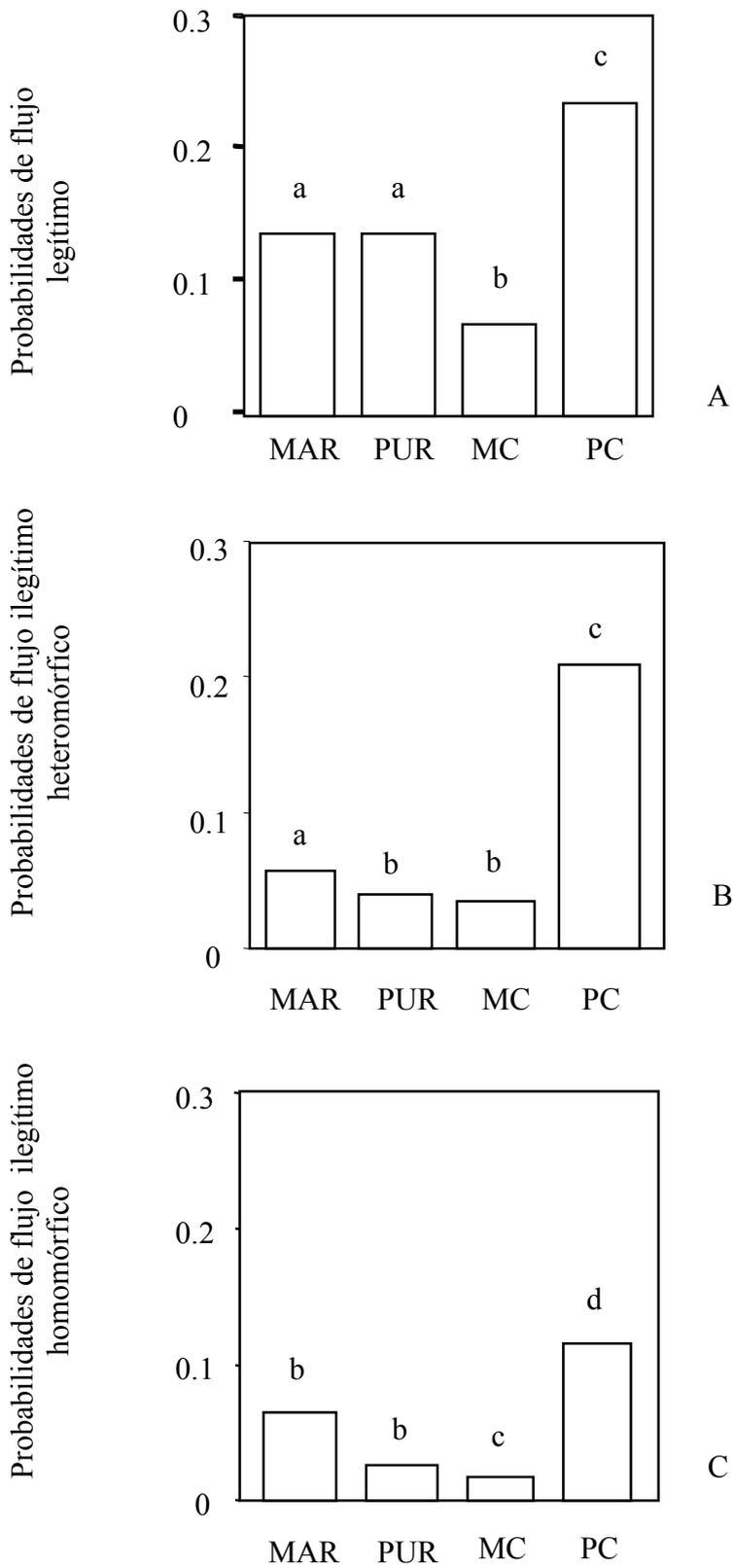


Fig. 8. Probabilidad de ocurrencia de flujo legítimo (A), ilegítimo heteromórfico (B), e ilegítimo homomórfico (C) en las cuatro poblaciones sin el morfo intermedio.

Modelo Genético.

A continuación se describen los resultados de las simulaciones del modelo genético utilizando los valores observados de flujo legítimo, de las dos cruzas ilegítimas S x mL y L x mS, y los valores observados de incompatibilidad (producción de semillas) (Weller et al. 2007).

En la población Mariquita el modelo predijo un equilibrio anisoplético ($\chi^2_{(2)}=16.42$ $P<0.001$) con desventaja del morfo corto (Fig. 10).

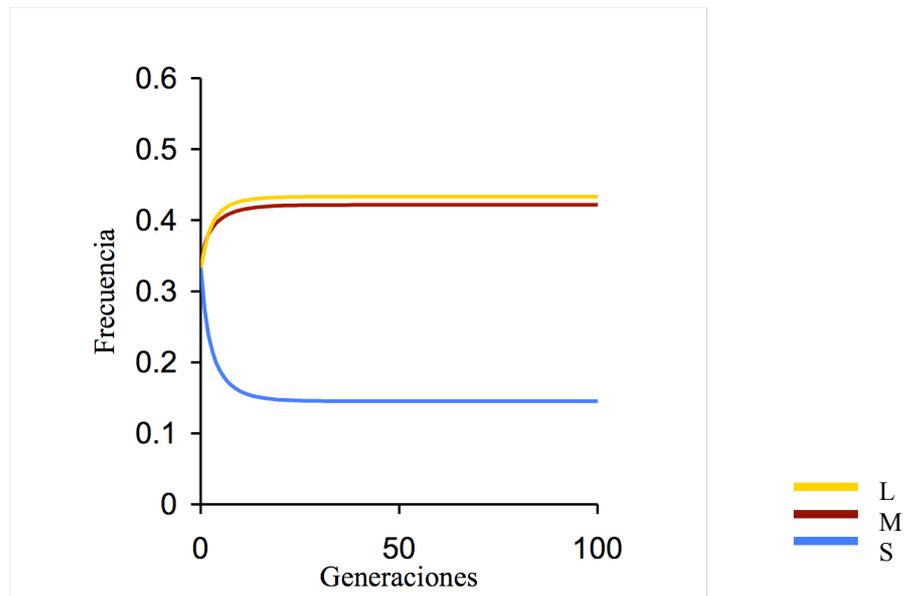


Fig. 10 Simulaciones del modelo genético en la población Mariquita usando los valores observados de flujo y compatibilidad.

En la población Púrica se observó la extinción del morfo corto, y el modelo predice una población distílica isoplética con los morfos largo e intermedio en frecuencias de 0.5 (Fig. 11).

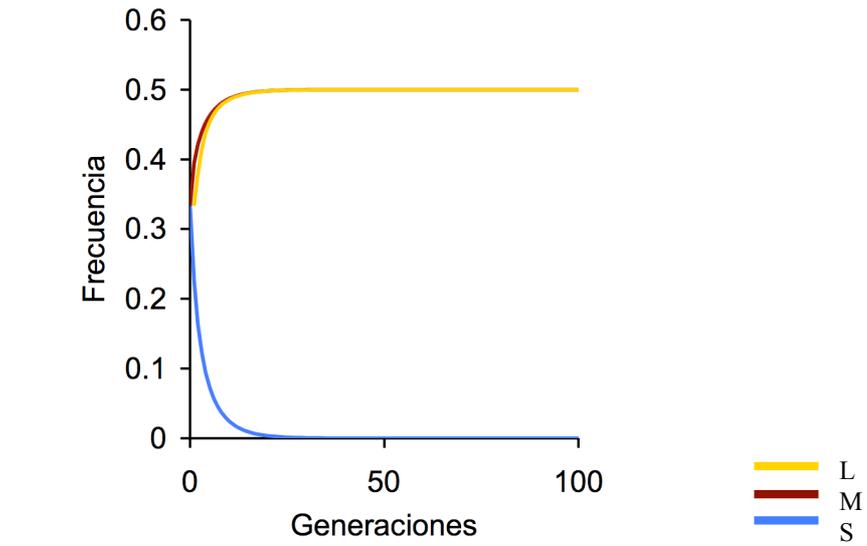


Fig. 11 Simulaciones del modelo genético en la población Púrica usando los valores observados de flujo y compatibilidad.

En la población Morse Canyon la simulación predijo la extinción del morfo intermedio y la evolución de una población distílica isoplética (Fig. 12).

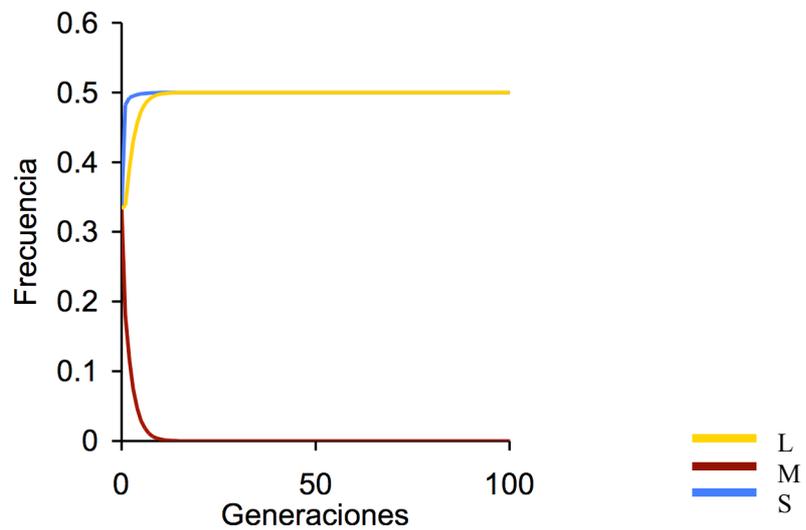


Fig. 12 Simulaciones del modelo genético en la población Morse Canyon usando los valores observados de flujo y compatibilidad.

Finalmente en la población distílica Pinery Canyon el modelo predice la permanencia de una condición distílica isoplética con frecuencias de los morfos L y S en 0.5 (Fig.13).

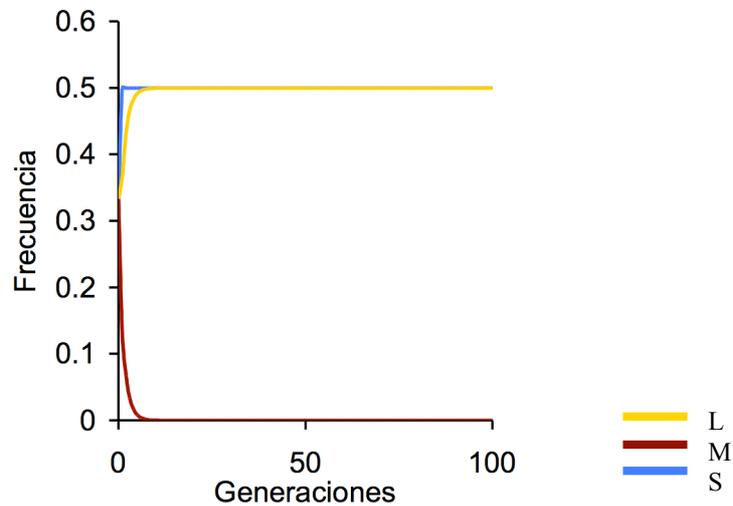


Fig. 13 Simulación del modelo genético en la población Pinery Canyon. Simulación usando los valores observados de flujo e incompatibilidad.

En el segundo grupo de simulaciones se eligió un escenario para la Mariquita en el que se trató de evaluar el papel del flujo de polen ante una completa modificación de las dos cruzas ilegítimas S x mL y L x mS. Este escenario simula una situación donde la única posible restricción para que evolucione la distilia son los patrones de flujo de polen. Se introdujeron en el modelo las probabilidades observadas de flujo legítimo y de las dos cruzas ilegítimas (S x mL y L x mS). El valor de compatibilidad de las cruzas legítimas se asignó de acuerdo a los resultados de Weller et al. (2007). Sin embargo, se asignó un valor de uno a la compatibilidad de las dos cruzas ilegítimas. El resultado de esta modificación predijo otra vez una población anisoplética ($\chi^2_{(2)}=3.39 P<0.0001$) con frecuencias de 0.415, 0.326 y 0.258 para el morfo largo medio y corto respectivamente (Fig 14). Esto sugiere que los flujos tienen el potencial de frenar la evolución a la distilia aún si el sistema de incompatibilidad está completamente modificado.

Debido a que en la primera serie de simulaciones se observó la pérdida del morfo corto en la población de la Púrica, se trató de evaluar qué parámetro podría revertir esta situación y producir un resultado semejante a los valores de frecuencias observadas en condiciones naturales. Esto se logró aumentando la probabilidad de flujo

en la cruce legítima L x IS (aumento de 0.3 a 0.8) (los valores observados para incompatibilidad y flujo en el resto de las cruces se ajustaron a los observados), ya que produjo una población anisoplética ($\chi^2_{(2)}=8.03$ $P<0.0001$) con frecuencias en 0.447, 0.337 y 0.215 de largos, medios y cortos respectivamente (Fig 15). Este resultado se acerca bastante a las frecuencias observadas en la población natural (0.48, 0.3 y 0.22). Por último, para evaluar el efecto de un aumento en la probabilidad del flujo legítimo se utilizó la población Morse Canyon, donde el morfo intermedio se encuentra en baja frecuencia. En esta ocasión se usaron los valores observados de flujo y compatibilidad, pero los flujos M x mS y M x mL se incrementaron al máximo (valores de uno). El resultado de esta simulación predijo una población anisoplética ($\chi^2_{(2)}=11.6$ $P < 0.0001$) con desventaja del morfo intermedio con frecuencias de 0.422, 0.402 y 0.175 para corto, largo e intermedio respectivamente (Fig. 16). Este resultado sugiere que un aumento en las cruces legítimas del morfo intermedio evita su extinción.

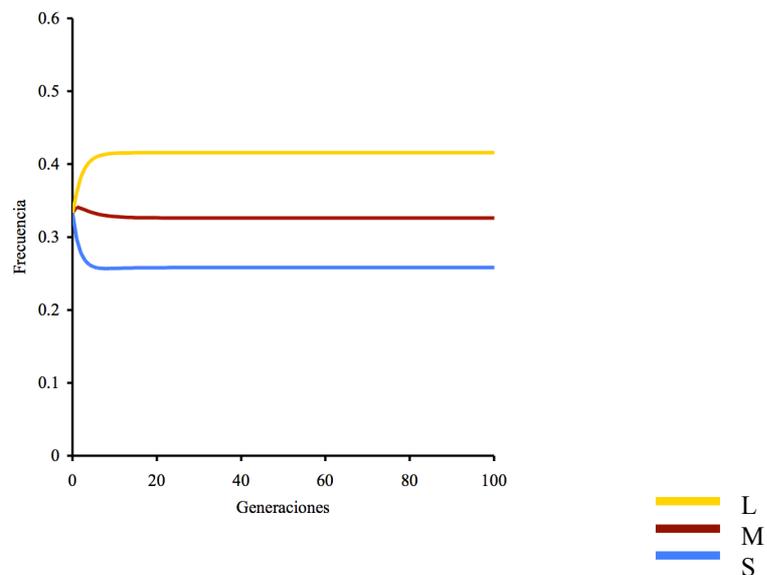


Fig. 14 Simulaciones del modelo genético en la población Mariquita aumentando la compatibilidad de las cruces ilegítimas S x mL y L x mS.

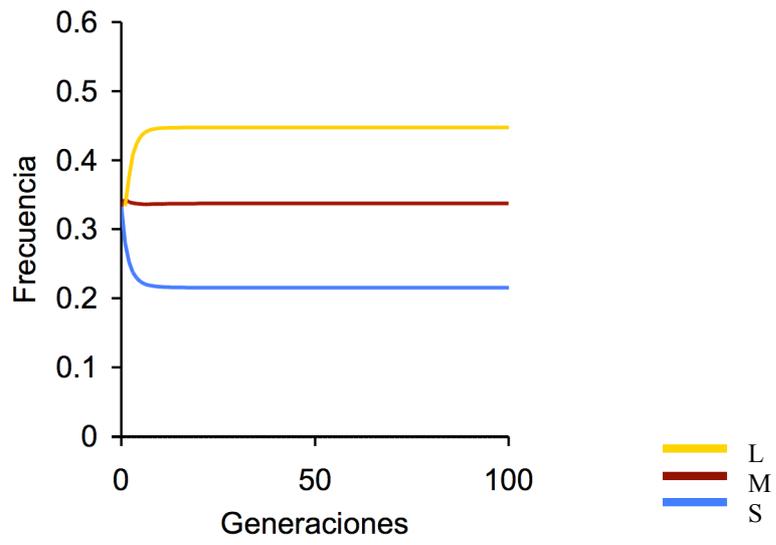


Fig. 15 Simulaciones del modelo genético en la población Púrica aumentando la cruce legítima LIS.

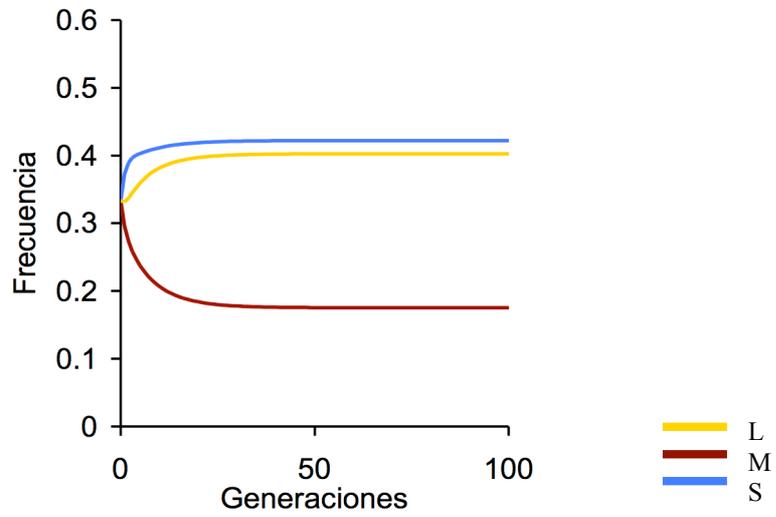


Fig. 16 Simulaciones del modelo genético en la población Morse Canyon con un aumento en las cruces legítimas del morfo intermedio.

Discusión y Conclusiones

Los resultados de este trabajo mostraron que la tasa de visita por polinizadores no difiere entre los morfos florales y que existen marcadas diferencias en las probabilidades de flujo entre las cuatro poblaciones y entre los morfos dentro de cada población. Este resultado es muy importante pues sugiere que las diferencias en los flujos de polen se deben a diferencias en la morfología floral y no a los patrones de forrajeo de los polinizadores. Por otro lado, los resultados mostraron tres patrones que podrían explicar la evolución de la distilia a partir de la tristilia en *O. alpina*. El primero es que, a pesar de que los flujos legítimos fueron más frecuentes en las cuatro poblaciones, los flujos ilegítimos tuvieron una alta probabilidad de ocurrencia. El segundo patrón es que el morfo largo es el mejor receptor de polen, ya que presentó la mayor probabilidad de recibir cualquier tipo de flujo. Por último, la población distílica tuvo la mayor probabilidad de recibir cualquier tipo de flujo (legítimos, ilegítimos heteromórficos e ilegítimos homomórficos). Estos patrones concuerdan con lo encontrado en otras especies tristílicas, donde el morfo largo es el mejor receptor de polen y donde además se encontró la ocurrencia de flujos ilegítimos (Ornduff, 1975; Glover y Barrett, 1983; Glover y Barrett, 1986; O'Neil, 1992).

En las poblaciones tristílicas se encontró una relación inversa entre la intensidad de los flujos legítimos y las modificaciones en el sistema de incompatibilidad y la pérdida del morfo intermedio (Fig. 6 A). La población tristílica isoplética (MAR) tuvo una mayor probabilidad de recibir flujo legítimo que las poblaciones tristílicas anisopléticas PUR y MC. Las cruza ilegítimas homomórficas mostraron el mismo patrón aunque en probabilidades de casi la mitad que las legítimas (Fig. 6 B). Resulta muy interesante encontrar un patrón que concuerde con el aumento en la modificación de la incompatibilidad y con la pérdida del morfo intermedio. Esto ocurre incluso cuando se analizan las poblaciones tristílicas sin el morfo intermedio (Fig. 8). Este hallazgo sugiere que los cambios en las probabilidades de flujo entre las poblaciones también son parte del proceso de transición de la tristilia a la distilia. Sin embargo es difícil saber cuál de estos factores (el flujo, la incompatibilidad o la morfología floral) es la causa. Sosenski et al. (Datos no publicados) han sugerido que los cambios en los niveles de los estilos y los estambres, asociados a las modificaciones del sistema de incompatibilidad, podrían afectar la accesibilidad de los polinizadores a las estructuras

reproductoras y alterar los patrones de flujo de polen. Otro factor que puede afectar los patrones de flujo de polen es la disminución en la frecuencia del morfo intermedio. Cuando el morfo intermedio disminuye su frecuencia o desaparece de una población, también disminuye la probabilidad de que el polen de anteras intermedias llegue a un estigma. Además la desaparición del morfo intermedio hace que la cantidad de polen de anteras largas y cortas (correspondientes al morfo intermedio) disminuya en la población. Posiblemente la disminución que se observa en los flujos LEG (Fig. 6) a lo largo de las poblaciones tristílicas se deba a la disminución de la frecuencia del morfo intermedio.

En contraste con lo esperado, hubo una alta probabilidad de transferencia de polen ilegítimo en las cuatro poblaciones de *Oxalis alpina*. De hecho, la mayor probabilidad de flujo ilegítimo ocurrió en la población tristílica isoplética (MAR) que no presenta modificaciones en el sistema de incompatibilidad (Weller et al. 2007) (Fig. 6 B). Este resultado sugiere que las modificaciones de los flujos de polen surgen antes que las modificaciones del sistema de incompatibilidad. Si esto es así, los flujos no representarían una restricción para que evolucione la distilia. Es decir, la presencia de flujos ilegítimos facilitaría la propagación de una mutación ventajosa en el sistema de incompatibilidad que permita que una cruce ilegítima produzca semillas. Este resultado resalta la importancia del hallazgo de Weller y colaboradores sobre la modificación de la incompatibilidad en dos cruces ilegítimas heteromórficas (S x mL y L x mS) en *Oxalis alpina*. Un aumento en las cruces heteromórficas entre los morfos L y S tendría un efecto muy importante sobre los patrones de segregación de los alelos creando una desventaja para el alelo M. Suponiendo que todos los genotipos se encuentran en equilibrio evolutivo, y que los morfos tienen la misma adecuación, entonces, un aumento en las cruces entre L y S (legítimas e ilegítimas heteromórficas) produciría una mayor proporción de genotipos S con alelos m (recesivo) en cada generación. El mejor ejemplo de esto sería una planta S con genotipo SsMM, que al cruzarse con una planta L (ssmm) reduce a la mitad la frecuencia del alelo M en la primera generación (SsMm). Esto es muy importante porque lo que se estaría seleccionando en contra es el alelo M y no todo el genotipo.

Otro de los resultados importantes de este trabajo es que el morfo M tuvo una menor probabilidad de recibir polen LEG e ILHE (Fig. 7 A y C). Dado que las

modificaciones en el sistema de incompatibilidad de las dos cruzas S x mL y L x mS, están asociadas con la desaparición del morfo intermedio, el hecho de que este morfo reciba menos cruzas legítimas e ilegítimas heteromórficas aceleraría su desaparición. El resultado de la simulación de la población Morse Canyon refuerza esta predicción ya que la baja probabilidad de recibir flujos LEG e ILHE, combinada con una modificación completa en el sistema de incompatibilidad podría conducir a la extinción del morfo intermedio (Fig. 12).

Sin embargo, el morfo intermedio presentó la mayor probabilidad de recibir flujos homomórficos (Fig. 7 B). Las cruzas homomórficas producen un sesgo hacia el morfo que se está cruzando. Por esta razón la selección natural podría favorecer una alta probabilidad de cruzas ILHO en el morfo intermedio ya que opera en contra de los factores que favorecen su desaparición. Otra forma para mantener al morfo intermedio sería aumentar la probabilidad en sus cruzas legítimas como se observa en la segunda simulación del modelo genético en la población Morse Canyon (Fig. 16).

Por otro lado las cruzas ilegítimas homomórficas explicarían el sesgo que se observa en distintas poblaciones de especies tristílicas hacia el morfo L (Fornoni et al. Datos no publicados). Las cruzas entre flores S pueden generar hijos de morfo S, M y L; cruzas entre individuos M sólo tienen hijos M y L. Finalmente, cruzas entre flores L producen sólo hijos L debido a que es el doble recesivo (Weller et al. 2007). Esto nos lleva directamente al hecho de que fue precisamente el morfo largo de *Oxalis alpina* el que presentó la mayor probabilidad de recibir polen (polvo) legítimo e ilegítimo. Este resultado es congruente con lo encontrado en otras especies tristílicas (Ornduff, 1975; Glover y Barrett, 1983; Glover y Barrett, 1986; O'Neil, 1992).

Los patrones de flujo de polen también mostraron que las poblaciones tristílicas presentan una baja probabilidad de recibir flujos legítimos, ilegítimos heteromórficos y homomórficos en comparación con la distílica (Pinery Canyon; Fig. 8). Las altas probabilidades de flujo en la población distílica Pinery Canyon sugieren que la población es más eficiente en donar y recibir polen. La predicción del modelo genético apoya esta idea al predecir el mantenimiento de la distilia en equilibrio isoplético usando los valores observados de flujo de polen e incompatibilidad.

Si consideramos que una población distílica presenta el máximo valor de modificación en la incompatibilidad de las cruzas S x mL y L x mS, es decir, que produce el mismo número de semillas que una craza legítima. Entonces, si consideramos a estas dos cruzas como legítimas en la población distílica (Pinery Canyon), la eficiencia de la distilia vs. tristilia se vuelve mucho más marcada (Fig. 17). La posible causa de la mayor eficiencia de la distilia es que una vez que se llega a esta condición ocurre un ajuste morfológico en la posición de anteras y estilos en los morfos L y S. Este ajuste podría facilitar el transporte de polen por medio de los insectos resultando en un incremento de los flujos legítimos (Sosenski et al. Datos no publicados).

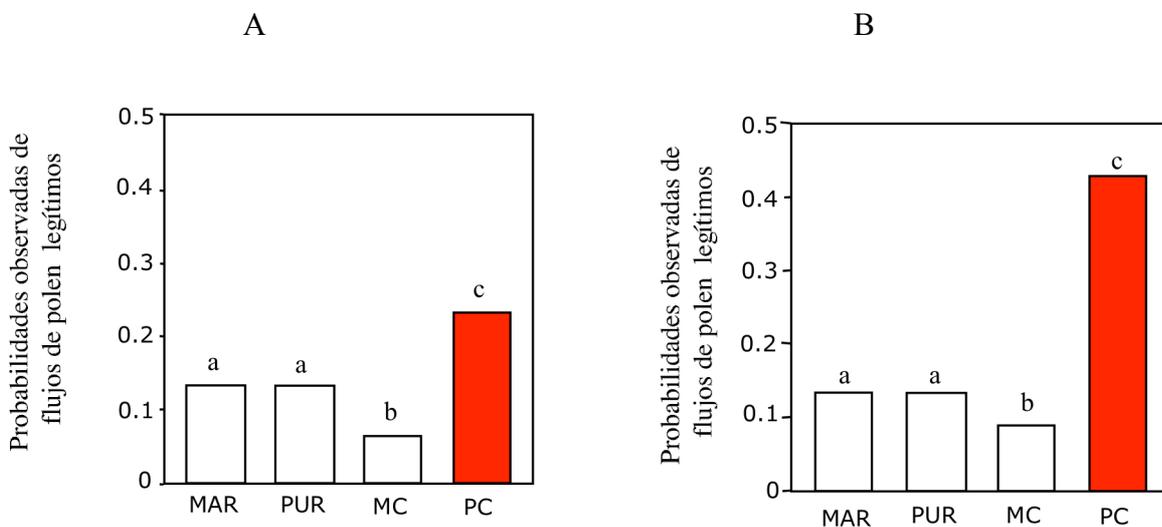


Fig. 13. A) Probabilidad de cruzas legítimas. B) Probabilidad de cruzas legítimas considerando como legítimas las dos cruzas heteromórficas S x mL y L x mS en las dos poblaciones modificadas. Pinery Canyon (barra con color).

Otro resultado interesante es que no se encontraron diferencias significativas en la probabilidad de recibir flujos ilegítimos heteromórficos (ILHE) y homomórficos (ILHO) entre los morfos L y S en las cuatro poblaciones. Los morfos L y S son igual de eficientes para recibir flujos de polen, incluso en las poblaciones tristílicas. Sin embargo, los resultados de las probabilidades de flujo ILHE e ILHO en las poblaciones tristílicas mostraron que existen diferencias significativas entre los morfos. Posiblemente estas diferencias son causadas por la presencia del morfo intermedio ya que presenta la menor probabilidad de recibir flujos legítimos e ILHE, y mayor probabilidad de recibir flujos ILHO. Según el modelo de Charlesworth (1979), la

desventaja del morfo intermedio radica en que la distancia entre estigmas y anteras que hay en este morfo incrementa la probabilidad de endogamia y de cruza ilegítimas homomórficas.

Todos estos resultados sugieren que las poblaciones tristílicas en *Oxalis alpina* se encuentran en diferentes equilibrios inestables y las predicciones del modelo así lo sugieren. La mayor habilidad del morfo L de recibir cualquier tipo de flujo, generaría un sesgo hacia este morfo. Por otro lado la alta probabilidad de recibir flujos ilegítimos, incluso en la población Mariquita (tristílica e isoplética), es una señal de que la tristilia no es tan eficiente en la transferencia de polen entre niveles compatibles (entrecruzamiento legítimo), como Darwin proponía. Posiblemente, en unas cuantas generaciones, se observen cambios en las frecuencias de los morfos en esta población. Esta predicción se confirma con el modelo genético que muestra una población anisoplética con desventaja del morfo corto en sólo 27 generaciones.

A pesar de que los cambios en los flujos de polen son un factor necesario para cambiar las frecuencias de los morfos, su efecto se encuentra limitado por la magnitud de la modificación del sistema de incompatibilidad. A su vez, el sistema de incompatibilidad se encuentra limitado por los patrones de flujo de polen. Esto último se observa claramente en la simulación del modelo en la población Mariquita, donde a pesar de una completa modificación en el sistema de incompatibilidad, no se extingue ninguno de los morfos (Fig. 14).

En la población tristílica anisoplética La Púrica, donde el sistema de incompatibilidad se encuentra parcialmente modificado (Weller et al, 2007), el modelo predice la extinción del morfo corto (Fig. 11). Esto apoya la importancia de los flujos en la evolución de la distilia, ya que puede generar fuertes desventajas sobre un morfo (bajas probabilidades de cruza legítimas observadas en este morfo; ver apéndice 2). Las predicciones del modelo mostraron que el sistema tristílico en esta especie es muy sensible a los cambios en los patrones de flujo de polen. La segunda predicción para la Púrica con un aumento en una cruce legítima (LIS) evitó la extinción del morfo corto en esta población (Fig. 15).

Finalmente los patrones de flujo de polen son muy importantes en las poblaciones de *Oxalis alpina*, ya que pueden explicar, junto con los valores de incompatibilidad, la variación observada en las frecuencias de los morfos en cuatro poblaciones. También pudieron explicar la extinción del morfo intermedio y confirmar la idea de que en *O. alpina* existe un gradiente evolutivo entre la tristilia y la distilia. Sin embargo, las poblaciones también podrían interpretarse como distintos estados de equilibrio de la heterostilia. Esto se explicaría por la alta susceptibilidad del sistema a pequeñas modificaciones en los parámetros (probabilidades de cruza e incompatibilidad) como se observó en las predicciones del modelo. Los cambios en cualquiera de los parámetros pueden llevar a muy variadas situaciones de equilibrio, incluyendo a la distilia. Pequeños cambios en las probabilidades de flujo, así como pequeños cambios en las incompatibilidades pueden generar ventajas o desventajas sobre los morfos o alelos, cambiando las frecuencias genotípicas y fenotípicas del equilibrio isoplético.

Bibliografía

- Adler L. y R. Irwin. 2006. Comparison of pollen transfer dynamics by multiple floral visitors: Experiment with pollen and fluorescent dye. *Annals of Botany* 97:141-150.
- Barrett S.C.H. 1988. The evolution maintenance, and loss of self-incompatibility system. En: J. L. Doust y L. L. Doust (Eds.). *Plant Reproductive Ecology Patterns and Strategies*. Oxford University Press, Nueva York. P: 98-124.
- Barrett S. C. H. 1992. *The evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.
- Barrett S.C.H. 1993. The evolutionary Biology of tristily En: Futuyma D. y J. Antonovics (Eds.) *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. Oxford University Press, Oxford U.K. vol. 9 p.p. 283-326.
- Baker H. G. 1962 Heterostyly in the Connaraceae with Special reference to *Byrsocarpus coccineus*. *Botanical Gazette* 123(3): 206-211.
- Castillo R. A., C. Cordero y C.A. Domínguez. 2002. Are reward polymorphisms subject to frequency-and density-dependent selection? Evidence from a monoecious species pollinated by deceit. *Journal of Evolutionary Biology*. 15: 544-552.
- Cesaro A.C., S.H.C. Barret, S. Maurice, B.E. Vaissiere y J.D. Thompson. 2004. An experimental evaluation of self-interference in *Narcissus assoanus*: functional and evolutionary implications. *Journal of Evolutionary Biology* 17:1367-1376.
- Charlesworth D. 1979. The Evolution and Breakdown of Tristyly. *Evolution* 33(1): 486-498.
- Cuevas E., F. Molina-Freaner, L. Eguiarte, y C. A. Domínguez. 2005. Pattern of male sterility withing and among populations of the distylous srhub *Eriythroxylum havanense* (erythroxlaceae). *Plant Ecology* 176: 165-172.

Cronquist A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press. London.

Darwin C. 1859. *El origen de las especies*. The modern Library, Nueva York.

Darwin C. 1877. *The different forms of flowers of plants of the same species*. Murray London.

De Nettancourt D. 2000. *Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants*. 2° ed. Springer-Verlag, Berlín p: 1-13, 26-31

Domínguez C. A., G. Ávila-Sakar, S. Vázquez-Santana y J. Márquez-Guzmán. 1997. Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany* 84(5): 626-632.

Faivre A. 2002. Variation in pollen tube inhibition sites within and among three heterostylous species of Rubiaceae. *Internacional Journal of plant sciences*. 163(5):783-794.

Fetcher A. E. 2000. *Resolution of male-female conflict in an hermaphroditic flower*. Proc. R. Soc. Lond. B 268: 525-529.

Fisher, R.A. 1949. *The theory of inbreeding*. Oliver y Boyd, Edhinburgh.

Friedman W. y S. Floyd. 2001. Perspective: The origin of flowering plants and their reproductive biology-A tale of two phylogenies. *Evolution* 55(2), p: 217-231.

Ganders Fred R. 1979. The Biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17 p: 607-35.

Glover D.E. y S. C. H. Barrett. 1986. Trimorphic Incompatibility in Mexican Populations of *Pontederia sagittata* Presl. (Pontederiaceae). *New Phytologist* 95(3): 439-455.

Heutch I. 1979. Equilibrium populations of heterostylous plants. *Theoretical Population Biology* 15 p: 43-57.

Hildebrand F. 1962. Citado en Barrett S.C.H. 1992. *Evolution and function of heterostyly*. Springer- verlag, Berlin.

Knowles Lacey L. 2000. Tests of Pleistocene speciation in montane grasshoppers (genus *melanopus*) from the sky islands of western north America. *Evolution* 54(4): 1337-1348.

Lau P. y C. Bosque. 2003. Pollen flow in the distylous *Palicourea fendleri* (Rubiaceae): an experimental test of the disassortative pollen flow hypothesis. *Oecologia* 135: 593-600.

Lloyd D.G. y C.J. Webb. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. I. Dichogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24 p:135-162.

Lloyd D.G. y C.J. Webb. 1992. The selection of heterostyly. En: S.C.H. Barret (ed.). *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag. Berlín p:179-207.

Masta E. S. 2000. Phylogeography of the jumping spider *Hanronattus pugilis* (araneae:salticidae):recent vicariance of Sky Islands populations?. *Evolution* 54(5): 1699-1711.

Nishihiro J. y I. Washitani. 1998. Patterns and consequences of self-pollen deposition on stigmas in heterostylous *Persicaria Japonica* (polygonaceae). *American Journal of Botany* 85(39):352-359.

Nishihiro J., I. Washitani, J.D. Thompson y B. A. Thompson. 2000. Patterns and consequences of stigma height variation in a natural population of a distylous plant, *Primula sieboldii*. *Functional ecology* 14: 502-512.

O'Neil P. 1992. Variation in male and female reproductive success among floral morphs in the tristylous plant *Lythrum salicaria* (Lythraceae). *American Journal of Botany* 79(9): 1024-1030.

Ornduff R. 1975. Pollen flow in *Lythrum junceum*, a tristylous species. *New Phytologist* 75: 161-166.

Ornduff R. 1978. Features of pollen flow in dimorphic species of *Lythrum* section *Euhyssopifolia*. *American Journal of Botany* 67(1): 95-103.

Ornduff R. 1980. Heterostyly, population composition, and pollen flow in *Hedyotis caerulea*. *American Journal of Botany* 67(1): 95-103.

Ree R. H. 1997. Pollen flow, fecundity, and the adaptive significance of heterostyly in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *Biotropica* 29(3): 298-308.

Richards A.J. 1986. *Plant breeding systems*. George Allen & Unwin. London.

Scribalo R. W. y S. C. H. Barrett. 1991. Pollen-pistil interactions in tristylous *Pontederia sagittata* (Pontederiaceae). I. Floral heteromorphism and structural features of pollen tube pathway. *American Journal of Botany* 78 : 1643-1661.

SAS Institute, 1988.

Sokal R.R. y F.J. Rohlf. 1981. *Biometry*. W.H. Freeman, San Francisco CA.

Swamy R. N. y B. Bahadur. 1984. Pollen flow in dimorphic *Turnera subulata* (Turneraceae). *New Phytologist* 98: 205-209.

Weller S. G. 1976 . The genetic control of tristyly in *Oxalis* section *Ionoxalis*. *Heredity* 37:387-393.

Weller S. G. y M. Denton. 1976. Cytogeographic evidence for the evolution of distyly from tristily in the North American species of *Oxalis* section *Ionoxalis*. *American Journal of Botany* 63 (1): 120-125.

Weller S. G. 1979. Variation in heterostylous reproductive systems among populations of *Oxalis alpina* in southeastern Arizona. *Systematic Botany* 4: 57-71.

Weller S. 1980. Pollen flow and fecundity in populations of *Lithospermum caroliniense*. *American Journal of Botany* 67(9): 1334-1341.

Weller S. G. 1981. Pollination Biology of heteromorphic populations of *Oxalis alpina* (Rose) Knuth (Oxalidaecae) in south-eastern Arizona. *Botanical Journal of the Linnean Society* 83:189-198.

Weller S. G., C. A. Domínguez, F. E. Molina-Freaner, J. Fornoni and G. LeBuhn. En prensa. The Evolution of Heterostyly in Populations of *Oxalis alpina* in the Sky Islands of the Sonoran desert. *American Journal of Botany* (En prensa).

Apéndice 1. Modelo Genético

Para calcular las frecuencias genotípicas y fenotípicas en el equilibrio de las poblaciones de *Oxalis alpina* se utilizó un modelo genético explícito, determinístico y recursivo (Fornoni et al. Datos no publicados). El modelo se basa en un sistema genético de dos locus (s y m) con dos alelos cada uno. Donde el locus s es epistático sobre el locus m (Fisher, 1941; Weller 1976). Este modelo calcula (Eq. 1) las frecuencias fenotípicas y genotípicas en equilibrio evolutivo a partir de sus frecuencias fenotípicas iniciales (F_i y F_j) (Fisher, 1949) y las probabilidades de ocurrencia para cada tipo de cruce ($F_i F_j$); así como del valor de la compatibilidad entre diferentes tipos de cruce (c_{ijk}). El valor de compatibilidad se estandarizó con respecto al valor más alto observado en un estudio previo (Weller et al. 2007) Para calcular la frecuencia fenotípica en la siguiente generación el modelo utiliza la matriz de segregación obtenida de cada tipo de cruce (legítima e ilegítima). Todos los valores que se introducen al modelo deben estar entre cero y uno. El modelo se basa en la siguiente ecuación que predice la frecuencia relativa (GR) del genotipo x en $t + 1$.

$$\text{Eq. 1} \quad GR = \sum_{i=1}^{10} \sum_{j=1}^{10} \sum_{k=1}^2 F_i F_j c_{ijk} s x_{ij}$$

Donde F_i y F_j corresponden a las frecuencias de genotipos paternos y maternos, respectivamente. $F_i F_j$ indican la probabilidad de cruce entre plantas del mismo ($i=j$) ó diferente ($i \neq j$) genotipo. c_{ijk} representa la proporción de semillas relativas al máximo que se producen cuando un estigma i recibe granos de polen (j) de un nivel de antera (k). Este parámetro expresa las semillas producidas por la cruce ijk relativo a la máxima producción de semillas en una cruce legítima. El último parámetro $s x_{ij}$, representa la proporción del genotipo x en la progenie producida por la cruce ij . Dado que la suma de GR_x no suma uno, las frecuencias genotípicas (G_x) en $t + 1$ fueron estimados como la frecuencia relativa (GR) fue estimada como:

$$G_x = \frac{GR_x}{\sum_{i=1}^{10} GR_i}$$

Esta ecuación puede ser iterada para estimar la frecuencia de cada genotipo en sucesivas generaciones, permitiendo estimar las frecuencias de equilibrio de cada morfo.

El modelo asume que (1) la probabilidad de cruce es proporcional a las frecuencias genotípicas, (2) la modificación en la incompatibilidad depende de un gen modificador no ligado, es decir que no se encuentra asociado al locus que determina a los morfos. (3) la segregación después de una cruce sigue un patrón de herencia Mendeliano, (4) No hay diferencias en la producción de polen y óvulos entre genotipos y (5) no hay descuento de polen.

Valores de Incompatibilidad

Con el fin de mantener constante la producción de semillas y reducir los efectos que pueda tener en el modelo, la producción de semillas se promedió en cada población. Debido a que el grado de modificación en el sistema de incompatibilidad en las tres poblaciones tristílicas estudiadas es diferente, el promedio en cada población se realizó con base en la clasificación realizada por Weller et al. (2007).

Debido a que la población Mariquita no se encuentra modificada, la compatibilidad en la primera simulación fue de 0.086 en las cruces legítimas y de 0.109 las cruces S x mL y L x mS. En la Púrica el valor de compatibilidad fue de 0.78 en las cruces legítimas y de 0.279 en las cruces S x mL y L x mS. Como no se encontraron diferencias entre la producción de semillas de las cruces legítimas y las cruces ilegítimas S x mL y L x mS en la población Morse Canyon, su valor de incompatibilidad fue el mismo (0.74). En las segundas simulaciones los valores permanecieron iguales a excepción de los que se describe anteriormente.

Anexo 2. Matrices de flujo de polen en cuatro poblaciones de *Oxalis alpina*.

A continuación se presentan las matrices de flujos para cada población. En la tabla 2 se presenta el número de flores con polvo observadas en cada tipo de cruce. La segunda tabla presenta las probabilidades de flujo estandarizado sobre el total para cada tipo de cruce. Se encuentran marcadas en negritas las cruces legítimas y en gris las dos cruces modificadas (S x mL y L x mS).

Las letras que encabezan a las columnas se refieren al nivel de antera del cual proviene el polen. La primera letra hace referencia al nivel de antera y la segunda, en mayúscula, al morfo al que pertenece. Ej mL es una antera intermedia del morfo largo. La letra que encabeza la fila corresponde al morfo receptor de polen. El valor total indica el número de flores con polvo que se observaron en cada población.

Tabla 3. Número de flores con polvo por población.

		IS	IM	mS	mL	sM	sL	Total
Mariquita	L	53	71	7	31	31	12	205
	M	2	32	31	43	30	12	150
	S	6	10	32	23	33	16	120
								475
Púrica	L	18	59	3	12	9	5	106
	M	2	17	8	6	11	10	54
	S	0	3	4	11	17	6	41
								201
Morse Canyon	L	24	2	15	5	10	5	61
	M	0	0	2	0	6	2	10
	S	0	0	2	0	7	6	15
								86
Pinery Canyon	L	35		45	11		5	96
	S	2		27	32		52	113
								209

Tabla 4. Probabilidades estandarizadas de flujo. Todas las probabilidades diferentes a cero son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$)

		IS	IM	mS	mL	sM	sL
Mariquita	L	0.746	1	0.099	0.437	0.437	0.169
	M	0.0282	0.4507	0.4366	0.6056	0.4225	0.1690
	S	0.0845	0.1408	0.4507	0.3239	0.4648	0.2254
		IS	IM	mS	mL	sM	sL
Púrica	L	0.305	1	0.051	0.203	0.153	0.085
	M	0.034	0.288	0.136	0.102	0.186	0.169
	S	0	0.051	0.068	0.186	0.288	0.102
		IS	IM	mS	mL	sM	sL
Morse Canyon	L	1	0.083	0.625	0.208	0.417	0.208
	M	0	0	0.083	0	0.25	0.083
	S	0	0	0.083	0	0.292	0.25
		IS		mS	mL		sL
Pinery Canyon	L	0.673		0.865	0.212		0.096
	S	0.038		0.519	0.615		1