



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Determinación y caracterización del
sistema de incompatibilidad en *Turnera
diffusa* Willd (Turneraceae)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A :

CÉSAR ISAAC CASTILLO TORRES



DIRECTORA DE TESIS: M. EN C. KARINA JIMÉNEZ DURÁN

MÉXICO. DF.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Datos del jurado

1. Datos del Alumno

| | |
|-----------------------------------------|-------------|
| Apellido paterno | Castillo |
| Apellido materno | Torres |
| Nombre(s) | César Isaac |
| Teléfono | 96277655 |
| Universidad Nacional Autónoma de México | |
| Facultad de Ciencias | |
| Carrera | Biología |
| Número de Cuenta | 305163433 |

2. Datos del Tutor

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

3. Datos del sinodal 1

| | |
|------------------|---------|
| Grado | Dra. |
| Nombre(s) | Judith |
| Apellido paterno | Márquez |
| Apellido materno | Guzmán |

4. Datos del sinodal 2

| | |
|------------------|----------|
| Grado | Dra. |
| Nombre(s) | Lilia |
| Apellido paterno | Alcaraz |
| Apellido materno | Meléndez |

5. Datos del sinodal 3

| | |
|------------------|-------------------|
| Grado | M. en C. |
| Nombre(s) | Beatriz Alejandra |
| Apellido paterno | Ávila |
| Apellido materno | Castañeda |

6. Datos del sinodal 4

| | |
|------------------|-----------|
| Grado | M. en C |
| Nombre(s) | Othón |
| Apellido paterno | Alcántara |
| Apellido materno | Ayala |

7. Datos del trabajo escrito

| | |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Título | Determinación y caracterización del sistema de incompatibilidad en <i>Turnera diffusa</i> Willd (Turneraceae) |
| Número de páginas | 83 |
| Año | 2012 |

DEDICATORIA

A mis padres

Alejandro Castillo Escobar y Sandra Verónica Torres que con su apoyo me dieron la oportunidad de estudiar y terminar una carrera...

A mis hermanos

Iván Alejandro y José Alberto que sus consejos de hermanos mayores me han ayudado a lo largo de mi vida y en este proceso siempre me apoyaron...

A mi mejor amigo de toda la vida

Dante Cruz Alcalá por su incomparable apoyo moral e intelectual...

A mis buenos amigos

David Mundo y Arturo Vázquez que siempre me han dado ánimos tanto en momentos buenos como en difíciles para seguir adelante...

Y por último a aquella persona que estuvo a mi lado en este trabajo largo tiempo y no habría palabras para describir todo el apoyo moral que me dio siempre...

AGRADECIMIENTOS

A la M. en C. Karina Jiménez Durán quien dirigió este trabajo de tesis, por su apoyo incondicional y por sus valiosas correcciones y comentarios a lo largo de esta tesis.

A la Dra. G. Judith Márquez Guzmán quien con su forma de ser siempre da ánimos de aprender más sobre las angiospermas y por sus excelentes comentarios objetivos en la versión final de este trabajo.

A la Dra. Margarita Collazo Ortega, la Dra. Sonia Vázquez Santana, la Dra. Ana Laura López Escamilla y la Biol. Laura Patricia Olgún Santos quienes a lo largo del taller sus comentarios, correcciones y críticas fueron circunstanciales para realizar y darle sentido a este trabajo de tesis.

A la M. en F. P. Ana Isabel Bieler Antolín por su ayuda en la toma de las micrografías de este trabajo.

A la Dra. A. Lilia Alcaraz Meléndez del Centro de Investigaciones Biológicas y del Noroeste S. C. quien me apoyó invaluablemente durante mi estancia en el CIBNOR y por sus comentarios en la revisión final de este trabajo.

Al M. en C. Margarito Rodríguez Álvarez y al técnico Sergio Manuel Real Cosío quienes de manera eficiente me apoyaron en el CIBNOR.

Al Sr. Amado Cota Cosío quien me ayudo a conocer aspectos empíricos de la Damiana.

Al Dr. Carlos Ramírez Serrano de la Universidad de Guadalajara por sus consejos, comentarios y perspectivas sobre mi trabajo durante mi estancia en el CIBNOR.

Al M. en C. Othón Alcántara Ayala quien fue el profesor que hizo que me dedicaría al estudio de las angiospermas y por sus comentarios y correcciones en la revisión final de este trabajo.

A la M. en C. Beatriz Alejandra Ávila Castañeda por sus sugerencias y comentarios objetivos en la revisión final de este trabajo.

A la M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco y al M. en C. José Gonzalo Ricardo Wong por su apoyo técnico en el "laboratorio del desarrollo en plantas".

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| Índice | |
| Resumen | 1 |
| Introducción | 3 |
| Antecedentes | 5 |
| Incompatibilidad en especies distílicas | 12 |
| Ejemplos de sistemas de incompatibilidad | 13 |
| Familia Boraginaceae | 13 |
| Familia Gentianaceae | 14 |
| Familia Malvaceae | 15 |
| Familia Menyanthaceae | 15 |
| Familia Primulaceae | 16 |
| Familia Plumbaginaceae | 17 |
| Familia Rubiaceae | 18 |
| Familia Turneraceae | 24 |
| Objetivos | 28 |
| Materiales y métodos | 29 |
| Descripción de la especie | 30 |
| Distribución geográfica | 30 |
| Identificación del sistema de incompatibilidad | 31 |
| Receptividad del estigma y polinizaciones controladas | 31 |
| Observación de los tubos polínicos | 34 |
| Producción de semillas de ambos morfos en el campo | 35 |
| Producción de semillas del morfo <i>pin</i> en la cruza intermorfo y del campo | 35 |
| Caracterización del sistema de incompatibilidad | 36 |
| Tasa de crecimiento y velocidad de los tubos polínicos | 36 |
| Resultados | 37 |
| Identificación del sistema de incompatibilidad | 37 |
| Receptividad del estigma | 37 |
| Observación de los tubos polínicos de 48h post-polinización | 37 |
| Formación de frutos y semillas | 40 |
| Comparación del número de semillas provenientes de cruzas controladas | 41 |
| Producción de semillas | 42 |
| Caracterización del sistema de incompatibilidad | 43 |
| 1h post-polinización | 43 |
| 3h post-polinización | 44 |
| 6h post-polinización | 46 |
| 9h post-polinización | 47 |
| Tasa de crecimiento de los tubos polínicos | 51 |
| Velocidad de crecimiento de los tubos polínicos | 52 |
| Velocidad de los tubos polínicos de ambos morfos en diferentes pistilos | 55 |
| Discusión | 57 |
| Conclusiones | 63 |
| Perspectivas | 65 |
| Bibliografía | 66 |
| Anexo I | 78 |
| Anexo II | 83 |

Determinación y caracterización del sistema de incompatibilidad en *Turnera diffusa* Willd (Turneraceae)

RESUMEN

Los sistemas reproductivos son estrategias adaptativas que utilizan las angiospermas para promover la polinización cruzada, entre estas adaptaciones se encuentra la heterostilia que involucra un sistema de incompatibilidad heteromórfico para evitar la autogamia (autopolinización y geitonogamia) y la polinización intramorfo. *Turnera diffusa* Willd es una especie reportada distílica morfológicamente, sin embargo, no hay estudios que caractericen el sistema de incompatibilidad heteromórfico. El objetivo de este trabajo fue identificar el sistema de incompatibilidad de *T. diffusa* Willd asociado a la distilia y caracterizar algunos eventos relacionados a la incompatibilidad. Los resultados muestran que *T. diffusa* sí presenta un sistema de incompatibilidad heteromórfico ya que la formación de frutos sólo se dio en las cruzas intermorfo en ambos morfos, además, a las 48h post-polinización sólo los tubos polínicos de la crusa intermorfo llegan a la base del estilo, mientras que, el crecimiento de los tubos polínicos de las cruzas incompatibles (intramorfo y autopolinización) se inhiben desde la germinación del polen en el estigma hasta el crecimiento de los tubos polínicos en algún punto del estilo. La inhibición de los tubos polínicos incompatibles comienza a partir de las 3h post-polinización. Los tubos polínicos incompatibles contienen depósito abundante de calosa y presentan hinchazón en la punta. Los tubos polínicos de la crusa intermorfo *pin* llegan a la base del estilo a las 6h post-polinización, mientras

que, los tubos polínicos de la cruce intermorfo *thrum* llegan a la base del estilo a partir de las 3h post-polinización pero a las 6 horas post-polinización ya llegaron todos los tubos polínicos a la base del estilo. Los tubos polínicos del morfo *pin* en el pistilo *thrum* son más rápidos que los tubos polínicos del morfo *thrum* en el pistilo *pin*. Los tubos polínicos de ambos morfos crecen más rápido en pistilos del morfo complementario.

INTRODUCCIÓN

Una flor es una estructura reproductiva, generalmente hermafrodita con dos verticilos sexuales que corresponden al gineceo y androceo. El primero formado por uno o más carpelos y el segundo formado por estambres. Además pueden tener dos verticilos no sexuales, el cáliz y la corola, que conforman el perianto (Ingrouille, 1992).

En las flores hermafroditas los órganos sexuales femeninos y masculinos se encuentran muy cerca, lo que provoca interferencia sexual, característica que disminuye las oportunidades de entrecruzamiento siendo su principal consecuencia la autopolinización (Barret, 2000).

En algunos casos la autogamia (autopolinización, geitonogamia y cleistogamia) puede ser un evento ventajoso, ya que proporciona el aseguramiento reproductivo, sin embargo, la progenie producida por autogamia tiene menor adecuación que la progenie producida por alogamia debido a los efectos de la depresión por endogamia (Eckert, 2000).

Muchas flores están adaptadas a promover la polinización cruzada, que es, la transferencia de polen de la flor de un individuo a un carpelo de una flor de un individuo diferente (Mauseth, 2003).

Una adaptación para promover la polinización cruzada es la heterostilia. En las especies heterostílicas, las poblaciones están compuestas por dos (distilia) o tres (tristilia) morfos florales que se diferencian recíprocamente uno del otro por la posición en que las anteras y estigmas están localizados en las flores. La heterostilia proporciona la precisión en la transferencia de polen sin el costo asociado a la interferencia sexual, promoviendo la polinización cruzada (Barret, 2002).

Existen reportes en la especie *T. diffusa* considerada como una especie distílica (Bullock 1985; Mabberley, 1997; Lott, 2002; Alvarado-Cárdenas, 2006; Shore *et al.*, 2006), sin embargo, no hay estudios que describan si presenta un sistema de incompatibilidad heteromórfico, el cual generalmente va asociado a la heterostilia. En este estudio se comprobó y caracterizó la existencia de un sistema de incompatibilidad heteromórfico.

ANTECEDENTES

Las plantas hermafroditas presentan los órganos sexuales masculinos (estambres) y los órganos sexuales femeninos (carpelos) en la misma flor, condición que aumenta la probabilidad de autopolinización (Barret, 2002).

El sistema sexual hermafrodita refleja la ventaja de economizar los recursos destinados a la atracción del polinizador y da un potencial aseguramiento reproductivo en ausencia de parejas o polinizadores (Sun *et al.*, 2007).

Las plantas con flores tienen tres formas básicas de reproducción o sistemas reproductivos: alogamia, autogamia y reproducción asexual. En algunas poblaciones por lo menos dos e incluso tres sistemas reproductivos están presentes, de modo que los individuos adoptan sistemas reproductivos mixtos (Richards, 1996).

La reproducción sexual en plantas involucra tres pasos: (i) formación de células haploides por meiosis, (ii) formación de gametos y (iii) la fusión de gametos para formar un nuevo cigoto. Una importante consecuencia genética de la reproducción sexual es que produce descendencia con genotipos nuevos y una nueva combinación de genes (Silvertown y Charlesworth, 2001).

Las variaciones genéticas dentro de las poblaciones de plantas están influenciados por las interacciones entre factores genéticos y ecológicos, donde los factores genéticos tales como los sistemas reproductivos, la tasa de mutación y la dominancia pueden ser afectados por los factores ambientales (Naik, 1984).

Los sistemas reproductivos incluyen todos los aspectos de la expresión sexual en plantas que afectan a la contribución relativa de la siguiente generación, ya que incluyen adaptaciones que promueven la fecundación cruzada (Dafni, 1992).

Existen adaptaciones, como la unisexualidad, que previenen la autogamia. Solo el 4% de las angiospermas son dioicas, con flores estaminadas separadas de flores pistiladas en dos plantas diferentes. También existen angiospermas monoicas con flores femeninas y masculinas en la misma planta. Existen interesantes condiciones intermedias como la andromonoecia, donde las flores estaminadas y hermafroditas se encuentran en la misma planta o ginodioecia donde se encuentran flores pistiladas y hermafroditas en plantas diferentes (Ingrouille y Eddie, 2006). Las especies androdioicas tienen flores estaminadas y hermafroditas en plantas diferentes, y en la ginomonoecia la misma planta contiene flores hermafroditas y pistiladas (Pugnaire y Valladares, 2007).

Entre otras adaptaciones se encuentra la separación espacial de las estructuras sexuales que se denomina hercogamia, la cual reduce la probabilidad de autopolinización y es característica de flores casmógamas donde la posición espacial de las anteras con respecto al estigma previene la autopolinización (Pound y Clements, 1978; Massinga *et al.*, 2005).

Algunas angiospermas están adaptadas a promover la polinización cruzada, con la maduración de las anteras antes de que el estigma esté receptivo a lo que se denomina protandria o bien el estigma se encuentra receptivo antes de que el polen de las anteras madure y se de la antesis, a lo que se denomina protoginia, lo que reduce las oportunidades de autopolinización. A este tipo de plantas se les llama dicógamas (Darwin 1859; Rea y Nasrallah, 2008).

Otras adaptaciones presentes en las angiospermas son la enantiofilia que es una forma de asimetría direccional en plantas en donde el estilo es desviado lejos del eje principal de la flor hacia la izquierda o derecha (Jesson y Barret, 2002). Otra adaptación es la flexistilia que se define como un dimorfismo sexual donde existen dos morfos que se diferencian en la expresión temporal de la función sexual y también implican el movimiento recíproco de la superficie del estigma por un eje vertical en el periodo de floración. Entre los procesos que promueven la polinización cruzada eficiente se encuentra la hercogamia recíproca. La flexistilia es una estrategia floral que combina tanto hercogamia recíproca como dicogamia en un solo polimorfismo estilar (Sun *et al.*, 2007).

Algunas plantas con flores hermafroditas han desarrollado sistemas de incompatibilidad que promueven la polinización cruzada. Los sistemas de incompatibilidad se clasifican en: monomórficos y heteromórficos. En los sistemas monomórficos la prevención de la autogamia depende únicamente de una respuesta química-fisiológica y son dos tipos: autoincompatibilidad gametofítica y autoincompatibilidad esporofítica (Pugnaire y Valladares, 2007).

La autoincompatibilidad gametofítica está controlada generalmente por un locus *S* con un gran número de alelos, donde cada planta contiene uno o dos diferentes alelos *S* (Ej. S_1S_1 , S_3S_4) de modo que el pistilo puede ser homocigoto o heterocigoto y el 50% de los granos de polen llevan un alelo *S* y el otro 50% llevan el otro alelo *S*. Cuando el polen llega sobre el estigma, éste germina y produce un tubo polínico que crece a través de la matriz extracelular del tejido de transmisión del estilo, si el grano de polen comparte un alelo con el pistilo, el crecimiento del tubo polínico se detiene (Levin, 1986).

La autoincompatibilidad esporofítica está controlada por un locus *S* con varios alelos, cada planta tiene dos diferentes alelos y pueden ser homocigoto o heterocigoto, pero la especificidad del polen así como la del pistilo está controlada por el tejido esporofítico, de manera que cada grano de polen se comporta como si tuviera dos alelos *S*, a pesar de que solo contenga uno de expresión haploide. Si el polen proviene de una planta que contenga un alelo en común con el tejido parental, el crecimiento del tubo polínico se inhibe en la superficie del estigma (Levin, 1986).

Los sistemas de incompatibilidad heteromórficos presentan diferencias morfológicas que pueden ser vistas en el esporofito como distilia o tristilia, cada uno de estos sistemas difieren en la altura del estilo, altura de la antera, tamaño y cantidad del polen (Pugnaire y Valladares, 2007). Además, la incompatibilidad heteromórfica ayuda a promover la polinización cruzada y el reconocimiento bioquímico del polen propio ayuda a evitar la autopolinización (Ingrouille, 1992).

Los sistemas de incompatibilidad heteromórfico están controlados también por un locus S, que es conocido como supergen, el cual contiene de tres a siete genes (Tabla 1) que controlan el dimorfismo floral y los sistemas de incompatibilidad (Labone *et al.*, 2009).

Tabla 1. Descripción del supergen S y su función en especies distílicas. (Tomado de: de Nettancourt, 2001).

| Gen | Función | Planta <i>pin</i> | | Planta <i>thrum</i> | |
|-----------|-------------------------------|-------------------|------------------------------------|---------------------|--------------------------------------|
| | | Genotipo | Fenotipo | Genotipo | Fenotipo |
| <i>Is</i> | Incompatibilidad en el estilo | <i>is is</i> | Rechazo del polen de <i>pin</i> | <i>Is is</i> | Rechazo del polen de <i>thrum</i> |
| <i>Ip</i> | Incompatibilidad de polen | <i>ip ip</i> | Rechazo en el estilo de <i>pin</i> | <i>Ip ip</i> | Rechazo en el estilo de <i>thrum</i> |
| <i>G</i> | Longitud del estilo | <i>g g</i> | Estilo largo | <i>G g</i> | Estilo corto |
| <i>P</i> | Tamaño del polen | <i>p p</i> | Pequeño | <i>P p</i> | Grande |
| <i>A</i> | Altura de la antera | <i>a a</i> | Baja | <i>A a</i> | Alta |

La distilia es un polimorfismo floral controlado genéticamente que consiste en la presencia de dos morfos florales (Figura 1) en una población. El atributo característico de las especies distílicas es la diferencia entre la longitud relativa de

los estambres y estilos entre los morfos florales. Las flores de plantas *pin* (longistilas) tienen flores con estilos largos y estambres cortos, en cambio, las flores de las plantas *thrum* (brevistilas) poseen estilos cortos y estambres largos (Martin, 1965; Ganders, 1979; Domínguez y Ávila-Sakar, 2002; Tamari y Shore, 2006).

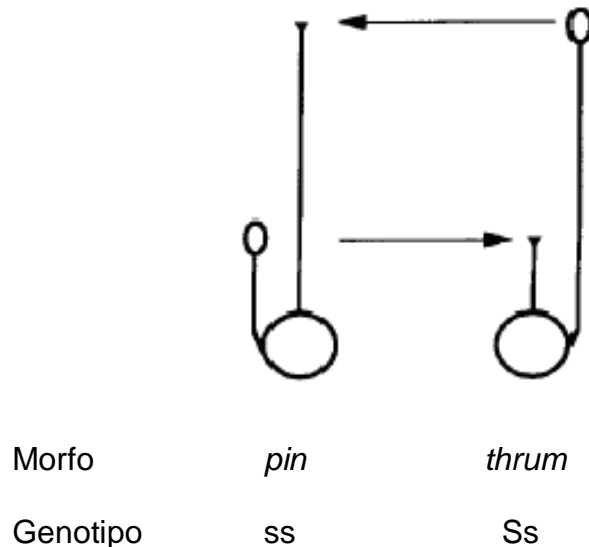


Figura 1. Morfología y genotipo de las flores distílicas (Modificado de Barret, 2000).

La distilia está controlada por un locus simple con dos alelos. El morfo *pin* es de genotipo *ss* y el morfo *thrum* es de genotipo *Ss*, basados en la predicción de los genes ligados *G*, *P* y *A* el homocigoto recesivo *pin* puede ser representado como *gpa/gpa*, y las plantas heterocigoto *thrum* pueden ser representados como *GPA/gpa* (Li *et al.*, 2007). Sin embargo, Baker (1966) y Ornduff (1979) reportaron que en *Armeria maritima* (Plumbaginaceae) e *Hypericum aegypticum* (Hypericaceae) respectivamente, que los genotipos de los morfos son diferentes, siendo el morfo *pin* de genotipo heterocigoto *Ss* (*GPA/gpa*) y el morfo *thrum* de genotipo homocigoto recesivo *ss* (*gpa/gpa*). En la tristilia (Figura 2) el modo más

común de herencia involucra dos loci dialélicos (S y M) donde S es epistático dominante sobre M , con este control genético los genotipos para los tres morfos son: morfo largo; $ssmm$; morfo mediano; $ssMm$; $ssMM$ y el morfo corto: $SsMm$, $Ssmm$, $SsMM$ (Barret, 1989; de Nettancourt, 2001).

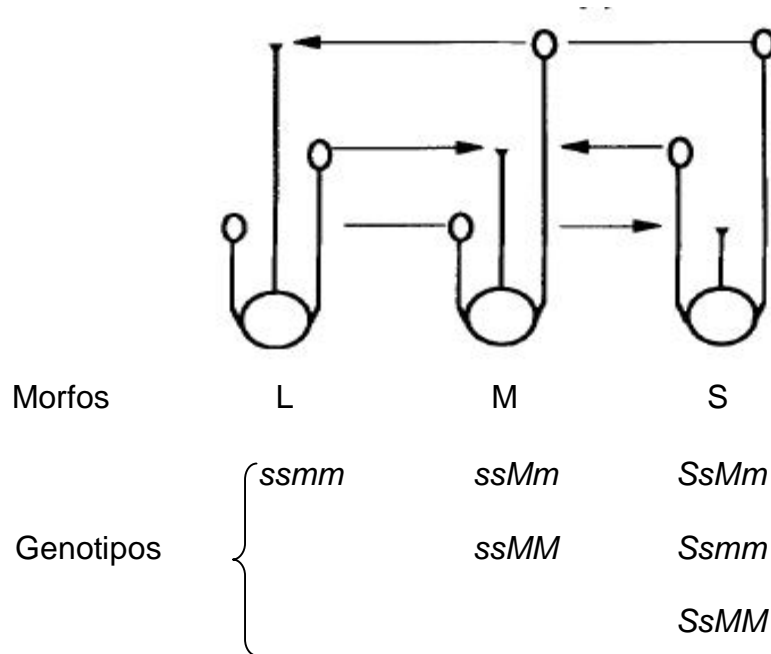


Figura 2. Morfología y genotipo de flores tristílicas. L: Morfo largo, M: Morfo mediano, S: Morfo corto. (Modificado de: Barret, 2000).

La tristilia es un raro polimorfismo sexual conocido en sólo seis familias de angiospermas: Amarillidaceae, Connaraceae, Linaceae, Lythraceae, Oxalidaceae y Pontederiaceae que implica la altura recíproca de la posición del estigma y las anteras en tres morfos florales (Ganders, 1979; Barret 1992; Barret y Hodings, 2006).

Los sistemas heteromórficos impiden que el polen ilegítimo de la polinización intramorfo y autopolinización genere semillas viables. Solo la transferencia de polen entre anteras y estigmas de la misma altura en morfos de flores de individuos diferentes (polinización intermorfo) resulta en una polinización legítima (Faivre, 2002).

Incompatibilidad en especies distílicas

En las especies distílicas solo las cruzas intermorfo generan semillas, mientras que, en las cruzas incompatibles (intramorfo y autopolinización) los tubos polínicos se inhiben en algún sitio del pistilo y presentan características que permiten identificar que se está llevando a cabo una reacción de incompatibilidad, la cual, impide que se formen semillas. El estudio de los sitios de inhibición de los tubos polínicos incompatibles ha sido revisado por Wedderburn y Richards (1990) en 52 especies de *Primula* (Primulaceae), por su parte Dulberger (1992) realizó una revisión bibliográfica de los sitios de inhibición de los tubos polínicos incompatibles de cruzas intramorfo de los morfos *pin* y *thrum* para nueve especies de Plumbaginaceae, once especies de Rubiaceae, cinco especies de *Primula* (Primulaceae), seis especies de *Linum* (Linaceae), dos especies de *Turnera* (Turneraceae), una especie de *Melochia* (Malvaceae) y *Oxalis* (Oxalidaceae), y siete especies de Boraginaceae.

Estos estudios en especies distílicas han permitido, en primer lugar, conocer si dichas especies presentan un sistema de incompatibilidad característico de la distilia y en segundo lugar (se presente o no el sistema de incompatibilidad), caracterizar los eventos de la interacción polen-pistilo.

Ejemplos de sistemas de incompatibilidad

Familia Boraginaceae

El sistema de incompatibilidad en *Anchuia officinalis* y *Anchuia hybrida* no es dialélico y es independiente de caracteres heteromórficos. El sitio donde se da la reacción de la incompatibilidad ocurre en el ovario y no en el estigma (Schou y Philipp, 1984; Dulberger 1970; citados por; Lewis y Jones 1992).

Barret (1998) menciona que el género *Narcissus* presenta sistema de incompatibilidad conocido como sistema de incompatibilidad ovárico o actividad tardía del sistema de incompatibilidad, donde la reacción de incompatibilidad ocurre después de que el tubo polínico ha entrado al ovario.

Taisma y Wolfgang-Varela (2005) realizaron sistemas de cruzas controladas en *Cordia curassavica* y reportan que en cruzas intermorfo se observa el mayor número de tubos polínicos a lo largo del estigma, estilo y ovario, a diferencia de la craza intramorfo *pin* donde la inhibición completa de los tubos polínicos ocurrió en el estigma. En la craza intramorfo *thrum* la inhibición de los tubos polínicos se dio

desde el estigma, estilo y ovario y en las autopolinizaciones de ambos morfos encontraron un patrón similar al de las cruzas intramorfo *pin*.

Brys *et al.* (2008) encontraron bajo un sistema de cruzas controladas en *Pulmonaria officinalis* que el morfo *pin* en autopolinizaciones y cruzas intramorfo es poco compatible, puesto que formaron semillas de dichas polinizaciones, mientras que el morfo *thrum* formó semillas de cruzas intermorfo e intramorfo pero no de autopolinizaciones, sin embargo, para ambos morfos el número de semillas de cruzas intermorfo es significativamente mayor. También reporta la reacción de incompatibilidad señalando que se presenta depósito abundante de calosa en la punta de los tubos polínicos incompatibles, sin embargo, no mencionan como es el patrón de aparición de calosa en los tubos polínicos compatibles.

Machado *et al.* (2010) estudiaron dos especies distílicas: *Cordia globosa* y *Cordia leucocephala*. Mediante un sistema de cruzas controladas demostraron que ambas presentan un sistema de incompatibilidad puesto que las únicas polinizaciones que formaron frutos fueron las cruzas intermorfo de los dos morfos.

Familia Gentianaceae

Wolfe *et al.* (2009) reportan que *Sebaea grandis* presenta un sistema de incompatibilidad heteromórfico puesto que en un experimento de cruzas controladas las polinizaciones intramorfo no produjeron frutos mientras que las polinizaciones intermorfo produjeron 70% de frutos en el morfo *thrum* y 50% en el morfo *pin*. Además reportan que los sitios donde se da el rechazo de los tubos

polínicos incompatibles varían entre morfos; en el morfo *pin* los tubos polínicos no crecen más allá de la superficie del estigma mientras que en el morfo *thrum* el crecimiento de los tubos polínicos es arrestado en el estilo, en contraste, los tubos polínicos compatibles crecen a lo largo del estigma, estilo y llegan al ovario.

Familia Malvaceae

Cope (1962) encontró en *Theobroma cacao* que la incompatibilidad se da a nivel de ovario, demostró la falla del desarrollo del ovario fecundado y reporta que una porción de 25-100% de los óvulos con este tipo de incompatibilidad no muestran fusión de gametos.

Martin (1967) estudió cuatro especies de *Melochia*; *M. nodiflora*, *M. pyramidata*, *M. tomentosa* y *M. villosa* y reporta que *M. nodiflora* es la única de las cuatro especie que no es distílica. Para las especies restantes realizó un sistema de cruzas controladas (intermorfo e intramorfo) y reporta que *M. tomentosa* y *M. villosa* son incompatibles puesto que las cruzas intramorfo no generaron ningún fruto, mientras que, *M. pyramidata* perdió por completo el sistema de incompatibilidad, ya que, en las cruzas intramorfo para ambos morfos generó incluso un número mayor de frutos que en cruzas intermorfo.

Familia Menyanthaceae

Wang *et al.* (2005) demostraron que *Nymphoides peltata* presenta un fuerte sistema de incompatibilidad, puesto que en un sistema de cruzas que realizaron, reportan que, en ambos morfos no se forman frutos tanto en autopolinizaciones

como en cruzas intramorfo, mientras que, ambos morfos generan mas del 60% de frutos del total de cruzas intermorfo.

Familia Primulaceae

Shivana *et al.* (1981) reportan los sitios de inhibición de polen incompatible de cruzas intramorfo en *Primula vulgaris* los cuales pueden ser en diversos sitios del estigma y estilo dependiendo del morfo, puesto que, en el morfo *thrum* la inhibición se da en la superficie del estigma a través de la falla de germinación del polen o la falla en la penetración al estigma después de la germinación y en el tejido de transmisión del estigma, entretanto, en el morfo *pin* el rechazo se da principalmente en el tejido de transmisión del estilo. También reportan que los tubos polínicos compatibles a las 48h posteriores a la polinización llevan a cabo la fecundación.

Washitani *et al.* (1994) estudiaron los patrones de fertilidad femenina en *Primula sieboldii* y encontraron que en cruzas intramorfo ambos morfos generalmente no forman frutos y semillas, en las autopolinizaciones manuales ambos morfos desarrollan pocos frutos y semillas, pero, en las cruzas intermorfo el número de semillas es mayor que en autopolinizaciones, sin embargo, los autores no discuten la implicación del número de frutos y semillas producidas en polinizaciones incompatibles con la distilia.

Brys *et al.* (2007) realizaron un sistema de cruzas controladas en *Hottonia palustris* y reportan lo siguiente; existe un sistema de autoincompatibilidad ya que

en autopolinizaciones la formación de frutos y semillas fue baja de 5% y 3% respectivamente. En polinizaciones intramorfo el morfo *pin* produce más frutos significativamente que el morfo *thrum* 56.3% y 29.5% respectivamente pero difieren ambos morfos significativamente con la proporción de frutos formados de cruza intermorfo ya que el morfo *pin* produce 85.6% y el morfo *thrum* 87.5% de frutos, adicionalmente reporta que se formaron semillas de cruza intramorfo en ambos morfos pero significativamente menores en comparación con las formadas de cruza intermorfo.

Chen (2009) estudió la biología reproductiva de *Primula merilliana* y reporta que esta especie es distíllica tanto en morfología como en función puesto que en un sistema de cruza obtuvo que los morfos *pin* y *thrum* en cruza incompatibles (intramorfo y autopolinización) producen un número bajo de semillas y el morfo *thrum* en la cruza intramorfo no produjo semillas, a diferencia de, las cruza compatibles donde el número de semillas es de 83.1% para el morfo *thrum* y 71.1% para el morfo *pin*.

Familia Plumbaginaceae

Ferrero *et al.* (2009) demostraron que *Plumbago auriculata* presenta un fuerte sistema de incompatibilidad heteromórfico ya que las cruza incompatibles no formaron ningún fruto, mientras que, las cruza compatibles desarrollaron 66% en el morfo *pin* y 53% en el morfo *thrum* de frutos. Adicionalmente reportan que no se produjeron tubos polínicos en cruza incompatibles, solo en cruza intermorfo y

dichos tubos polínicos disminuyen en número mientras mas se acercan a la base del estilo.

Familia Rubiaceae

Bawa y Beach (1983) estudiaron 14 especies de la familia Rubiaceae donde 10 de ellas son distílicas y nueve presentaron incompatibilidad. En *Psychotria acuminata* los tubos polínicos en autopolinizaciones, intramorfo e intermorfo llegaron a la base del estilo siendo la única especie autocompatible. Mientras que en *Cephaelis elata*, *Coussarea sp*, *Faramea suerrensis*, *Faramea sp.*, *Psychotria chiapensis*, *Psychotria officinalis*, *Psychotria suerrensis* y *Rudgea corniflora* el sitio de inhibición de los tubos polínicos incompatibles varia entre las especies, los morfos y en las cruzas, donde en el morfo *thrum* generalmente la inhibición se da en el estigma mientras que en el morfo *pin* el sitio de inhibición varia desde el estigma hasta la base del estilo.

Richards y Koptur (1993) realizaron un sistema de cruzas controladas en *Guettarda scabra* y reportan que tiene un sistema atípico de incompatibilidad o que lo puede estar perdiendo, puesto que todas las polinizaciones (autopolinización manual, intramorfo e intermorfo) formaron frutos en ambos morfos. En el morfo *thrum* no hubo diferencia significativa en la formación de frutos en las tres cruzas, mientras tanto, en el morfo *pin* la diferencia fue marginalmente significativa en cuanto en la formación de frutos ($p=0.040$) de las tres cruzas. Los autores mencionan que dichos resultados sugieren que *Guettarda scabra* es

distíllica morfológicamente ya que funcionalmente está perdiendo el sistema de incompatibilidad.

Pailler y Thompson (1997) reportan la incompatibilidad en *Gaertnera vaginata*, encontraron que el morfo *pin* en autopolinizaciones y cruzas intramorfo es completamente incompatible, puesto que, dichas polinizaciones no formaron frutos, entretanto, el morfo *thrum* no formó frutos en autopolinizaciones, pero en cruzas intramorfo formó un 25% de frutos, sin embargo esto difiere de las cruzas intermorfo en ambos morfos donde la producción de frutos es de 100%.

Faivre (2002) reporta el crecimiento del tubo polínico en cruzas intermorfo y el sitio de inhibición del tubo polínico en cruzas incompatibles en *Psychotria poeppigiana* Muell., *P. chiapensis* Standl., y *Bouvardia ternifolia* Cav., obteniendo lo siguiente:

En *P. poeppigiana* y *P. chiapensis* los tubos polínicos de autopolinizaciones y cruzas intramorfo del morfo *thrum* no germinaron o fueron inhibidos en el estigma. En el morfo *pin* los tubos polínicos de las mismas cruzas fueron inhibidos después del punto medio del estilo. Para las tres especies reportan que en cruzas intermorfo los tubos polínicos llegan a la base del estilo.

B. ternifolia. El morfo *thrum* presentó tubos polínicos en las autopolinizaciones y cruzas intramorfo en diferentes sitios del pistilo que van desde el estigma hasta la base del estilo, mientras que, el morfo *pin* tiende a presentar los tubos polínicos de cruzas intramorfo después de la mitad del estilo. En contraste, en

autopolinizaciones encontraron tubos polínicos antes de la mitad del estilo en ambos morfos.

Castro *et al.* (2004) reportan que en *Psychotria jasminoides*, *P. birotula*, *P. mapourioides* y *P. pubigera*, una porción pequeña de tubos polínicos crece en el tejido del estilo pero nunca alcanzan el ovario principalmente en el morfo *pin*. En el morfo *thrum* la inhibición del tubo polínico incompatible se da en el estigma. Además mencionan que los tapones de calosa en cruza incompatibles son de tamaño irregular y ligeramente hinchados para ambos morfos. Mientras que, en cruza compatibles los tubos polínicos llegan a la base del estilo. En cuanto a la formación de frutos reportan que en *P. jasminoides* las cruza incompatibles en ambos morfos forman frutos pero significativamente menor a los de las cruza intermorfo en ambos morfo.

En *P. birotula* la autopolinización del morfo *thrum* fue la única cruza donde se desarrollaron frutos, entretanto, en las cruza incompatibles del morfo *pin* y la cruza intramorfo del morfo *thrum* no se desarrollaron frutos. Los frutos formados de la autopolinización en el morfo *thrum* son, en cantidad, significativamente menores que los formados en la cruza intermorfo.

En *P. mapourioides* el morfo *thrum* solo desarrolló frutos en la cruza intermorfo, el morfo *pin* formó frutos en todas las cruza, pero los frutos provenientes de la cruza intermorfo fueron mayores significativamente que los formados en las cruza incompatibles.

Castro y Araujo (2004) reportan la incompatibilidad en *Psychotrya nuda* donde las autopolinizaciones y cruzas intramorfo forman pocos frutos, a diferencia de las cruzas intreromorfo donde se da la mayor formación de frutos en ambos morfos. Las autopolinizaciones y crusa intramorfo formaron 3 y 13 frutos respectivamente en el morfo *thrum* y en el morfo *pin* dichas cruzas no formaron frutos. Adicionalmente, mencionan que la reacción de incompatibilidad ocurre principalmente sobre el estigma, presentando en los tubos polínicos incompatibles depósito abundante de calosa y de irregular tamaño. Además, señalan que los tubos polínicos incompatibles crecen en el estilo del morfo *thrum* y rara vez en el morfo *pin*.

Massinga *et al.* (2005) demostraron la incompatibilidad heteromórfica en *Pentasia prunelloides* y *P. angustifolia*, mediante un sistema de cruzas encontraron que en ambas especies las autopolinizaciones no forman frutos, pero en las cruzas intramorfo *P. angustifolia* forma pocos frutos en ambos morfos y *P. prunelloides* sólo forma en el morfo *thrum*. Mientras que ambas especies en cruzas intermorfo forman el mayor número de frutos en ambos morfos. Además, reportan para *P. prunelloides* que el sitio de inhibición de los tubos polínicos incompatibles en el morfo *thrum* se da en el estilo y en el morfo *pin* el rechazo se da en la parte superior del estigma. No reportan el sitio de rechazo para *P. angustifolia*.

Rossi *et al.* (2005) encontraron que *Psychotria ipecacuanha* es parcialmente compatible ya que en cruzas intramorfo formaron frutos en ambos morfos; *thrum* 6.7% y *pin* 20%, pero en autopolinizaciones manuales no formaron ningún fruto,

mientras, en las polinizaciones intermorfo se da la mayor formación de frutos; *thrum* 40% y *pin* 51%. Adicionalmente, mencionan que los tubos polínicos incompatibles presentan crecimiento irregular, se desarrollan solo hasta el primer tercio del estilo y en pocas ocasiones alcanzan la base del estilo.

Consolaro *et al.* (2009) estudiaron cuatro especies de *Palicourea*; *P. marcgravii*, *P. officinalis*, *P. macrobotrys* y *P. coriacea*, donde solo las dos primeras son distílicas y mediante un sistema de cruzas reportan que en las cruzas incompatibles en ambos morfos el número de frutos es reducido (<17), a diferencia de el número de frutos que es mayor significativamente en cruzas intermorfo de ambos morfos.

Li *et al.* (2010) realizaron un sistema de cruzas en *Mussaenda pubescens*; autopolinizaciones y cruzas intramorfo para el morfo *thrum*, y cruza intermorfo para el morfo *pin* puesto que es una especie dioica que parece haber tenido un sistema de incompatibilidad dimórfico. Encontraron que en la cruza intermorfo *pin* los tubos polínicos compatibles se extienden a lo largo de pistilo llegando hasta el ovario mostrando intervalos regulares de tapones de calosa, mientras que, el morfo *thrum* en autopolinizaciones y cruzas intramorfo es incompatible, ya que los tubos polínicos son arrestados en el estigma aunque algunos tubos polínicos llegan a la base del estilo y un gran porcentaje muestran hinchazón en sus puntas y adicionalmente había pocos tapones de calosa.

Machado de Oliveira *et al.* (2010) reportan la incompatibilidad de *Palicourea rigida* puesto que en el sistema de cruzas que realizaron encontraron que el morfo *thrum* en las cruzas incompatibles (autopolinización e intramorfo) no producen frutos a diferencia del morfo *pin* que en la autopolinización y en la crusa intramorfo produjo 2 y 1 fruto respectivamente y sólo las cruzas intermorfo en ambos morfos producen un número elevado de frutos. También reportan que el sitio de incompatibilidad de los tubos polínicos difiere entre morfos. En el morfo *thrum* el rechazo se da en el estigma, mientras que, en la autopolinización del morfo *pin* el sitio de inhibición es en la base del estilo justo antes de llegar al ovario y en la crusa intramorfo la inhibición se da a lo largo del estilo sin llegar al ovario.

Wu *et al.* (2010) reportan para *Hedyotis acutangula* lo siguiente: los tubos polínicos compatibles de ambos morfos fueron más rápidos que los tubos polínicos incompatibles, siendo los tubos polínicos de la polinización intermorfo *pin* los más veloces. Adicionalmente reportan que los tubos polínicos de cruzas intermorfo e intramorfo presentan un patrón de aparición de calosa excepto en los tubos polínicos de la autopolinización, además los tubos polínicos de la autopolinización del morfo *thrum* presentan tapones de calosa anormales y de tamaño irregular. Para las cruzas incompatibles y compatibles de ambos morfos observaron tubos polínicos en la base del estilo. Adicionalmente encontraron bajo un sistema de cruzas controladas que las polinizaciones incompatibles generaron frutos pero en una menor proporción que los provenientes de cruzas compatibles para ambos morfos.

Familia Turneraceae

La familia Turneraceae comprende diez géneros y 226 especies donde la distilia esta presente en siete géneros (*Turnera*, *Piriqueta*, *Hyalocalyx*, *Loewia*, *Stapfiella*, *Streptopetalum* y *Tricliceras*) y en el 81% de las especies. Las especies restantes son homostílicas (*Adenoa*, *Erblichia* y *Mathurina*). *Adenoa* Arbo es un género monotípico endémico de Cuba, *Mathurina penduliflora* Balf. f. es endémica de la isla Rodríguez y *Erblichia* tiene una especie en América y cuatro en Madagascar. La distilia en la familia Turneraceae ocurre principalmente en el género *Turnera* y *Piriqueta* las cuales comprenden de 109 y 38 especies distílicas respectivamente, e interesantemente *Turnera* tiene cinco especies con poblaciones distílicas y homostílicas y *Piriqueta* cuatro especies con poblaciones distílicas y homostílicas (Shore *et al.*, 2006).

Martin (1965) reporta la incompatibilidad en *Turnera ulmifolia* mediante un sistema de cruza controladas donde en autopolinizaciones y en cruza intramorfo no hubo desarrollo de frutos, solo en dos excepciones y dichas excepciones solo tenían una semilla en cada fruto. En contraste, todas las cruza intermorfo produjeron frutos que contenían de 5-25 semillas cada fruto. También señala que el polen de autopolinizaciones germina normalmente en el ápice de las papilas estigmáticas pero sus tubos polínicos llegaron solo a la base del estigma. Además reporta que en autopolinizaciones la punta de los tubos polínicos a menudo se hincha, hay liberación del citoplasma y depósito abundante calosa en las paredes de los tubos polínicos, en contraste, las polinizaciones intermorfo el crecimiento normal del tubo

polínico se caracterizó por la poca deposición de calosa y el crecimiento a través del tejido del estilo de los tubo polínicos.

Bentley (1979) realiza el primer reporte de incompatibilidad en *Turnera trioniflora*, mediante un sistema de cruzas controladas y reporta que las autopolinizaciones y cruzas intramorfo no desarrollaron semillas, mientras que, las cruzas intermorfo generaron un promedio de 21-22 semillas en cada morfo.

Barret y Shore (1985) demostraron un sistema fisiológico de incompatibilidad en *Turnera hermannioides* Camb., puesto que las autopolinizaciones y cruzas intramorfo en ambos morfos generaron pocos frutos y pocas semillas por fruto, en contraste con las cruzas intermorfo en ambos morfos donde el número de frutos y semillas desarrolladas fue significativamente mayor.

Lopez (1998) estudió la biología reproductiva de *Turnera pumilea* L. y concluye que *T. pumilea* es una especie monomórfica autocompatible, puesto que, en el sistema de cruzas que llevó a cabo, las autopolinizaciones formaron un número de semillas que no difiere al número de semillas de cruzas intermorfo lo que significa que ha perdido el sistema de incompatibilidad.

Tamari *et al.* (2001) estudiaron los sitios de incompatibilidad de *Piriqueta caroliniana* (Walt) y cinco especies del género *Turnera*. Demuestran que los sitios de inhibición en la autopolinización ocurren principalmente en el estigma y en la región superior del estilo en ambos morfos. Además, reportan que en las

autopolinizaciones del morfo *thrum* los tubos polínicos no generan tapones de calosa y que los tubos polínicos de la autopolinización en el morfo *pin* son más largos que en la autopolinización del morfo *thrum*. Con esto sugieren que los mecanismos de autoincompatibilidad podrían ser diferentes entre ambos morfos.

Shore *et al.* 2006 realizan una amplia revisión de las especies distílicas en la familia Turneraceae y reportan que *Turnera melochioides* y *T. pumilea* var. *Piauhyensis* son autocompatibles y que las especies *T. chamaedrifolia*, *Piriqueta morongii* y *P. racemosa* tienen poblaciones distílicas y homostílicas autocompatibles.

Safavian (2009) reportan los sitios de inhibición de los tubos polínicos de autopolinizaciones de dos especies de *Turnera*. En *T. joelii* la inhibición de los tubos polínicos del morfo *pin* se da en la parte superior del estilo y en el morfo *thrum* la inhibición ocurre en el estigma. En *T. scabra* la inhibición de los tubos polínicos del morfo *pin* se da un poco más allá de la parte superior del estilo y en el morfo *thrum* la inhibición ocurre en el estigma. También menciona que en los tubos polínicos incompatibles los tapones de calosa en ambos morfos de *T. joelii* y *T. scabra* son más largos que los presentes en tubos polínicos compatibles.

Las especies distílicas presentan diversas características en el sistema de incompatibilidad, ya que, la reacción de incompatibilidad puede darse desde la nula germinación de los granos de polen, inhibición de los tubos polínicos en el estigma hasta algún punto del estilo incluyendo la base del estilo pero además

pueden llegar al óvulo y fecundarlo pero no desarrollar semillas, o bien pueden desarrollar frutos con semillas pero inviabiles. Por otra parte también existen especies distílicas que han perdido el sistema de incompatibilidad tales como: *Melochia pyramidata* (Martin, 1967); *Psychotria acuminata* (Bawa y Beach 1983); *Guettarda scabra* (Richards y Koptur, 1993); *Turnera pumilea* (Lopez, 1998); *T. melochioides*, *T. pumilea* var. *piauhyensis*, *T. chamaedrifolia*, *Piriqueta morongii* y *P. racemosa* (Shore *et al.* 2006) manteniendo ambos morfos existentes pero autocompatibles. En la especie *Turnera diffusa* no se ha descrito ni caracterizado el sistema de incompatibilidad, puesto que los reportes solo mencionan que es distílica morfológicamente, pero no se ha corroborado si funcionalmente presenta el sistema de incompatibilidad característico de especies distílicas, por tal motivo, este fue el objetivo del trabajo.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el sistema de incompatibilidad heteromórfico en *Turnera diffusa*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar el sistema de incompatibilidad de *T. diffusa*.
- Describir los eventos asociados al sistema de incompatibilidad en *T. diffusa*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitio de estudio

Se emplearon plantas de *Turnera diffusa* en el campo experimental del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR) de la Ciudad de La Paz en el estado de Baja California Sur (Figura 3) con las siguientes coordenadas: 24° 8' 11.5" Latitud Norte y 110° 25' 42.4 longitud oeste.



Figura 3. Sitio de estudio dentro del CIBNOR.

Descripción de la especie

Turnera diffusa Willd es un arbusto de 25-100 cm de alto, con hojas sésiles o pecioladas, peciolas de 1.8-2.0 mm de largo, tomentosos a seríceos, laminas de 6.0-1.8 cm de largo y 3.0-7.0 cm de ancho elípticas u obovadas, base cuneada sin nectários, ápice agudo a obtuso. Flores solitarias, hermafroditas, heterostílicas y epífitas, sésiles o con pedicelos de 1mm de largo, dos brácteas, persistentes de 4.0-5.0 mm de largo y 1.2-2.0 mm de ancho lanceoladas y vellosas. Pétalos de 6.0-6.5 mm de largo y 3.8-4.2 mm de ancho, obovados, ápice obtuso, amarillos y glabros. Filamentos de 5.0-6.0 mm de largo, anteras 0.4-1.3 mm de largo y 1.0 mm de ancho, ovadas a oblongas; ovario de 1.0-1.1 mm de largo y 1.0 mm de ancho y ovoide. Estilos de 2.2-3.3 mm de largo y glabros. Cápsulas de 3.0-3.8 mm de largo y 3.00 mm de diámetro, ovoidales, de color verde-amarillentas a pardas, tuberculadas y seríceas. Semillas de 1.6-1.9 mm de largo y 7.0-1.0 mm de ancho, reniformes y de color pardas a negras. (Alvarado-Cárdenas, 2006).

Distribución geográfica de *T. Diffusa*

Las especies de la Familia Turneraceae se distribuyen principalmente en los trópicos y subtrópicos de América y África y pocas especies crecen en Asia. México cuenta con diez especies de la familia y un género con dos especies en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Lott, 2002; Alvarado-Cárdenas, 2006).

La distribución de *T. diffusa* va desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Sudamérica incluyendo las Antillas. En México se encuentra en los estados de Baja California, Baja California Sur, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo,

Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (Alvarado-Cárdenas, 2006).

T. diffusa se desarrolla dentro de la vegetación denominada matorral xerófilo, habita en bosques y matorrales espinosos, a alturas de 0-300 m, con clima de árido a semiárido, a temperaturas medias anuales de 22.1 a 24° C, con una máxima de 40° C en los meses de julio y agosto y mínimas de 12° C en los meses de enero y diciembre (Alcaraz, 1999; Lott, 2002)

Identificación del sistema de incompatibilidad

En el CIBNOR se identificaron 218 flores de *T. diffusa* correspondientes a 111 del morfo *pin* y 107 del morfo *thrum*, cada individuo se etiquetó y se le asignó un número. En cada individuo identificado numéricamente, se emascularon los botones florales y se cubrieron con “papel celofán dulce” y cuando se identificó que el estigma estaba receptivo se polinizaron las flores (modificado de Rossi *et al*, 2005).

Receptividad del estigma y polinizaciones controladas

Para verificar que el estigma se encontraba receptivo se realizó lo siguiente: Se colectaron de cinco a ocho flores de ambos morfos a intervalos de una hora en un periodo de diez de la mañana a dos de la tarde. Las flores se colocaron en una placa de elisa, posteriormente se emascularon y se les agregó una gota de agua oxigenada (Pio *et al.*, 2004). Las flores que se eligieron para la prueba de

receptividad del estigma fueron flores en antesis con el estigma abierto y flores en pre-antesis con el estigma que estaba desde cerrado hasta semiabierto. Una vez identificado que el estigma se encontraba receptivo se realizó lo siguiente:

Control tratamiento. Se emascularon botones de ambos morfos en pre-antesis y se etiquetaron.

Control positivo. Se marcaron botones florales de ambos morfos con etiquetas sin embolsar ni emasculas para que se llevara a cabo la polinización de forma natural.

Control negativo. Se emascularon botones florales de ambos morfos, se cubrieron con papel celofán dulce, se etiquetaron y no se polinizaron.

Autopolinización manual. Se polinizaron flores previamente embolsadas en botón floral, una vez polinizadas se volvieron a embolsar.

Polinización intramorfo. Se polinizaron flores previamente emasculadas y cubiertas de un morfo con polen de flores de otro individuo del mismo morfo. , una vez polinizadas se volvieron a embolsar.

Polinización intermorfo. Se polinizaron flores previamente emasculadas y cubiertas de un morfo con polen de flores de otro individuo del morfo complementario, una vez polinizadas se volvieron a embolsar.

Se utilizaron un total de 94 flores para realizar los controles (Tabla 2) distribuidos en ambos morfos a diferentes horas post-polinización.

Tabla 2. Total de controles en ambos morfos a diferentes horas post-polinización. Ctrl. +; control positivo, Ctrl t; control tratamiento, y Ctrl -; control negativo.

| Hora post-polinización | 1 h | | 3 h | | 6 h | | 48 h | | |
|------------------------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|---------|--------|--------|
| | Ctrl. + | Ctrl t | Ctrl. + | Ctrl t | Ctrl. + | Ctrl t | Ctrl. + | Ctrl t | Ctrl - |
| <i>pin</i> | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 |
| <i>thrum</i> | 5 | 5 | 4 | 4 | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 |

En cuanto a las polinizaciones se realizó un total de 124 polinizaciones en ambos morfos, para todas las polinizaciones de 48 h se realizaron seis polinizaciones por morfo en cada cruce, mientras que para las demás polinizaciones (autopolinización, cruce intramorfo y cruce intermorfo) se realizaron cinco polinizaciones excepto para la autopolinización en el morfo *thrum* a 1 h post-polinización donde se realizaron tres polinizaciones (Tabla 3).

Tabla 3. Total de polinizaciones realizadas en ambos morfos por hora y por tratamiento. Auto; Autopolinización, Intra; cruza intramorfo e Inter; cruza intermorfo.

| Hora post-polinización | 1h | | | 3h | | | 6h | | | 48h | | |
|------------------------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|
| Morfo | Auto | Intra | Inter | Auto | Intra | Inter | Auto | Intra | Inter | Auto | Intra | Inter |
| <i>pin</i> | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 |
| <i>thrum</i> | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 | 6 | 6 | 6 |

Se colectaron los pistilos (sin el ovario) en post-polinización de 48 h estos se fijaron en una solución de ácido acético y etanol a una proporción 1:3 (Weller y Denton, 1976) y los ovarios se dejaron en las plantas para que formaran frutos y semillas.

Observación de los tubos polínicos

El protocolo que se siguió para observar los tubos polínicos en pistilos polinizados de 48 h fue el siguiente:

- Los pistilos se suavizaron en una solución de sulfito de sodio al 10%.
- Se colocaron por 5 minutos en autoclave (Kho y Baer, 1968; citado por Goldraij *et al.*, 2006).
- Los pistilos se sumergieron en una solución de azul de anilina al 1% y se dejaron en oscuridad a 4° C hasta su observación.
- Para observar los pistilos éstos se colocaron sobre un portaobjetos con una o dos gotas de azul de anilina, se les colocó un cubreobjetos y se realizó un aplastado cuidadosamente retirando el excedente de azul de anilina por fuera del cubre objetos y las preparaciones se sellaron con barniz para uñas.

-Las preparaciones se mantuvieron en oscuridad a 4° C hasta su observación (López *et al.*, 2005).

-Los tubos polínicos se observaron y se tomaron micrografías en un fotomicroscopio de fluorescencia Olympus modelo Provis AX70.

Producción de semillas de ambos morfos en el campo

En el campo se colectaron frutos aleatoriamente formados en la naturaleza; 19 del morfo *pin* y 32 del morfo *thrum* y cada fruto fue depositado en un frasco y rotulado. En el laboratorio se realizó el conteo total de semillas por fruto, se calculó el promedio y la desviación estándar (Zar, 1984) para cada morfo. Se realizó una prueba *t* de *student* con $\alpha=0.05$ con el programa Microsoft Excel® para comparar estadísticamente los promedios del número de semillas de ambos morfo.

Producción de semillas del morfo *pin* en la cruce intermorfo y del campo

En el laboratorio se realizó el conteo total de semillas de los frutos obtenidos de las cruces intermorfo del morfo *pin* y se compararon estadísticamente con una prueba *t* de *student* con las semillas provenientes de frutos producidos de forma natural colectados del campo del mismo morfo. No se realizó el conteo de semillas del morfo *thrum* ya que cuando se intentó colectar dichos frutos ya habían caído de la planta.

Caracterización del sistema de incompatibilidad

Se realizaron los tratamientos anteriores con pistilos en post-polinización de 1, 3, 6 y 9 h (modificado de Snow y Spira, 1991). La observación de los tubos polínicos se llevó a cabo con el protocolo para la observación de tubos polínicos (descrito anteriormente), se observaron y se obtuvo el registro de micrografías con un fotomicroscopio de fluorescencia Olympus modelo Provis AX70.

Tasa de crecimiento y velocidad de los tubos polínicos

Se midieron los tubos polínicos con el programa UTHSCSA Image Tool 3.00[®] de las diferentes cruces en ambos morfos y se calculó el promedio (\bar{x}) y la desviación estándar (D.E.) de la longitud de los tubos polínicos. Con estas medidas se calculó la tasa de crecimiento de los tubos polínicos y su velocidad de crecimiento $V=d/t$ donde la distancia (d) es el promedio de las medidas de los tubos polínicos y el tiempo (t) es el intervalo post-polinización en el que se colectaron los pistilos.

RESULTADOS

Identificación del sistema de incompatibilidad

Receptividad del estigma

Se comprobó que los estigmas estaban receptivos cuando al agregarle una gota de agua oxigenada, mostraban efervescencia, lo cual solo ocurrió con los estigmas de morfología plumosa descrita como “estigma penicilado” (Alvarado-Cárdenas, 2006; Baudilio-Rondón, 2008). Mientras que los estigmas que no se encontraron receptivos, no reaccionaron con el agua oxigenada y morfológicamente parecían ser más pequeños y estar cerrados. Los estigmas receptivos fueron identificados en el periodo de 11:00-14:00h, mientras que, los estigmas antes y después de ese intervalo de horas no estaban receptivos.

Observación de los tubos polínicos de 48h post-polinización

Morfo pin: **Autopolinización**; se observó abundante polen sobre el estigma de los pistilos, la inhibición de los tubos polínicos se dio principalmente en la primera región del estilo, aunque también hubo tubos polínicos inhibidos antes de la base del estigma. Gran parte de los tubos polínicos presentaron tapones de calosa, y estos tapones tenían depósito abundante de calosa. Algunos tubos polínicos presentaron hinchazón en la punta o en alguna región del tubo polínico (Figura 4a). **Cruza intramorfo**; los pistilos presentaron abundante polen en el estigma, la germinación fue desde 10% hasta ~40%, los tubos polínicos presentaron pocos tapones de calosa y en dichos tapones la calosa se depositó abundantemente (Figura 4b). La reacción de incompatibilidad se dio desde la baja germinación de los granos de polen y la inhibición del tubo polínico en alguna región del estigma

pero principalmente fueron inhibidos en la zona de transición del estigma y del estilo y en la primera región del estilo. **Cruza intermorfo**; los pistilos contenían abundante polen en el estigma, el cual germinó de 80-100%, los tubos polínicos presentan aparición repetida de tapones de calosa a diferencia de las cruza incompatibles. Los tubos polínicos llegaron a la base del estilo (Figura 4c).

Morfo thrum: **Autopolinización**; el polen que se encontraba en el estigma presentó poca germinación, los tapones de calosa de los tubos polínicos presentaron abundante depósito de calosa, la inhibición de los tubos polínicos se dio principalmente antes de la base del estigma y en la primera región del estilo y algunos tubos polínicos presentaron hinchazón en la punta (Figura 4d). **Cruza intramorfo**; el polen que se observó germinó hasta un ~70%, los tubos polínicos presentaron depósito abundante de calosa en los tapones de calosa (Figura 4e) la inhibición se dio en la base del estigma, en la primera región del estilo y se observaron pocos tubos polínicos en la base del estilo. **Cruza intermorfo**; los pistilos contenían abundante polen en el estigma el cual germinó ~50% y se observaron los tubos polínicos en la base del estilo (Figura 4f).

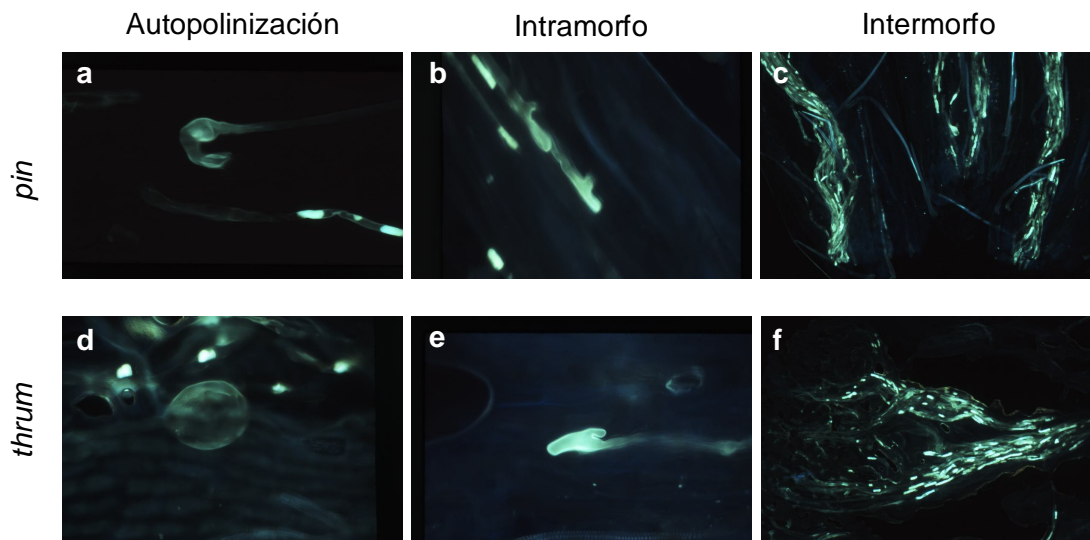


Figura 4. Tubos polínicos a 48h post-polinización a-c. Morfo *pin*. a) Autopolinización. Tubo polínico con hinchazón 100x. b) Cruza intramorfo. Tubos polínicos incompatibles en la mitad del estilo, los tubos polínicos presentan acumulación de calosa en la punta y una morfología aberrante 100x. c) Cruza intermorfo. Tubos polínicos compatibles llegando a la base del estilo 25x. d-f. Morfo *thrum*. d) Autopolinización. Punta hinchada de un tubo polínico incompatible 100x. e) Cruza intramorfo. Punta de un tubo polínico incompatible con morfología aberrante en la punta del tubo polínico 100x. f) Cruza intermorfo. Tubos polínicos compatibles llegando a la base del estilo 25x.

Solo los tubos polínicos de las cruza intermorfo de ambos morfos llegaron a la base del estilo y no se detuvieron, mientras que, en ambos morfos en las cruza ilegítimas (cruza intramorfo y autopolinización) la inhibición de los tubos polínicos se da principalmente en el estigma y en la primera porción del estilo (Tabla 4).

Tabla 4. Sitio de inhibición de los tubos polínicos en cruza incompatibles para ambos morfos en las horas post-polinización. Las letras en negritas indican el principal sitio de inhibición de los tubos polínicos.

| Tipo de cruza | <i>pin</i> | | <i>thrum</i> | |
|---------------|----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| | Autopolinización | Cruza intramorfo | Autopolinización | Cruza intramorfo |
| 48h | <p>Primera región del estilo</p> <p>Antes de la base del estigma</p> | <p>Sobre el estigma</p> <p>Zona de transición del estigma y estilo</p> <p>Primera región del estilo</p> | <p>Antes de la base del estigma</p> <p>Primera región del estilo</p> | <p>Base del estigma</p> <p>Primera región del estilo</p> <p>Base del estilo</p> |

Formación de frutos y semillas

En las polinizaciones controladas destinadas a la formación de frutos, las cruza intermorfo de ambos morfos, formaron cinco frutos de seis flores polinizadas de cada morfo, las cruza intramorfo no formaron ningún fruto de seis flores polinizadas en ambos morfos y en las autopolinizaciones solo se formó un fruto de seis flores polinizadas en el morfo *thrum*, mientras que, en el morfo *pin* no se formó ningún fruto de seis flores polinizadas (Tabla 5).

Tabla 5. Total de frutos provenientes de diferentes cruzas controladas. Entre paréntesis el número de polinizaciones.

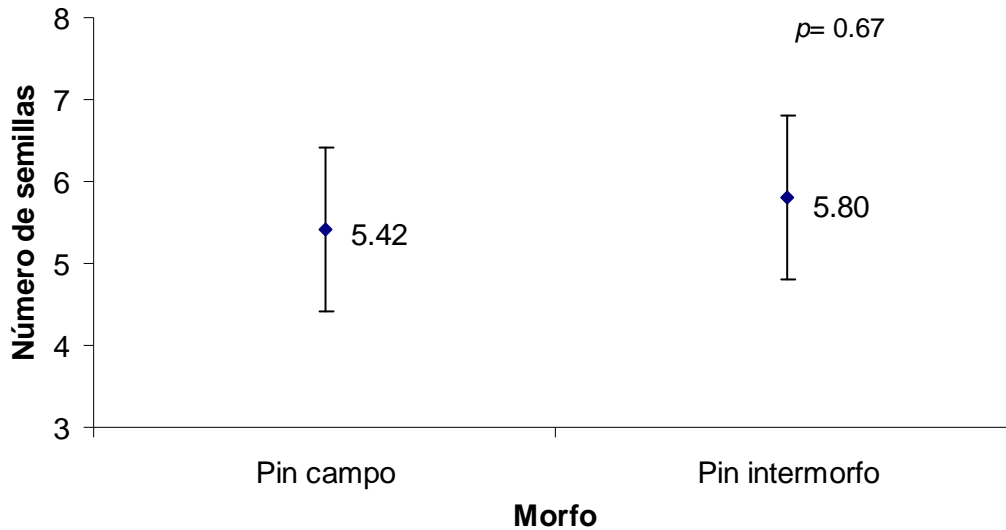
| Polinización | Morfo floral | |
|------------------|---------------------------|---------------------------|
| | <i>pin</i> | <i>thrum</i> |
| | Frutos/flores polinizadas | Frutos/flores polinizadas |
| Autopolinización | 0/(6) | 1/(6) |
| Intramorfo | 0/(6) | 0/(6) |
| Intermorfo | 5/(6) | 5/(6) |

Comparación del número de semillas provenientes de cruzas controladas

En el morfo *pin* de cruzas intermorfo se obtuvo un promedio de 5.8 ± 1.64 semillas por fruto, mientras que, en el morfo *pin* se produjeron en forma natural un promedio de 5.42 ± 2.00 semillas en la población (Gráfica 1). La prueba estadística *t* ($p=0.67$) indica que no hay diferencia significativa en el número de semillas que producen ambos morfos en el campo.

Para el morfo *thrum* se identificó la formación de frutos por que los ovarios se hincharon y se tornaron de color verde, mientras que, los ovarios que no produjeron frutos no se hincharon, presentaron una coloración blanca y disminuyeron su tamaño, sin embargo. Los frutos se perdieron antes de ser colectados.

Promedio del número de semillas de cruzas intermorfo y semillas producidas de manera natural del morfo pin

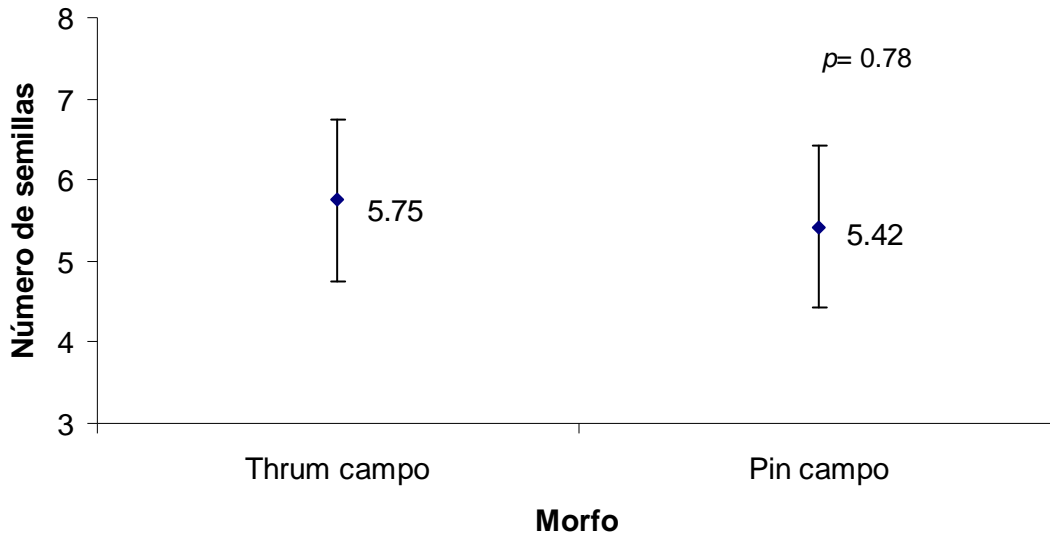


Gráfica 1. Promedio de semillas para cada morfo \pm desviación estándar (D.E.). Morfo *pin* (campo): $n= 19$, $x= 5.42\pm 2.00$. Morfo *pin* (intermorfo): $n=5$, $x= 5.8\pm 1.64$. $t_{0.05}$, $p= 0.67$.

Producción de semillas

El morfo *pin* produce un promedio de semillas de 5.42 ± 2.00 , mientras que, el morfo *thrum* produce un promedio de semillas de 5.75 ± 1.79 de forma natural en la población, (Gráfica 2). La prueba estadística $t_{0.05}$, $p= 0.78$ indica que no hay diferencia significativa en el número de semillas que producen ambos morfos en el campo.

Promedio del número de semillas que producen ambos morfos de manera natural



Gráfica 2. Promedio de semillas para cada morfo \pm desviación estándar (D.E.). Morfo *thrum*: $n=32$, $x= 5.75\pm 1.79$. Morfo *pin*: $n= 19$, $x= 5.42\pm 2.00$. $t_{0.05}$, $p= 0.78$.

Caracterización del sistema de incompatibilidad

La caracterización del sistema de incompatibilidad fue descrita con observaciones de tubos polínicos a 1, 3, 6 y 9h post-polinización (Figuras 5-8).

1h post-polinización

A este intervalo post-polinización en todas las polinizaciones los tubos polínicos llegan a la base del estigma y unos cuantos llegan a la primera porción del estilo. Sin embargo, el polen de la cruce intramorfo del morfo *thrum* no germina a este tiempo post-polinización (Figura 5a-f).

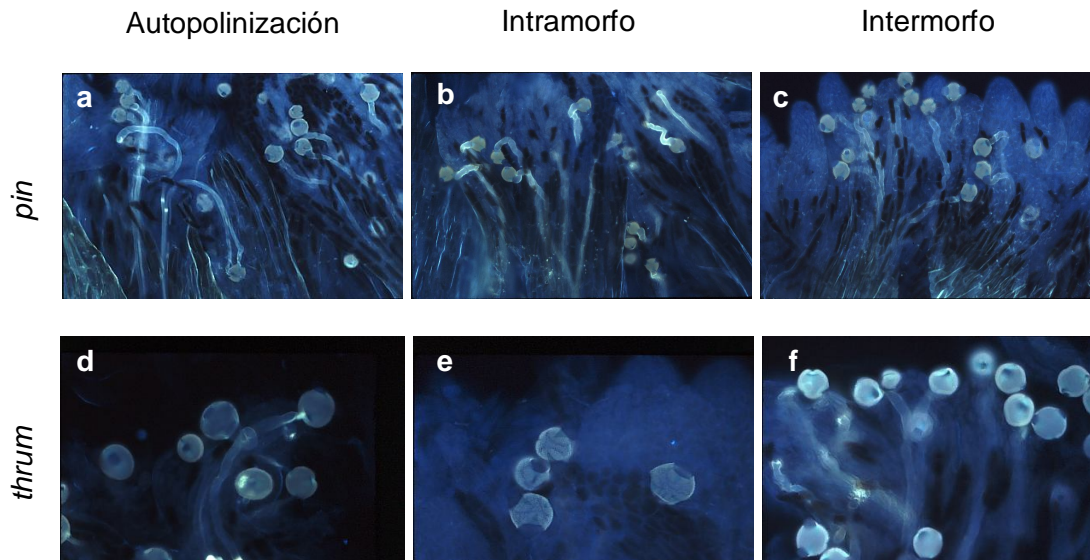


Figura 5. Tubos polínicos a 1h post-polinización a-c: Morfo *pin*. a) Autopolinización. Tubos polínicos incompatibles en la base del estigma 50x. b) Cruza intramorfo. Tubos polínicos incompatibles en la base del estigma y primera porción del estilo 50x. c) Cruza intermorfo. Tubos polínicos compatibles en la base del estigma y a la zona de transición del estigma y del estilo 50x. d-f. Morfo *thrum* d) Autopolinización. Tubos polínicos incompatibles en la parte superior del estigma 100x. e) Cruza intramorfo. Granos de polen adheridos al estigma sin germinar 100x. f) Cruza intermorfo. Granos de polen y tubos polínicos compatibles en la parte superior del estigma 100x.

3h post-polinización

En este tiempo post-polinización se observó lo siguiente. Morfo *pin*:

Autopolinización; los tubos polínicos se inhiben desde la base del estigma hasta mas allá de la primera mitad del estilo. La mayor inhibición se da en la primera porción del estilo (Figura 6a). **Cruza intramorfo;** la inhibición de los tubos polínicos se presenta desde la base del estigma y el primer tercio del estilo y existe abundante depósito de calosa (Figura 6b). **Cruza Intermorfo;** la mayoría de los tubos polínicos llegan a la primera porción del estilo y otros en minoría llegan a la mitad del estilo, adicionalmente se observó que en la base del estilo había un tubo polínico (Figura 6c).

Morfo *thrum*: **Autopolinización**; los tubos polínicos se inhiben principalmente en la base del estigma (Figura 6d) y antes de la primera mitad del estilo, sin embargo, hay algunos tubos polínicos que se observaron en la base del estilo. **Cruza Intramorfo**; La inhibición de los tubos polínicos se da principalmente en la parte superior del estigma, donde solo emerge el tubo polínico del grano de polen y también se inhiben en la base del estigma y en la primera porción del estilo (Figura 6e). **Cruza Intermorfo**; Algunos tubos polínicos llegan a la mitad del estilo y la mayoría llega a base del estilo (Figura 6f).

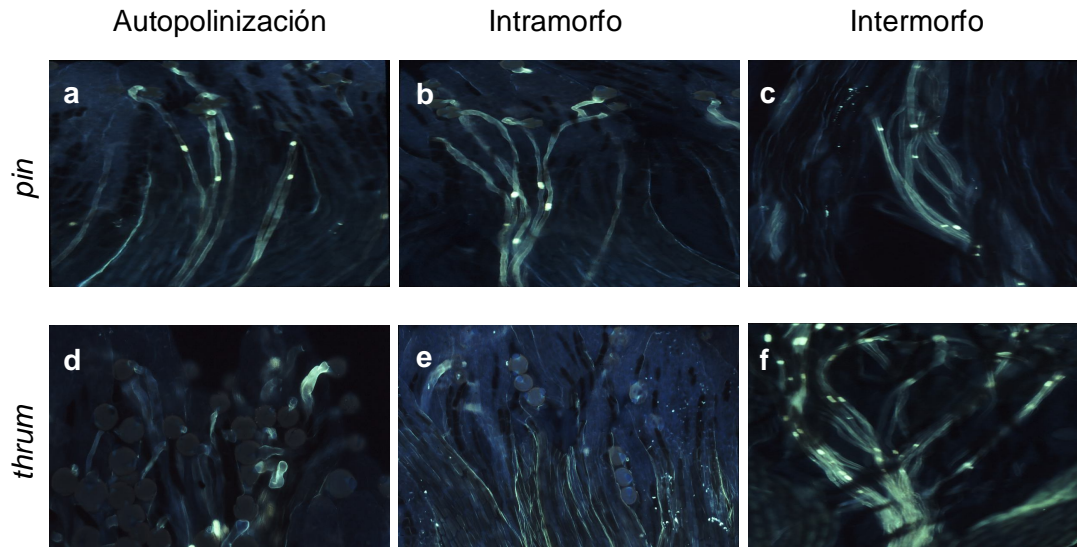


Figura 6. Tubos polínicos a 3h post-polinización a-c: Morfo *pin*, a) Autopolinización. Tubos polínicos incompatibles en la primera porción del estilo 50x. b) Cruza intramorfo. Tubos polínicos incompatibles en la primera porción del estilo 50x. c) Cruza intermorfo. Tubos polínicos compatibles llegando casi a la base del estilo 50x. d-f. Morfo *thrum*. d) Autopolinización. Tubos polínicos incompatibles en la parte superior del estigma 75x. e) Cruza intramorfo. Tubos polínicos incompatibles en la parte superior del estigma 50x. f) Cruza intermorfo. Tubos polínicos compatibles llegando a la base del estilo 50x.

6h post-polinización

En este tiempo de post-polinización se observó lo siguiente. Morfo *pin*: **Autopolinización**; la mayoría de los tubos polínicos se inhibieron en la base del estigma, sin embargo, algunos pocos llegaron mas allá de la primera porción del estilo (Figura 7a), algunos tubos polínicos tienen paredes engrosadas. **Cruza Intramorfo**; la inhibición de los tubos polínicos se da principalmente en la base del estigma y en la primera porción del estilo, sin embargo, se observaron tubos polínicos en la base del estilo. También hay depósito abundante de calosa en algunos tubos polínicos y algunos presentan la punta hinchada (Figura 7b). **Cruza Intermorfo**; los tubos alcanzan la base del estilo (Figura 7c).

Morfo *thrum*; **Autopolinización**; Muy pocos granos de polen germinaron y la inhibición de los tubos polínicos se da principalmente en la base del estigma y en la primera porción del estilo. Se observaron pocos tubos polínicos que llegaron a la base del estilo. Hay tubos polínicos con abundante depósito de calosa, hinchados y bifurcados en la punta (Figura 7d). **Cruza Intramorfo**; los tubos polínicos se inhiben en la base del estigma y en la primera porción del estilo, sin embargo, hay pocos tubos polínicos que llegaron a la mitad del estilo (Figura 7e) y base de éste. Se observó abundante depósito de calosa en los tapones. **Cruza Intermorfo**; los tubos polínicos llegaron a la base del estilo (Figura 7f).

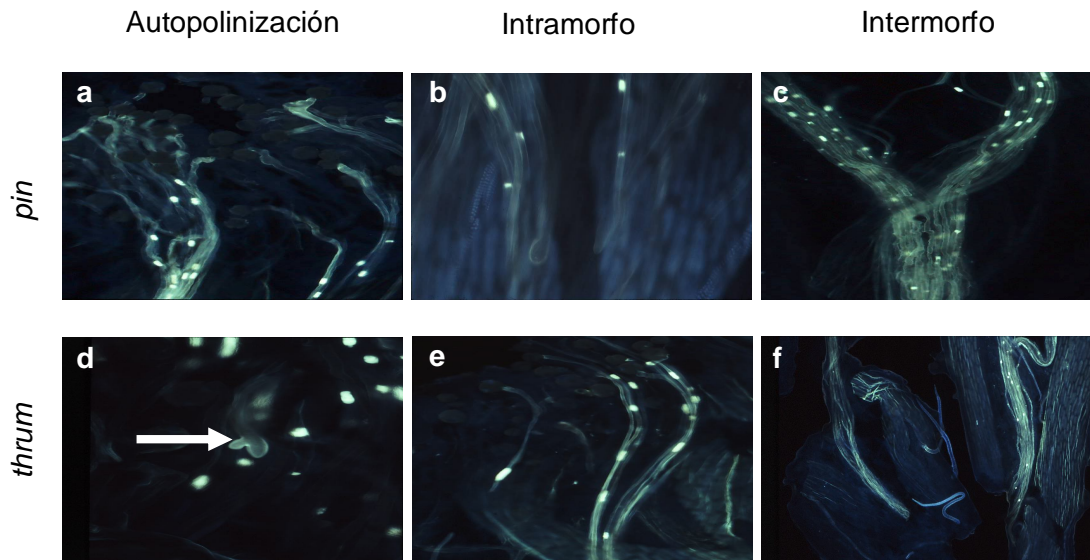


Figura 7. Tubos polínicos a 6h post-polinización a-c: Morfo *pin*, a) Autopolinización. Tubos polínicos incompatibles en el primer tercio del estilo 50x. b) Cruza intramorfo. Tubo polínico incompatible con hinchazón en la punta 100x. c) Cruza intermorfo. Tubos polínicos compatibles convergiendo en la mitad del estilo 50x. d-f. Morfo *thrum*. d) Autopolinización. Tubo polínico incompatible con bifurcación en la punta 100x. e) Cruza intramorfo. Tubos polínicos incompatibles con abundante depósito de calosa 50x. f) Cruza intermorfo. Tubos polínicos compatibles en la base del estilo 25x.

9h post-polinización

A este intervalo post-polinización se observó lo siguiente. Morfo *pin*:

Autopolinización; En el estigma (de los pistilos) se observó abundante polen, el cual presentó germinación de 60-80% y los tubos polínicos se inhiben desde alguna región del estigma hasta la primera porción del estilo. Hay tubos polínicos con la punta hinchada (Figura 8a). **Cruza Intramorfo;** hay abundante polen a lo largo del estigma pero la germinación del polen fue casi nula y hasta un ~40%, la inhibición de los tubos polínicos se presentó en los granos de polen, sobre el estigma, en la base del estigma y entre la zona de transición del estigma y el estilo. Los más largos se inhibieron en la primera porción del estilo. Adicionalmente se observó que los tapones de calosa presentaron abundante depósito de calosa (Figura 8b). **Cruza Intermorfo;** hay abundantes granos de

polen en los estigmas, los cuales germinaron del 90-100% y la mayoría de los tubos polínicos llegaron a la base del estilo (Figura 8c).

Morfo thrum; **Autopolinización**; el polen mostró una germinación variada por pistilo. En el 60% de los pistilos hubo nula germinación y en los pistilos restantes la germinación fue hasta del ~80% la reacción de incompatibilidad se dio desde nula germinación del polen, inhibición de los tubos polínicos en la primera porción del estilo (Figura 8d) y hasta dos tubos polínicos en la base del estilo. **Cruza Intramorfo**; se observó abundante polen en los estigmas, el cual germinó en poca proporción ~20% y la inhibición de los tubos polínicos se dio desde las primeras regiones del estigma, hasta la primera porción del estilo. En dos pistilos se observó un tubo polínico que llegó hasta la base del estilo (Figura 8e). **Cruza Intermorfo**; se observó abundante polen a lo largo de los estigmas de los pistilos el cual germinó ~90-100% y la mayoría de los tubos polínicos llegaron a la base del estilo (Figura 8f).

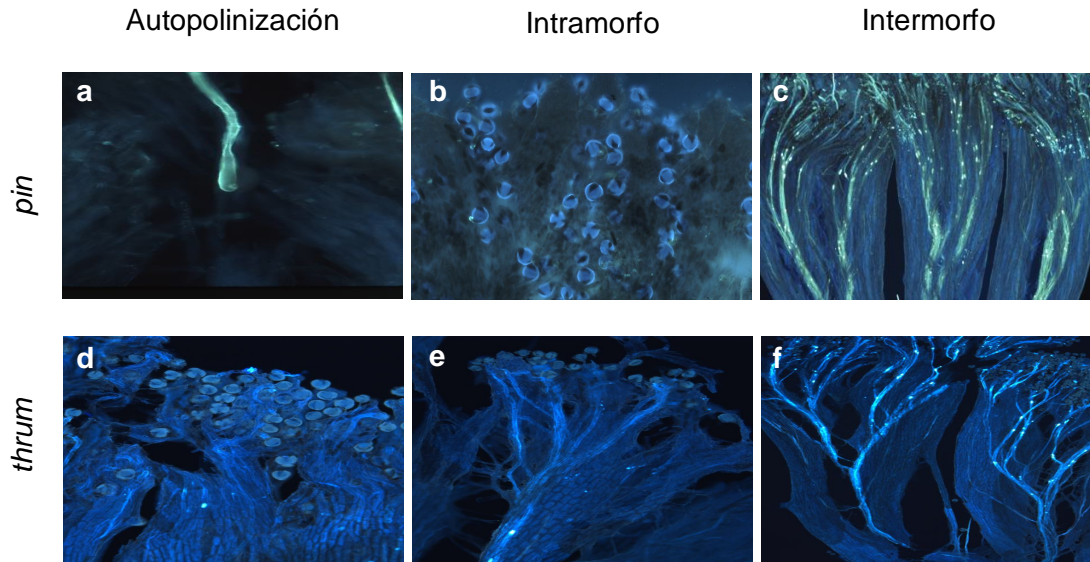


Figura 8. Tubos polínicos a 9h post-polinización a-c: Morfo *pin*. a) Autopolinización. Tubo polínico incompatible en la mitad del estilo 100x. b) Cruza intramorfo. Polen incompatible sin germinar 50x. c) Cruza intermorfo. Tubos polínicos llegando a la base de los estilo 15x. d-f. Morfo *thrum*. d) Autopolinización. Polen sin germinar. e) Cruza intramorfo. Tubos polínicos incompatibles con ausencia en la aparición de los tapones de calosa con respecto a la cruza intermorfo *thrum*. f) Cruza intermorfo. Tubos polínicos en la base del estilo.

Los sitios de inhibición de los tubos polínicos incompatibles varían en cada morfo y tipo de cruza, los cuales, pueden ser en la parte superior del estigma, en la base del estigma, en el sitio de transición del estigma y del estilo, en la primera porción, en la mitad, y en la base del estilo. La tabla 6 representa el sitio de inhibición de los tubos polínicos de las diferentes cruza en las diferentes horas post-polinización para cada morfo de *T. diffusa*.

Tabla 6. Sitio de inhibición de los tubos polínicos en cruza incompatibles para ambos morfos en las horas post-polinización. Las letras en negritas indican el principal sitio de inhibición de los tubos polínicos.

| | | <i>pin</i> | | <i>thrum</i> | |
|---------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| Tipo de cruza | Autopolinización | Cruza intramorfo | Autopolinización | Cruza intramorfo | |
| 1h | Base del estigma | Base del estigma | Base del estigma | Polen sin germinar | |
| | Base del estigma | Base del estigma | Base del estigma | Parte superior del estigma | |
| 3h | Primera porción del estilo | Primer tercio del estilo | Primer tercio del estilo | Base del estigma | Primera porción del estilo |
| | Base del estigma | Base del estigma | Parte superior del estigma | Base del estigma | Base del estigma |
| 6h | Primera porción del estilo | Primera porción del estilo | Base del estigma | Primera porción del estilo | Mitad del estilo |
| | | Base del estilo | Primera porción del estilo | Base del estilo | |
| 9h | A lo largo del estigma | A lo largo del estigma | Primera porción del estilo | Primera porción del estilo | |
| | Primera porción del estilo | Primera porción del estilo | Base del estilo | Base del estilo | |

Las letras en negritas indican el principal sitio de inhibición de los tubos polínicos.

El tiempo en el que llegan los tubos polínicos compatibles a la base del estilo en cada morfo es diferente. Los tubos polínicos de la crusa intermorfo *pin* (morfo *pin* receptor de polen) llegan a la base del estilo a las seis horas post-polinización, mientras que, la mayoría de los tubos polínicos de la crusa intermorfo *thrum* (morfo *thrum* receptor de polen) llegan a la base del estilo a las tres horas post-polinización, aunque también se observaron abundantes tubos polínicos en la mitad del estilo, pero a las seis horas post-polinización todos los tubos polínicos ya llegaron a la base del estilo (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación del sitio al que llegan los tubos polínicos compatibles en ambos morfos en las diferentes horas post-polinización de las cruas intermorfo

| Tipo de crusa | <i>pin</i> | <i>thrum</i> |
|---------------|----------------------------|--------------------------------------------|
| | Cruza intermorfo | Cruza intermorfo |
| 1h | Base del estigma | Base del estigma |
| 3h | Primera porción del estilo | Mitad del estilo Base del estilo |
| 6h | Base del estilo | Base del estilo |
| 9h | Base del estilo | Base del estilo |

Tasa de crecimiento de los tubos polínicos

Los tubos polínicos compatibles de ambos morfos son más largos ($x \pm D.E$) a razón que aumenta el tiempo post-polinización: morfo *pin* intermorfo; 1h $302.64 \pm 157.49 \mu\text{m}$, 3h $765.29 \pm 294.77 \mu\text{m}$ y 6h $2,555.62 \pm 537.05 \mu\text{m}$; morfo *thrum* intermorfo; 1h $405.9 \pm 306,48 \mu\text{m}$, 3h $1,327.28 \pm 346,63 \mu\text{m}$, 6h $1,809.64 \pm 561,55 \mu\text{m}$. A diferencia de los tubos polínicos incompatibles donde no se encuentra una relación de la distancia con el tiempo (Tabla 8).

Tabla 8. Tasa de crecimiento de los tubos polínicos de ambos morfos en las diferentes polinizaciones. Se muestra el promedio mas menos la desviación estándar ($x \pm D.E.$) de la distancia de los tubos polínicos, n es el número de tubos polínicos que se midieron.

| Distancia μm | | | | | | | |
|-------------------------|--------------|------------------|---------------------|------------|---------------------|------------|-----------------------|
| Tiempo (h) | Polinización | Autopolinización | | Intramorfo | | Intermorfo | |
| | Morfo | n | $x \pm D.E.$ | n | $x \pm D.E.$ | n | $x \pm D.E.$ |
| 1 | <i>pin</i> | 23 | 202,88 \pm 97,87 | 11 | 250,19 \pm 150,07 | 71 | 302,64 \pm 157,49 |
| | <i>thrum</i> | 75 | 785,93 \pm 407,56 | 0 | 0,00 | 25 | 405,9 \pm 306,48 |
| 3 | <i>pin</i> | 46 | 695,02 \pm 243,96 | 98 | 672,12 \pm 259,82 | 21 | 765,29 \pm 294,77 |
| | <i>thrum</i> | 89 | 828,98 \pm 385,80 | 13 | 934,09 \pm 287,52 | 72 | 1,327,28 \pm 346,63 |
| 6 | <i>pin</i> | 70 | 671,17 \pm 406,42 | 116 | 874,97 \pm 398,71 | 67 | 2,555,62 \pm 537,05 |
| | <i>thrum</i> | 145 | 412,21 \pm 430,04 | 111 | 727,27 \pm 715,33 | 79 | 1,809,64 \pm 561,55 |

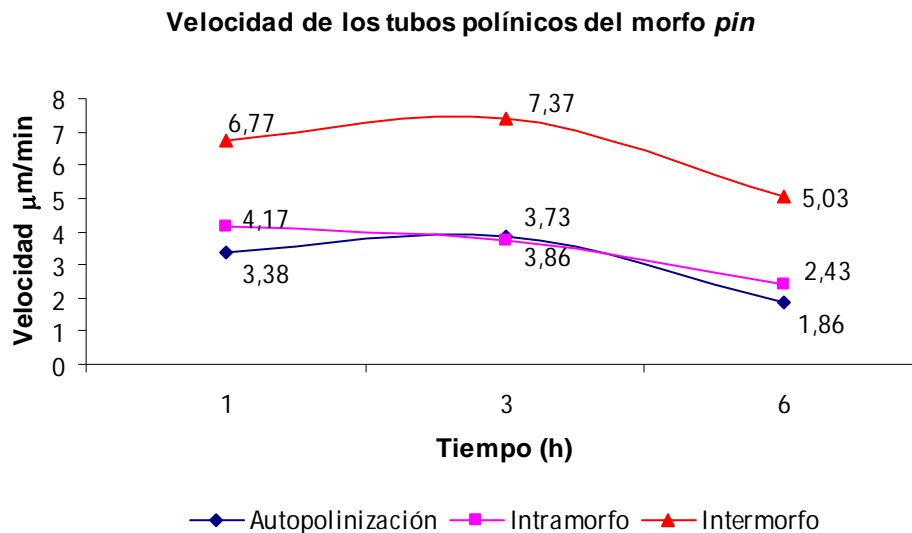
Velocidad de crecimiento de los tubos polínicos

En la tabla 9 se muestran las velocidades de los tubos polínicos en las diferentes cruzas y horas post-polinización. Estos datos se representan en las gráficas 3-7, para comparar las velocidades de los tubos polínicos en diferentes cruzas.

Tabla 9. Velocidad de los tubos polínicos en los morfos en las diferentes cruzas.

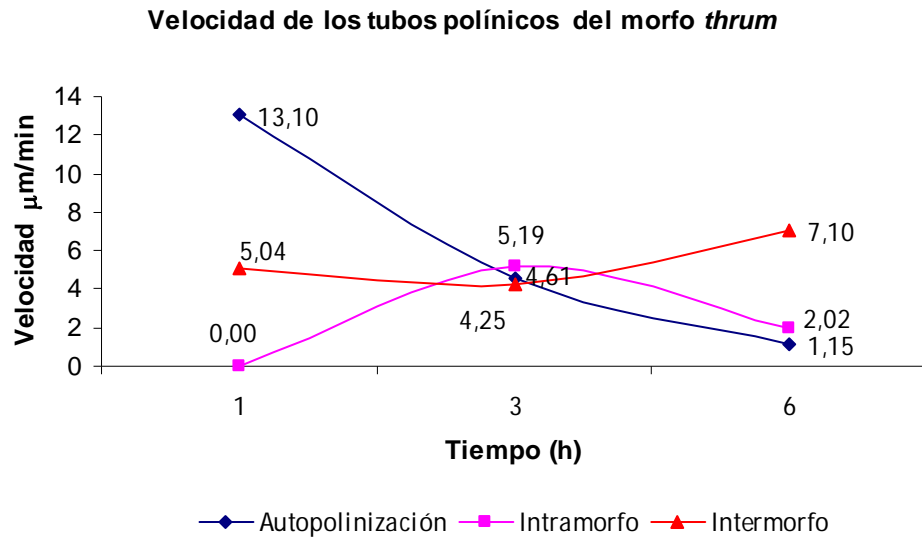
| Velocidad ($\mu\text{m}/\text{min.}$) | | | | |
|-----------------------------------------|--------------|------------------|------------|------------|
| Tiempo | Morfo | Autopolinización | Intramorfo | Intermorfo |
| 1 | <i>pin</i> | 3,38 | 4,17 | 5,04 |
| | <i>thrum</i> | 13,10 | 0,00 | 6,77 |
| 3 | <i>pin</i> | 3,86 | 3,73 | 4,25 |
| | <i>thrum</i> | 4,61 | 5,19 | 7,37 |
| 6 | <i>pin</i> | 1,86 | 2,43 | 7,10 |
| | <i>thrum</i> | 1,15 | 2,02 | 5,03 |

La velocidad de los tubos polínicos del morfo *pin* tiende a disminuir conforme pasa el tiempo en las tres cruzas; autopolinización, cruce intramorfo y cruce compatible (en este caso el morfo *thrum* es el receptor de polen), pero los tubos polínicos de la cruce compatible tienden a ser mas veloces que los tubos polínicos incompatibles (Gráfica 3).



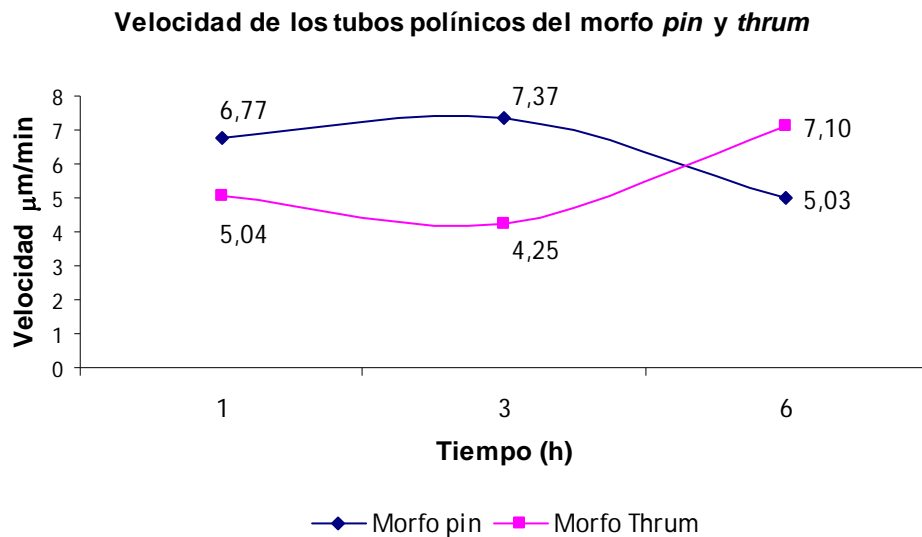
Grafica 3. Velocidad de crecimiento de los tubos polínicos del morfo *pin* en diferentes cruzas.

Los tubos polínicos del morfo *thrum* de la cruce compatible (en este caso el morfo *pin* es el receptor de polen) a una hora post-polinización son mas lentos que los tubos polínicos de la autopolinización, mientras que los tubos polínicos de la cruce intramorfo aún no han germinado. A las 3 h post-polinización los tubos polínicos de la autopolinización y de la cruce compatible disminuyen su velocidad, mientras que, los tubos polínicos de la cruce intramorfo la aumentan, sin embargo, a las 6 horas post-polinización los tubos polínicos de la cruce compatible son mas rápidos que los tubos polínicos de la autopolinización y la cruce intramorfo (Gráfica 4).



Gráfica 4. Velocidad de crecimiento de los tubos polínicos del morfo *thrum* en diferentes cruzas.

Los tubos polínicos del morfo *thrum* a 1 y 3 horas post-polinización tienen una menor velocidad de crecimiento que los tubos polínicos del morfo *pin*, sin embargo, a las 6h post-polinización la velocidad de los tubos polínicos del morfo *thrum* es mayor que la velocidad de los tubos polínicos del morfo *pin* (Gráfica 5).

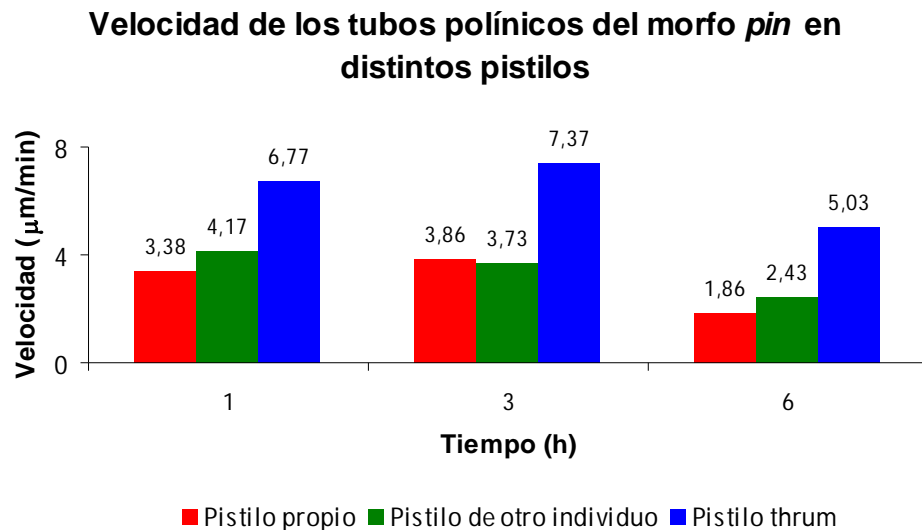


Gráfica 5. Velocidad de crecimiento de los tubos polínicos compatibles de ambos morfos.

Velocidad de los tubos polínicos de ambos morfos en diferentes pistilos

La velocidad de los tubos polínicos de ambos morfos difiere según el pistilo en el que se encuentren, siendo los tubos polínicos de ambos morfos más veloces en pistilos del morfo complementario (Grafica 6-7).

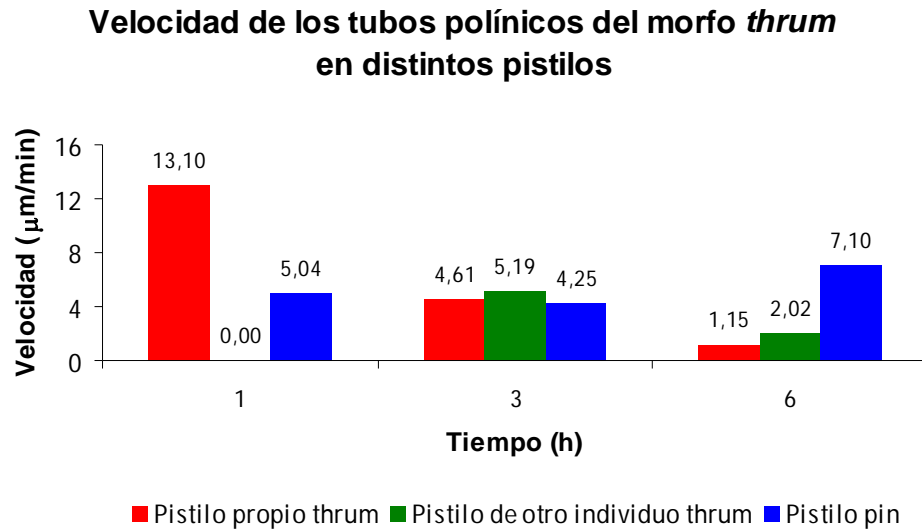
Los tubos polínicos del morfo *pin* mostraron que a todas las horas post-polinización son mas veloces en el pistilo del morfo *thrum* que en el pistilo *pin* de la misma flor (autopolinización) y que en el pistilo *pin* de un individuo diferente (cruza intramorfo) (Gráfica 6).



Grafica 6. Velocidad de los tubos polínicos del morfo *pin* en distintos pistilos.

Los tubos polínicos del morfo *thrum* son mas veloces a la primera hora en su mismo pistilo (autopolinización), mientras que a las 3 horas pos-polinización los tubos polínicos en otro pistilo *thrum* (cruza intramorfo) son los mas veloces y a las

6 horas post-polinización los tubos polínicos del morfo *thrum* son mas veloces en el pistilo del morfo *pin* (Gráfica 7).



Gráfica 7. Velocidad de los tubos polínicos del morfo *thrum* en distintos pistilos.

DISCUSIÓN

El estudio de los sistemas de incompatibilidad se basa tanto en la observación del crecimiento y morfología de los tubos polínicos compatibles e incompatibles a lo largo del pistilo (Cope, 1962; Martin, 1965; Shivana *et al.*, 1981; Bawa y Beach, 1983; Barret, 1998; Tamari *et al.*, 2001; Faivre, 2002; Castro y Araujo, 2004; Castro *et al.*, 2004; Massinga *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2005; Taisma y Wolfgang-Varela, 2005; Brys *et al.*, 2008; Ferrero *et al.*, 2009; Safavian, 2009; Wolfe *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Machado de Oliveira *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010), como en la formación de frutos y semillas en cruza controladas; (Martin, 1965; Martin, 1967; Bentley, 1979; Barret y Shore, 1985; Richards y Koptur, 1993; Washitani *et al.*, 1994; Paillet y Thompson, 1997; Lopez, 1998; Castro y Araujo, 2004; Castro *et al.*, 2004; Massinga *et al.*, 2005; Rossi *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Brys *et al.*, 2007; Brys *et al.*, 2008; Chen, 2009; Consolaro *et al.*, 2009; Ferrero *et al.*, 2009; Wolfe *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2010; Machado de oliveira *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2010) y en el seguimiento de los individuos provenientes de cruza incompatibles desde la germinación de las semillas hasta el crecimiento y desarrollo de las plántulas (Darwin, 1877).

En *T. diffusa* se estudió el crecimiento de los tubos polínicos y formación de frutos y semillas. El fruto que se formó de las autopolinizaciones del morfo *thrum* concuerda con lo que reportan, Barret y Shore (1985) en *Turnera hermmaniodides*, Washitani *et al.* (1994) en *Primula sieboldii*, Paillet y Thompson (1997) en *Gaertnera vaginata*, Castro y Araujo (2004) en *Psychotria nuda*, Castro *et al.*, (2004) en *Psychotria jasminoides*, *P. birotula* y *P. mapourioides*, Massinga *et*

al. (2005) en *Pentasia prunelloides* y *P. angustifolia*, Rossi et al. (2005) en *Psychotria ipecacuana*, Brys et al. (2007) en *Hottonia palustres*, Brys et al. (2008) en *Pulmonaria officinalis*, Chen (2009) en *Primula merilliana*, Consolaro et al. (2009) en *P. marcgravii* y *P. officinalis*, Machado de oliveira et al. (2010) en *Palicourea rigida* y Wu et al. (2010) en *Hedyotis acutangula*, puesto que, encontraron que en cruzas incompatibles (autopolinización o cruza intramorfo) en alguno o en ambos morfos se llegan a desarrollar pocos frutos con un número menor de semillas en comparación con las cruzas intermorfo, sin embargo, se esperaría que las polinizaciones incompatibles no formaran frutos como lo reportan Martin (1965) en *Turnera ulmifolia*, Martin (1967) en *Melochia tomentosa* y *M. villosa*, Bentley (1979), Wang et al. (2005) en *Nymphoides peltata*, Ferrero et al. (2009) en *Plumbago auriculata*, Wolfe et al. (2009) en *Sebaea grandis*, Machado et al. (2010) para *Cordia globosa* y *Cordia leucocephala* que es lo que caracteriza el sistema de incompatibilidad.

El sitio de inhibición de los tubos polínicos incompatibles (autopolinización e intramorfo) de *T. diffusa*, se dio en diversos puntos del pistilo que van desde el estigma, mitad y base del estilo, lo cual es similar a lo que reportan (Martin, 1965 Shivana et al. 1981; Bawa y Beach, 1983; Tamari et al., 2001; Faivre, 2002; Castro y Araujo, 2004; Castro et al., 2004; Massinga et al., 2005; Rossi et al., 2005; Taisma y Wolfgang-Varela, 2005; Safavian, 2009; Wolfe et al., 2009; Li et al., 2010; Machado de Oliveira et al. 2010; Wu et al. 2010), donde mencionan que observaron tubos polínicos incompatibles inhibidos en diferentes regiones del

pistilo incluso algunos alcanzando el ovario (Cope 1962; Barret, 1998; Lewis y Jones 1992; Taisma y Wolfgang-Varela, 2005).

En diversas especies distílicas no se encuentra una diferencia marcada en el sitio de inhibición entre el morfo *pin* y *thrum* en las cruzas incompatibles (Shivana *et al.*, 1981 en *Primula vulgaris*; Bawa y Beach, 1983 en *Coussarea sp*; Tamari *et al.*, 2001 en *Turnera scabra* Millspaugh; Faivre, 2002 en *Bouvardia ternifolia* Cav; Taisma y Wolfgang-Varela, 2005 en *Cordia curassavica*; Safavian, 2009 en *Turnera joelii* y *Turnera scabra*; Wolfe *et al.*, 2009 en *Sebaea grandis*; Machado de Oliveira *et al.*, 2010 en *Palicourea rigida*) ya que el sitio de inhibición de estas especies puede ir desde el estigma hasta algún sitio del estilo. Sin embargo, hay especies que sí tienen una diferencia marcada en el sitio de inhibición en ambos morfos (Bawa y Beach, 1983 en *Cephaelis elata*, *Coussarea sp*, *Psychotria chiapensis*, *Psychotria officinalis*, *Psychotria suerrensensis* y *Rudgea corniflora*; Faivre, 2002 en *Psychotria poeppigiana* Muell y *Psychotria chiapensis* Standl; Castro y Araujo 2004 en *Psychotrya nuda*; Castro *et al.* 2004; en *Psychotria jasminoides*, *P. birotula*, *P. mapourioides* y *P. pubigera*; Massinga *et al.*, 2005 en *Pentasia prunelloides*;) o es igual en ambos morfos en las cruzas incompatibles (Martin, 1965 en *Turnera ulmifolia*; Ferrero *et al.*, 2009 en *Plumbago auriculata*; Bawa y Beach, 1983 en *Faramea suerrensensis*; Tamari *et al.* 2001 en *Turnera subulata* Smith, *Turnera krapovickasii* Arbo, *Turnera joelii* Arbo, *Turnera grandiflora* y *Piriqueta caroliniana* Walt.; Rossi *et al.*, 2005 en *Psychotria ipecacuanha*; Wu *et al.*, 2010 en *Hedyotis acutangula*);). En *Turnera diffusa* el sitio de inhibición de los tubos polínicos no tiene una diferencia bien marcada ya que los tubos polínicos del

morfo *pin* en cruzas incompatibles se inhiben principalmente en la zona de transición del estigma y estilo y primera región del estilo, mientras que los tubos polínicos incompatibles del morfo *thrum* se inhiben principalmente desde la base del estigma hasta la primera región del estilo, estos resultados concuerdan con lo reportado en el trabajo de Martin (1965) con *Turnera ulmifolia*; Tamari *et al.*, 2001 en diversas especies de *Turnera sp.* y *Piriqueta caroliniana*, ya que sus resultados indican que el sitio de inhibición es el mismo en ambos morfos en las cruzas incompatibles, pero contrastan con lo que reporta Safavian (2009) en *Turnera joelii* y *Turnera scabra*, puesto que, en estas especies el sitio de inhibición de los tubos polínicos sí varía en cada morfo.

Las características que se encontraron en los tubos polínicos incompatibles tales como puntas hinchadas, abundante depósito de calosa y apariciones irregulares de tapones de calosa, corresponde a lo que reportan (Martin, 1965; Tamari *et al.* 2001; Castro y Araujo, 2004; Castro *et al.*, 2004; Rossi *et al.*, 2005; Brys *et al.*, 2008; Safavian, 2009; Li *et al.* 2010; Wu *et al.*, 2010) para las cruzas incompatibles donde se presenta hinchazón en la punta de tubos polínicos y abundante depósito de calosa.

Tamari *et al.* (2001) sugieren que los mecanismos de incompatibilidad pueden ser diferentes en los morfos de las especies de *Turnera sp.* y *Piriqueta caroliniana* que estudiaron, ya que reportan que los tubos polínicos del morfo *thrum* en las autopolinizaciones no forman tapones de calosa y que los tubos polínicos del morfo *pin* en la misma polinización son mas largos. En este estudio

de *Turnera diffusa* no se encontró una diferencia observable en cuanto a las características de la reacción de incompatibilidad en los morfos, por lo tanto, en este estudio la reacción de incompatibilidad se da en ambos morfos de manera similar.

Los tubos polínicos compatibles en el pistilo del morfo *pin* llegan a la base del estilo a las 6 horas post-polinización, mientras que, los tubos polínicos compatibles en el pistilo del morfo *thrum* llegan a la base del estilo a las 3 horas post-polinización, estos resultados podían haberse esperado ya que la distancia que tienen que recorrer los tubos polínicos compatibles en el estilo del morfo *pin* es mayor a la distancia que tienen que recorrer los tubos polínicos compatibles en el morfo *thrum*. Estos resultados se complementan con la tasa de crecimiento de los tubos polínicos (Tabla 8) donde a las 6 horas post-polinización en las cruzas compatibles los tubos polínicos de ambos morfos logran su mayor distancia, la cual difiere entre cada morfo.

Los datos obtenidos en este estudio en cuanto a la tasa de crecimiento y velocidad de los tubos polínicos son, en cierta medida, similares en cuanto a las cruzas compatibles frente a las cruzas incompatibles, ya que, se observa que los tubos polínicos compatibles tienden a ser más rápidos en comparación con los tubos polínicos incompatibles, sin embargo, los tubos polínicos de la autopolinización del morfo *thrum* son más largos y por ende más rápidos que los tubos polínicos de la cruce intramorfo y que los tubos polínicos compatibles a la primera hora post-polinización, este dato a pesar de parecer erróneo concuerda con lo que reporta

Tamari *et al.*, (2001), puesto que reportan que los tubos polínicos de la autopolinización del morfo *pin* son mas largos incluso que los tubos polínicos compatibles. Por tal motivo este dato podría considerarse como otra característica de la reacción de incompatibilidad.

La velocidad de los tubos polínicos de *Turnera diffusa* difiere entre morfos siendo mas veloces los tubos polínicos del morfo *pin*, puesto que a las tres horas post-polinización una gran porción de tubos polínicos ya llegó a la base del estilo, mientras que, los tubos polínicos del morfo *thrum* llegan a la base del estilo hasta las 6 horas post-polinización, esto difiere con lo que reporta Shivanna *et al.* (1981) ya que en su trabajo reportan que a la misma hora post-polinización en ambos morfos los tubos polínicos compatibles a las 32 horas están en el ovario y a las 48 horas ocurre la fecundación. Pero estos resultados concuerdan con lo que reporta Wu *et al.* (2010) puesto que en su estudio encontraron que sí hay una diferencia en la velocidad de los tubos polínicos compatibles. Por lo tanto, en este trabajo se encontró que los tubos polínicos compatibles de *Turnera diffusa* tienen velocidad diferente entre los morfos.

CONCLUSIONES

Solo se formaron frutos y semillas en las cruzas intermorfo en ambos morfos, mientras que en las cruzas intramorfo y autopolinización no se formaron frutos (solo uno en la autopolinización del morfo *thrum*), estos resultados también demuestran que *T. diffusa* es distíllica tanto morfológicamente como funcionalmente.

Turnera diffusa presenta un sistema de incompatibilidad heteromórfico ya que los tubos polínicos de las cruzas intermorfo en ambos morfos llegaron a la base del estilo a las 48 h post-polinización, mientras que, los tubos polínicos de las cruzas intramorfo y autopolinización en ambos morfos son inhibidos desde el estigma hasta la primera porción del estilo. Adicionalmente, los tubos polínicos de las cruzas intramorfo y autopolinización de ambos morfos presentan características tales como; hinchazón en la punta del tubo polínico, expansión en los tapones de calosa, pocos tapones de calosa y morfología aberrante de los tubos polínicos, estas características corroboran que en *T. diffusa* se está dando una reacción de incompatibilidad.

En *Turnera diffusa* los tubos polínicos compatibles tienden a ser mas veloces que los tubos polínicos incompatibles a lo largo del tiempo post-polinización.

Los tubos polínicos de ambos morfos son más veloces en los pistilos del morfo complementario en comparación de estar en su mismo pistilo o en un pistilo de otro individuo del mismo morfo.

Los tubos polínicos del morfo *pin* son más veloces que los tubos polínicos del morfo *thrum* en cruzas compatibles.

Los resultados de la inhibición de los tubos polínicos a las 48h post-polinización, la nula formación de frutos en cruzas incompatibles, las características de los tubos polínicos incompatibles y la velocidad de los tubos polínicos de ambos morfos en distintos pistilos sugieren que *T. diffusa* es autoincompatible tanto morfológicamente como funcionalmente, por lo tanto, se considera que *Turnera diffusa* presenta un sistema de incompatibilidad heteromórfico característico de especies distílicas.

PERSPECTIVAS

Se debe aumentar significativamente el número de polinizaciones destinadas a formar frutos y semillas. También es importante poder hacer estudios en donde se puedan clonar los genes que median las características propias de la heterostilia que se encuentran en el locus *S*, pero principalmente, aquellos que están involucrados en el reconocimiento y rechazo del polen, ya que en base a esta información se puede establecer el mecanismo de rechazo del polen incompatible en esta especie de importancia económica.

Bibliografía

Alcaraz L. 1999. Estudio de las condiciones para la micropropagación de Damiana (*Turnera diffusa*). Tesis de Doctorado en Ciencias. (Biología). Posgrado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F. 95 pp.

Alvarado-Cárdenas L. O. 2006. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán: Turneraceae. Fascículo 43. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 16 pp.

Barret S. C. H. 1989. The evolutionary breakdown of heterostyly. En: Bock J. H. y Y. B. Linhart (Ed.). The evolutionary ecology of plants. Westview Press. Estados Unidos de América. Colorado. 151-169 pp.

Barret S. C. H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. En: Barret S. C. H. (Ed.). Evolution and function of heterostyly. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg. 279 pp.

Barret S. C. H. 1998. The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in Plant Science*. 3: 335-341.

Barret S. C. H. 2000. The Evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. *Annals of Botany*. 85: 253-265.

Barret S. C. H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Genetics*. 3: 274-284.

Barret S. C. H. y J. S. Shore. 1985. Dimorphic incompatibility in *Turnera hermannioides* Camb. (Turneraceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 72: 259-263.

Barret S. C. H. y K. A. Hodgins. 2006. Floral design and the evolution of asymmetrical mating systems. En: Harder L. D. y S. C. H. Barret. (Eds.). *Ecology and evolution of flowers*. Oxford University Press. Nueva York. 370 pp.

Baker H. G. 1966. The evolution, functioning and breakdown of heteromorphic incompatibility systems. I. The Plumbaginaceae. *Evolution*. 20: 349-368.

Baudilio-Rondón J. 2008. Revisión taxonómica del género *Waltheria* L. (Sterculiaceae) en Venezuela. *Ernstia*. 18: 7-36.

Bawa K. S. y J. H. Beach 1983. Self-incompatibility systems in the Rubiaceae of a tropical lowland wet forest. *American Journal of Botany*. 70: 1281-1288.

Bentley L. B. 1979. Heterostyly in *Turnera trioniflora*, a roadside weed of the amazon basin. *Biotropica*. 11: 11-17.

Brys R., H. Jacquemyn y M. Hermy. 2007. Impact of mate availability, population size, and spatial aggregation of morphs on sexual reproduction in a distylous, aquatic plant. *American Journal of Botany*. 94: 119-127.

Brys R., H. Jacquemyn, M. Hermy y T. Beeckman. 2008. Pollen deposition and the functioning of distyly in the perennial *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 273: 1-12.

Bullock S. H. 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. *Biotropica*. 17: 287-231.

Castro C. C. y A. C. Araujo. 2004. Distyly and sequential pollinators of *Psychotria nuda* (Rubiaceae) in the Atlantic rain forest, Brazil. *Plant Systematics and Evolution*. 244: 131-139.

Castro C. C., P. E. A. M. Oliveira y M. C. Alves. 2004. Breeding systems and floral morphometry of distylous *Psychotria L.* Species in the Atlantic rain forest, SE Brazil. *Plant Biology*. 6: 755-760.

Chen M. 2009. Comparative reproductive biology of *Primula merrilliana* Schltr. and *P. cicutariifolia* Pax. *Plant Systematics and Evolution*. 278:23-32.

Consolaro H., R. D. P. Toledo, R. L. Ferreguti, J. Hay y P. E. de Oliveira. 2009. Distilia e homostilia em espécies de *Palicourea* Aubl. (Rubiaceae) do Cerrado do Brasil Central. *Revista Brasileira de Botânica*. 32: 677-689.

Cope F. W. 1962. The mechanism of pollen incompatibility in *Theobroma cacao* L. *Heredity*. 17: 157-182.

Dafni A. 1992. Pollination ecology: a practical approach. Oxford University Press. Estados Unidos de América. 250 pp.

Darwin C. 1859. El origen de las especies. 1ra ed. Colección Austral. España. 632 pp.

Darwin C. 1877. Las distintas formas de las flores en plantas de la misma especie. Biblioteca Darwiniana. 283 pp.

de Nettancourt D. 2001. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. 2da ed. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg. Nueva York. 322 pp.

Domínguez C. y S. Ávila-Sakar. 2002. *Erithroxylum havanense* Jacq. (Erythroxylaceae). En: Noguera F. A., J. H. Vega-Rivera, A. N. García-Aldrete y M. Quezada-Avenidaño (Eds.). Historia natural de Chamela. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 568 pp.

Dulberger R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. En: Barret S. C. H. (Ed.). Evolution and function of heterostyly. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg. Nueva York. 279 pp.

Eckert C. G. 2000. Contribution of autogamy and geitonogamy to self-fertilization in a mass-flowering, clonal plant. *Ecology for Ecological Society of America*. 81: 532-542.

Faivre A. E. 2002. Variation in pollen tube inhibition sites within and among three heterostylous species of Rubiaceae. *International Journal of Plants Sciences*. 163: 783-794.

Ferrero V., C. de Vega, G. I. Stafford, J. Van-Staden, S. D. Johnson. 2009. Heterostyly and pollinators in *Plumbago auriculata* (Plumbaginaceae). *South African Journal of Botany*. 75: 778-784.

Ganders F. R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany*. 17: 607-35.

Goldraij A., K. Kondo, C. B. Lee, C. N. Hancock, M. Sivaguru, S. Vazquez-Santana, S. Kim, T. E. Phillips, F. Cruz-Garcia y B. McClure. 2006. Compartmentalization of S-RNase and HT-B degradation in self-incompatible *Nicotiana*. *Nature*. 439: 805-810.

Ingrouille M. 1992. Diversity and evolution of land plants. 1ra ed. Chapman y Hall. Gran Bretaña. 340 pp.

Ingrouille M. y B. Eddie. 2006. Plants: Evolution and diversity. 3ra ed. Cambridge University Press. Nueva York. 440 pp.

Jesson L. K. y S. C. H. Barret. 2002. Enantiostyly in *Wachendorfia* (Haemodoraceae): The influence of reproductive systems on the maintenance of the polymorphism. *American Journal of Botany*. 89: 253-252.

Labone J. J. D., A. Goultiaeva y J. S. Shore. 2009. High-resolution mapping of the S-locus in *Turnera* leads to the discovery of three genes tightly associated with the S-alleles. *Molecular Genetics and Genomics*. 281: 673-685.

Levin D. A. 1986. Breeding structure and genetic variation. En: Crawley M. J. (Ed.). *Plant Ecology*. Blackwell Scientific Publication. Imperial College. London. 217-251 pp.

Lewis D. y D. A. Jones. 1992. The genetics of heterostyly. En: Barret S. C. H. (Ed.). *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag. Berlin-Heidelberg. Nueva York. 279 pp.

Li J., M. Webster, M. Furuya y P. M. Gilmartin. 2007. Identification and characterization of *pin* and *thrum* alleles of two genes that co-segregate with the *Primula S* locus. *The Plant Journal*. 51: 18-31.

Li A. M., X. Q. Wu, D. X. Zhang y S. C. H. Barrett. 2010. Cryptic dioecy in *Mussaenda pubescens* (Rubiaceae): a species with stigma-height dimorphism stigma-height dimorphism. *Annals of Botany*. 106: 521-531.

Lopez D. M. 1998. Reproductive biology of *Turnera pumilea* L. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Graduate Program in Biology. York University. Canadá. 123 pp.

López-Curto M., J. Márquez-Guzmán y G. Murguía-Sánchez. 2005. Técnicas para el estudio de desarrollo en angiospermas. 2da. ed. La Prensa de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 178 pp.

Lott E. J. 2002. Lista anotada de plantas vasculares de Chamela-Cuixmala. En: Noguera F. A., J. H. Vega-Rivera, A. N. García-Aldrete y M. Quezada-Avenidaño (Eds.). Historia natural de Chamela. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 568 pp.

Mabberley D. J. 1997. The plant-book. 2ª ed. Cambridge University Press. Reino Unido. 858 pp.

Machado de Oliveira A., A. P. Silva, H. Consolaro, M. A. G. e Barros y P. E. Oliveira. 2010. Breeding biology and distyly in *Palicourea rigida* H. B. & K. (Rubiaceae) in the Cerrados of Central Brazil. *Acta Botanica Brasilica*. 24: 686-696.

Machado I. C., A. V. Lopes y M. Sazima. 2010. Contrasting bee pollination in two co-occurring distilyc species of *Cordia* (Cordiaceae, Boraginales) in the Brazilian semi-arid Caatinga: generalist in *C. globosa* vs specialist in *C. leucocephala*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 82: 881-891.

Martin F. W. 1965. Distyly and incompatibility in *Turnera ulmifolia*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*. 92: 185-192.

Martin F. W. 1967. Distyly, self-Incompatibility, and evolution in *Melochia*. *Evolution*. 21: 493-499.

Massinga P. H., S. D. Johnson y L. D. Harder. 2005. Heteromorphic incompatibility and efficiency of pollination in two distylous *Pentanisia* species (Rubiaceae). *Annals of Botany*. 95: 389-399.

Mauseth J. D. 2003. Botany. An introduction to plant biology. 3ra. ed. Jones and Bartlett Publishers. Massachusetts. 848 pp.

Naik V. N. 1984. Taxonomy of angiosperms. McGraw-Hill. Nueva Delhi. Republica de la India. 304 pp.

Ornduff R. 1979. The genetics of heterostyly in *Hypericum aegypticum*. *Heredity*. 42: 271-272.

Pailler T. y J. D. Thompson. 1997. Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in *Gaertnera vaginata* (Rubiaceae) endemic to La Reunion Island. *American Journal of Botany*. 84: 315-327.

Pio L. A. S. , J. Darlan-Ramos, M. Pasqual, F. C. Santos y K. Pereira-Junqueira. 2004. Receptiveness of the stigma and *in vitro* germination of orange pollen, submitted to different temperatures. *Ciência e Agrotecnologia*. 28: 1087-1091.

Pound R. y Clements F. E. 1978. The phytogeography of Nebraska. Arno Press Inc. University of Wisconsin. Estados Unidos de América. 442 pp.

Pugnaire F. I. y F. Valladares. 2007. Functional plant ecology. 2da ed. CRC Press. Estados Unidos de América. 724 pp.

Rea A. C. y J. B. Nasrallah. 2008. Self-incompatibility systems: barriers to self-fertilization in flowering plants. *The International Journal of Developmental Biology*. 52: 627-636.

Richards A. J. 1996. Breeding systems in flowering plants and the control of variability. *Folia Geobotanica y Phytotaxonomica*. 31: 283-293.

Richards J. H. y S. Koptur. 1993. Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*. 80 (1): 31-40

Rossi A. A. B., L. O. de Oliveira y M. F. Vieira. 2005. Distyly and variation in floral traits in natural populations of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). *Revista Brasileira de Botanica*. 28: 285-294.

Safavian D. 2009. Investigation of the structural basis of self-incompatibility and the nature of distyly in *Turnera joelii* and *T. scabra* (Turneraceae). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Graduate Program in Biology. York University. Canada. 123 pp.

Shivana K. R., J. Heslop-Harrison y Y. Helsop-Harrison. 1981. Heterostyly in *Primula*. 2. Sites of pollen inhibition, and effects of pistil constituents on compatible and incompatible pollen-tube growth. *Protoplasma*. 107: 319-337.

Shore J. S., M. M. Arbo y A. Fernandez. 2006. Breeding system variation, genetics and evolution in the Turneraceae. *New Phytologist*. 171: 539-551

Silvertown J. W. y D. Charlesworth. 2001. Introduction to plant population biology. Wiley-Blackwell. Inglaterra. 347 pp.

Snow A. A. y T. P. Spira. 1991. Differential pollen-tube growth rates and nonrandom fertilization in *Hibiscus moscheutos* (Malvaceae). *American Journal of Botany* 78: 1419-1426.

Sun S., J. Gao, W. Liao, Q. Li y D. Zhang. 2007. Adaptive significance of flexistylis in *Alpinia blepharocalyx* (Zingiberaceae): A hand-pollination experiment. *Annals of Botany*. 99: 661-666.

Taisma M. A. y C. Wolfgang-Varela. 2005. Sistema de compatibilidad en la especie distíllica *Cordia curassavica* (JACQ.) R&S (Boraginaceae). *Interciencia*. 30: 431-435.

Tamari F., A. Athanasiou y J. S. Shore. 2001. Pollen tube growth and inhibition in distylous and homostylous *Turnera* and *Piriqueta* (Turneraceae). *Canadian Journal of Botany*. 79: 578-591.

Tamari F. y J. S. Shore 2006. Allelic variation for a short-specific polygalacturonase in *Turnera subulata*: is it associated with the degree of self-compatibility?. *International Journal of Plant Sciences*. 167:125–133.

Wang Y., Q. F. Wang, Y. H. Guo y S. C. H. Barrett. 2005. Reproductive consequences of interactions between clonal growth and sexual reproduction in *Nymphoides peltata*: a distylous aquatic plant. *New Phytologist*. 165: 329-336.

Washitani I., R Osawa, H. Namai y M. Niwa. 1994. Patterns of female fertility in heterostylous *Primula sieboldii* under severe pollinator limitation. *Journal of Ecology*. 82: 571-579.

Wedderburn F. y A. J. Richards. 1990. Variation in within-morph incompatibility inhibition sites in heteromorphic *Primula* L. *New Phytologist*. 116: 149-162.

Weller S. G. y M. F. 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: 120-125.

Wolfe L. M., P. H. Massinga y S. D. Johnson. 2009. A quantitative evaluation of the distylous syndrome in *Sebaea grandis* (Gentianaceae). *South African Journal of Botany*. 75: 785-790.

Wu X., A. Li y D. Zhang. 2010. Cryptic self-incompatibility and distyly in *Hedyotis acutangula* Champ. (Rubiaceae). *Plant Biology*. 12: 484-494.

Zar J. H. 1984. Biostatistical analysis. 2da ed. Prentice-Hall. Estados Unidos de América. Nueva Jersey. 718 pp.

ANEXOS

Anexo I. Evidencia de la de incompatibilidad en diversas especies distílicas.

| | | | Sitio de inhibición del tubo polínico y/o características de incompatibilidad | | | | |
|------------------------------------------------------------------------|--------------|------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|--------------------|
| | | | <i>pin</i> | | <i>thrum</i> | | |
| Autor | Familia | Especie | Autopolinización | Cruza intramorfo | Autopolinización | Cruza intramorfo | Método de estudio |
| Schou y Philipp, 1984; Dulberger 1970; citados por; Lewis y Jones 1992 | Boraginaceae | <i>Anchuia officinalis</i> y <i>A. hybrida</i> | Ovario (no específica en que cruza) | Ovario (no específica en que cruza) | Ovario (no específica en que cruza) | Ovario (no específica en que cruza) | Tubos polínicos |
| Barret (1998) | | <i>Narcissus sp</i> | Ovario (no específica en que cruza) | Ovario (no específica en que cruza) | Ovario (no específica en que cruza) | Ovario (no específica en que cruza) | Tubos polínicos |
| Taisma y Wolfgang-Varela (2005) | | <i>Cordia curassavica</i> | Estigma | Estigma | Estigma | Estigma estilo y ovario | Tubos polínicos |
| Brys <i>et al.</i> (2008) | | <i>Pulmonaria officinalis</i> | Expansión de calosa en la punta de los tubos polínicos incompatibles | Expansión de calosa en la punta de los tubos polínicos incompatibles | Expansión de calosa en la punta de los tubos polínicos incompatibles | Expansión de calosa en la punta de los tubos polínicos incompatibles | Tubos polínicos |
| | | <i>Pulmonaria officinalis</i> | Formó pocas semillas | Formó pocas semillas | No formó semillas | Formo pocas semillas | Conteo de semillas |
| Machado <i>et al.</i> (2010) | | <i>Cordia globosa</i> | No formó frutos | No formó frutos | No formó frutos | No formó frutos | Conteo de frutos |
| | | <i>C. leucocephala</i> | No formó frutos | No formó frutos | No formó frutos | No formó frutos | Conteo de frutos |
| Wolfe <i>et al.</i> (2009) | Gentianaceae | <i>Sebaea grandis</i> | No se realizó | Superficie del estigma | No se realizó | Estilo | Tubos polínicos |
| | | <i>Sebaea grandis</i> | No se realizó | No formó frutos | No se realizó | No formó frutos | Conteo de frutos |
| Cope (1962) | Malvaceae | <i>Theobroma cacao</i> | Ovario (no específica en que cruza) | Ovario (no específica en que cruza) | Ovario (no específica en que cruza) | Ovario (no específica en que cruza) | Tubos polínicos |
| Martin (1967) | | <i>Melochia pyramidata</i> | No se realizó | Autocompatible | No se realizó | Autocompatible | Conteo de frutos |

| | | | | | | | |
|--------------------------------|----------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------|--------------------|
| | | <i>M. tomentosa</i> | No se realizó | No formó frutos | No se realizó | No formó frutos | Conteo de frutos |
| | | <i>M. villosa</i> | No se realizó | No formó frutos | No se realizó | No formó frutos | Conteo de frutos |
| Wang <i>et al.</i> (2005) | Menyanthaceae | <i>Nymphoides peltata</i> | No formó frutos | No formó frutos | No formó frutos | No formó frutos | Conteo de frutos |
| Shivana <i>et al.</i> (1981) | Primulaceae | <i>Primula vulgaris</i> | No se realizó | Tejido de transmisión del estilo | No se realizó | Superficie del estigma y tejido de transmisión del estigma | Tubos polínicos |
| Washitani <i>et al.</i> (1994) | | <i>P. sieboldii</i> | Formó pocos frutos | No formó frutos | Formó pocos frutos | No formó frutos | Conteo de frutos |
| | | | Formó pocas semillas | No formó semillas | Formó pocas semillas | No formó semillas | Conteo de semillas |
| Brys <i>et al.</i> (2007) | | <i>Hottonia palustris</i> | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Conteo de frutos |
| | | | Formó pocas semillas | Formó pocas semillas | Formó pocas semillas | Formó pocas semillas | Conteo de semillas |
| Chen (2009) | | <i>P. merilliana</i> | Formó pocas semillas | Formó pocas semillas | Formó pocas semillas | No produjo semillas | Conteo de semillas |
| Ferrero <i>et al.</i> (2009) | Plumbaginaceae | <i>Plumbago auriculata</i> | El polen no germinó | El polen no germinó | El polen no germinó | El polen no germinó | Tubos polínicos |
| | | <i>P. auriculata</i> | No formó frutos | No formó frutos | No formó frutos | No formó frutos | Conteo de frutos |
| Bawa y Beach (1983) | Rubiaceae | <i>Psychotria acuminata</i> | Autocompatible | Autocompatible | Autocompatible | Autocompatible | Tubos polínicos |
| | | <i>Cephaelis elata</i> | Estigma y base del estilo | Estigma y base del estilo | Estigma | Estigma | Tubos polínicos |
| | | <i>Coussarea sp.</i> | Estigma y estilo | Estigma y estilo | Estigma, estilo y base del estilo | Estigma | Tubos polínicos |
| | | <i>Faramea suerrensis</i> | Estigma | Estigma | Estigma | Estigma | Tubos polínicos |
| | | <i>Faramea sp.</i> | Estigma | Estigma | Estigma | Estigma | Tubos polínicos |
| | | <i>Psychotria chiapensis</i> | Estigma y estilo | Estigma y estilo | Estigma | Estigma | Tubos polínicos |
| | | <i>Psychotria officinalis</i> | Mitad del estilo | Mitad del estilo | Estigma | Estigma | Tubos polínicos |
| | | <i>Psychotria suerrensis</i> | Unión del estigma y estilo | Unión del estigma y estilo | Estigma | Estigma | Tubos polínicos |

| | | <i>Rudgea corniflora</i> | Base del estilo | Base del estilo | Estigma | Estigma | Tubos polínicos |
|---------------------------|--|-------------------------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------|
| Richards y Koptur (1993) | | <i>Guettarda scabra</i> | Sí formó frutos | Sí formó frutos | Sí formó frutos | Sí formó frutos | Conteo de frutos |
| Pailler y Thompson (1997) | | <i>Gaertnera vaginata</i> | No formó frutos | No formó frutos | No formó frutos | Formó pocos frutos | Conteo de frutos |
| Faivre (2002) | | <i>Bouvardia ternifolia</i> | Antes de la mitad del estilo | Después de la mitad del estilo | Antes de la mitad del estilo | Desde el estigma hasta la base del estilo | Tubos polínicos |
| | | <i>Psychotria poeppigiana</i> | Después del punto medio del estilo | Después del punto medio del estilo | No germinaron o fueron inhibidos en el estigma | No germinaron o fueron inhibidos en el estigma | Tubos polínicos |
| | | <i>Psychotria chiapensis</i> | Después del punto medio del estilo | Después del punto medio del estilo | No germinaron o fueron inhibidos en el estigma | No germinaron o fueron inhibidos en el estigma | Tubos polínicos |
| Castro et al. (2004) | | <i>Psychotria jasminoides</i> | Principalmente en el estigma y poco en el estilo | Principalmente en el estigma y poco en el estilo | Estigma | Estigma | Tubos polínicos |
| | | <i>Psychotria jasminoides</i> | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Conteo de frutos |
| | | <i>P. birotula</i> | Principalmente en el estigma y poco en el estilo | Principalmente en el estigma y poco en el estilo | Estigma | Estigma | Tubos polínicos |
| | | <i>P. birotula</i> | No formó frutos | No formó frutos | Formó pocos frutos | No formó frutos | Conteo de frutos |
| | | <i>P. mapourioides</i> | Principalmente en el estigma y poco en el estilo | Principalmente en el estigma y poco en el estilo | Estigma | Estigma | Tubos polínicos |
| | | <i>P. mapourioides</i> | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | No formó frutos | No formó frutos | Conteo de frutos |
| | | <i>P. pubigera</i> | Principalmente en el estigma y poco en el estilo | Principalmente en el estigma y poco en el estilo | Estigma | Estigma | Tubos polínicos |
| | | <i>P. pubigera</i> | No se realizó | No se realizó | No se realizó | No se realizó | Conteo de frutos |
| Castro y Araujo (2004) | | <i>Psychotrya nuda</i> | Estigma | Estigma | Estigma y estilo | Estigma y estilo | Tubos polínicos |

| | | | | | | | |
|------------------------------------------|-------------|-------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------|
| | | <i>Psychotrya nuda</i> | No formó frutos | No formó frutos | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Conteo de frutos |
| Massinga <i>et al.</i> (2005) | | <i>Pentasia prunelloides</i> | Parte superior del estigma | Parte superior del estigma | Estilo | Estilo | Tubos polínicos |
| | | <i>Pentasia prunelloides</i> | No formó frutos | No formó frutos | No formó frutos | Formó pocos frutos | Conteo de frutos |
| | | <i>P. angustifolia</i> | No se reporta | No se reporta | No se reporta | No se reporta | Tubos polínicos |
| | | <i>P. angustifolia</i> | No formó frutos | Formó pocos frutos | No formó frutos | Formó pocos frutos | Conteo de frutos |
| Rossi <i>et al.</i> (2005) | | <i>Psychotria ipecacuanha</i> | En el primer tercio del estilo | En el primer tercio del estilo | En el primer tercio del estilo | En el primer tercio del estilo | Tubos polínicos |
| | | <i>Psychotria ipecacuanha</i> | No formó frutos | Formó pocos frutos | No formó frutos | Formó pocos frutos | Conteo de frutos |
| Consolaro <i>et al.</i> (2009) | | <i>Palicourea marcgravii</i> | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Conteo de frutos |
| | | <i>Palicourea officinalis</i> | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Conteo de frutos |
| Li <i>et al.</i> (2010) | | <i>Mussaenda pubescens</i> | No se realizó | No se realizó | Estigma | Estigma | Tubos polínicos |
| Machado de Oliveira <i>et al.</i> (2010) | | <i>Palicourea rigida</i> | En la base del estilo | A lo largo del estilo | Estigma | Estigma | Tubos polínicos |
| | | <i>Palicourea rigida</i> | Formó dos frutos | Formó un fruto | No formó frutos | No formó frutos | Conteo de frutos |
| Wu <i>et al.</i> (2010) | | <i>Hedyotis acutangula</i> | Base del estilo | Base del estilo | Base del estilo (crecimiento anormal) | Base del estilo (crecimiento anormal) | Tubos polínicos |
| | | <i>H. acutangula</i> | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Conteo de frutos |
| Martin (1965) | Turneraceae | <i>Turnera ulmifolia</i> | Base del estigma y sitio de transición con el estilo | Base del estigma y sitio de transición con el estilo | Base del estigma y sitio de transición con el estilo | Base del estigma y sitio de transición con el estilo | Tubos polínicos |
| | | <i>T. ulmifolia</i> | No formó frutos | No formó frutos | No formó frutos | No formó frutos | Conteo de frutos |
| | | <i>T. ulmifolia</i> | No formó semillas | No formó semillas | No formó semillas | No formó semillas | Conteo de semillas |
| Bentley (1979) | | <i>T. trioniflora</i> | No formó semillas | No formó semillas | No formó semillas | No formó semillas | Conteo de semillas |
| Barret y Shore (1985) | | <i>T. trioniflora</i> | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Formó pocos frutos | Conteo de frutos |

| | | | | | | | | |
|----------------------|--|------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| | | <i>T. trioniflora</i> | Formó pocas semillas | Formó pocas semillas | Formó pocas semillas | Formó pocas semillas | Formó pocas semillas | Conteo de semillas |
| Lopez (1998) | | <i>T. pumilea</i> | Formó semillas = intermorfo | No se realizó | Formó semillas = intermorfo | No se realizó | No se realizó | Conteo de semillas |
| Tamari et al. (2001) | | <i>T. scabra</i> | Estigma, región superior del estilo y pocos en la base del estilo | No se realizó | Estigma y región superior del estilo | No se realizó | No se realizó | Tubos polínicos |
| | | <i>T. subulata</i> | Estigma y región superior del estilo | No se realizó | Estigma y región superior del estilo | No se realizó | No se realizó | Tubos polínicos |
| | | <i>T. krapovickasii</i> | Estigma y región superior del estilo | No se realizó | Estigma y región superior del estilo | No se realizó | No se realizó | Tubos polínicos |
| | | <i>T. joelii</i> | Estigma y región superior del estilo | No se realizó | Estigma y región superior del estilo | No se realizó | No se realizó | Tubos polínicos |
| | | <i>T. grandiflora</i> | Estigma y región superior del estilo | No se realizó | Estigma y región superior del estilo | No se realizó | No se realizó | Tubos polínicos |
| | | <i>Piriqueta caroliniana</i> | Estigma y región superior del estilo | No se realizó | Estigma y región superior del estilo | No se realizó | No se realizó | Tubos polínicos |
| Safavian (2009) | | <i>T. joelii</i> | Psrte superior del estilo | No se realizó | Estigma | No se realizó | No se realizó | Tubos polínicos |
| | | <i>T. scabra</i> | Mas allá de la parte superior del estilo | No se realizó | Estigma | No se realizó | No se realizó | Tubos polínicos |

Anexo II. Imágenes de *Turnera diffusa*.



Morfo *pin*



Morfo *thrum*