



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD

**Filtros selectivos en el mutualismo específico entre *Ficus*  
(Moraceae) y sus avispas polinizadoras de la familia Agaonidae**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**NADIA CASTRO CÁRDENAS**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GUILLERMO IBARRA MANRÍQUEZ**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA**

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. SILVANA MARTÉN RODRÍGUEZ**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, ENES-MORELIA

Morelia, Michoacán, Abril 2023



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD

**Filtros selectivos en el mutualismo específico entre *Ficus*  
(Moraceae) y sus avispas polinizadoras de la familia Agaonidae**

# **TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**NADIA CASTRO CÁRDENAS**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GUILLERMO IBARRA MANRÍQUEZ**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA**

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. SILVANA MARTÉN RODRÍGUEZ**

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES, ENES-MORELIA

Morelia, Michoacán, 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD IIES-M

OFICIO CPCB/214/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

Me permito informar a usted que, en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de noviembre de 2022, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS**, de la estudiante **CASTRO CÁRDENAS NADIA**, con número de cuenta **306004469** con la tesis titulada, "**FILTROS SELECTIVOS EN EL MUTUALISMO ESPECÍFICO ENTRE *FICUS* (MORACEAE) Y SUS AVISPAS POLINIZADORAS DE LA FAMILIA AGAONIDAE**", realizada bajo la dirección del DR. GUILLERMO IBARRA MANRÍQUEZ, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidenta: DRA. SILVIA AGUILAR RODRÍGUEZ  
Vocal: DR. ARMANDO AGUIRRE JAIMES  
Vocal: DR. EDUARDO CUEVAS GARCÍA  
Vocal: DR. SANDRA LUZ GÓMEZ ACEVEDO  
Secretaría: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA

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

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 21 de febrero de 2023

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **Agradecimientos institucionales**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la formación y motivación para continuar con mis estudios.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por ser beneficiaria de la beca de manutención (CVU-706201) que me permitió dedicar tiempo completo para mis estudios de posgrado.

El desarrollo de esta tesis contó con el apoyo económico del presupuesto operativo del Laboratorio de Ecología y Sistemática Vegetal del IIES, a cargo del Dr. Guillermo Ibarra Manríquez.

A los miembros de mi comité tutor, la Dra. Sonia Vázquez Santana y la Dra. Silvana Martén Rodríguez por su apoyo en la planeación, desarrollo y revisión tanto del proyecto como de la tesis.

A mi asesor, el Dr. Guillermo Ibarra Manríquez por la dirección del proyecto y por su confianza para trabajar en este proyecto.

## **Agradecimientos a título personal**

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme seguir avanzando en mis estudios.

Al Dr. Guillermo Ibarra Manríquez por todo el apoyo brindado en la realización del proyecto y por promover e impulsar mi formación académica. Por su apoyo, meticulosidad, enseñanzas, paciencia infinita y por su gran pasión en el estudio del género *Ficus* en México. Por todo el apoyo académico y económico, muchas gracias.

A la Dra. Sonia Vázquez Santana por la activa participación en el proyecto y permitirme trabajar en su laboratorio. Por sus enseñanzas, comentarios y correcciones a lo largo de los años. Por motivarme a ser una mejor científica. Por brindarme su confianza, apoyo desinteresado y su valiosa amistad.

A la Dra. Silvana Martén Rodríguez por la activa participación en el proyecto y por estar al tanto del proyecto y de mi formación académica.

Al Comité de jurado de examen: Dra. Silvia Aguilar Rodríguez, Dr. Armando Aguirre Jaimes, Dra. Sonia Vázquez Santana, Dr. Eduardo Cuevas García y Dra. Sandra Luz Gómez Acevedo por sus comentarios que ayudaron a mejorar el escrito.

A la Dra. Silvia Espinosa Matías por el procesamiento y la toma de fotomicrografías en el Microscopio Electrónico de Barrido de la Facultad de Ciencias, UNAM. Por su gran amistad y valiosos comentarios durante mis estudios de posgrado.

A la M. en F.P Ana Isabel Bieler Antolín por la toma de fotomicrografías en el Laboratorio de Microcine de la Facultad de Ciencias, UNAM.

Al Dr. Orlando Hernández Cristobal por el procesamiento y la toma de fotomicrografías en el Microscopio Electrónico de Barrido de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, campus Morelia, UNAM.

A la Dra. Simone de Pauda Teixeira por sus aportaciones en el capítulo 2 y por brindar su apoyo durante mi estancia de investigación en la Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Al Dr. Armando Navarrete Segueda por el trabajo en las salidas de campo, así como en la realización del mapa de localidades en el Capítulo 1 y sus comentarios en el escrito de la tesis. Por la gran amistad incondicional, las palabras nunca alcanzarán para agradecerle!!! Gracias Armie!!!

A las Dras. Eva Piedra-Malagón y Karen Hernández-Esquivel por su apoyo en el trabajo de campo, así como en el conteo de flores de los siconos de *Ficus*. Por todos los

momentos compartidos y por su gran amistad. Por ser un equipo de apoyo al estudiar el género *Ficus*, y por llorar más de una vez de frustración al no obtener resultados. Por compartir e integrar información de nuestros respectivos proyectos y ayudarme a entender un poco mejor el tenebroso e interesante mundo del mutualismo *fig-fig wasp*. Por siempre alentarme con sus bonitos comentarios. Gracias chicas!!!

A la M. en C. Ma. Guadalupe Cornejo Tenorio por su apoyo en el trabajo de campo, así como en el conteo de flores de los siconos de *Ficus*.

Al M. en C. Iván Leonardo Ek Rodríguez por su apoyo en el trabajo de campo, así como en la paciencia para contar flores de los siconos de *Ficus*. Por las escapadas a Balzapote para relajarnos con una caminera y por apoyarme en la búsqueda de los higos hasta localidades muy muy lejanas.

Al Dr. William Ramírez por valiosos consejos para disectar avispas y por su amplio conocimiento en la taxonomía de la familia Agaonidae. Por transmitir el amor por este grupo tan complejo y por su tenacidad para próximamente describir un nuevo género de avispas polinizadoras en el Neotrópico.

Al Dr. Mauricio Quesada Avendraño por las facilidades otorgadas para el uso de los Microscopios Estereoscópicos y Ópticos del Laboratorio Nacional de Análisis y Síntesis Ecológica, UNAM.

A la M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco por su asesoramiento técnico en el laboratorio. Por su apoyo incondicional durante mi formación académica y su gran amistad a lo largo de los años.

A la Biól. Balbina Hernández-Ramos por su apoyo en la separación de avispas polinizadoras de la familia Agaonidae.

A Rosamond Coates jefa de la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, quien proporcionó las facilidades y apoyo para llevar a cabo exitosamente el trabajo de campo.

Al parataxónomo Santiago Sinaca por siempre estar dispuesto a buscar más individuos con higos y por compartir su enorme conocimiento en la identificación de árboles de la Reserva de Los Tuxtlas. Por todas las caminatas e infinitas charlas en los 14 toques de Catemaco a Montepío y entre los cerros y potreros que nunca tuvieron fin. Por su entusiasmo al buscar higos y por siempre darme alientos en los momentos donde no encontrábamos higos!!!!

A mis compañeros del IIES y del DesPlant por sus consejos, risas y frustraciones, las cuales hicieron más agradable este proceso llamado doctorado. A Pedro, Víctor, Marco Tulio, Adrián Calleros, Sergio Nicasio, Edna, Hernán, Laura, Altagracia, Saddan, Polo, Jorge,



Alex, Jacob, Karman, Bambi, Ingrit, Mónica, Whalie, Ulises, Ricardo, Mague, Alde, Salgueiro, Emma.

A todas las personas con las que compartí experiencias y momentos durante el doctorado, es imposible mencionar a todos pero tengo la certeza de que más de uno se sentirá aludido. Muchas gracias.

Al personal administrativo del Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad y al personal de la secretaría de Posgrado de la UNAM, por su amabilidad y disposición en resolver dudas con los trámites.

A Marcela Aragón por ser la mejor amiga en los momentos más difíciles del doctorado, a pesar de la distancia geográfica. Siempre es mejor compartir los momentos agrios contigo. A GRPT por compartir momentos y enseñanzas en la brecha final de este proyecto.

Finalmente, pero no más importante a mi madre Verónica Cárdenas Martínez, por ser ejemplo de tenacidad y fortaleza ante todas las adversidades. Por todo su afecto, respaldo moral y económico en tiempos difíciles. Por siempre estar al pendiente de mi salud y por siempre darme amor infinito. A Lorena, Samanta, Pablo, Martha y Jonathan por su apoyo, gracias. A mis pequeños sobrinos David (Mocho) y Daniel (Mochito) por siempre compartir risas, llantos y berrinches. A Nina por las noches de desvelo y por su apoyo silencioso cuando me hacía falta fuerza.

*Ami familia*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>CAPÍTULO I</b>	7
INTRODUCCIÓN GENERAL	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
OBJETIVO GENERAL	
METODOLOGÍA GENERAL	
REFERENCIAS	
<b>CAPÍTULO II</b>	52
El papel del ostíolo en el mutualismo <i>Ficus</i> -avispa polinizadora, desde una perspectiva morfo-anatómica.	
<b>CAPÍTULO III</b>	71
Tipos de polinización en especies neotropicales de <i>Ficus</i> (Moraceae) y su relación con los caracteres florales y las avispas polinizadoras	
<b>CAPÍTULO IV</b>	127
DISCUSIÓN GENERAL	
CONCLUSIONES	
REFERENCIAS	

## RESUMEN

Las plantas del género *Ficus* (Moraceae) presentan una inflorescencia prácticamente cerrada, denominada sicono, en cuyo interior se encuentran numerosas flores unisexuales. La polinización de los siconos se realiza exclusivamente por avispas de la familia Agaonidae, las cuales ingresan al sicono a través de una abertura apical llamada ostíolo, el cual se encuentra parcialmente cerrado por las brácteas ostiolares. Esta interacción representa la única alternativa reproductiva para las especies interactuantes y se ha considerado como un modelo de mutualismo coevolutivo. Se calcula que el origen de la interacción oscila entre los 60 y 100 Ma. La especificidad del mutualismo se atribuye principalmente a una serie de filtros biológicos entre los que destacan la sincronización del ciclo de desarrollo del sicono y el de las avispas polinizadoras, la emisión de compuestos orgánicos volátiles del sicono que permite que las avispas detecten las flores pistiladas receptivas, así como la presencia del ostíolo, que actúa como barrera física. Por lo tanto, la integración de estos filtros biológicos proporciona un sistema de estudio fascinante para comprender, en conjunto, las adaptaciones mutuas que han contribuido a la especificidad en el mutualismo *Ficus*-avispa Agaonidae.

A pesar de la gran importancia ecológica y evolutiva de esta interacción, en México solo se conocen de manera general los aspectos biológicos que modulan y favorecen el establecimiento de este mutualismo. Por lo tanto, este trabajo tuvo como objetivo general describir las adaptaciones morfo-anatómicas presentes en especies adscritas a dos secciones del género *Ficus* (*Americanae* y *Pharmacosycea*), así como de sus avispas polinizadoras, en la región de Los Tuxtlas, en el estado de Veracruz, México. La tesis está estructurada en cuatro capítulos.

En el capítulo 1, se presenta una introducción general para proveer un marco teórico de las principales características sobre el mutualismo *Ficus*-avispa Agaonidae, una caracterización de la zona de estudio y los métodos generales abordados.

En el capítulo II se describe y analiza la diversidad estructural del ostíolo, durante la fase receptiva del sicono en especies de *Ficus*. Los resultados indican que el ostíolo es una estructura compleja, compuesta por dos zonas principales: las brácteas ostiolares y una zona periostiolar. Se demostró que la variación en la disposición de las brácteas ostiolares en ambas secciones fue más amplia que la reportada en estudios previos. Además, el análisis de las estructuras ostiolares permitió identificar por primera vez, la presencia de dos tipos de glándulas emisoras de compuestos volátiles, las cuales se asume que están implicadas en la atracción de sus avispas polinizadoras. Asimismo, se observaron tricomas y coléteres que posiblemente funcionan para las avispas como señales táctiles y

estructuras lubricantes, respectivamente. En conjunto, la evidencia proporcionada apoya la hipótesis de que el ostíolo es un filtro selectivo en el mutualismo *Ficus*-Agaonidae.

En el capítulo III se evaluó el modo de polinización (activo o pasivo) de cada especie de *Ficus*, a través de observaciones directas e indirectas de la morfología de los siconos y de las avispas polinizadoras. Se demostró que en cada sección se presenta sólo un modo de polinización y que las características florales de los siconos se relacionan con las observadas en las avispas polinizadoras. Específicamente, la sección *Americanae* es polinizada activamente, ya que las flores pistiladas forman un sinestigma (estructura especializada que permite una mayor eficiencia en la polinización) las flores estaminadas tienen una antera y sus avispas polinizadoras, exclusivas del género *Pegoscapus*, tienen corbículas, facilitando el transporte de los granos de polen. Por el contrario, en la sección *Pharmacosycea* se observó una polinización pasiva, cuyos siconos carecen de sinestigma, las flores estaminadas presentan dos anteras y la polinización la realizan avispas del género *Tetrapus*, las cuales carecen de corbículas; de manera que el transporte de los granos de polen se realiza a través del cuerpo de la avispa. La proporción antera/óvulo coincide con el promedio reportado para cada modo de polinización (activa menor de 0.15; pasiva mayor de 0.21). También, se registró la presencia de una sola morfoespecie de avispa polinizadora por especie de *Ficus*, lo cual apoya el paradigma *uno a uno*, el cual propone que cada especie de *Ficus* es polinizada exclusivamente por una especie de avispa Agaonidae.

En el capítulo IV se integra toda la información obtenida en el estudio y se presenta una discusión general de los principales hallazgos y las conclusiones sobre la importancia de estudiar conjuntamente los siconos y las avispas polinizadoras. Como conclusiones, se documenta el papel del ostíolo como filtro selectivo en las secciones neotropicales del género *Ficus*. Además, se detallan las características morfológicas de cada modo de polinización entre *Ficus*-avispa Agaonidae como evidencia de una historia coevolutiva.

## ABSTRACT

Plants of the genus *Ficus* (Moraceae) have a practically closed inflorescence called a syconium, which have numerous unisexual flowers inside. The pollination of the syconia is carried out exclusively by wasps of the Agaonidae family, which enter in the syconium through an apical opening called the ostiole, which is partially closed by the ostiolar bracts when the pistillate flowers are receptive. This interaction, whose origin is estimated between 60-100 Ma., represents the only reproductive alternative for the interacting species and has been considered a model of coevolutionary mutualism. The specificity of the mutualism is mainly attributed to several biological filters, such as the synchronization of the syconium development cycle along with fig wasps' cycle, the emission of volatile organic compounds from the syconium, which allow the wasps to detect receptive pistillate flowers, as well as the presence of the ostiole, acting as a physical barrier. Thus, integrating these biological filters provides a fascinating system to study and for understanding the mutual adaptations that have contributed to the specificity in the *Ficus*-wasp mutualism Agaonidae.

Despite ecological and evolutionary importance of this interaction, the knowledge about the biological aspects that modulate and favor the establishment of this mutualism in Mexico is scarce. Therefore, the general objective of this work was to describe the morpho-anatomical adaptations related to this mutualism in species belonging to two sections of the genus *Ficus* (*Americanae* and *Pharmacosycea*), as well as their fig wasps distributed in the region of Los Tuxtlas, in the Veracruz state, Mexico. The thesis is structured into four chapters.

Chapter I presents a general introduction to provide a theoretical framework of the main characteristics of the *Ficus*-wasp Agaonidae mutualism, a characterization of the study area, and the general methods implemented.

Chapter II described and analyzed the ostiole's structural diversity during the syconium's receptive phase in the *Ficus* species. The results indicated that the ostiole is a complex structure composed of two zones: the ostiolar bracts and a periostiole zone. The variation in the arrangement of the ostiolar bracts in both sections was broader than reported from previous studies. In addition, the analysis of the ostiolar structures allowed us to identify, for the first time, the presence of two types of glands emitting volatile compounds, assumed to be involved in the attraction of their pollinating wasps. Also, were observed trichomes and colleters that possibly function for wasps as tactile signals and lubricating structures, respectively. Altogether, the evidences supports the hypothesis that the ostiole is a selective filter in the *Ficus*-Agaonidae mutualism.

Chapter III evaluates the type of pollination (active or passive) of each *Ficus* species through direct and indirect observations of the morphology of the syconia and the pollinating wasps. It is demonstrated that only one mode of pollination (active or passive) is present in each section and that the floral characteristics of the syconia are related to those observed in the pollinating wasps. Specifically, section *Americanae* is actively pollinated since pistillate flowers form a synstigma (a structure that allow a pollination), more efficient, staminate flowers have one anther, and their exclusive fig wasps of the genus *Pegoscapus* have pollen pocket, enhancing the transport of the pollen grains. In contrast, passively pollinating is found in section *Pharmacosycea*, which produces syconia without synstigma, staminate flowers with two anthers, and pollination is carried out by wasps belonging only to the genus *Tetrapus*, those who lack of corbiculae were not observed, with pollen grains transportation throughout the body wasps. Furthermore, the anther-to-ovule ratio coincides with the average reported for each pollination mode (active minor of 0.15, passive more than 0.21). Also, the presence of only one pollinating wasp morphospecies per *Ficus* species was recorded, supporting the one-to-one paradigm, which proposes that each *Ficus* species is pollinated exclusively by one species of Agaonidae wasp.

Chapter IV integrates all the information obtained in the study and presents a general discussion of the main findings and conclusions on the characteristics and importance of studying syconia and pollinating wasps. In conclusion, the role of the ostiole as a selective filter is documented in both neotropical sections of the genus *Ficus*. In addition, the morphological characteristics of each mode of pollination between *Ficus* and Agaonidae wasps are detailed as evidence of a coevolutionary history.

## CAPÍTULO I





*Ficus isophlebia* creciendo en un potrero en la región de Los Tuxtlas, Veracruz, México.  
Fotografía: Nadia Castro Cárdenas

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### 1. Presentación del estudio

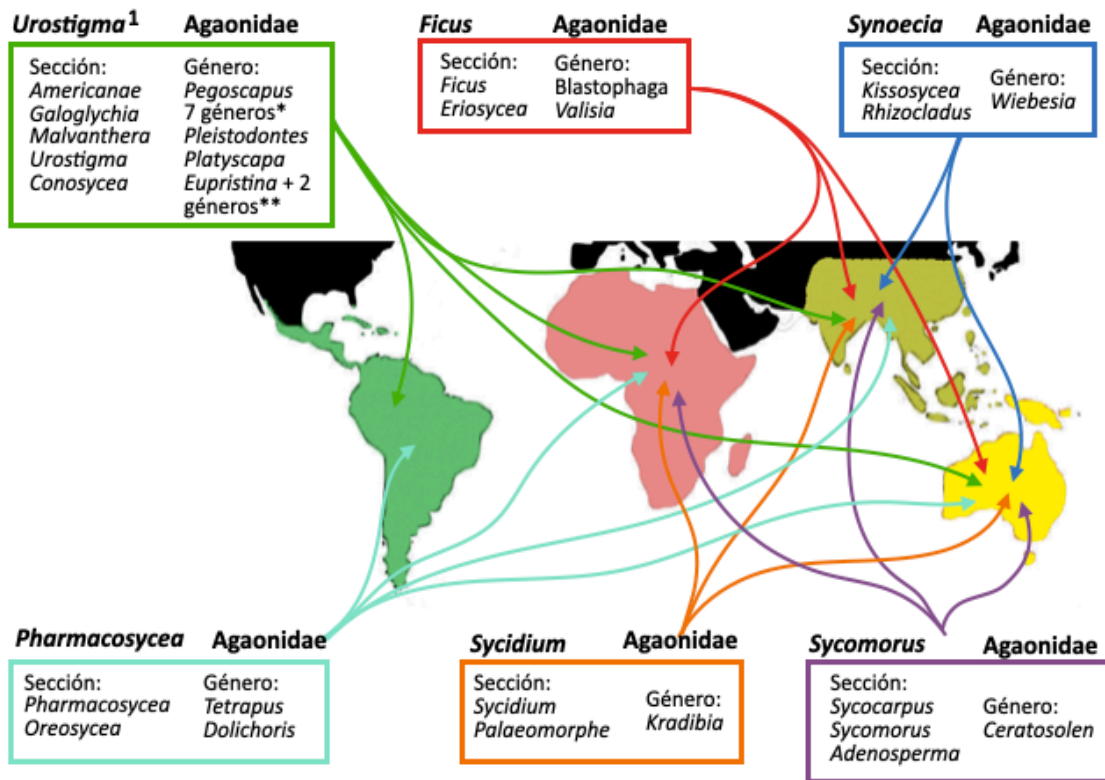
La presentación floral (tamaño, número y arreglo de las flores) influye en la visita de los polinizadores y puede ser un factor determinante del éxito reproductivo (Ohashi y Yahara, 2001). Por lo general, los polinizadores son atraídos por despliegues florales masivos o por inflorescencias que contienen más flores (Harder y Johnson, 2005). Lo anterior podría reflejar una mayor facilidad entre los polinizadores para detectar este tipo de arreglos florales, pero también puede ser indicador de la cantidad, calidad y tipo de recompensas que ofrecen y, en consecuencia, influir en la búsqueda de alimento y en el éxito reproductivo de los polinizadores (Faegri y van der Pijl, 1979; Endress, 1994). Esto puede ser más evidente en los sistemas de polinización-oviposición (*nursery pollination*), donde se proporcionan las recompensas florales o se intercambian por sitios de cría, es decir, los polinizadores ovipositan dentro de las estructuras reproductivas de las plantas cuando polinizan las flores y, a menudo, esta interacción es altamente específica (Dufaÿ y Anstett, 2003; Pellmyr, 2003; Hossaert-McKey et al., 2010; Suleman et al., 2013; Souto-Vilarós et al., 2018).

Actualmente sólo se conocen 17 sistemas de polinización-oviposición (Hossaert-McKey et al., 2010; Nunes et al., 2018). La interacción entre las especies del género *Ficus* (Moraceae) y sus avispas polinizadoras, de la familia Agaonidae, es uno de estos sistemas y de los pocos reportados de mutualismo estricto (Weiblen, 2002; Kato et al., 2003; Pellmyr, 2003; Kawakita, 2010). Esta interacción es compleja, debido a la presentación floral en una inflorescencia tipo urna y al reconocimiento específico que debe existir entre ambos interactuantes (Galil y Eisikowitch, 1968; Smith y Bronstein, 1996; Weiblen, 2002). La especificidad del mutualismo se debe, principalmente, a una serie de filtros biológicos, entre los que destacan los compuestos orgánicos volátiles (VOCs-volatile organic compounds), el ostiolo (entrada apical del sicono cubierta por brácteas) y la coincidencia de los ciclos de vida de los interactuantes (Weiblen, 2002; Cook y Segar, 2010; Hossaert-McKey et al., 2010; Farré-Armengol et al., 2013).

La integración de los llamados filtros biológicos de *Ficus* proporciona un sistema fascinante de estudio para comprender cómo el conjunto de estructuras clave, tanto en los siconos, como en las avispas polinizadoras, han contribuido a la especificidad en este mutualismo obligado. Por lo tanto, el presente estudio se centra en describir la morfoanatomía de esas estructuras clave en el mutualismo. En las siguientes secciones se describen los aspectos morfológicos más destacados que promueven la especificidad en la interacción mutualista *Ficus*-avispa Agaonidae. Para cada sección, se revisó literatura correspondiente de los factores morfológicos, ecológicos y químicos que pudieran estar favoreciendo el reconocimiento específico planta-polinizador.

## **2. Género *Ficus***

*Ficus* (Moraceae) es uno de los géneros con más especies dentro de las angiospermas, con cerca de 800 especies (Berg, 1989; Frodin, 2004; POWO, 2020) y es el cuarto más diverso de árboles tropicales y subtropicales dentro de las angiospermas (Beech et al., 2017). El género está dividido en seis subgéneros y 19 secciones, que se distribuyen en las partes tropicales de África, América, Asia y Australia (Fig. 1) (Berg y Corner, 2005; Pederneiras et al., 2015). La sinapomorfía para reconocer al género es su peculiar inflorescencia denominada sicono o higo, el cual es único dentro de las plantas con flores (Berg, 1989).



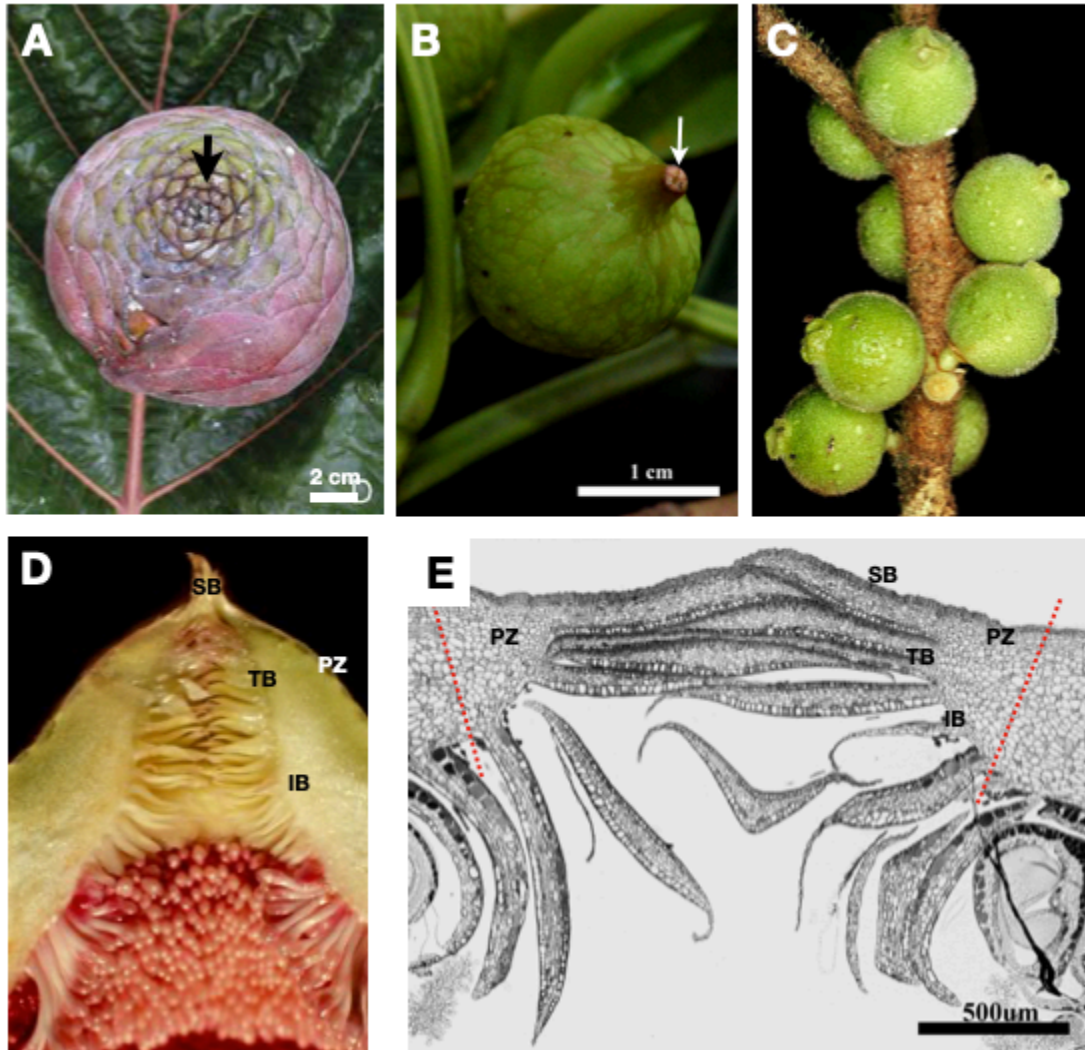
**Figura 1. Clasificación y distribución del género *Ficus*.** El género *Ficus* se encuentra dividido en los subgéneros *Ficus*, *Pharmacosycea*, *Sycidium*, *Sycomorus*, *Synoecia* y *Urostigma* (Cruaud et al., 2012). Se detallan las secciones más comunes y los géneros de avispas polinizadoras de la familia Agaonidae asociadas a cada sección. **1**= Nombre actualmente aceptado *Spherosuke* (Pederneiras et al., 2015). \**Agaon*, *Alfonsiella*, *Allotriozoon*, *Courtella*, *Elisabethiella*, *Niegeriella* y *Paragaon*. \*\**Deilagaon* y *Waterstoniella*. (Ilustraciones digitales por Nadia Castro-Cárdenas).

## 2.1. El sicono

El sicono es una inflorescencia altamente modificada, que semeja una urna, que contiene en su interior numerosas flores unisexuales y se comunican con el exterior por un orificio apical de la inflorescencia denominado ostíolo (Fig. 2; Janzen, 1979; Verkerke, 1989). El ostíolo generalmente es pequeño y está formado por brácteas ostiolares y una zona periostiolar (Ramírez, 1974; Verkerke, 1989; los detalles se describirán en el Capítulo 2). Generalmente, el ostíolo puede encontrarse superficialmente, a nivel de la epidermis externa de la inflorescencia, pero también puede estar hundido (e. g. subg. *Synoecia*) o

elevado (*e. g.* sect. *Americanae*, *F. baeuerlenii* King) con respecto a la epidermis del sicono (Berg y Corner, 2005; Capítulo 2).

Las brácteas ostiolares se han clasificado en tres tipos (superficiales, transicionales e internas); por su posición en el sicono y dependiendo de las secciones del género, presentan características particulares (Ramírez, 1974; Verkerke, 1989; Machado et al., 2013; Capítulo II). Las brácteas superficiales generalmente se encuentran entrelazadas, y en ocasiones pueden ser tan largas que se flexionan hacia del interior del sicono, y en conjunto con los otros tipos de brácteas, conforman un orificio en forma de hendidura bilabiada o trilabiada (sect. *Galoglychia*, *Stilpnophyllum*) o ser cortas y entrelazadas, formando ostíolos con forma circular (subg. *Urostigma*, *Sycidium* y *Sycocarpus* y sect. *Americanae*, *Pharmacosycea*) (Ramírez, 1974; Verkerke, 1989; Berg y Corner, 2005). Sin embargo, existen casos en que las brácteas ostiolares no se entrelazan (*e. g.* subg. *Sycidium*, *Ficus* y las especies *F. insipida*, *F. dammaropsis*, *F. satterthwaitei*, *F. uncinata*) (Verkerke, 1989; Berg y Corner, 2005). Recientemente, se ha propuesto que existe una zona periostiolar, que rodea a las brácteas superficiales y comparte características morfológicas con éstas, por lo que se propone su incorporación a la caracterización del ostíolo (Castro-Cárdenas et al., 2022; Capítulo 2).

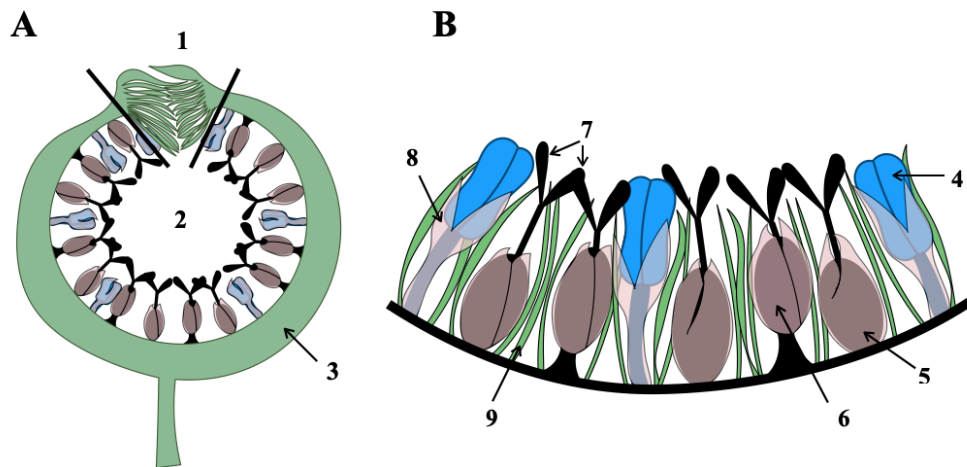


**Figura 2.** Siconos de *Ficus*. **A)** *Ficus dammaropsis* Diels. (Subg. *Sycomorus*). **B)** *F. insipida* Willd. (sect. *Pharmacosycea*). **C)** *F. trigona* L.f. (sect. *Americanae*). Ostiolo elevado. **D)** *F. pumila* L. (subg. *Synoecia*). **E)** *F. americana* Aubl. (sect. *Americanae*). **A)** Ostiolo hundido. **B-C)** Ostiolo elevado. **D-E)** Cortes longitudinales del ostiolo, se aprecian las brácteas superficiales (SB), transicionales (TB) y las internas (IB) rodeadas de la zona periostiolar (PZ). (Fotografías: A, Weiblen G (Ezedin y Weiblen, 2019); B, E, Castro-Cárdenas en este trabajo; C, Sasaki D (<https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:853876-1>); D, van Noort S (<http://www.figweb.org>).

Anatómicamente, la pared del sicono generalmente está formada por varias capas de células parenquimatosas, en las que se pueden encontrar laticíferos, células con taninos o células esclerenquimáticas (Bajjnath y Naicker, 1989; Verkerke, 1989; Fan et al., 2019). En ocasiones, la epidermis externa puede estar densamente cubierta por tricomas, tanto glandulares, como no glandulares (Verkerke, 1989). En algunos siconos se presentan

manchas con agrupaciones de estomas y, en apariencia, son diferentes a los que se pueden encontrar en las hojas (Verkerke, 1989). En ciertas especies se encuentran células esclerenquimáticas en dos capas o aparecen de forma difusa a lo largo del receptáculo (Verkerke, 1989; Berg y Corner 2005), cuya función, posiblemente, sea una barrera física al estar lignificadas y así obstaculizar la oviposición de avispas parásitas y no polinizadoras (Ghara et al., 2011; Fan et al., 2019).

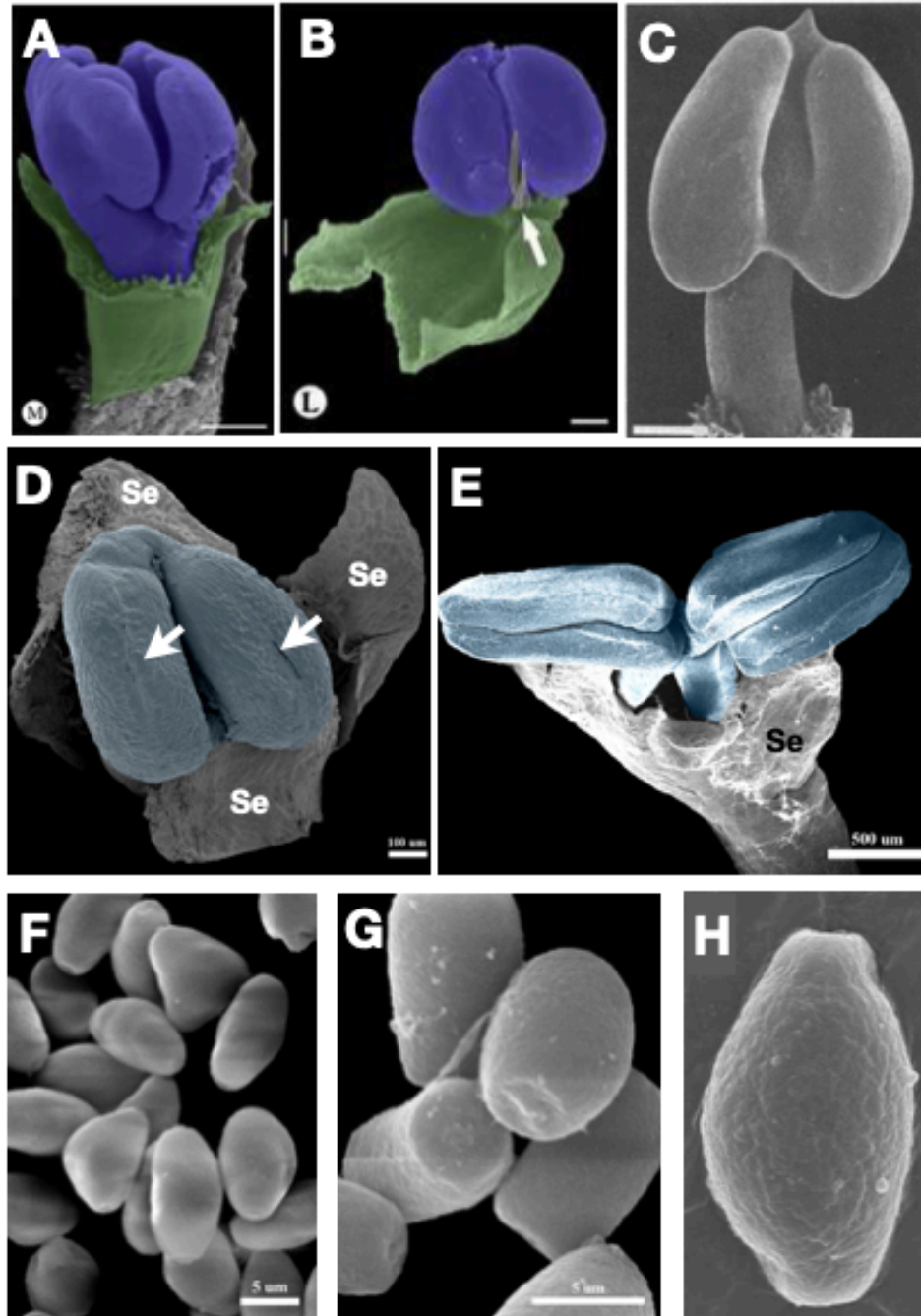
Al interior del sicono se encuentran flores unisexuales (pistiladas, estaminadas y neutras), brácteas interflorales y tricomas (Verkerke, 1989; Fig. 3). El número de flores dependerá del tamaño del sicono, ya que en los pequeños se reconocen desde diez flores (*F. oleifolia*), en medianos pueden encontrarse de 5,000-7,000 (*F. pumila*; *F. drupaceae*, *F. mauritiana*), mientras que aquellos muy grandes llegan a albergar hasta 21,600 flores (*F. sakalavarum*; Kjellberg et al., 2001 apéndice electrónico). El perianto generalmente es membranáceo y el número de sépalos varía de tres a seis, dependiendo de las especies. Los sépalos pueden ser libres o connados, con o sin tricomas, blanquecinos o en algunos grupos tener tonalidades rojizas (Berg y Corner 2005).



**Figura 3.** Morfología del sicono de *Ficus*. **A)** Esquema general de la morfología del sicono de especies monoicas. **1**, ostiolo; **2**, cavidad ostiolar; **3**, pared del receptáculo del sicono. **B)** Distribución de las flores al interior del sicono. **4**, flor estaminada; **5**, flor pistilada y séstil de estilo largo; **6**, flor pistilada de estilo corto; **7**, estigmas; **8**, sépalos; **9**, brácteas interflorales. (Ilustraciones digitales por Nadia Castro-Cárdenas).

Las flores estaminadas generalmente consisten en uno o dos estambres, con anteras introrsas, rodeadas de un perianto simple formado de sépalos (Fig. 4A-E). Las flores se pueden distribuir en una o más hileras cercanas al ostíolo (sect. *Sycomorus*, *Sycidium*, *Oreosyce* y subsect. *Urostigma*) o estar dispersas entre las flores pistiladas (subg. *Urostigma* y sect. *Pharmacosyce*) (Berg y Corner, 2005; Pederneiras et al., 2018). El número de flores por sicono varía considerablemente, pero se estima que cerca del 10 % del total de flores en el sicono son estaminadas en especies monoicas (Kjellberg et al., 2001). En su mayoría, las flores estaminadas son pediceladas, pero en ocasiones pueden ser sésiles (Fig. 4B), como en las especies de la sect. *Rhizocladus* (Verkerke, 1989; Berg y Corner, 2005). En algunas especies se presentan pistilodios (e. g. sect. *Paleomorphe*, subg. *Sycidium*), los cuales no forman semillas, ni son parasitadas por las avispas polinizadoras (Berg y Corner, 2005). La dehiscencia de las anteras se produce generalmente por hendiduras longitudinales o raramente transversales (sect. *Malvanthera*), aunque no todas las especies presentan una línea de dehiscencia (Verkerke, 1989; Fig. 4B-E). La antesis de las flores estaminadas coincide con la maduración de las semillas (Verkerke, 1989; Berg y Corner, 2005; Basso et al., 2014). Los granos de polen miden menos de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro, con dos o tres poros, pero generalmente son biporados. Los granos son cilíndricos, esféricos o elipsoidales (Ibarra-Manríquez y Martínez-Hernández, 1997; Wang et al., 2014; Liu et al., 2017; Delgado-Pérez et al., 2020), con ornamentaciones psiladas, ruguladas o granulada-ruguladas (Wang et al., 2014; Fig. 4F-H).





**Figura 4. Flores estaminadas y granos de polen de *Ficus*.** **A)** *F. racemosa* L. **B)** *F. religiosa* L. **C)** sección *Galoglychia*. **D)** *F. petiolaris* Kunth. **E)** *F. yoponensis* Desv. **F)** *F. colubrinae* Standl. **G)** *F. insipida* Willd. **H)** *F. ischnopda* Miq. **A)** Anteras introrsas, rodeadas de sépalos (Te). **B-C)** Anteras sin líneas de dehiscencia **D)** Antera con tenues líneas de dehiscencia (flechas) **E)** Anteras iniciando dehiscencia. **F)** Granos de polen tri y biporados **G)** Granos de polen cilíndricos y biporados. **H)** Grano de polen elipsoide. (Fotografías tomadas de: A, B: Basso-Alves et al., 2014; C, Verkerke 1989; D-G, Castro-Cárdenas en este estudio; H, Wang et al., 2014).

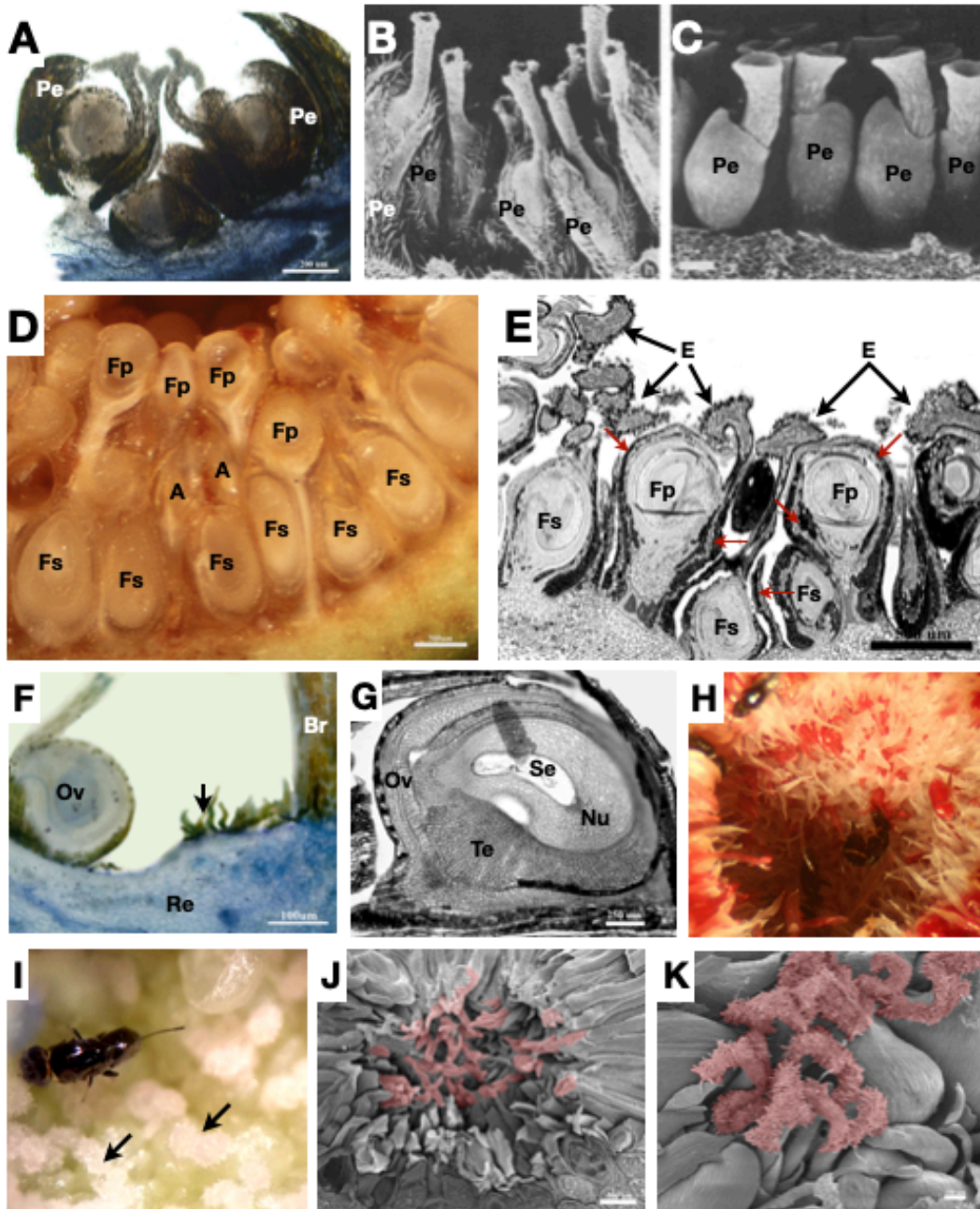
Las flores neutras son estériles; presentan un perianto bien desarrollado, similar a las flores estaminadas, en ocasiones presentan un estambre o un gineceo poco desarrollado. A menudo se distribuyen cerca de las brácteas ostiolares, pero también pueden estar dispersas en el sicono (Berg y Corner, 2005); en el subg. *Synoecia* son conspicuas. Por las características que presentan se ha sugerido que pudieron haber sido flores estaminadas (Verkerke, 1989), ya que comúnmente se encuentran en los siconos con flores pistiladas en las especies dioicas (Berg y Corner, 2005).

Las flores pistiladas tienen un ovario unilocular, que puede o no presentar un pedicelo corto o largo, y en su mayoría están rodeados por sépalos (Fig. 5A-E). Los sépalos son libres o connados y rodean al ovario (Fig. 5B, C). En la sect. *Kissosyceae* (subg. *Synoecia*) pueden llegar a ser filamentosos o pueden estar reducidos formando una copa corta con bordes estrechos (*F. schwarzi*) (Verkerke, 1989; Berg y Corner, 2005) o no presentar perianto (e. g. *F. uncinata* -Berg y Corner, 2005). El color y la forma del perianto de las flores femeninas tiene importancia taxonómica (Fig. 5H; Verkerke, 1989). El estilo puede estar en posición central o lateral, con diferentes longitudes entre las flores a lo largo de la inflorescencia (Fig. 5E, F, G). En especies con siconos monoicos, el estilo difiere de longitud, por lo que se distinguen flores corto-estiladas y largo-estiladas (Fig. 5D, E; Jousselin et al., 2003). Este último tipo de flores son generalmente sésiles, mientras que las corto-estiladas son siempre pediceladas y con ovarios ligeramente más largos (Berg y Corner, 2005).

Las diferencias entre el largo del estilo en ambos morfos florales pistilados hacen que los estigmas estén a la misma altura (Fig. 5 I-K). Los estigmas tienen distintas formas y pueden ser secos (Verkerke, 1989) o húmedos (Delgado-Pérez et al., 2022). Generalmente se tienen dos ramas estigmáticas, que pueden ser: i) filiformes a subuladas (subg. *Pharmacosyceae*; sect. *Galoglychia* y en *F. palmata*), ii) presentar solo una rama estigmática (sect. *Galoglychia*, particularmente en las especies africanas (Berg y Wiebes, 1992), y iii) infundibuliformes y con papilas estigmáticas cortas (sect. *Sycidium*, *Sycomorus*, *Neomorpha* y *Sycocarpus*) (Verkerke, 1989).

Cuando los estigmas están muy próximos forman una estructura denominada sinestigma (Fig. 5I, K). El sinestigma puede ser una estructura continua dentro del sicono, compuesta por todos los estigmas de todas las flores femeninas o estar en contacto de dos o más estigmas como en el subg. *Spherosuke* y las sect. *Americanae*, *Conosycea*, *Galoglychia*, *Sycidium*, *Sycocarpus* y *Sycomorus* (Verkerke, 1989; Kjellberg et al., 2001; Jousselin et al., 2003; Basso-Alves et al., 2014; Deng et al., 2015; Teixeira et al., 2018, 2020). El grado de cohesividad estigmática está determinado por: i) la proximidad de las papilas estigmáticas (Teixeira et al., 2020), ii) el número de estigmas involucrados (Jousselin y Kjellberg, 2001; Zhang et al., 2009; Teixeira et al., 2018) y iii) la presencia de tricomas en los estilos (Verkerke, 1987; Teixeira et al., 2018). Cabe destacar que el sinestigma desempeña un papel fundamental en la polinización, debido a que se asegura la producción de semillas, al actuar como una superficie común para la germinación de polen, el crecimiento y la competencia de los tubos polínicos hacia todos los ovarios disponibles (Jousselin y Kjellberg, 2001; Teixeira et al., 2020), por lo que tiene un papel análogo al compitum presente en algunas angiospermas de temprana divergencia (Amborellaceae, Austrobaileyaceae, Illiciaceae, Nymphaeaceae, Schisandraceae; Endress, 2011).

El ovario contiene un único óvulo, hemianatópro o anatópro, bitégmico y crasinucelado (Fig. 5 G; Verkerke, 1989). En etapa receptiva los ovarios están distribuidos en dos niveles, debido a la longitud del estilo y pedicelo (Verkerke, 1989), como un posible mecanismo para maximizar el espacio durante el desarrollo de las semillas y de las avispas polinizadoras (Janzen, 1979; Verkerke, 1989; Jousselin et al., 2001). En especies dioicas, las flores pistiladas de los siconos masculinos no producen semillas, aunque los óvulos estén bien desarrollados, debido a que en estas flores se desarrollarán las avispas polinizadoras (Berg y Wiebes, 1992; Cook y Rasplus 2003; Berg y Corner, 2005).



**Figura 5. Flores pistiladas de *Ficus*.** **A)** *F. americana* Aubl. **B)** *F. asperifolia* Miq. **C)** subg. *Sycocarpus*. **D)** *F. obtusifolia* Kunth. **E)** *F. isophlebia* Standl. **F)** *F. americana* Aubl. **G)** *F. yoponensis* Desv. **H)** *F. insipida* Willd. **I)** *F. tuerckheimii* Standl. **J)** *F. apollinaris* Dugand. **K)** *F. petiolaris* Kunth. **A-C)** Flores pistiladas, se observa el perianto (Pe) que rodea al ovario. **D)** Distribución espacial de las flores. Se aprecian las flores pediceladas (Fp), las flores sésiles (Fs) y las flores estaminadas (A). **E)** Corte histológico de las flores pistiladas pediceladas (Fp) y sésiles. Los estigmas (E) están al mismo nivel. **F)** La flor pistilada (corte longitudinal) solo presenta un ovario (Ov). En la pared interna del receptáculo (Re) con tricomas (flecha), muy próximos a las brácteas (Br). **G)** Corte longitudinal del ovario. El saco embrionario (Se)

se encuentra rodeado por la nucela (Nu). Sólo se aprecia un tegumento (Te). **H-I)** Avispas polinizadoras al interior del sicono. **H)** Estigmas de color blanco y los tépalos de color rosado. **I)** Se aprecian los estigmas muy próximos (flechas). **J)** Vista superficial al interior del sicono. Los estigmas (rosados) se encuentran al mismo nivel formando un sinestigma. **K)** Porción del sinestigma (en rosa) lineal. (Fotografías tomadas: A, D-K, Castro-Cárdenas N; B-C, Verkerke, 1989).

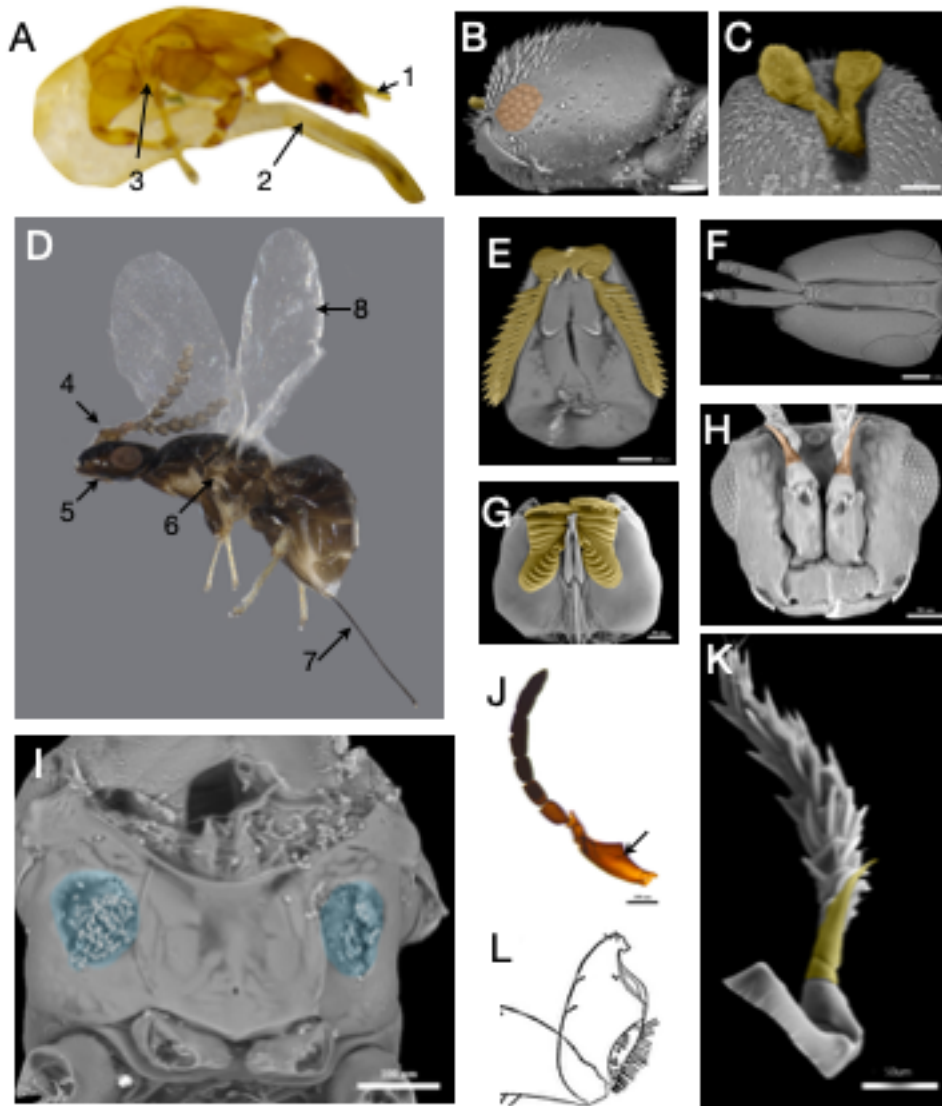
Las brácteas interflorales se encuentran dispersas entre las flores pistiladas y estaminadas de las especies monoicas, con excepción de las especies de la sect. *Urostigma* y *Sycomorus* (Verkerke 1989). Este tipo de brácteas son estructuras alargadas, con pocas capas de células y con varias formas, se originan en la pared interna del sicono (Bajinath y Naicker, 1989; Verkerke, 1989). De las estructuras que se encuentran en el interior del sicono, son las primeras en diferenciarse y en etapas tempranas del desarrollo del sicono protegen los primordios florales. Sólo durante la fase receptiva (fase B o pistilada, p. 26), las brácteas interflorales tiene una altura menor que las flores (Bajinath y Naicker, 1989; Verkerke, 1989; Berg y Corner, 2005). Al interior del sicono se presentan tricomas de apariencia secretora, entre las brácteas interflorales y los sépalos (Bajinath y Naicker, 1989; Delgado-Pérez et al., 2020); sin embargo, su función aún es desconocida.

### **3. Avispas polinizadoras del género *Ficus***

Las avispas que polinizan a los *Ficus* pertenecen a la familia Agaonidae (Chalcidoidea: Hymenoptera), que comprende aproximadamente 20 géneros. Se han descrito 356 especies, pero se estima que su riqueza puede llegar a las 1,000 especies (Lopez-Vaamonde et al., 2009; Cruaud et al., 2010). Cada especie de avispa Agaonidae está asociada con una sola especie de *Ficus*, aunque existen excepciones al respecto (Molbo et al., 2003; Machado et al., 2005; Su et al., 2008; Suleman et al., 2014).

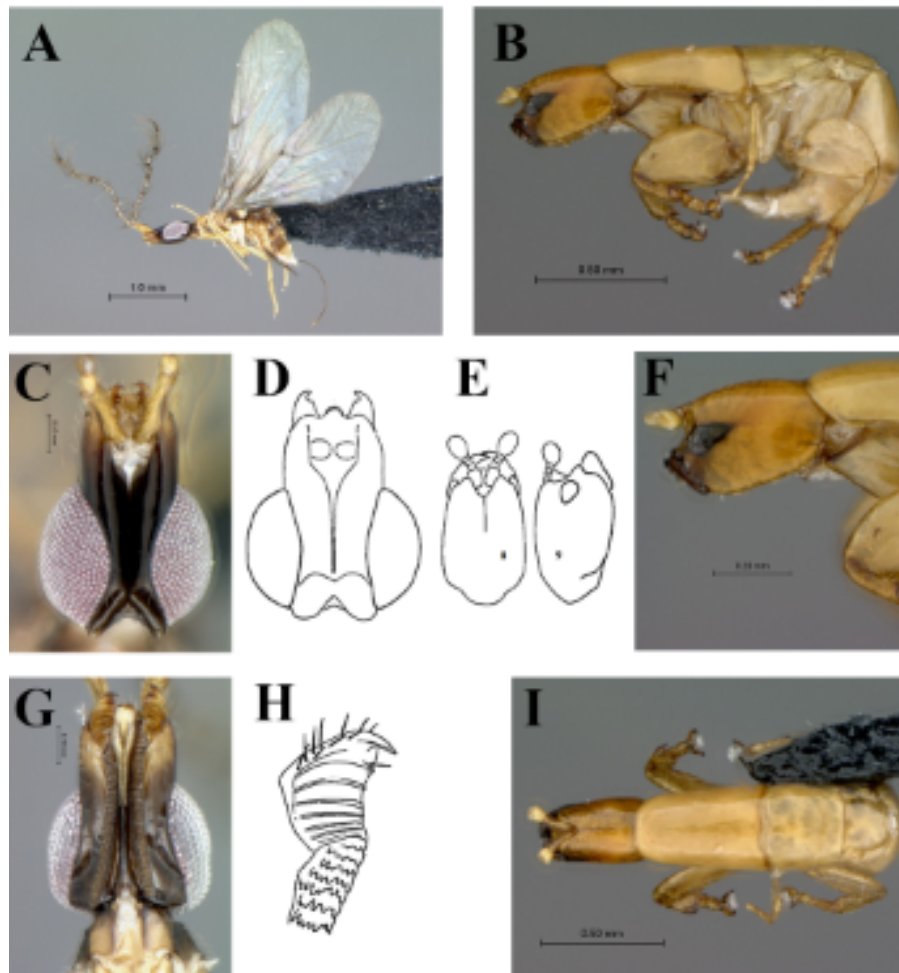
Las avispas Agaonidae adultas exhiben un alto grado de dimorfismo sexual (Figs. 6A, B; 7A, B). Las hembras se caracterizan por tener una cabeza más larga que ancha; sin embargo, en el género *Agaon* esta relación es inversa (Fig. 7C, D); presentan un sólo

apéndice mandibular, con una hilera (lamela) de finos dientes (Figs. 7 E, G; 8G, H). La cabeza tiene una forma acanalada y en ella se localizan las antenas (Figs. 6F; 7C, D). El tercer segmento de las antenas se encuentra transformado en la parte apical, es una proyección en forma de diente (Fig. 6H, J, K). En algunas especies, sobre el mesosoma, se presentan estructuras denominadas corbículas (Fig. 6I). Las patas delanteras, en ocasiones, presentan estructuras para el transporte del polen, particularmente en la coxa (peines coxales) (Fig. 6L). Los machos son más pequeños que las hembras, son ápteros, con reminiscencias de ojos y carecen de ocelos (Figs. 6A-C; 7A-B, E, F). Las antenas presentan un número reducido de segmentos y generalmente se encuentran ubicados en la parte frontal de la cabeza (Figs. 6B; 7E, F, I). Las patas mesotorácicas son más reducidas y las tibias son cortas y espinosas (Figs. 6A; 7I). El gáster termina en un tubo con la genitalia, el cual es casi la mitad del tamaño del cuerpo (metasoma telescópico. Figs. 6A; 7B).



**Figura 6. Caracteres diagnósticos de Agaonidae.** **A-C)** Avispas polinizadoras machos. **A)** *Pegoscapus* sp. (**1.** Antenas reducidas; **2.** Metasoma telescópico; **3.** Segundo par de patas reducido). **B-C)** Macho de *Tetrapus* sp. Vista lateral de la cabeza. **B)** Acercamiento a la reminiscencia del ojo (naranja) y posición de las antenas (amarillo). **C)** Acercamiento a las antenas (amarillo) en posición apical. **D-L)** Avispas polinizadoras hembras. **D)** Hembra de *Pegoscapus* sp. (**4.** Antenas; **5.** Mandíbula; **6.** Corbícula en el mesosoma; **7.** Ovipositor; **8.** Ala). **E-G, L)** *Tetrapus* sp. **E)** Aparato mandibular (amarillo). **F)** Vista apical de la cabeza acanalada, se observa la inserción de las antenas en la parte media de la cabeza (flecha). **G)** Aparato mandibular (amarillo). **H)** Vista ápical de la cabeza. Se detalla la modificación del tercer segmento antenal (café). **G-I, K)** *Pegoscapus* sp. **I)** Vista apical de las corbículas en el mesosoma. **J)** Acercamiento de una antena. Se observa la modificación del tercer segmento (flecha). **L)** Esquema de la ubicación de una corbícula coxal. **K)** Acercamiento de una antena. Se observa la modificación del tercer segmento (amarillo). (Fotografías: A-K, Castro-Cárdenas N; L, Ramírez 1969).

La familia Agaonidae (*sensu* Rasplus et al., 1998) es un grupo monofilético (Herre et al., 1996; Rasplus et al., 1998; Gibson, 2003) y se proponen dos sinapomorfías constantes (Bouček, 1993): i) la presencia de un apéndice mandibular, con láminas ventrales o hileras de dientes (Figs. 7E, G; 8G-H) y ii) un metasoma telescópico en los machos (Figs. 7B; 8B). Otros caracteres propuestos son el tercer segmento antenal transformado (ausente o reducido en los géneros *Tetrapus*, *Deilagaon* y algunas especies de *Liporrhopalum*), y una cabeza acanalada, excepto en *Agaon*, *Courtella* y *Pleistodontes* (Bouček, 1993).

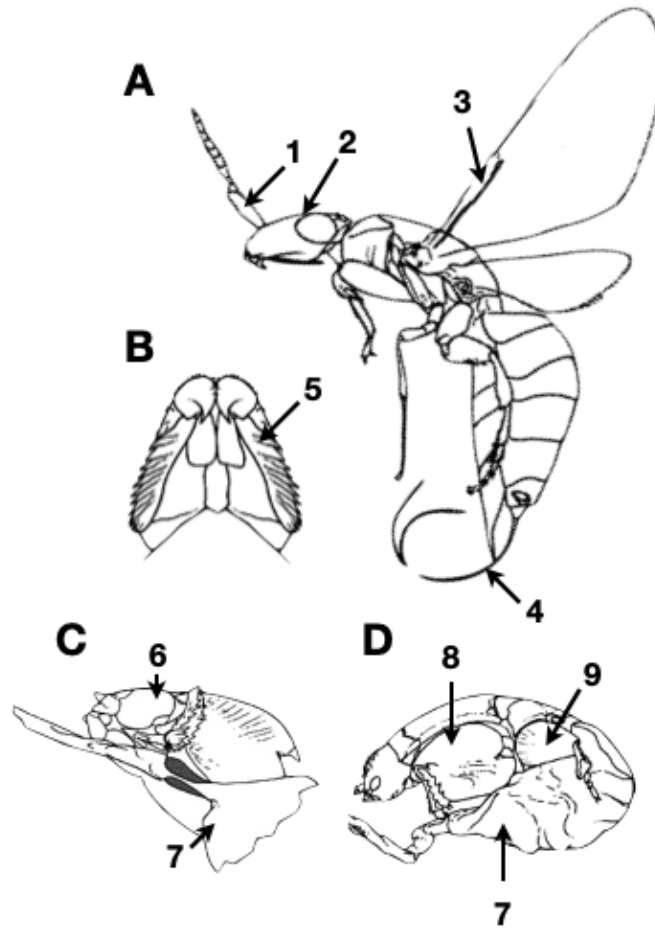


**Figura 7. Avispas polinizadoras de *Agaon kiellandi* Wiebes. A) Hembra B) Macho C-D) Vista apical de la cabeza, la cual es más ancha que larga. Los ojos ocupan la mayor proporción de la cabeza. E) Vista apical de la cabeza del macho. Se aprecian las antenas reducidas. F) Vista lateral de la cabeza del macho. G) Vista ventral de la cabeza, se aprecia el aparato mandibular. H) Esquema de los dientes (lamela). I) Vista dorsal del macho. Se observa el segundo par de patas poco desarrollado. (Fotografías: A, B, C, F, G, I: van Noort S. [www.figweb.org], D, E, H: Wiebes 1994).**



A pesar de que se ha demostrado que Agaonidae es un grupo monofilético, las relaciones infragenéricas no están resueltas en su totalidad (Bouček, 1993; Rasplus et al., 1998; Lopez-Vaamonde et al., 2009; Cruaud et al., 2010). La hipótesis filogenética hasta el momento sugiere cuatro subfamilias: i) Tetrapusinae (*Tetrapus*), ii) Kradibiinae (*Ceratosolen* y *Kradibia*), iii) Blastophaginae (*Dolichoris*, *Blastophaga* y *Wiebesia*) y iv) Agaoninae (*Alfonsiella*, *Allotriozoon*, *Courtelia*, *Deilagaon*, *Elisabethiella*, *Eupristina*, *Nigeriella*, *Pegoscapus*, *Platyscapa*, *Pleistodontes* y *Waterstoniella*) (Cruaud et al., 2010). Las cuatro subfamilias de avispas polinizadoras se encuentran relacionadas con subgéneros o secciones de *Ficus* (Fig. 1), cuyos siconos sirven como sitios de cría para que se desarrollen sus larvas (Rønsted et al., 2008; Jansen-González et al., 2012).

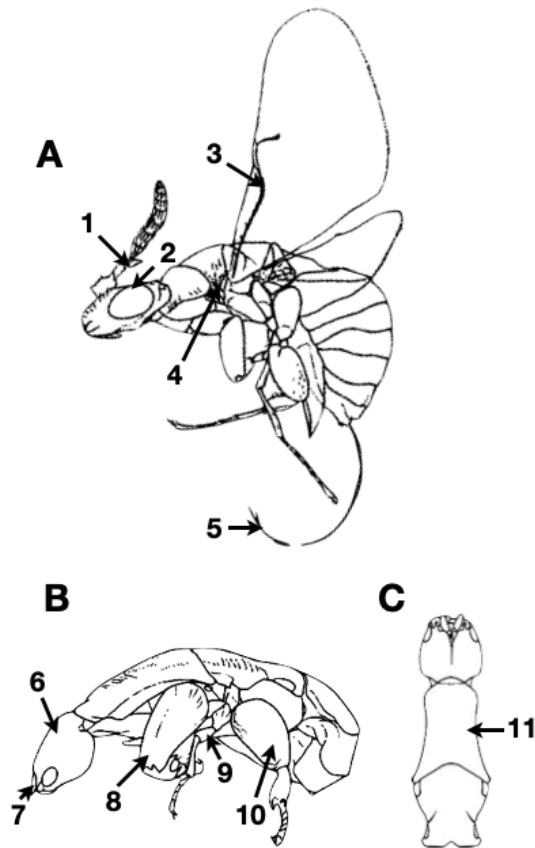
En América se reconocen dos géneros de avispas polinizadoras, *Tetrapus* y *Pegoscapus* (Ramírez 1970b; Wiebes 1995; Rasplus y Soldati, 2005). El primero de ellos fue descrito por Mayr, en 1885 y hasta la fecha sólo se han sido descrito siete especies, pero se reconocen que existen un vacío en la taxonomía del grupo (Ramírez, 1974). Las especies hospederas se encuentran en la sección *Pharmacosycea* (subg. *Pharmacosycea*). El género se caracteriza porque las hembras miden aproximadamente 2 mm, presentan una cabeza oblonga, más larga que ancha, un apéndice mandibular, con dos columnas longitudinales de dientes grandes; en los machos las antenas son más o menos claviformes, con un mesonoto distinto, separado de las placas metanotales y del propodeo, que también está separado (Fig. 8; Wiebes, 1995). En el caso de las hembras, Ramírez (1974) indica que carecen de corbículas (estructuras de las avispas hembra para colectar polen).



**Figura 8. Caracteres diagnósticos de *Tetrapus* Mayr.** **A)** Avispa hembra. **B)** Mandíbulas con apéndices planos y alargados presentando dientes. **C-D)** Avispa macho. **C)** Vista ventral. Se observa la longitud del mesosoma telescópico. **D)** Vista lateral. Se observa que las patas medias están casi ausentes o reducidas. **1.** Antena **2.** Cabeza. **3.** Vena marginal segmentada. **4.** Ovipositor **5.** Apéndice laminar con dientes. **6.** Cabeza. **7.** Mesosoma telescópico. **8.** Patas delanteras. **9.** Patas traseras. (Ramírez, 1970; Wiebes, 1995).

El género *Pegoscopus* fue descrito por Cameron 1906 y comprende 46 especies descritas hasta la fecha, sin embargo, también faltan bastantes especies por describir debido a que se asocia cada especie de avispa a una especie de *Ficus*. El género se distribuye en la región tropical de Florida, y desde México hasta Argentina (Wiebes, 1995). Las especies hospederas de este género pertenecen a la sección *Americanae* (subg. *Spherosuke*). Las especies se caracterizan porque las hembras miden 1.8 mm

aproximadamente, tienen una cabeza tan larga como ancha, el apéndice mandibular tiene varias lamelas ventrales sin dientes; los machos presentan antenas delgadas, sin ser clavadas, el mesotono se fusiona con el metanoto y se encuentra completamente separado del propodeo (Fig. 9; Wiebes, 1995). Las hembras presentan corbículas coxales y esternales (Ramírez, 1974).



**Figura 9. Caracteres diagnósticos de *Pegoscapus Cameron*. A) Avispa hembra B-C) Avispa macho. B) Vista lateral. C) Vista dorsal, se aprecian el mesotono que se fusiona con el metanoto. 1. Antena 2. Cabeza. 3. Vena marginal. 4. Corbícula 5. Ovipositor 6. Cabeza. 7. Antena reducida. 8. Patas delanteras. 9. Patas medias. 10. Patas traseras. 11. Mesotono fusionado con el metanoto (Ramírez, 1970; Wiebes, 1995).**

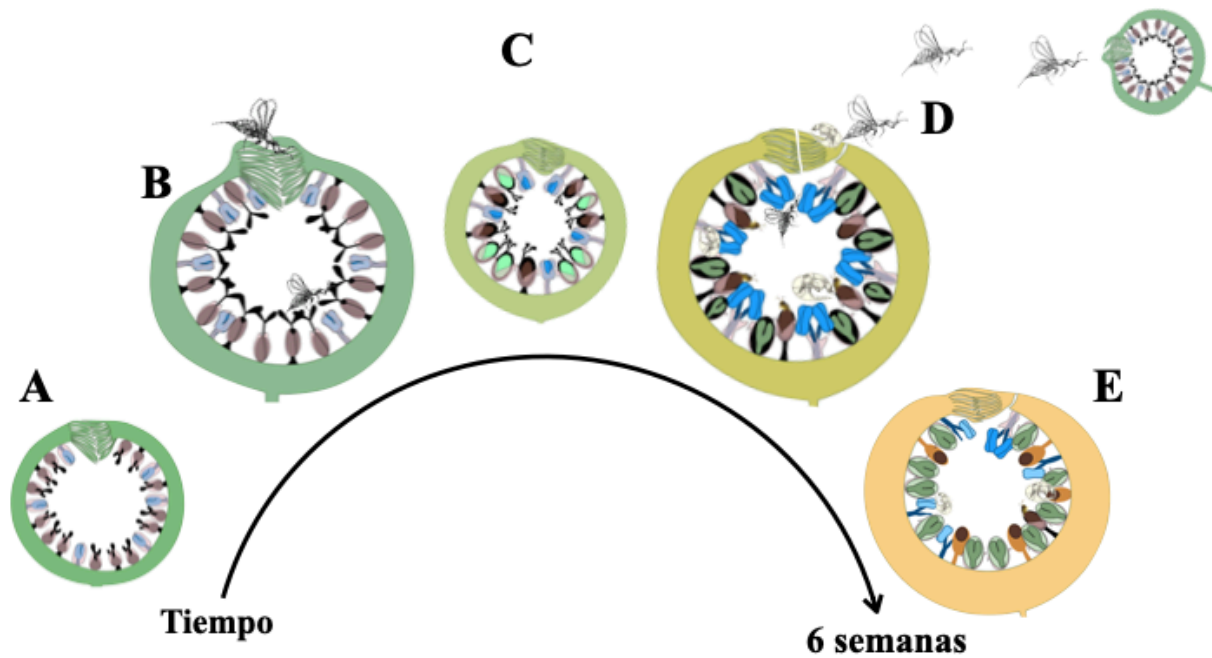
#### 4. Ciclos de vida de *Ficus*-avispa polinizadoras

Se reconocen cinco etapas de desarrollo de los siconos: pre-femenina (A), femenina o receptiva (B), interfloral (C), masculina o donadora (D) y post-floral (E) (Fig. 10; Galil y

Eisikowich, 1968). Las etapas A y E están asociadas con el surgimiento del sicono y con la dispersión de los frutos, respectivamente; mientras que las fases B, C y D están asociadas con el ciclo de vida de las avispas polinizadoras (Weiblen 2002; Cook y Rasplus, 2003).

La etapa **A**, comienza con el surgimiento de la yema del sicono y de los primordios florales y culmina con la maduración de las flores pistiladas. Durante la fase **B** las flores pistiladas presentan estigmas receptivos y comienza la emisión de compuestos volátiles para atraer a las avispas polinizadoras, las cuales entran al sicono a través del ostíolo. Una vez en la cavidad siconial, las avispas polinizan y ovipositan las flores pistiladas. La avispa fundadora inserta su ovipositor a través del estilo de la flor y deposita un huevo entre el ovario y el tegumento del óvulo (Jansen-González et al., 2012). Durante la oviposición, las avispas fundadoras inyectan sustancias químicas para que la flor pueda convertirse en agalla (Martinson et al., 2014).

Durante la fase **C**, se lleva a cabo el desarrollo de las avispas polinizadoras hijas a expensas del endospermo o el tejido nucelar del óvulo, mientras que en las flores no ovipositadas, se forman las semillas (Jansen-González et al., 2012; Martinson et al., 2014). Dependiendo de la especie de *Ficus* y las condiciones ambientales del entorno (Chiang et al., 2018), las larvas de las avispas polinizadoras se desarrollarán en aproximadamente tres semanas o si el entorno es frío, pueden tardar varios meses en alcanzar la etapa adulta (Smith y Bronstein, 1996; Patel y Hossaert-McKey, 2000; Chiang et al., 2018). Los machos de las avispas polinizadoras emergen de las flores agalladas antes que las hembras (Gu et al., 2014), para aparearse con ellas; mientras tanto, las flores estaminadas maduran. Después de aparearse, los machos realizan túneles para que las avispas polinizadoras hijas puedan salir del sicono. En la fase **D**, los granos de polen están maduros y puede presentarse la dehiscencia de las anteras, lo cual depende del tipo de polinización (ver más adelante). Las avispas hembra emergen de las agallas y colectan el polen, ya sea de forma activa o pasiva, según la especie (ver p. 29). Finalmente, en la etapa **E**, después de la salida de las avispas polinizadoras, la pared del sicono experimenta cambios en su tamaño, textura, coloración y composición química, lo que facilita la atracción y dispersión de los frutos por distintos grupos de frugívoros (Fig. 10; Shanahan et al., 2001).



**Figura 10. Fases de desarrollo de los siconos de especies monoicas de *Ficus*.** **A.** Pre-femenina. **B.** Femenina o receptiva. **C.** Interfloral. **D.** Masculina o donadora. **E.** Post-floral. El tiempo de desarrollo del sicono es aproximadamente de seis semanas. (Galil y Eisikowitch, 1968) (Ilustraciones digitales Nadia Castro-Cárdenas).

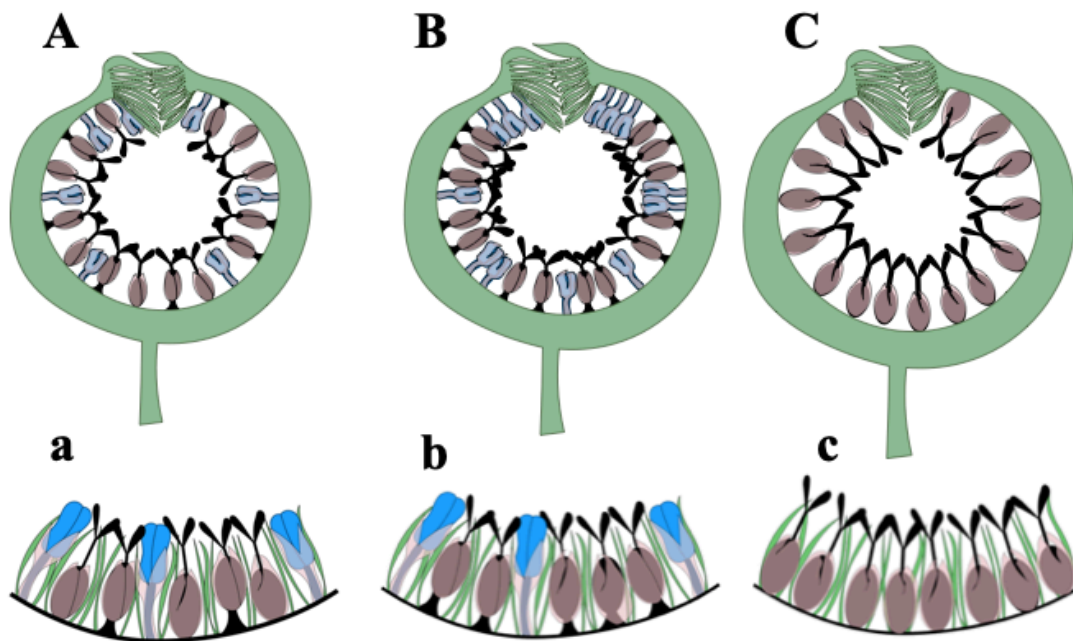
Recientemente, Palmieri y Pereira (2018) propusieron la adición de una nueva fase de desarrollo (Fase F), la cual se relaciona con los siconos que no son consumidos por los dispersores primarios y que son aprovechados por dispersores secundarios. Los ciclos antes descritos, a su vez, están acoplados con interacciones antagonistas con avispas no polinizadoras. Estas avispas son parásitas que ovipositan desde el exterior del sicono, dejando sus huevecillos dentro de las flores pistiladas, sin que ocurra polinización (Herre et al., 1996; Borges, 2015; Farache et al., 2016). En algunas especies también se han descrito avispas parasitoides, las cuales dejan sus huevos dentro de las avispas polinizadoras que se están desarrollando en el sicono y de las cuales se alimentan (Ghara et al., 2011; Borges, 2015).

### 3. Sistemas reproductivos en *Ficus*

En el género *Ficus* se presentan principalmente los sistemas reproductivos monoicos y ginodioicos (Cook y Rasplus, 2003); sin embargo, aún no se precisa sobre la condición basal, debido a discrepancias entre las filogenias (Jousselin et al., 2003; Clement y Weiblen, 2009; Rasplus et al., 2020).

Se estima que la mitad de las ca. 800 especies de *Ficus* son monoicas (Berg, 1989). Este sistema se caracteriza por la presencia de flores pistiladas y estaminadas en un mismo sicono, donde se producen polen, semillas y se reproducen las avispas polinizadoras (Fig. 11A). Las flores pistiladas presentan pedicelos y estilos con diferentes longitudes, los estigmas pueden ser libres o formar un sinestigma y las flores estaminadas frecuentemente son menos numerosas que las flores pistiladas (Fig. 11a; Berg y Corner, 2005). Por otra parte, ca. de 300 especies son funcionalmente dioicas, pero estructuralmente ginodioicas (Fig. 11B, C; Berg, 1989; Cook y Rasplus, 2003). En este sistema se presentan individuos funcionalmente femeninos, ya que sus siconos contienen exclusivamente flores pistiladas, mientras que existen otros individuos, que son funcionalmente masculinos, pero que presentan siconos con flores estaminadas y pistiladas (Fig. 11B, C, b, c; Kjellberg et al., 1987; Cook y Rasplus, 2003). Los siconos de los árboles masculinos únicamente tienen flores pistiladas de estilo corto y las avispas polinizadoras ovipositan en todas las flores, de manera que no desarrollan semillas (Fig. 11; Cook y Rasplus, 2003). Los siconos de los árboles femeninos tienen flores pistiladas de estilo largo, cuyos ovarios son inaccesibles para la oviposición de las avispas polinizadoras. Por lo tanto, estos siconos producen sólo semillas (Verkerke, 1987).

A pesar, de que se comienzan a elucidar algunas de las estrategias en cada sistema reproductivo, la variación observada plantea preguntas interesantes sobre qué presiones evolutivas pueden haber influido en las transiciones inferidas de un sistema monoico a dioico o viceversa, y si esos cambios pueden haber influido en los patrones de diversificación evolutiva de ambos socios mutualistas (Yang et al., 2015).



**Figura 11.** Diferentes tipos de siconos en *Ficus*. **(A)** Sicono de especies monoicas. **(a)** Distribución de las flores pistiladas y estaminadas dentro de un mismo sicono. Este tipo de siconos producirá semillas, polen y avispas polinizadoras. **(B)** y **(C)** Siconos de especies ginodioicos. **(B)** Sicono funcionalmente femenino. **(b)** Las flores pistiladas presentan estilos cortos y pueden ser ovipositadas, mientras que las flores estaminadas se concentran principalmente en la región ostiolar. Este tipo de siconos producirá polen y avispas polinizadoras. **(C)** Sicono funcionalmente masculino. **(c)** Las flores pistiladas presentan estilos más largos que los ovipositores de sus avispas polinizadoras. Este tipo de siconos solo producirán semillas (Ilustraciones digitales por Nadia Castro-Cárdenas)

#### 4. Polinización en *Ficus*

Las especies de *Ficus* exhiben dos modos de polinización: pasiva y activa. Ambos tipos de polinización son resultado de una serie de adaptaciones morfológicas y conductuales por parte de sus avispas polinizadoras (Ramírez, 1969; Frank, 1984; Machado et al., 2001). Se estima que la polinización pasiva se presenta en cerca de 250 especies de *Ficus* (Kjellberg et al., 2001; Jouselin et al., 2004). Este tipo de polinización comienza cuando las avispas polinizadoras ingresan cubiertas de polen y polinizan de manera "accidental" las flores pistiladas y, al mismo tiempo, ovipositan sus huevos (Jouselin y Kjellberg, 2001; Kjellberg et al., 2001; Jouselin et al., 2003; Jouselin et al., 2004). Posteriormente, durante la fase D,

ocurre la maduración y liberación del polen al interior del sicono, lo cual coincide con la emergencia de las avispas polinizadoras, de modo que el polen queda atrapado en varias partes del cuerpo de las avispas cuando dejan su sicono natal (Galil y Eisikowitch, 1968; Ramírez, 1969). Las especies que son polinizadas pasivamente presentan proporciones relativamente más altas de anteras con respecto a las especies con polinización activa, por lo que se produce mucho más polen por sicono, lo que facilita que las avispas polinizadoras queden impregnadas de polen (Ramírez, 1969; Galil y Eisikowitch, 1971; Kjellberg et al., 2001).

En contraste, la polinización activa se presenta en casi 500 especies (Jousselin y Kjellberg, 2001; Kjellberg et al., 2001). En este caso, las avispas polinizadoras (recién emergidas) localizan los estambres y cargan el polen en estructuras especializadas, localizadas en la parte externa del tórax, llamadas corbículas (Ramírez, 1969). Posteriormente, al ingresar a un nuevo sicono, toman de sus corbículas el polen para depositarlo de manera activa en las flores pistiladas, mientras ovipositan para asegurar la producción de semillas (Jansen-González et al., 2012). Por lo tanto, este tipo de polinización se distingue por un comportamiento de recolección y deposición de polen por parte de sus avispas polinizadoras más especializado y no fortuito, como en el caso de la polinización pasiva (Jousselin y Kjellberg, 2001; Kjellberg et al., 2001; Cook y Rasplus, 2003; Jousselin et al., 2003). Las especies de *Ficus* con este modo de polinización, presentan proporciones más bajas de anteras, además de que estas son relativamente más pequeñas (Galil y Meiri, 1981), por lo que hay una menor producción de polen (Kjellberg et al., 2001).

Las proporciones antera/óvulo se han destacado como indicadores del modo de polinización (Kjellberg et al., 2001). De acuerdo con Kjellberg et al. (2001), proporciones bajas, menores de 0.16, se asocian con la polinización activa, mientras que valores mayores de 0.21 se relacionan con la polinización pasiva.



## 5. Co-adaptaciones morfológicas en el mutualismo *Ficus*-avispa Agaonidae

El mutualismo entre *Ficus* y avispas polinizadoras es de los más estrictos que se conocen en la naturaleza, por lo que se asume que ambos linajes han coevolucionado (Ramírez, 1970; Herre et al., 2008). Se calcula que el origen de la interacción *Ficus*-Agaonidae oscila entre 60 y 100 Ma (Machado et al., 2001; Datwyler y Weiblen, 2004; Rønsted et al., 2008; Cruaud et al., 2012). La coevolución entre *Ficus*-Agaonidae está parcialmente demostrada debido a una serie de asociaciones morfológicas y funcionales entre los siconos y las avispas polinizadoras (Cuadro 1). Otra evidencia que apoya la coevolución es el hecho de que ambos linajes son monofiléticos (Cruaud et al., 2010; 2012), lo que implicó que ambos socios pudieran evolucionar de manera paralela. Se reconoce que cada sección o subsección de *Ficus* es polinizada por un género de Agaonidae (Fig. 1).

**Cuadro 1.** Características que se relacionan con la coevolución entre *Ficus* y sus avispas Agaonidae.

Atributos	Papel en la interacción mutualista	Referencia
<b>Sicono</b>		
Tamaño del ostíolo y el tamaño de la avispa polinizadora (e. g. largo y ancho de la cabeza)	Atributos relacionados alométricamente (positiva o negativamente) para mantener la especificidad. Un desacoplamiento puede impedir la entrada de la avispa al sicono.	1, 2
Arreglo de las brácteas ostiolares	Interviene en el número de avispas polinizadoras que ingresan a la cavidad siconial y es una barrera física para minimizar o evitar el acceso al sicono de avispas no polinizadoras, herbívoros y patógenos.	1, 3, 4
Estructuras secretoras	Emisión de los compuestos volátiles para la atracción de las avispas polinizadoras.	5, 6
<b>Flores pistiladas</b>		
Número de ovarios por sicono	Determina el número potencial de semillas y de ovarios parasitados por avispas.	7, 8, 9

<b>Atributos</b>	<b>Papel en la interacción mutualista</b>	<b>Referencia</b>
Tamaños del estilo y del ovipositor	Se relacionan alométricamente. El tamaño del ovipositor de la avispa polinizadora determinará el morfo floral que será parasitado.	10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
<b><i>Flores estaminadas</i></b>		
Número de anteras por flor	Permite inferir el número potencial de los granos de polen por sicono.	14, 17
Tipo de dehiscencia	Se relaciona con la recolección en anteras abiertas o rupturas necesarias por parte de las avispas polinizadoras.	18, 19
Forma y ornamentación del polen	Adherencia o no del polen al exoesqueleto de las avispas polinizadoras.	17
<b><i>Avispas polinizadoras</i></b>		
Forma de la mandíbula y la orientación de los dientes	Se asocian con la ruptura de las anteras para coleccionar los granos de polen, la entrada de las avispas polinizadoras través del ostiolo y la competencia de sitios de cría entre éstas.	15, 20
Presencia de corbículas	Transporte de los granos de polen.	17, 21

1) Liu et al., 2011; 2) Zeng et al., 2018; 3) Janzen 1979; 4) Gibernau et al., 1996; 5) Machado et al., 2013; 6) Souza et al., 2015; 7) Nerdf et al., 1996; 8) Raja et al., 2008; 9) Suleman et al., 2014; 10) Ganeshiah et al., 1999; 11) Jousselin et al., 2001; 12) Jousselin et al., 2003; 13) Jousselin et al., 2004; 14) Kjellberg et al., 2001; 15) Yu et al., 2004; 16) Dunn et al., 2008; 17) Wang et al., 2014; 18) Verkerke 1989; 19) Cook et al., 2004; 20) Dunn et al., 2015; 21) Compton et al., 2010.

## **6. Compuestos volátiles florales en *Ficus***

En el caso del mutualismo estrecho de *Ficus* con las avispas Agaonidae, el encuentro entre ambos participantes es un paso crucial para la continuidad de su ciclo de vida. Los compuestos orgánicos volátiles florales (VOCs, por sus siglas en inglés) están claramente involucrados en este reconocimiento (Barker, 1985; van Noort, 1989). Se han identificado cerca de 120 compuestos diferentes en las especies estudiadas de *Ficus* (Grison-Pigé et al., 2002; Hossaert-Mckey et al., 2010).

Dentro de los principales compuestos detectados en la interacción se encuentran distintas familias químicas, entre los que destacan los terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos), compuestos alifáticos y aquellos derivados del ciclo del ácido shikimico (Grison-Pigé et al., 2002). A pesar de ello, sólo el 20 % de los compuestos presentes en *Ficus* son raros con respecto a los registrados para las demás especies de angiospermas (Grison-Pigé et al., 2002; Knudsen et al., 2006), por lo que se ha registrado que las mezclas en las especies estudiadas son altamente específicas para atraer a sus avispas polinizadoras (Hossaert-McKey et al., 1994, 2010; Chen et al., 2009; Proffit et al., 2020). Por ejemplo, en *F. carica*, *F. hispida* y *F. semicordata*, los monoterpenos (linalool y dos óxidos de linalool (furanoides) y un compuesto benzenoide (alcohol bencílico) son necesarios para la atracción específica de sus avispas polinizadoras (Grison-Pigé et al., 2001; Proffit et al., 2008; Wang et al., 2013). Por otro lado, en *F. semicordata* el 4 metil-anisol se encuentra en una alta concentración y es altamente específico para la atracción de su avispa polinizadora (Hossaert-McKey et al., 2016). En especies simpátricas, las diferencias entre las mezclas de VOCs pueden reforzar las presiones selectivas reduciendo la frecuencia de errores de selección del hospedero correcto por parte de sus avispas polinizadoras (Wang et al., 2013). En estudios recientes se ha determinado, por medio de registros electroantenográficos y pruebas de comportamiento, que la combinación de VOCs, en las mezclas emitidas por los *Ficus* es crucial para la atracción de sus avispas polinizadoras (Proffit et al., 2020). También se ha inferido que la ausencia de nuevos compuestos específicos podría estar limitado por restricciones evolutivas que restringen la capacidad de sintetizar nuevos compuestos (Okamoto y Su, 2021).

Las avispas polinizadoras detectan los VOCs desde largas distancias (Gates y Nason, 2012). Se ha argumentado que también identifican compuestos clave, en pequeñas cantidades y a distancias cortas, para tener una identificación correcta del hospedero (Wang et al., 2013; Okamoto y Su, 2021). En *F. carica* se ha comprobado que cambios pequeños en la proporción de compuestos en la mezcla conduce a la pérdida de atracción (Proffit et al., 2020). Aunado a esto, se menciona que la especificidad también puede estar influenciada por el comportamiento de las avispas polinizadoras al examinar los siconos

receptivos (Renwick, 1989; Dobson y Bergström, 2000; Schiestl, 2010; Soler et al., 2011; Farré-Armengol et al., 2013; Muhlemann et al., 2014). Cuando una avispa localiza un árbol receptivo, aterriza sobre un sicón y comienza una secuencia fija de los eventos conductuales con el fin de identificar si entrará al sicón (Frank, 1984; Barker, 1985; van Noort et al. 1989). En especies simpátricas de *Ficus*, las especies de avispas polinizadoras identifican su hospedero, caminando sobre el sicón, lo que indica que las avispas utilizan señales de largo y corto alcance, además de señales táctiles en la superficie del sicón (Azuma et al., 2010; Wang et al., 2013).

## 7. Planteamiento del problema

La especificidad planta-polinizador puede estar influenciada por diferentes barreras (precigóticas o postcigóticas) que ocasionan el aislamiento reproductivo entre especies de plantas (Grant, 1994), las cuales pueden ser producto de procesos conductuales por parte de los polinizadores, adaptaciones morfológicas, o cambios químicos en las plantas (Baack et al., 2015). En los sistemas de polinización-oviposición (*nursery pollination*) los cambios conductuales y las modificaciones morfológicas son más fuertes, debido a que los servicios de polinización se intercambian por sitios de cría (Ollerton, 2006). Los mutualismos con sistemas de polinización-oviposición más conocidos son: i) *Yucca* (Asparagaceae) con polillas del género *Tegeticula* (Pellmyr, 2003), ii) *Glochidion* (Phyllanthaceae) con polillas *Epicephala* (Kawakita, 2010), iii) *Lophocereus schottii* (Cactaceae) con el lepidóptero *Upiga virescens* (Fleming y Holland, 1998) y iv) *Ficus* con avispas de la familia Agaonidae (Herre et al., 2008).

En el caso del mutualismo *Ficus*-agaónidos representa un sistema para analizar el aislamiento reproductivo por medio de la diversidad morfológica, ya que, en términos generales, una especie de avispa polinizadora está asociada con una especie de *Ficus* (*one-to-one rule*), aunque existen excepciones al respecto (Michaloud et al., 1985; Rasplus, 1996; Haine et al., 2006; Su et al., 2008; Cook y Segar, 2010). En este sentido, es ampliamente reconocido que la sincronización de los ciclos de vida de los interactuantes juega un papel

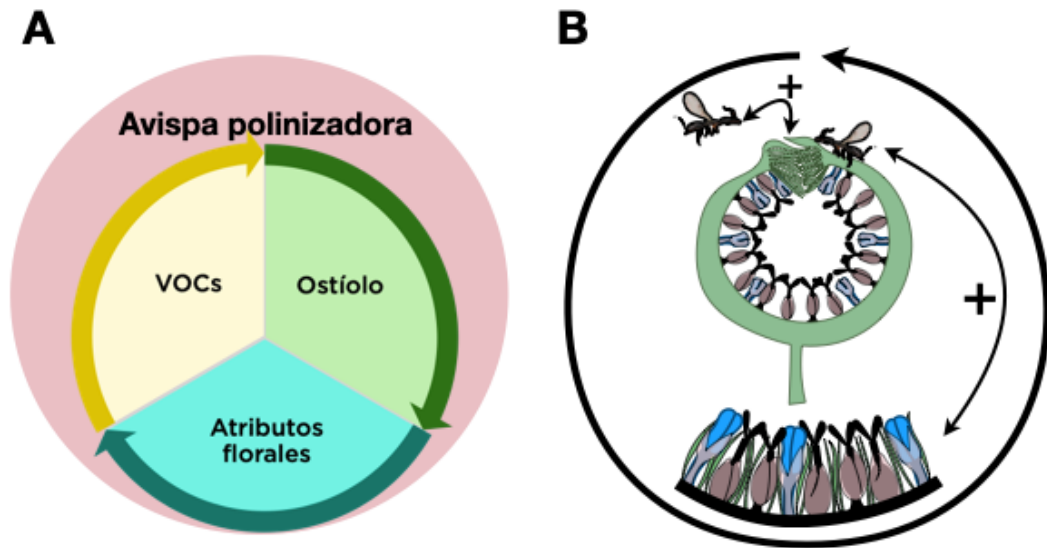
determinante en el éxito reproductivo de ambos socios (Galil y Eisikowitch, 1968). Asimismo, existen factores morfológicos y químicos que no se han explorados en comparación con los factores ecológicos y genéticos dentro del sistema (Weiblen, 2002; Cook y Segar, 2010; Wang et al., 2013; Okamoto y Su, 2021).

Por lo tanto, entender la coevolución basada en rasgos genéticos, morfológicos y químicos forma parte fundamental para comprender la estrecha relación entre ambos socios mutualistas (Jousselin et al., 2003; Hossaert-McKey et al., 2010; Wang et al., 2013; Segar et al., 2019; Zhang et al., 2020). La especificidad en esta interacción se ha mantenido por una serie de filtros biológicos, entre los que destacan los VOCs y el ostíolo (Janzen, 1979; Grison-Pigé et al., 2002; Cook y Rasplus, 2003; Cook y Segar, 2010; Machado et al., 2013; Hossaert-McKey et al., 2016). Se ha propuesto que el ostíolo es una estructura implicada en la emisión de los VOCs (Souza et al., 2015). Sin embargo, el ostíolo también podría jugar un papel como barrera selectiva para sus avispas polinizadoras (Liu et al., 2011; Ramírez W. com. person.). En consecuencia, implementar estrategias de investigación multidisciplinarias permitirá comprender el papel funcional del ostíolo en el mutualismo y su papel selectivo en el sistema *Ficus*-avispa Agaonidae (Soler et al., 2011; Liu et al., 2011; Souto-Vilarós et al., 2018; Wang et al., 2019).

Adicionalmente, el análisis morfológico y químico a diferentes escalas, contribuirá a interpretar las estructuras claves en esta interacción y contribuirá al entendimiento de mecanismos implicados en la especificidad entre los interactuantes (Hembry y Althoff, 2016). En este contexto, en el presente estudio se plantea la siguiente pregunta de investigación: ¿En qué medida la morfología floral del sicono de *Ficus* y la de sus avispas polinizadoras de la familia Agaonidae influyen en el reconocimiento mutuo de especies?

Para guiar la presente investigación, se diseñó un esquema conceptual que ilustra los filtros físicos reproductivos implicados en el mutualismo y su posible efecto sobre la especificidad en el mutualismo *Ficus*-avispa Agaonidae (Fig. 12). Estos componentes se han reportado como posibles filtros selectivos en el mutualismo *Ficus*-avispa Agaonidae

(Janzen, 1979; Weiblen, 2002; Cook y Segar, 2010; Hossaert-McKey et al., 2016; Zeng et al., 2018).



**Figura 12.** Filtros físicos en *Ficus*. **A)** Esquema de los tres filtros selectivos presentes en *Ficus* (Janzen, 1979; Zeng et al., 2018) . La relación entre las tres variables es cíclica debido a que la falta de una provocaría una reducción en el éxito reproductivo de *Ficus* con sus avispas polinizadoras. **B)** Las flechas indican los elementos que se correlacionan positivamente entre ambos interactuantes. 1) Relación entre el tamaño del ostíolo y el tamaño de la avispa polinizadora, debido a que son atributos relacionados alométricamente (positiva o negativamente) para mantener la especificidad. 2) Tamaño del estilo y el largo del ovipositor, debido a que el largo del ovipositor de la avispa polinizadora determinará el morfo floral que será parasitado. (Ilustraciones digitales por Nadia Castro-Cárdenas).

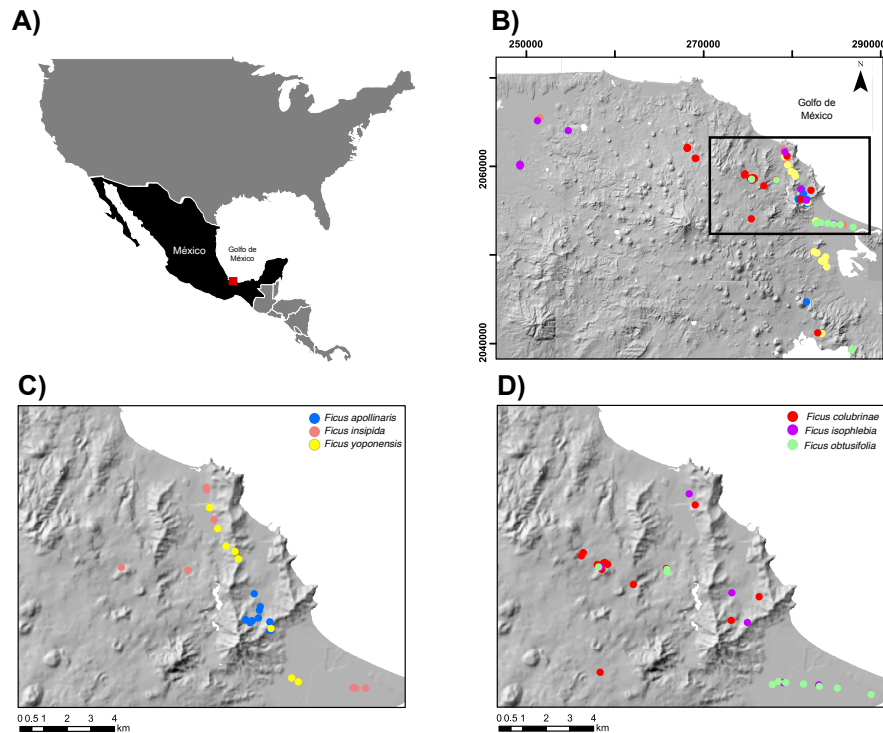
## 8. Objetivos y estructura de la tesis

El presente estudio tuvo como objetivo general describir las principales estructuras reproductivas de los siconos de seis especies de *Ficus* y de sus avispas polinizadoras como mecanismos mediadores en su interacción mutualista, en la región de Los Tuxtlas, en el estado de Veracruz, México. Primeramente, se describió y analizó la diversidad estructural del ostíolo durante la fase receptiva en especies de *Ficus* de las secciones *Americanae* y *Pharmacosycea* con relación a sus avispas polinizadoras (Capítulo II). Además, se

contrastaron los modos de polinización presentes en ambas secciones, considerando aspectos florales y la morfología de sus avispas polinizadoras (Capítulo III).

## 9. Área de estudio

La zona de estudio se encuentra localizada en la costa del Golfo de México, en el sureste de Veracruz, dentro del área norte perteneciente a la Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas (RBLT) ( $18^{\circ} 8' - 18^{\circ} 45' N$ ,  $94^{\circ} 37' - 95^{\circ} 22' O$ ; 1,680 m s.n.m.). La sierra de Los Tuxtlas comprende un área de 80 km de largo por 55 km de ancho, abarcando una superficie de 330,000 ha, que incluye el Área Natural Protegida RBLT, con sus tres zonas núcleo (Volcán San Martín Tuxtla, Sierra Santa Martha y San Martín Pajapan) y la zona de amortiguamiento (Guevara, 2010). La zona de amortiguamiento representa el 80% de la superficie total de la Reserva y se estima que sólo el 22 % de la reserva contiene selvas, bosques y manglares en un grado adecuado de conservación (Fig. 13; Ramírez, 2011).



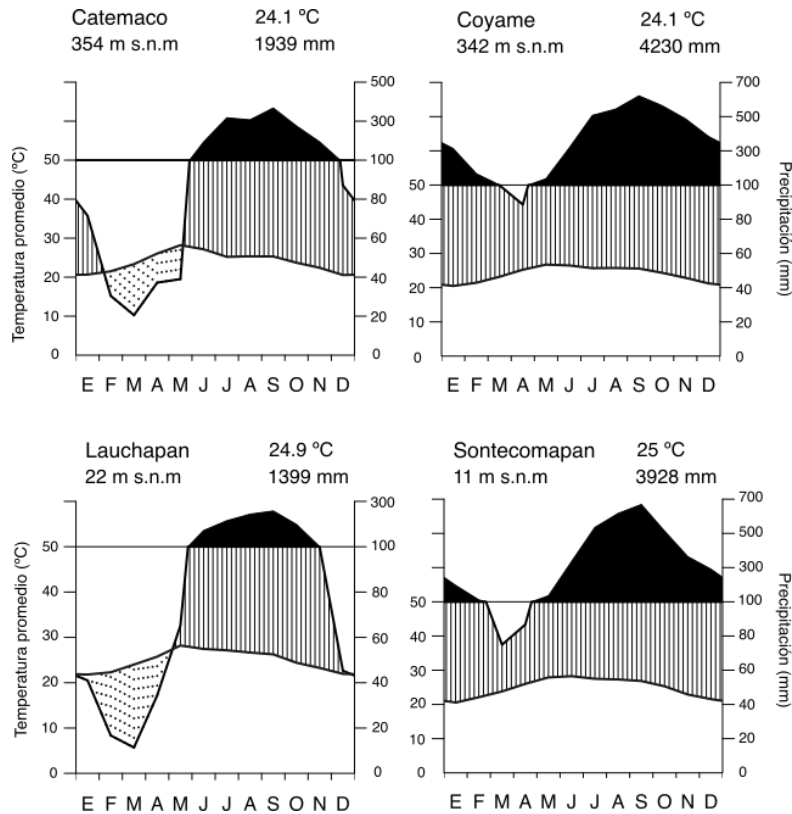
**Figura 13.** Localización geográfica de la zona de estudio en la región de Los Tuxtlas, Veracruz, México (recuadro rojo). **A)** Zona norte de la Reserva de la Biosfera de Los Tuxtlas, Veracruz, México. **B)** Puntos de muestreo de los individuos de *Ficus* colectados. **C y D)** Acercamiento del recuadro en **B).** **C)** Puntos de muestreo de las especies pertenecientes a

la sección de *Pharmacosycea* (subg. *Pharmacosycea*, *Ficus*). **D)** Puntos de muestreo de las especies pertenecientes a la sección *Americanae* (subg. *Spherosuke*, *Ficus*).

La región de Los Tuxtlas forma parte del complejo volcánico del Terciario Superior y Cuaternario Medio, compuesto por andesita basáltica y basalto (Verma et al., 1993), el cual está bordeado por flujos lávicos del Holoceno (Nelson y Gonzalez-Caver, 1992). Por la distribución de los materiales geológicos se ha creado un paisaje heterogéneo, donde las pendientes oscilan entre los 2° hasta los 45°. La variabilidad geomorfológica de la zona es tal, que se puede dividir en 45 unidades de relieve, agrupadas en 10 paisajes geomorfológicos, que tienen intervalos altitudinales que van desde los 0 a los 1,680 m s.n.m (Geissert, 2004). Esta diversidad territorial y de inclinación genera un paisaje de alta complejidad, que influye en la hidrología, microclima, formación de suelo y la distribución de la flora y fauna, permitiendo así el establecimiento de distintas asociaciones vegetales y ecosistemas, como encinares, pinares, manglares, sabana y vegetación costera (Sousa, 1968).

El clima predominante de la zona estudiada es cálido húmedo, con lluvias todo el año (Af) con temperatura media anual de 24.5 °C y la precipitación anual es de 3,928 mm (Fig. 14; SMN, 2010). Las lluvias se registran durante todo el año, pero son más frecuentes y abundantes durante el verano, mientras que en la época seca se presenta entre marzo-mayo, siendo este último el mes más seco (Soto, 2004; SMN, 2010).





**Figura 14.** Diagramas ombrotérmicos para las localidades de Catemaco, Coyame, Lauchapan y Sontecomapan, Veracruz. Los datos corresponden a 30 años de observaciones de las Estaciones Meteorológicas de la Sistema Meteorológico Nacional (2010).

La región de Los Tuxtlas es considerada como la frontera boreal de la selva alta perennifolia, ya que permite el desarrollo de especies tropicales y boreales únicas de la región (Castillo-Campos y Laborde, 2004). Dentro de los tipos de vegetación descritos para esta región, el presente estudio se desarrollo en la selva alta perennifolia, de acuerdo con Miranda y Hernández-X. (1963) o como un bosque tropical perennifolio, según Rzedowski (1978), así como en comunidades en donde esta vegetación se encontraba y que ahora presenta fragmentos con vegetación en distintas etapas de regeneración y pastizales para la crianza de ganado. La Reserva de la Biosfera Los Tuxtlas alberga uno de los últimos remanentes de selva húmeda de la costa del Golfo de México (Guevara y Sanchez-Ríos, 2004). La riqueza de especies de plantas vasculares conocida para toda la región es de 2,548 especies, distribuidas en 208 familias y 1018 géneros (Villaseñor et al., 2018). Las

familias con mayor número de especies en la región son Fabaceae (212), Orchidaceae (171), Asteraceae (150) y Rubiaceae (143). La mayoría de los individuos de las especies estudiadas de *Ficus* se encontraban en zonas de pastizales, remantes de selva o como cercas vivas (Fig. 13).

### 9.1 Selección de las especies de *Ficus*

Se seleccionaron tres especies de cada sección de *Ficus*, las cuales presentaban diferencias en el diámetro del sicono. Las especies de la sección *Pharmacosycea* fueron *Ficus apollinaris* Dugand., *F. insipida* Willd. y *F. yoponensis* Desv. y de la sección *Americanae*, *F. colubrinae* Standl, *F. isophlebia* Standl. y *F. obtusifolia* Kunth. La localización de individuos se realizó por medio de múltiples recorridos, durante los meses de marzo a junio de los años 2018 a 2020. Se colectaron siconos con flores pistiladas receptivas (Fase B) y siconos con flores estaminadas y avispas emergentes (Fase D) (Galil y Eisikowitch, 1968). Una característica del género es que los individuos presentan bajas densidades (Galil y Eisikowitch, 1968), con patrones fenológicos asincrónicos en la producción de siconos (Janzen, 1979; Bronstein y McKey, 1989). Por ello, se estableció que los individuos de cada especie contarán con al menos, cinco individuos con las fases requeridas.

## 10. Metodología general

### 10.1 Colecta y procesamiento del material

Para cada especie de *Ficus* se colectaron 10 siconos en Fase B y D de cinco individuos diferentes. Se diseccionaron los siconos, retirando la mayor parte del receptáculo. El material se fijó en FAA (formaldehído, alcohol etílico, ácido acético y agua destilada en proporción 1:5:0.5:3.5) o en formalina neutra, durante 48 horas. Posteriormente, para su procesamiento histológico, se hicieron dos lavados con agua destilada de 10 minutos cada uno y se deshidrataron gradualmente con una serie de etanoles del 30 hasta el 70 %. Una parte del material se reservó para su procesamiento y observación en el microscopio

electrónico de barrido (MEB), mientras que otra parte se incluyó en resinas sintéticas (LR-White e Historesin) y en Parafina (Paraplast plus) (Márquez-Guzmán et al., 2016).

### *10.2 Procesamiento del material para el análisis histológico y micromorfológico*

El material se deshidrató en etanoles graduales en un tiempo de una hora por cada concentración (70 %, 85 %, 96 %, 100 %). Parte de las muestras fueron embebidas en resina plástica LR-White (Electron Microscopy Sciences), cortadas a 1.5  $\mu\text{m}$  usando un ultramicrotomo Leica RM2164 y teñidas con azul de toluidina al 0.05 %. Otra parte del material fue incluido con Historesina, cortado a 4  $\mu\text{m}$ , usando un microtomo rotatorio Leica RM-2245 y teñido con azul de toluidina al 0.05 %, en buffer de fosfatos a pH 6.8. Finalmente, el material restante fue embebido con parafina, cortado a 5-7  $\mu\text{m}$  usando un microtomo rotatorio y teñidos con safranina y verde-rápido (Márquez-Guzmán et al., 2016).

Para determinar la naturaleza química de los tejidos y contenidos celulares, se realizó un análisis histoquímico, con las muestras embebidas en historesina y en parafina. Se aplicaron pruebas de ácido peryódico de Schiff's (PAS) para identificar polisacáridos insolubles, lugol para almidón, Suddan IV y Rojo "O" de aceite para detectar sustancias lipofílicas y reactivo de Nadi para terpenos (Márquez-Guzmán et al., 2016; Castro-Cárdenas et al., 2022). Las secciones anatómicas fueron observadas y fotografiadas usando un microscopio óptico Olympus Provis AX70 adicionado con cámara digital.

### *10.3 Procesamiento del material para microscopía electrónica de barrido*

La morfología externa e interna del sicono se evaluó a través de microscopía electrónica de barrido (MEB). Después de llevar a cabo la deshidratación con etanoles graduales, se procesó el material en una desecadora de punto crítico con  $\text{CO}_2$ . Se montó en portamuestras metálicos sobre cinta conductora de carbón y se cubrieron con oro, en una ionizadora Denton Vacuum Desk-II. Las imágenes fueron observadas usando un microscopio Jeol JSM-5310 LV.

## Literatura Citada

- AZUMA, H., R.D. HARRISON, K. NAKAMURA y Z.-H. SU. 2010. Molecular phylogenies of figs and fig-pollinating wasps in the Ryukyu and Bonin (Ogasawara) islands, Japan. *Genes & Genetic Systems* 85: 177–192.
- BAACK, E., M.C. MELO, L.H. RIESEBERG y D. ORTIZ-BARRIENTOS. 2015. The origins of reproductive isolation in plants. *New Phytologist* 207: 968–984.
- BAIJNATH, H. y S. NAICKER. 1989. Developmental anatomy of *Ficus ingens* syconia in relation to its wasp fauna. *South African Journal of Botany* 55: 409–421.
- BARKER, N.P. 1985. Evidence of a volatile attractant in *Ficus ingens* (Moraceae). *Bothalia* 15: 607–611.
- BASSO-ALVES, J.P., R.A.S. PEREIRA, Y.-Q. PENG y S.P. TEIXEIRA. 2014. Different ontogenetic processes promote dichy in *Ficus* L. (Moraceae). *Acta Oecologica* 57: 5–16.
- BEECH, E., M. RIVERS, S. OLDFIELD y P.P. SMITH. 2017. GlobalTreeSearch: The first complete global database of tree species and country distributions. *Journal of Sustainable Forestry* 36: 454–489.
- BERG, C. 1989. Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia* 45: 605–611.
- BERG, C. y E.H. CORNER. 2005. Moraceae: Ficeae. In N. H. of N. Leiden [ed.], *Flora Malesiana*, 1–730. The Netherlands.
- BERG, C. y J. WIEBES. 1992. African fig trees and fig wasps. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Verhandelingen Afdeling Natuurkunde.
- BORGES, R.M. 2015. How to be a fig wasp parasite on the fig-fig wasp mutualism. *Current Opinion in Insect Science* 8: 34–40.
- BOUČEK, Z. 1993. The genera of chalcidoid wasps from *Ficus* fruit in the new world. *Journal of Natural History* 27: 173–217.
- BRONSTEIN, J.L. y D. MCKEY. 1989. The fig/pollinator mutualism: A model system for comparative biology. *Experientia* 45: 601–604.
- CASTILLO-CAMPOS, G. y J. LABORDE. 2004. La vegetación. In S. Guevara, J. Laborde, and G. Sanchez-Ríos [eds.], *Los Tuxtlas. El paisaje de la sierra*, 231–266. Instituto de Ecología A.C. y Unión Europea, Xalapa, Veracruz.
- CASTRO-CÁRDENAS N, VÁZQUEZ-SANTANA S, TEIXEIRA SP, IBARRA-MANRÍQUEZ G, 2022. The roles of the ostiole in the fig-fig wasp mutualism from a morpho-anatomical perspective.

*Journal of Plant Research* 135(6): 739-755.

- CHEN, C., Q. SONG, M. PROFFIT, J.M. BESSIÈRE, Z. LI, y M. HOSSAERT-MCKEY. 2009. Private channel: A single unusual compound assures specific pollinator attraction in *Ficus semicordata*. *Functional Ecology* 23: 941–950.
- CHIANG, Y.P., A. BAIN, W.J. WU, y L.S. CHOU. 2018. Adaptive phenology of *Ficus subpisocarpa* and *Ficus caulocarpa* in Taipei, Taiwan. *Acta Oecologica* 90: 35–45.
- CLEMENT, W.L. y G.D. WEIBLEN. 2009. Morphological evolution in the mulberry family (Moraceae). *Systematic Botany* 34: 530–552.
- COOK, J.M. y J.-Y.Y. RASPLUS. 2003. Mutualists with attitude: Coevolving fig wasps and figs. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 241–248.
- COOK, J.M. y S.T. SEGAR. 2010. Speciation in fig wasps. *Ecological Entomology* 35: 54–66.
- CRUAUD, A., G.J.-Z. R. GENSON, C. CRUAUD, A. COULOUX, F. KJELLBERG, S. VAN NOORT. y J.Y. RASPLUS. 2010. Laying the foundations for a new classification of Agaonidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), a multilocus phylogenetic approach. *Cladistics* 26: 359–387.
- CRUAUD, A., N. RONSTED, B. CHANTARASUWAN, L.S. CHOU, W.L. CLEMENT, A. COULOUX, B. COUSINS, GENSON, G., HARRISON, R.D., HANSON, P.E., HOSSAERT-MCKEY, M., JABBOUR-ZAHAB, R., JOUSSELIN, E., KERDELHUÉ, C., KJELLBERG, F., LOPEZ-VAAMONDE, C., PEEBLES, J., QIONG-PENG, Y., SANTINELO-PEREIRA, R.A., SCHRAMM, T., UBADILLAH, R., VAN NOORT, S., WEIBLEN, G.D., RONG-YANG, D., YODPINYANEE, A., LIBESKIND-HADAS, R., COOK, J.M., RASPLUS, J.Y., SAVOLAINEN, V. 2012. An extreme case of plant-insect codiversification: figs and fig-pollinating wasps. *Systematic Biology* 61: 1029–1047.
- DATWYLER, S.L. Y G.D. WEIBLEN. 2004. The origin of the fig: Phylogenetic relationships of Moraceae from NdhF sequences. *American Journal of Botany* 91: 767–777.
- DELGADO-PÉREZ, G., S. VÁZQUEZ-SANTANA, G. CORNEJO-TENORIO y G. IBARRA-MANRÍQUEZ. 2020. Morpho-Anatomical traits of the sycone development phases of *Ficus tuerckheimii* (Subg. *Spherosuke*, Sect. *Americanae*, Moraceae). *Botanical Sciences* 98: 570–583.
- DENG, H., Y. LI, L. CHEN y S. TANG. 2015. Reproductive biology of *Ficus beipeiensis*. *American Journal of Plant Sciences* 06: 2893–2905.
- DOBSON, H. y G. BERGSTRÖM. 2000. The ecology and evolution of pollen odors. *Plant Systematics and Evolution* 222: 63–87.
- DUFAÏ, M. y M.C. ANSTETT. 2003. Conflicts between plants and pollinators that reproduce within inflorescences: evolutionary variations on a theme. *Oikos* 100: 3–14.

- ENDRESS, P.K. 1994. Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press.
- ENDRESS, P.K. 2011. Evolutionary diversification of the flowers in angiosperms. *American Journal of Botany* 98: 370–396.
- EZEDIN, Z, y GD. WEIBLEN. 2019. Additions and changes to *Ficus* (Moraceae) in New Guinea with comments on the world's largest fig. *Gardens' Bulletin Singapore* 71: 197–216.
- FAEGRI, K. y L. VAN DER PIJL. 1979. The principles of pollination ecology. Pergamon Press Oxford.
- FAN, K., A. BAIN, H. TZENG, Y. CHIANG y L.S. CHOU. 2019. Comparative anatomy of the fig wall (*Ficus*, Moraceae). *Botany* 97(8): 417–426.
- FARACHE, F.H.A., J.Y. RASPLUS, D. AZAR, R.A.S. PEREIRA y S.G. COMPTON. 2016. First record of a non-pollinating fig wasp (Hymenoptera: Sycophaginae) from Dominican amber, with estimation of the size of its host figs. *Journal of Natural History* 50: 2237–2247.
- FARRÉ-ARMENGOL, G., I. FILELLA, J. LLUSIA y J. PEÑUELAS. 2013. Floral volatile organic compounds: Between attraction and deterrence of visitors under global change. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 15: 56–67.
- FLEMING, T.H. y J.N. HOLLAND. 1998. The evolution of obligate pollination mutualisms: *Senita* cactus and senita moth. *Oecologia* 114: 368–375.
- FRANK, S. 1984. The behavior and morphology of the fig wasps *Pegoscapus assuetus* and *P. jimenezi*: descriptions and suggested behavioral characters for phylogenetic studies. *Psyche* 289–308.
- FRODIN, D. 2004. History and concepts of big plant genera. *Taxon* 53: 753–776.
- GALIL, J. y D. EISIKOWITCH. 1968. On the pollination ecology of *Ficus sycomorus* in East Africa. *Ecology* 49: 259–269.
- GALIL, J. y D. EISIKOWITCH. 1971. Studies on mutualistic symbiosis between syconia and sycophilous wasps in monoecious figs. *New Phytologist* 70: 773–787.
- GALIL, J. y L. MEIRI. 1981. Number and structure of anthers in fig syconia in relation to behaviour of the pollen vectors. *New Phytologist* 88: 83–87.
- GATES, D.J. y J.D. NASON. 2012. Flowering asynchrony and mating system effects on reproductive assurance and mutualism persistence in fragmented fig-fig wasp populations. *American Journal of Botany* 99: 757–768.
- GEISSERT, K. 2004. La Geomorfología. In S. Guevara, J. Laborde, and G. Sanchez-Ríos [eds.],

- Los Tuxtlas. El paisaje de la sierra, 288. Instituto de Ecología A.C. y Unión Europea, Xalapa, Veracruz.
- GHARA, M., L. KUNDANATI y R.M. BORGES. 2011. Nature's swiss army knives: Ovipositor structure mirrors ecology in a multitrophic fig wasp community. *PLoS ONE* 6: a23642.
- GIBSON, G.A.P. 2003. Phylogenetics and classification of Cleonyminae (Hymenoptera: Chalcidoidea: Pteromalidae). *Memoirs on Entomology, International* 16: 100–101.
- GRANT, V. 1994. Modes and origins of mechanical and ethological isolation in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 3–10.
- GRISON-PIGÉ, L., J.M. BESSIÈRE, C. TURLINGS, T. F. KJELLBERG, J. ROY y M. HOSSAERT-MCKEY. 2001. Limited intersex mimicry of oral odour in *Ficus carica*. *Functional Ecology* 15: 551–558.
- GRISON-PIGÉ, L., M. HOSSAERT-MCKEY, J.M. GREEFF y J.M. BESSIÈRE. 2002. Fig volatile compounds – A first comparative study. *Phytochemistry* 61: 61–71.
- GU, H.F., J.H. XIAO, D.W. DUNN, L.M. NIU, B. WANG, L.Y. JIA y D.W. HUANG. 2014. Evidence for the circadian gene period as a proximate mechanism of protandry in a pollinating fig wasp. *Biology Letters* 10: (3): 20130914.
- GUEVARA, S. 2010. Los Tuxtlas. Tierra mítica. Comisión Organizadora del Estado de Veracruz de Ignacio de la Llave para la Conmemoración del Bicentenario de la Independencia Nacional y del Centenario de la Revolución Mexicana, Secretaria de Educación de Educación-Gobierno del Estado de Veracruz. Veracruz.
- GUEVARA, S. y G. SANCHEZ-RÍOS. 2004. La deforestación. In S. Guevara, J. Laborde, and G. Sanchez-Rios [eds.], Los Tuxtlas. El paisaje de la sierra, Instituto de Ecología A.C. y Unión Europea, Xalapa, Veracruz.
- HAINE, E.R., J. MARTIN y J.M. COOK. 2006. Deep mtDNA divergences indicate cryptic species in a fig-pollinating wasp. *BMC Evolutionary Biology* 6: 1–11.
- HARDER, L.D. y S.D. JOHNSON. 2005. Adaptive plasticity of floral display size in animal-pollinated plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 272: 2651–2657.
- HEMBRY, D.H. y D.M. ALTHOFF. 2016. Diversification and coevolution in brood pollination mutualisms: Windows into the role of biotic interactions in generating biological diversity. *American Journal of Botany* 103: 1783–1792.
- HERRE, E., K. JANDÉR y C.A. MACHADO. 2008. Evolutionary ecology of figs and their associates: Recent progress and outstanding puzzles. *Annual Review of Ecology and Systematics* 39: 439–458.

- HERRE, E., C.A. MACHADO, E. BERMINGHAM, J.D. NASON, D.M. WINDSOR, S. MCCAFFERTY, W. VAN HOUTEN y K. BACHMANN. 1996. Molecular phylogenies of figs and their pollinator wasps. *Journal of Biogeography* 23: 521–530.
- HOSSAERT-MCKEY, M., M. GIBERNAU y J.E. FREY. 1994. Chemosensory attraction of fig wasps to substances produced by receptive figs. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 70: 185–191.
- HOSSAERT-MCKEY, M., M. PROFFIT, C. SOLER, C. CHEN, J.M. BESSIERE, B. SCHATZ y R.M. BORGES. 2016. How to be a dioecious fig: Chemical mimicry between sexes matters only when both sexes flower synchronously. *Scientific Reports* 6: 21236.
- HOSSAERT-MCKEY, M., C. SOLER, B. SCHATZ y M. PROFFIT. 2010. Floral scents: Their roles in nursery pollination mutualisms. *Chemoecology* 20: 75–88.
- IBARRA-MANRÍQUEZ, G. y E. MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ. 1997. Estudio palinológico de *Ficus*, subgénero *Pharmacosycea* (Moraceae) de Veracruz, México. 61: 95–100.
- JANSEN-GONZÁLEZ, S., S.P. TEIXEIRA y R.A.S. PEREIRA. 2012. Mutualism from the inside: Coordinated development of plant and insect in an active pollinating fig wasp. *Arthropod-Plant Interactions* 6: 601–609.
- JANZEN, D. 1979. How to be a Fig. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10: 13–51.
- JOUSSELIN, E., M. HOSSAERT-MCKEY, E. HERRE y F. KJELLBERG. 2003. Why do fig wasps actively pollinate monoecious figs? *Oecologia* 134: 381–387.
- JOUSSELIN, E. y F. KJELLBERG. 2001. The functional implications of active and passive pollination in dioecious figs. *Ecology Letters* 4: 151–158.
- JOUSSELIN, E., F. KJELLBERG y E. HERRE. 2004. Flower specialization in a passively pollinated monoecious fig: A question of style and stigma? *International Journal of Plant Sciences* 165: 587–593.
- JOUSSELIN, E., J.Y. RASPLUS y F. KJELLBERG. 2003. Convergence and coevolution in a mutualism: Evidence from a molecular phylogeny of *Ficus*. *Evolution* 57: 1255–1269.
- KATO, M.J., A. TAKIMURA y A. KAWAKITA. 2003. An obligate pollination mutualism and reciprocal diversification in the tree genus *Glochidion* (Euphorbiaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 5264–5267.
- KAWAKITA, A. 2010. Evolution of obligate pollination mutualism in the tribe Phyllanthaeae (Phyllanthaceae). *Plant Species Biology* 25: 3–19.
- KJELLBERG, F., P.-H. GOUYON, M. IBRAHIM, M. RAYMOND y G. VALDEYRON. 1987. The stability of the



- symbiosis between dioecious figs and their pollinators: a study of *Ficus carica* L. and *Blastophaga psenes* L. *Evolution* 41: 693–704.
- KJELLBERG, F., E. JOUSSELIN, J.L. BRONSTEIN, A. PATEL, J. YOKOYAMA y J.-Y. RASPLUS. 2001. Pollination mode in fig wasps: the predictive power of correlated traits. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268: 1113–1121.
- KNUDSEN, J.T., R. ERIKSSON, J. GERSHENZON, B. STÅHL y B. STAHL. 2006. Diversity and distribution of floral scent. *The Botanical Review* 72: 1–120.
- LIU, C., D.R. YANG y Y.Q. PENG. 2011. Body size in a pollinating fig wasp and implications for stability in a fig-pollinator mutualism. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 138: 249–255.
- LIU, M., P. YANG, D. YANG y Y. PENG. 2017. Pollination mode of four *Ficus* species and pollen characteristics. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)* 32: 294–302.
- LOPEZ-VAAMONDE, C., N. WIKSTRÖM, K.M. KJER, G.D. WEIBLEN, J.-Y. RASPLUS, C.A. MACHADO y J.M. COOK. 2009. Molecular dating and biogeography of fig-pollinating wasps. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 715–726.
- MACHADO, A.F.P., A.M. DE SOUZA y C.A.E. LEITÃO. 2013. Secretory structures at syconia and flowers of *Ficus enormis* (Moraceae): A specialization at ostiolar bracts and the first report of inflorescence colleters. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 208: 45–51.
- MACHADO, C.A., E. JOUSSELIN, F. KJELLBERG, S.G. COMPTON y E. HERRE. 2001. Phylogenetic relationships, historical biogeography and character evolution of fig-pollinating wasps. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 268: 685–694.
- MACHADO, C.A., N. ROBBINS, M. GILBERT y E. HERRE. 2005. Critical review of host specificity and its coevolutionary implications in the fig/fig-wasp mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 6558–6565.
- MÁRQUEZ-GUZMÁN, J., J. WONG, M. PÉREZ-PACHECO, M. LÓPEZ y M. COLLAZO. 2016. Técnicas de Laboratorio para el Estudio del Desarrollo de Angiospermas. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- MARTINSON, E.O., K.C. JANDÉR, Y.Q. PENG, H.H. CHEN, C.A. MACHADO, A.E. ARNOLD, y E. HERRE. 2014. Relative investment in egg load and poison sac in fig wasps: Implications for physiological mechanisms underlying seed and wasp production in figs. *Acta Oecologica* 57: 58–66.
- MICHALOUD, G., S. MICHALOUD-PELLETIER, J. WIEBES y C. BERG. 1985. The co-occurrence of two

- pollinating species of fig wasp and one species of fig. *Proceedings - Nederlandse Akademie van Wetenschappen* 88: 93–119.
- MIRANDA, F., E. HERNÁNDEZ-X. 1963. Los tipos de vegetación de México y su clasificación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 28: 29–179.
- MOLBO, D., C.A. MACHADO, J. SEVENSTER, L. KELLER y E. HERRE. 2003. Cryptic species of fig-pollinating wasps: Implications for the evolution of the fig-wasp mutualism, sex allocation, and precision of adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 5867–5872.
- MUHLEMANN, J.K., A. KLEMPIEN y N. DUDAREVA. 2014. Floral volatiles: From biosynthesis to function. *Plant, Cell and Environment* 37: 1936–1949.
- NELSON, S.A. y E. GONZALEZ-CAVER. 1992. Geology and K-Ar dating of the Tuxtla Volcanic Field, Veracruz, Mexico. *Bulletin of Volcanology* 55: 85–96.
- VAN NOORT, S. 1989. Pollinator-specific volatile attractants released from the figs of *Ficus burtt-davyi*. *Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Wetenskap* 85: 323–324.
- NUNES, C.E.P., P.K. MARUYAMA, M. AZEVEDO-SILVA y M. SAZIMA. 2018. Parasitoids turn herbivores into mutualists in a nursery system involving active pollination. *Current Biology* 28: 980–986.e3.
- OHASHI, K. y T. YAHARA. 2001. Behavioural responses of pollinators to variation in floral display size and their influences on the evolution of floral traits. *In Cognitive Ecology of Pollination*, 274–296.
- OKAMOTO, T. y Z.H. SU. 2021. Chemical analysis of floral scents in sympatric *Ficus* species: highlighting different compositions of floral scents in morphologically and phylogenetically close species. *Plant Systematics and Evolution* 307: 1–12.
- OLLERTON, J. 2006. “Biological barter”: Patterns of specialization compared across different mutualisms. *In Plant-pollinator interactions: from specialization to generalization*, 411–436.
- PALMIERI, L., R. PEREIRA. 2018. The role of non-fig-wasp insects on fig tree biology, with a proposal of the F phase (Fallen figs). *Acta Oecologica* 90: 132–139.
- PATEL, A. y M. HOSSAERT-MCKEY. 2000. Components of reproductive success in two dioecious fig species, *Ficus exasperata* and *Ficus hispida*. *Ecology* 81: 2850–2866.
- PEDERNEIRAS, L.C., J.P.P. CARAUTA, S.R. NETO y V. DE FREITAS MANSANO. 2015. An overview of the infrageneric nomenclature of *Ficus* (Moraceae). *Taxon* 64: 589–594.

- PEDERNEIRAS, L.C., A.L. GAGLIOTI, S. ROMANIUC-NETO y V.D.F. MANSANO. 2018. The role of biogeographical barriers and bridges in determining divergent lineages in *Ficus* (Moraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 187: 594–613.
- PELLMYR, O. 2003. *Yuccas*, Yucca moths, and Coevolution: A Review. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 90: 35–55.
- POPMA, J., F. BONGERS y J. MEAVE DEL CASTILLO. 1988. Patterns in the vertical structure of the tropical lowland rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *Vegetatio* 74: 81–91.
- POWO, 2020. Plants of the World Online. Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet. <http://www.plantsoftheworldonline.org>. Accessed 02 December 2021.
- PROFFIT, M., B. LAPEYRE, B. BUATOIS, X.X. DENG, P. ARNAL, F. GOUZERH, D. CARRASCO y M. HOSSAERT-MCKEY. 2020. Chemical signal is in the blend: bases of plant-pollinator encounter in a highly specialized interaction. *Scientific Reports* 10: 1–11.
- PROFFIT, M., B. SCHATZ, J.M. BESSIÈRE, C. CHEN, C. SOLER y M. HOSSAERT-MCKEY. 2008. Signalling receptivity: comparison of the emission of volatile compounds by figs of *Ficus hispida* before, during and after the phase of receptivity to pollinators. *Symbiosis* 45: 15–24.
- RAMÍREZ, F. 2011. Actualización de la tasa de cambio del uso del suelo en la Reserva de la Biosfera de Los Tuxtlas. *In* Informe Final, PSSM-CONANP, Xalapa, Veracruz.
- RAMÍREZ, W. 1974. Coevolution of *Ficus* and Agaonidae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61: 770–780.
- RAMÍREZ, W. 1969. Fig Wasps: mechanism of pollen transfer. *Science* 163: 580–581.
- RAMÍREZ, W. 1970. Taxonomic and biological studies of Neotropical fig wasps (Hymenoptera: Agaonidae). 69: 1–44.
- RASPLUS, JY., C. KERDELHUÉ, I. LE CLAINCHE y G. MONDOR. 1998. Molecular phylogeny of fig wasps Agaonidae are not monophyletic. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Serie III*.
- RASPLUS, JY. 1996. The one-to-one species specificity of the *Ficus*-Agaonidae mutualism: how casual? *In* The Biodiversity of African Plants.
- RASPLUS, JY., y L. SOLDATI. 2005. Familia Agaonidae. Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical.
- RASPLUS, JY, L.J. RODRIGUEZ, L. SAUNÉ, YQ. PENG, A. BAIN, F. KJELLBERG, RD. HARRISON, ET AL. 2020. Exploring systematic biases, rooting methods and morphological evidence to unravel the evolutionary history of the genus *Ficus* (Moraceae). *Cladistics* 37: 402–422.
- RENWICK, J. 1989. Chemical ecology of oviposition in phytophagous insects. *Experientia* 45:

223–228.

- RØNSTED, N., G.D. WEIBLEN, W.L. CLEMENT, N.J.C. ZEREGA y V. SAVOLAINEN. 2008. Reconstructing the phylogeny of figs (*Ficus*, Moraceae) to reveal the history of the fig pollination mutualism. *Symbiosis (Rehovot)* 45: 45–55.
- RZEDOWSKI, J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México.
- SCHIESTL, F.P. 2010. The evolution of floral scent and insect chemical communication. *Ecology Letters* 13: 643–656.
- SEGAR, S.T., M. VOLF, M. SISOL, N.A. PARDIKES y D. SOUTO-VILARÓS. 2019. Chemical cues and genetic divergence in insects on plants: conceptual cross pollination between mutualistic and antagonistic systems. *Current Opinion in Insect Science* 32: 83–90.
- SHANAHAN, M., S.O. SAMSON, S.G. COMPTON y R.T. CORLETT. 2001. Fig-eating by vertebrate frugivores: A global review. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 76: 529–572.
- SMITH, M. y J.L. BRONSTEIN. 1996. Site variation in reproductive synchrony in three Neotropical figs. *Journal of Biogeography* 23: 477–486.
- SMN, (SERVICIO METEOROLÓGICO NACIONAL). 2010. Información Climatológica por estado (documento en línea). *Servicio Meteorológico Nacional*<https://smn.cna.gob.mx/es/informacion-climatologic>.
- SOLER, C., M. HOSSAERT-MCKEY, B. BUATOIS, J.M. BESSIRE, B. SCHATZ y M. PROFFIT. 2011. Geographic variation of floral scent in a highly specialized pollination mutualism. *Phytochemistry* 72: 74–81.
- SOTO, M. 2004. El Clima. In S. Guevara, J. Laborde, and G. Sanchez-Ríos [eds.], Los Tuxtles. El paisaje de la sierra, Instituto de Ecología A.C. y Unión Europea, Xalapa, Veracruz.
- SOUSA, M. 1968. Ecología de las leguminosas de Los Tuxtles, Veracruz. *Anales del Instituto de Biología, UNAM* 39: 121–160.
- SOUTO-VILARÓS, D., M. PROFFIT, B. BUATOIS, M. RINDOS, M. SISOL, T. KUYAIVA, B. ISUA, ET AL. 2018. Pollination along an elevational gradient mediated both by floral scent and pollinator compatibility in the fig and fig-wasp mutualism. *Journal of Ecology* 106: 2256–2273.
- SOUZA, C.D., R.A.S. PEREIRA, C.R. MARINHO, F. KJELLBERG y S.P. TEIXEIRA. 2015. Diversity of fig glands is associated with nursery mutualism in fig trees. *American Journal of Botany* 102: 1564–1577.
- SU, Z.-H.H., H. IINO, K. NAKAMURA, A. SERRATO y K. OYAMA. 2008. Breakdown of the one-to-one

- rule in Mexican fig-wasp associations inferred by molecular phylogenetic analysis. *Symbiosis* 45: 73–81.
- SULEMAN, N., R.J. QUINNELL y S.G. COMPTON. 2014. Floral ratios in the figs of *Ficus montana* span the range from actively to passively pollinated fig trees. *Acta Oecologica* 57: 67–72.
- SULEMAN, N., R.J. QUINNELL y S.G. COMPTON. 2013. Variation in inflorescence size in a dioecious fig tree and its consequences for the plant and its pollinator fig wasp. *Plant Systematics and Evolution* 299: 927–934.
- TEIXEIRA, S.P., M.F.B. COSTA, J.P. BASSO-ALVES, F. KJELLBERG y R.A.S. PEREIRA. 2018. Morphological diversity and function of the stigma in *Ficus* species (Moraceae). *Acta Oecologica* 90: 117–131.
- TEIXEIRA, S.P., M.F.B. COSTA, J.P. BASSO-ALVES, F. KJELLBERG y R.A.S. PEREIRA. 2020. The synstigma turns the fig into a large flower. *Botanical Journal of the Linnean Society* 1–13.
- VERKERKE, W. 1989. Structure and function of the fig. *Experientia* 45: 612–622.
- VERKERKE, W. 1987. Syconial anatomy of *Ficus asperifolia* (Moraceae), a gynodioecious tropical fig. *Proceedings Nederlandse Akademie van Wetenschappen. Series C: Biological and Medical Sciences* 90: 461–492.
- VERMA, S., A. SALAZAR, J. NEGENDANK, M. MILÁN, I. NAVARRO-L y T. BESCH. 1993. Características petrográfica y geoquímicas de elementos mayores del Campo Volcánico de Los Tuxtlas, Veracruz, México. *Geofísica Internacional* 32: 237–248.
- VILLASEÑOR, J.L., E. ORTIZ y A. CAMPOS-VILLANUEVA. 2018. High Richness of Vascular Plants in the Tropical Los Tuxtlas Region, Mexico. *Tropical Conservation Science* 11: 1–12.
- WANG, G., J. CHEN, Z.-B. LI, F.P. ZHANG y D.R. YANG. 2014. Has pollination mode shaped the evolution of *Ficus* pollen? *PLoS ONE* 9: 1–7.
- WANG, G., S.G. COMPTON y J. CHEN. 2013. The mechanism of pollinator specificity between two sympatric fig varieties: A combination of olfactory signals and contact cues. *Annals of Botany* 111: 173–181.
- WANG, R., XY. CHEN, Y. CHEN, G. WANG, D. DUNN, R.J. QUINNELL, y S.G. COMPTON. 2019. Loss of top-down biotic interactions changes the relative benefits for obligate mutualists. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 286 – 2018-2501.
- WEIBLEN, G.D. 2002. How to be a fig wasp. *Annual Review of Entomology* 47: 299–330.
- WIEBES, J.T. 1995. The New World Agaoninae (Pollinators of Figs). Amsterdam, North Holland.

- YANG, L.Y., C.A. MACHADO, X.D. DANG, Y.Q. PENG, D.R. YANG, D.Y. ZHANG y W.J. LIAO. 2015. The incidence and pattern of copollinator diversification in dioecious and monoecious figs. *Evolution* 69: 294–304.
- ZENG, J., H. YU y F. KJELLBERG. 2018. Transcriptome analysis of genes involved in the response of a pollinator fig wasp to volatile organic compounds from its host figs. *Acta Oecologica* 90: 91–98.
- ZHANG, F., Y.Q. PENG, S.G. COMPTON y D. YANG. 2009. Floral characteristics of *Ficus curtipes* and the oviposition behavior of its pollinator fig wasp. *Annals of The Entomological Society of America* 102: 556–559.
- ZHANG, X., G. WANG, S. ZHANG, S. CHEN, Y. WANG, P. WEN, X. MA, Y. SHI, R. QI, Y. YANG, Z. LIAO, J. LIN, J. LIN, X. XU, X. CHEN, X. XU, F. DENG, L. ZHAO, Y-I. LEE, E. WANG, X-Y CHEN, Y. LIN, J. ZHANG, H. TANG, J. CHEN, R. MING. 2020. Genomes of the Banyan tree and pollinator wasp provide insights into fig-wasp coevolution. *Cell* 183: 875-889.e17.

## Capítulo II

### **El papel del ostíolo en el mutualismo *Ficus*-avispa polinizadora desde una perspectiva morfo-anatómica**

**(The roles of the ostiole in the fig-fig wasp mutualism from a  
morpho-anatomical perspective)**

Publicado en *Journal of Plant Research*

Castro-Cárdenas, N., Vázquez-Santana, S., Teixeira, S.P. Ibarra-Manríquez, G. 2022.

The roles of the ostiole in the fig-fig wasp mutualism from a morpho-anatomical perspective. *Journal of Plant Research* 135: 739–755.

<https://doi.org/10.1007/s10265-022-01413-9>

*Journal of*  
***Plant Research***

Vol. 135 No. 6

November 2022



 Springer

The Botanical Society of Japan

Portada de la Revista *Journal of Plant Research*, vol. 135, N. 6. Noviembre 2022.





# The roles of the ostiole in the fig-fig wasp mutualism from a morpho-anatomical perspective

Nadia Castro-Cárdenas<sup>1,2</sup> · Sonia Vázquez-Santana<sup>3</sup> · Simone P. Teixeira<sup>4</sup> · Guillermo Ibarra-Manríquez<sup>1</sup>

Received: 26 August 2021 / Accepted: 11 September 2022  
© The Author(s) under exclusive licence to The Botanical Society of Japan 2022, corrected publication 2022

## Abstract

The syconium is the urn-shaped inflorescence shared by all species of the genus *Ficus*. The orifice at the apex of the syconium is called the ostiole, and it is covered by interlocking bracts. The ostiolar bracts can have different arrangements, which only allow the entry of mutualist wasps and promote reproductive isolation among *Ficus* species. Here, we analyze the ostiolar structures that could play a role as selective filter and therefore impact the fig-fig wasp mutualism in the neotropical *Ficus* sections *Americanae* and *Pharmacosycea*. Samples of syconia with pistillate flowers during the receptive phase of seven species of *Ficus* were examined using light and scanning electron microscopy. Tests for histolocalization of substances were employed to detect secretory activity throughout the ostiolar tissues. Our results indicated that the ostiole has two components: ostiolar bracts and the periostiolar zone. Interspecies variation in ostiolar bract arrangement in both sections studied was broader than previously reported. We report for the first time for *Ficus*: (i) two types of ostiolar osmophores (mesophyll and diffuse), that could be a source of volatile compounds for attracting fig wasps; (ii) colleters in the axil of ostiolar bracts, which probably lubricate and facilitate the entry of pollinating wasps into the syconial cavity; (iii) secretory trichomes around the ostiolar bracts, and (iv) syconium basal bracts (*F. isophlebia*) covering the ostiole, which are the first physical barrier that the fig wasps must overcome to access receptive pistillate flowers. We describe the zones that compose the ostiole, which support the hypothesis that the ostiole is a selective filter in the interactions of fig trees with Agaonidae fig wasps. We also suggest that ostiolar osmophores, colleters, the periostiolar zone, and the arrangements of the ostiolar bracts may be informative with respect to *Ficus* systematics.

**Keywords** Colleters · Diffuse osmophore · Fig · Mesophyll osmophore · Ostiolar bracts · Syconium

## Introduction

*Ficus* (Moraceae) species that inhabit the American continent belong to subg. *Pharmacosycea* (Miq.) Miq. and subg. *Spherosuke* Raf. (Berg 1989; Ibarra-Manríquez et al. 2012; Pederneiras et al. 2015). These subgenera are associated with specific genera of Agaonidae pollinating wasps: *Tetrapus*

Mayr 1885 in *Pharmacosycea*, and *Pegoscapus* Cameron 1906, in *Spherosuke* Raf. (Cruaud et al. 2012; Rasplus and Soldati 2005). The fig or syconium is a modified urn-shaped inflorescence that encloses numerous unisexual flowers; it is the synapomorphy that distinguishes *Ficus* from the rest of the angiosperms (Basso-Alves et al. 2014; Berg and Corner 2005; Galil and Eisikowitch 1968; Verkerke 1989). The

✉ Guillermo Ibarra-Manríquez  
gibarra@iies.unam.mx

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Antigua carretera a Pátzcuaro 8701. Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta. C. P. 58190. Morelia, C. P. 58190 Morelia, Michoacán, Mexico

<sup>2</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C. P. 04510 Ciudad de México, Mexico

<sup>3</sup> Laboratorio de Desarrollo en Plantas, Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C. P. 04510 Ciudad de México, Mexico

<sup>4</sup> Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café, s/n, 14040-903, SPRibeirão Preto, Brazil

pollinating wasps can only enter the syconium through a small apical orifice called the ostiole, which is covered by superficial bracts. Wasps are attracted by a particular mixture of volatile compounds during the receptive phase of the syconium, which lasts between 1 and 7 days, depending on the species (Berg and Corner 2005; Harrison 2005; Hossaert-Mckey et al. 2010; Piedra-Malagón et al. 2019; Wang et al. 2013).

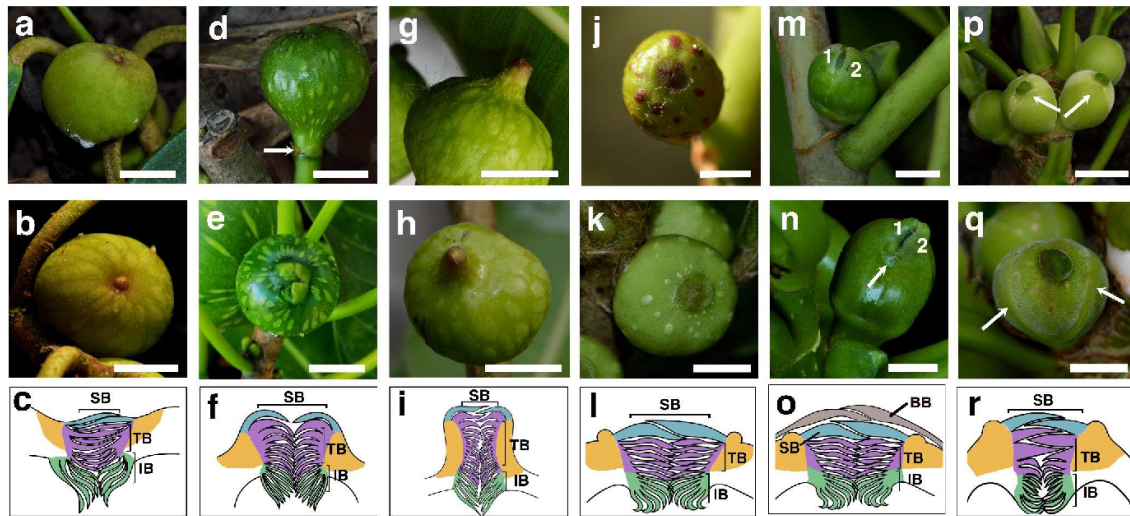
The ostiole is one of the most important selective filters in the complex mutualistic relationship between *Ficus* and Agaonidae wasps in that it limits the size and number of fig wasps that enter the syconium, it is a source of the fragrance that attracts pollinating wasps, and it prevents the entry of parasites and herbivores into the syconium (Hao-Yuan et al. 2010; Janzen 1979; Liu et al. 2011; Souto-Vilarós et al. 2018; Souza et al. 2015; van Noort and Compton 1996; Verkerke 1988; Wang et al. 2013). Specifically, zones on the ostiolar bracts and the external surface of the receptacle of *F. auriculata* Lour., *F. enormis* Mart. ex Miq., *F. ingens* (Miq.) Miq., *F. lyrata* Warb., *F. microcarpa* L. f., *F. montana* Burm. f., *F. pumila* L., and *F. tikoua* Bureau have been found to emit floral scents that attract pollinating wasps (Bajinath and Naicker 1989; Machado et al. 2013; Souza et al. 2015). Stomata and trichomes near the ostiolar bracts also seem to participate in fragrance emission in *F. ottomifolia* (Miq.) Miq. (Verkerke 1986) and *F. asperifolia* Miq. (Verkerke 1987a).

The bracts associated with the ostiole vary among the sections and subgenera of *Ficus* in morphology and arrangement and have been given different names depending on their position along the ostiole. Ramírez (1974) recognized two types of ostiolar bracts (superficial and others) and described the arrangements of these bracts within the sections and subgenera of *Ficus*. Verkerke (1989) proposed three ostiolar types based exclusively on the arrangement of the ostiolar bracts. In Type I, all ostiolar bracts interlock to form a helicoidal passage through the ostiole; this type has been recorded in subg. *Urostigma* (Endl.) Miq. and the sections *Americanae* (Miq.) Corner, *Conosycea* (Miq.) C.C. Berg, *Leucogyne* Corner, *Stilpnophyllum* (Endl.) C.C. Berg and *Urostigma* (Endl.) Griseb. In Type II, the superficial bracts of the ostiole are interlocked, while the apex of the internal bracts curves downwards, forming a tunnel into the cavity of the syconium (subg. *Pharmacosycea* (Miq.) Miq., sect. *Pharmacosycea* (Miq.) Griseb.). In Type III, all ostiolar bracts descend to form a bilabiate (subg. *Urostigma*, sect. *Galoglychia* (Gasp.) Endl.) or bilabiate-triradiate structure (subg. *Urostigma*, sect. *Malvanthera* Corner). Moreover, Machado et al. (2013) further proposed three different types of ostiolar bracts based on anatomical and functional characteristics: (i) secretory—the most external or superficial bracts, characterized mainly by the presence of trichomoids;

(ii) transitional—situated more internally than secretory bracts, with shorter trichomoids, and (iii) wall—positioned in the internal wall of the ostiole, with a conical appearance and abaxial epidermis without trichomoids.

There are only a few studies that provide some details of the structure of the ostiole and its relationship with pollinating wasps on the American continent. The anatomy of different types of ostiolar bracts and the secretory structures associated with them, such as trichomoids and secretory trichomes, were described in *F. enormis*, showing the morphophysiological complexity of the ostiolar bracts (Machado et al. 2013). Mesophyll osmophores in the ostiolar bracts and the outer wall of the syconium were associated with zones of emission of volatile compounds that allow fig wasps to locate the syconia during the receptive phase (Souza et al. 2015; Piedra-Malagón et al. 2019) described developmental phases of the syconium of *F. petiolaris* Kunth, though few details were provided on the morphology of the ostiole. Syconium development, particularly morphological changes in the ostiolar bracts were reported for *F. tuerckheimii* Standl., including the presence of trichomoids on the external ostiolar bracts and osmophores on the external syconium wall close to the ostiole (Delgado-Pérez et al. 2020). Lastly, Rojas-Cortés et al. (2022) described the morphological changes in the developmental phases of the syconium of *F. pringlei* S. Watson, with images of the ostiole morphological changes in each development phase.

Despite the importance of the ostiole, its morphology or anatomy has only been detailed in approximately 20 species, covering only some of the sections and subgenera of *Ficus* (Delgado-Pérez et al. 2020; Machado et al. 2013; Souza et al. 2015; Verkerke 1989). Additionally, descriptions of the structures associated with the ostiole vary in their degree of detail, making it difficult to compare them among taxa. This information is particularly scarce for American *Ficus* species, where the anatomy of the ostiolar bracts and the structures associated with the production of volatile compounds (e.g., osmophores or trichomoids), have been described for only four species (Delgado-Pérez et al. 2020; Machado et al. 2013; Souza et al. 2015). In this context, the present study aimed to compare the morphoanatomy of the ostiole among seven American species of *Ficus* belonging to the sections *Americanae* and *Pharmacosycea* by: (i) identifying and describing the structures that compose the ostiole; (ii) identifying the secretory structures of the ostiole related to the attraction of its pollinating wasps, and (iii) the discuss the potential roles of the ostiole in the fig-fig wasp mutualism.



**Fig. 1** Syconium ostioles of *Ficus*. The top row shows mainly the lateral view of the syconium, the middle row shows principally the frontal view of the ostiole, and the bottom row shows a diagram of the location and arrangement of the different classes of bracts. Sect. *Pharmacosycea*. a–c *F. apollinaris*. d–f *F. insipida*. g–i *F. yoponensis*. Sect. *Americanae*. j *F. americana*. k–l *F. colubrinae*. m–o *F. isophlebia*. p–r *F. obtusifolia*. c, f, i, l, o, r Diagrams of the ostiole. In *F. insipida* (e, f), the

superficial bracts are not interlaced, leaving the ostiole partially open. In *F. isophlebia* (m, n) that basal bracts (1, 2) cover the ostiole and the wing of a pollinating wasp is visible stuck between the basal bracts (arrow in n). BB basal bract (grey shading), SB superficial bracts (blue shading), TB transitional bracts (purple shading), IB internal bracts (green shading), PZ periostiolar zone (yellow shading). Scale bars: d, e = 2 cm; g, h, p = 1 cm; a, b, m, n, q = 5 mm; j = 2.5 mm

## Materials and methods

### Sampling and study area

The species included in the study were collected in the Los Tuxtlas mountain range of southeastern Veracruz, Mexico (18°10'–18°45' N and 94°42'–95°27' W). They belong to the two American sections of *Ficus*: *Pharmacosycea* (*F. apollinaris* Dugand., *F. insipida* Willd., and *F. yoponensis* Desv.) and *Americanae* (*F. americana* Aubl., *F. colubrinae* Standl., *F. isophlebia* Standl., and *F. obtusifolia* Kunth) (Fig. 1). Hereafter, the sections will be mentioned without indicating their taxonomic category. The species studied were chosen because they cover a wide range of syconium size and are relatively abundant regionally. A total of 50 syconia were collected from five individuals (10 syconia from each individual) of each species. The syconia had pistillate flowers with receptive stigmas (phase B of female sensu Galil and Eisikowitch 1968). Syconia samples were fixed in buffered formalin (Lillie 1954) and FAA solution (Johansen 1940; Márquez-Guzmán et al. 2016).

### Histological and surface analyses

For the analysis of syconia under light microscopy, the fixed material was dehydrated in an ascending ethanol series and embedded in LR White resin (Electron Microscopy

Sciences), Leica Histo-resin (Heraeus-Kulzer, Hanau, Germany), or Paraplast (Sigma-Aldrich). The material was divided into three parts to include it in different resins. The LR White resin-embedded material was cut into 1–2 mm thick sections using a RMC-MT-990 rotary microtome and stained with 0.0% toluidine blue (Márquez-Guzmán et al. 2016). The Paraplast-embedded materials were sectioned at 5–7 µm, using a rotary microtome, stained with safranin and fast green. Histo-resin-embedded material were sectioned at 3–4 µm with a Leica RM-2245 rotary microtome and stained with 0.05% toluidine blue in pH 6.8 phosphate buffer (O'Brien et al. 1964). The sections were mounted in synthetic resin.

Histochemical tests were performed to detect total polysaccharides (periodic acid Schiff's reagent; Feder and O'Brien 1968), lipophilic compounds (Sudan IV; Jensen 1962 and Sudan Black B; Pearse 1980), terpenes (Nadi reagent; David and Carde 1964), metabolically active tissues (neutral red, and phenolic compounds 0.05% toluidine blue in pH 6.8 phosphate buffer; O'Brien et al. 1964). Photomicrographs were taken using an Olympus Provis AX70 light microscope equipped with a digital camera.

The morphology of the ostiole was described using scanning electron microscopy (SEM). The fixed samples were dehydrated in gradual ethanol, critical point dried with CO<sub>2</sub>, mounted on stubs, coated with gold, observed, and photographed using a Jeol JSM-5310 LV scanning electron

**Table 1** Characteristics of the ostiole in seven neotropical species of *Ficus* (Presence (+), Absence (-))

Ostiole traits	Sect. <i>Pharmacosycea</i>			Sect. <i>Americanae</i>			
	<i>F. apollinaris</i>	<i>F. insipida</i>	<i>F. yoponensis</i>	<i>F. americana</i>	<i>F. colubrinae</i>	<i>F. isophlebia</i>	<i>F. obtusifolia</i>
<b>Periostiole zone</b>							
Laticifer	-	+	+	-	-	-	-
Diffuse osmophores	+	+	+	+	+	+	+
Mesophyll osmophores	+	-	+	+	+	+	+
<b>Superficial bracts</b>							
Colleters	+	+	+	+	+	+	+
Phenolic epidermis	+	+	+	+	+	+	+
Laticifer	-	+	+	-	-	-	-
Mesophyll osmophores	-	+	+	+	+	+	+
<b>Transitional bracts</b>							
Colleters	+	+	+	+	+	+	+
Druses	+	+	+	+	+	+	+
Phenolic epidermis	+	+	+	+	+	+	+
Palisade epidermis	-	+	-	-	-	-	-
<b>Internal bracts</b>							
Colleters	+	+	+	+	+	+	+

microscope. Some of the photographs were artificially colored with Adobe Photoshop version 21.0.1 software.

The typification of the ostiolar bracts follows the criteria proposed by Machado et al. (2013), but with modifications to the nomenclature. We refer to the bracts that Machado et al. (2013) called secretory ostiolar bracts as “superficial bracts” because we found that in *F. insipida* these bracts lack secretory structures (see result section), making the previous name inaccurate in this case. We refer to Machado et al.’s “wall bracts” as “internal ostiolar bracts” to better differentiate among the bract types, since all three types are inserted into the ostiolar wall. We considered that these names, related to the bracts’ position and morphology in the ostiole are more precise. The mesophyll osmophores combined the criteria used by Endress (1994) and Vogel (1990). We defined these glandular structures as secretory tissues where volatile compounds are released in the mesophyll; mesophyll cells contain a high amount of reserve substances, large nuclei, dense cytoplasm, and rich vascularization.

## Results

### Delimitation of the ostiole

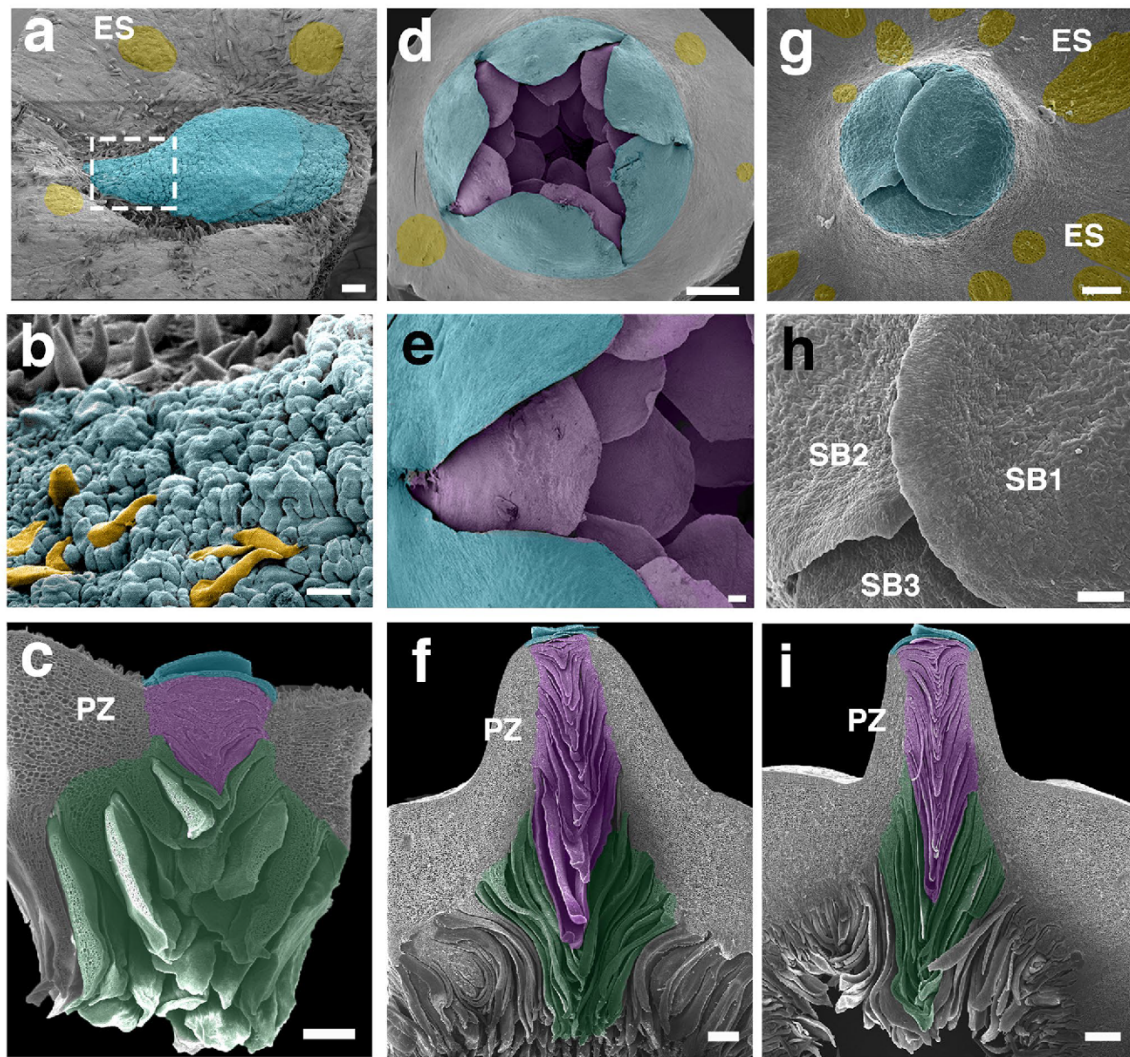
Two zones were identified for the ostioles of all studied species: the zone with bracts (superficial, transitional, or internal) and the periostiole zone (Fig. 1; Table 1). In species of *Pharmacosycea*, the periostiole zone showed elongations or invaginations (Fig. 1c, f, i), while in *Americanae*, it presented annular thickening around the ostiolar bracts (Fig. 1 L, o, r). It was identified that there is very little

variation within each species between the two identified zones of the ostiole.

During the receptive phase, *Pharmacosycea* species presented inconspicuous syconium basal bracts (Fig. 1d), while in *Americanae* they ranged from inconspicuous (*F. americana* and *F. colubrinae*; Fig. 1j, k) to conspicuous (*F. isophlebia* and *F. obtusifolia*; Fig. 1 m, n, p, q). For the first time in *Ficus*, we found that in *F. isophlebia* the basal bracts nearly cover the syconium, including the ostiole, meaning that pollinating wasps must pass through the syconium basal bracts before reaching the superficial ostiolar bracts (Fig. 1 m, n). We observed secretory trichomes close to the apex and along the margin of the basal bracts (Fig. 4g, Fig. S1). The structures found in the two zones of the ostiole in each section are described below.

### Ostiolar bracts (superficial, transitional, and internal)

In *Pharmacosycea* species, the superficial bracts were arranged in an interlocking pattern (Figs. 1a-c and g-i and a, c, g, h and i), except for *F. insipida*, whose bracts only partially covered the ostiole (Figs. 2e and f and d-f). *Ficus apollinaris* presented a rugose epidermis and acicular trichomes (Fig. 2b). In all species, the mesophyll in the thicker area of the bract has four to six layers with dense cytoplasm, druses, phenolic substances, and laticifers (Fig. 3b, d). On the superficial bracts of *F. apollinaris* and *F. yoponensis*, the abaxial side had mesophyll osmophores with two to four layers of small cells with conspicuous nuclei and terpenes (Fig. 3b, c, h, i). The adaxial side of the bracts was composed of cubic cells that, according to the staining reactions,



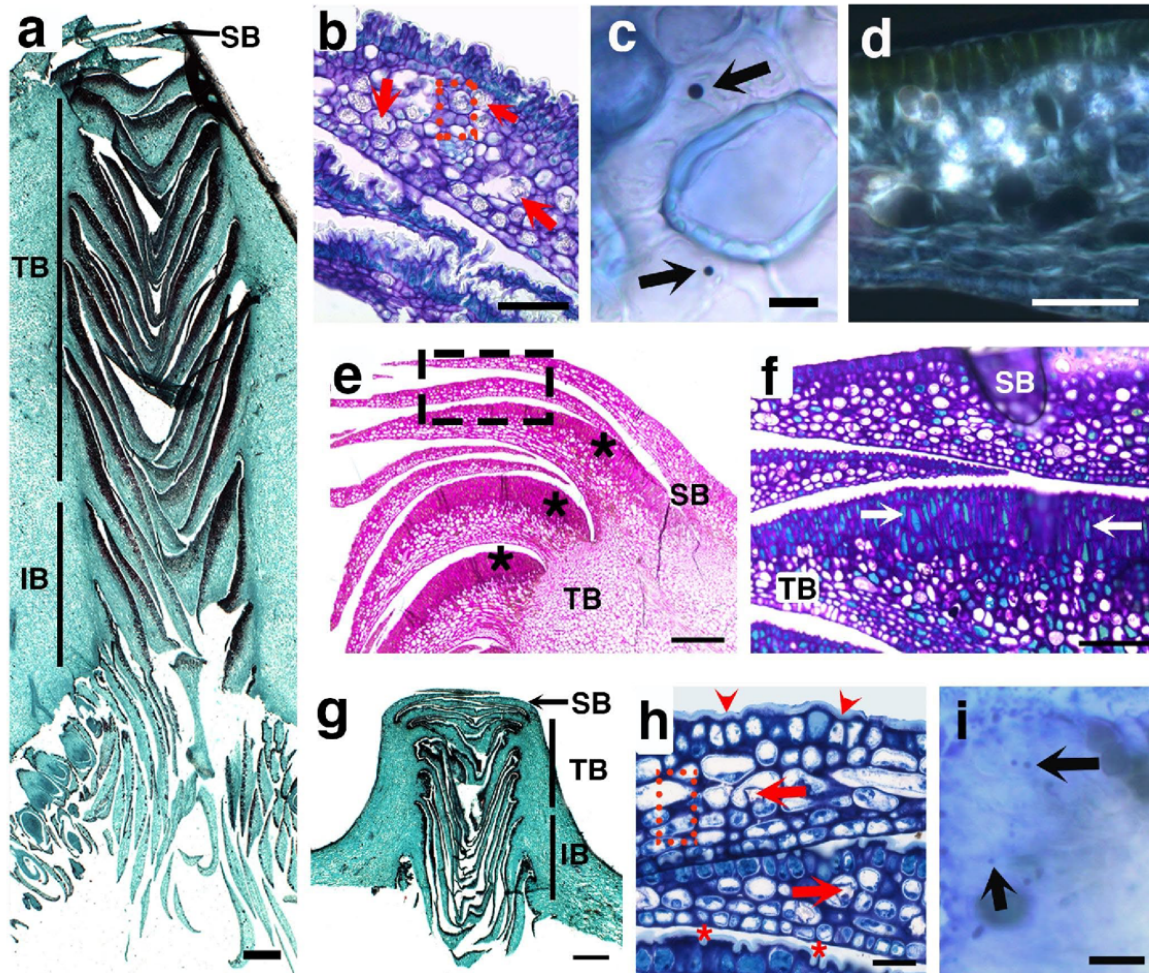
**Fig. 2** Ostiolar bracts of *Ficus* sect. *Pharmacosycea* (scanning electron microscopy). **a-c***F. apollinaris*. **d-f***F. insipida*. **g-i***F. yoponensis*. **a, d, g** Top row. Ostiole in frontal view. Osmophores (yellow shading) can be seen in the periostiole zone. **d** Note that in *F. insipida*, the superficial bracts do not interlace. **b, e, h**, Middle row. **b** Detail of the **a**. Mesophyll osmophore with rugose and abaxial secretory epidermis in the superficial bracts with acicular trichomes (yellow shading). **e**

Superficial (blue shading) and transitional (purple shading) bracts. **h** Detail of the rugose epidermis of the superficial bracts. **c, f, i** Bottom row: Longitudinal section of the arrangement of ostiolar bracts: superficial (blue shading), transitional (purple shading) and internal (green shading). *ES* syconium epidermis, internal bract (green), *PZ* periostiole zone, *SB* superficial bract (blue), transitional bract (purple). Scale bars: **d** = 1 mm; **f, i** = 500  $\mu$ m; **g, c** = 250  $\mu$ m; **a, e, h** = 100  $\mu$ m; **b** = 10  $\mu$ m

contain phenolic compounds (Fig. 3a, g). The cuticle of those cells is thicker on the external wall (Fig. 3 h).

The transitional bracts had a helicoidal arrangement (Figs. 1f and i, 2f and i and 3a and f) in all species except for *F. apollinaris*, in which some of the transitional bracts that were inserted near the internal bracts were perpendicular

to the superficial bracts (Figs. 1c and 2c). In all species, this kind of bracts were characterized by phenolic epidermal cells on the abaxial side (Fig. 3a, b, d, e), mesophyll composed of 10 or more parenchyma cell strata, with dense cytoplasm and abundant druses (Fig. 3e-g). Particularly, in *F. insipida*, we observed a palisade epidermis on the abaxial



**Fig. 3** Anatomy of the ostiolar bracts of *Ficus* sect. *Pharmacosycea*. **a, d, e, f** *F. insipida*. **b, c** *F. apollinaris*. **g-i** *F. yoponensis*. **a, g** Longitudinal sections of the ostiolar bracts showing the epidermis with tannins (red-brown) on the abaxial side. **b** Close-up of the superficial bracts, mesophyll osmophores composed of two or three cell layers, and druses (arrows) in mesophyll cells. **c** Detail of the **b** (red rectangle) showing droplets (arrows) of the terpenes in the mesophyll cells. **d** Detail of superficial bract with druses. **e** Superficial and transitional bracts. Epidermal prolongations of the transitional bracts (asterisks) are absent from the superficial bracts. **f** Close-up of the superficial and transitional bracts of the rectangle in **e**. Detail of several layers

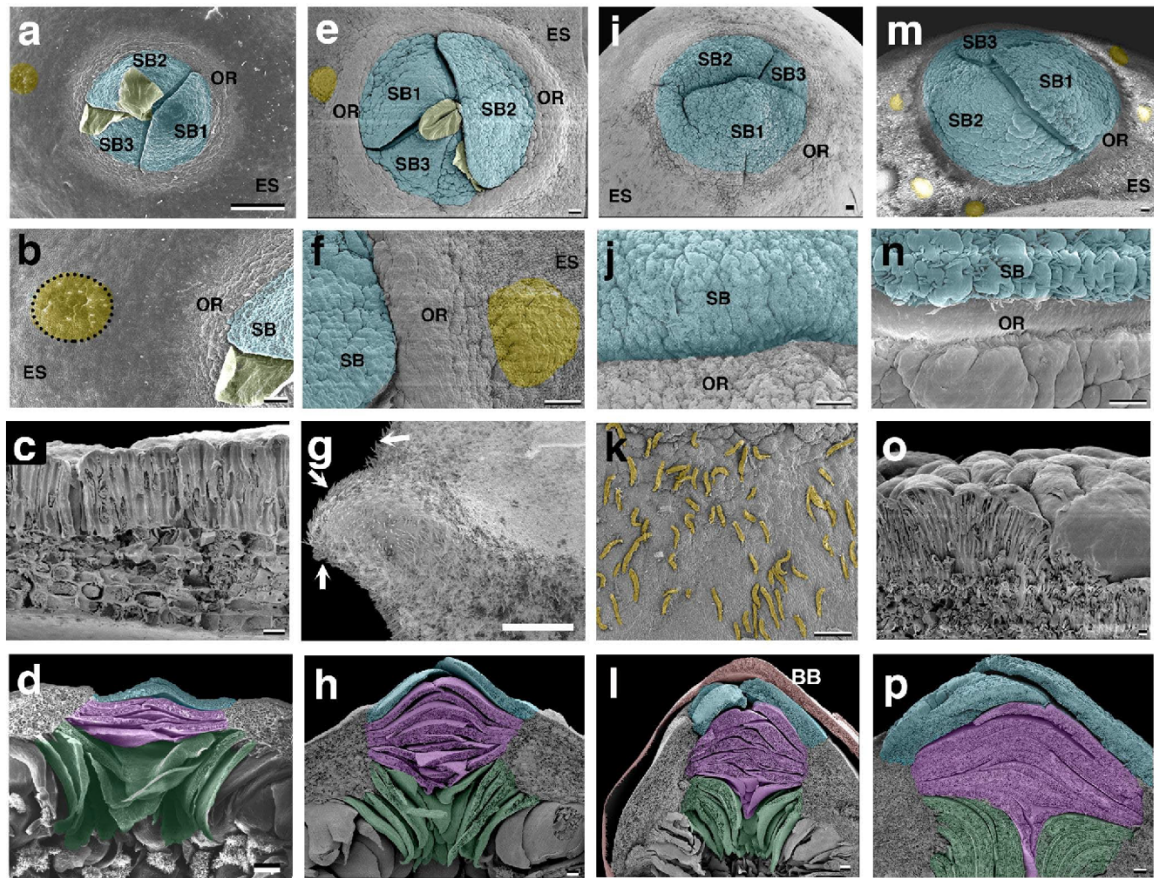
of small cells with dense cytoplasm on transitional bracts (arrows). **h** Thick cuticle of the superficial and transitional bracts (arrow heads and asterisks, respectively), mesophyll cells with dense cytoplasm, and druses (arrows). **i** Close-up of the rectangle in the **h** showing droplets (arrows) of the terpenes in the mesophyll. *IB* internal bract, *SB* superficial bract, *TB* transitional bract. Staining. **a, g** safranin and fast green; **b, f** 0.05% toluidine blue in phosphate buffer, pH 6.8; **c, i** Nadi reagent; **e** periodic acid-Schiff; **h** 0.05% toluidine blue. Scale bars: **d** = 500  $\mu$ m; **a, g** = 400  $\mu$ m; **f** = 250  $\mu$ m; **e** = 100  $\mu$ m; **b** = 50  $\mu$ m; **h** = 20  $\mu$ m; **c, i** = 12.5  $\mu$ m

side with phenolic compounds (Fig. 3e, f). The epidermis of the adaxial side showed rectangular phenolic cells (Fig. 3a, g).

The internal bracts were inserted into the ostiole underneath the transitional bracts, closest to the syconial cavity. They had a resupinate arrangement in *F. insipida* and *F. yoponensis* and a helicoidal arrangement *F. apollinaris* (Figs. 1c, f and i, 2c, f and i and 3a and g). The epidermis

of the abaxial side had small cells, the mesophyll was composed of one or two strata without druses, and the epidermis on the adaxial side had smaller rectangular phenolic cells (Fig. 3a, g).

In *Americanae* species, there were three superficial bracts arranged in an interlocking pattern (Fig. 1 L, o, r, 4a, e, i, m, 5a, d, g, j). The mesophyll has six or more layers in the thicker bract area with dense cytoplasm, druses, terpene



**Fig. 4** Morphology of the ostiolar bracts of *Ficus* sect. *Americanae* (scanning electron microscopy). **a-d** *F. americana*. **e-g** *F. colubrinae*. **h-l** *F. isophlebia*. **m-p** *F. obtusifolia*. **a, e, i, m** Top row. Ostiole in frontal view. **a, b, e** Wings (golden shading) of pollinating wasps are observed. **b, f, j, n** Second row. Close-up of the periostolar zone. **b** Diffuse osmophore (yellow dotted circle). **c, g, k, o** Third row. **c** Close-up of a mesophyll osmophore. **g** Basal bract of the syconium

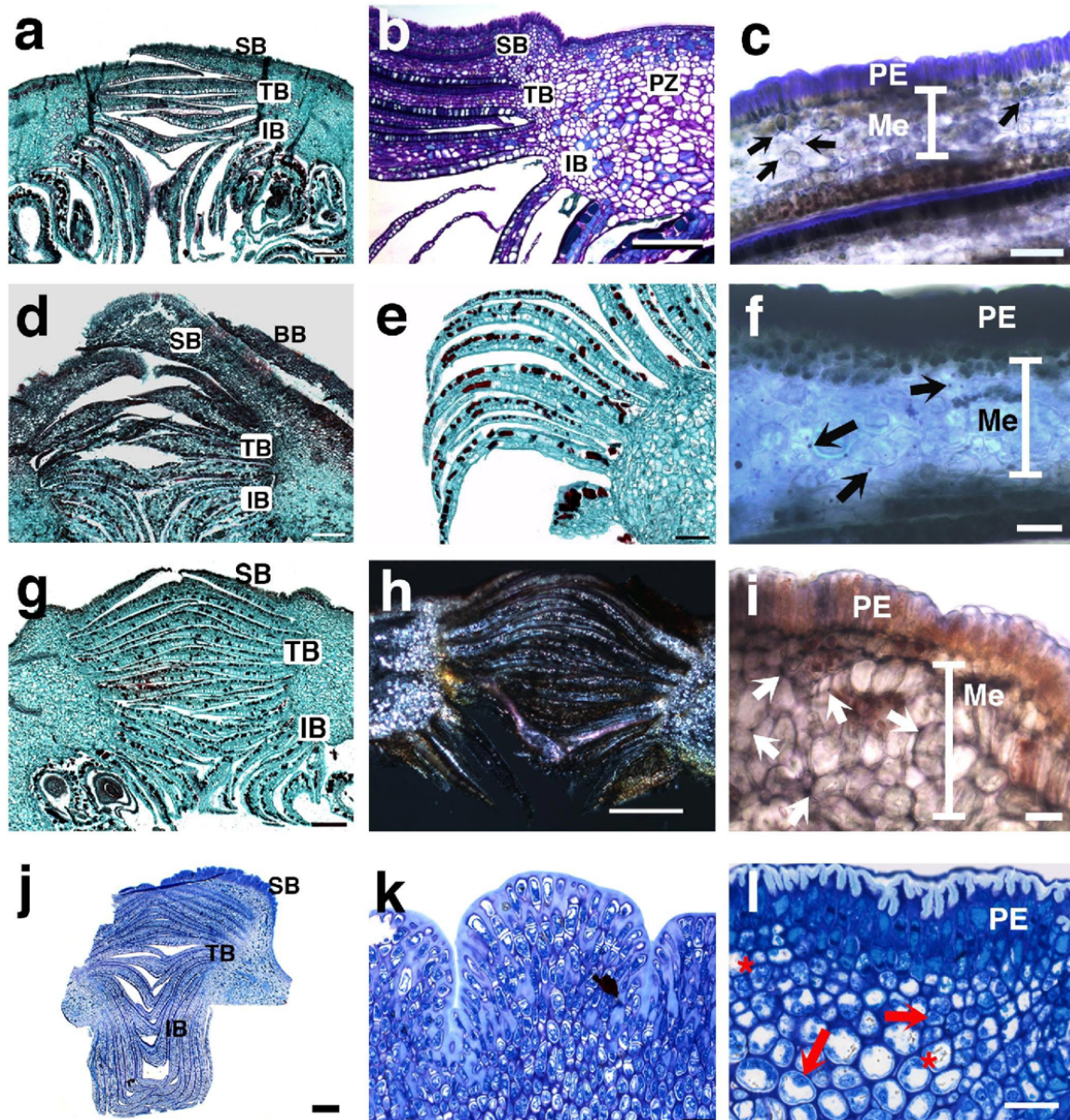
with several secretory acicular trichomes (arrows). **k** Secretory and acicular trichomes of the periostolar zone. **o** Close-up of a mesophyll osmophore. **d, h, l, p** Fourth row. Longitudinal section of the ostiole showing the arrangement of bracts. **BB** basal bract (brown shading). **ES** receptacle epidermis, internal bracts (green shading), **SB** superficial bracts (blue shading), **TB** transitional bract (purple shading), **OR** ostiolar ring. Scale bars: **a, g** = 500  $\mu$ m; **d** = 200  $\mu$ m; **b, e, f, h, i, j, k, l, m, n, p** = 100  $\mu$ m; **c, o** = 10  $\mu$ m

droplets, phenolic substances, and laticifer (Fig. 5). On the superficial bracts, there were mesophyll osmophores with elongate cells, dense cytoplasm, and thick cuticles (Figs. 4c and o and 5c, f, i, 7i-o). Mesophyll osmophores has cytoplasm-rich cells with large nuclei and thin walls (Fig. 5L, 7i, m-o). Sometimes the cuticle extends only into the epidermal cells, both periclinal and anticlinal (Fig. 7h, k). In *F. obtusifolia*, palisade epidermis of the mesophyll osmophores were grouped, forming small gemmae with dense cytoplasm (Figs. 4o and 5j and k). The adaxial side of the bracts was composed of cubic cells containing phenolic compounds (Fig. 5a, d, g, j).

The transitional bracts had a helical arrangement (Fig. 1L, o, r, 4d, h, l, p). In all species, the bracts were

characterized by phenolic epidermal cells on the abaxial side (Fig. 5a, b, d, g, j) and mesophyll composed of five to eight parenchyma cell strata, with dense cytoplasm and abundant druses (Fig. 5b, h).

The internal bracts showed a helicoidal arrangement. These bracts were arranged nearly vertically, with straight apices (Fig. 1L, o, r, 4d, h, l). In *F. americana*, *F. colubrinae*, and *F. isophlebia*, the apex of the bracts curved toward the abaxial surface (Fig. 5a, d, g), while in *F. obtusifolia*, it curved toward the adaxial surface (Fig. 5j). The mesophyll is reduced, composed of an abaxial side of small cells and one or two layers without druses (Fig. 5a, d, g, j). The adaxial side had an isodiametric shape in cross-section and did not show phenolic cells (Fig. 5e).



**Fig. 5** Anatomy of ostiolar bracts of *Ficus* sect. *Americanae*. **a-c** *F. americana*. **d-f** *F. isophlebia*. **g-i** *F. colubrinae*. **j-l** *F. obtusifolia*. **a, d, g, j** General view of the ostiolar bract arrangement and periostolar zone. **b** Periostolar zone and ostiolar bracts. **c, f, i** Superficial bracts showing mesophyll terpenes (arrows). **e** Internal bracts. **h** General view of the ostiole showing druses observed in polarized light. **k** Small gemmae in the mesophyll osmophores of the superficial bracts. **l** Close-up a

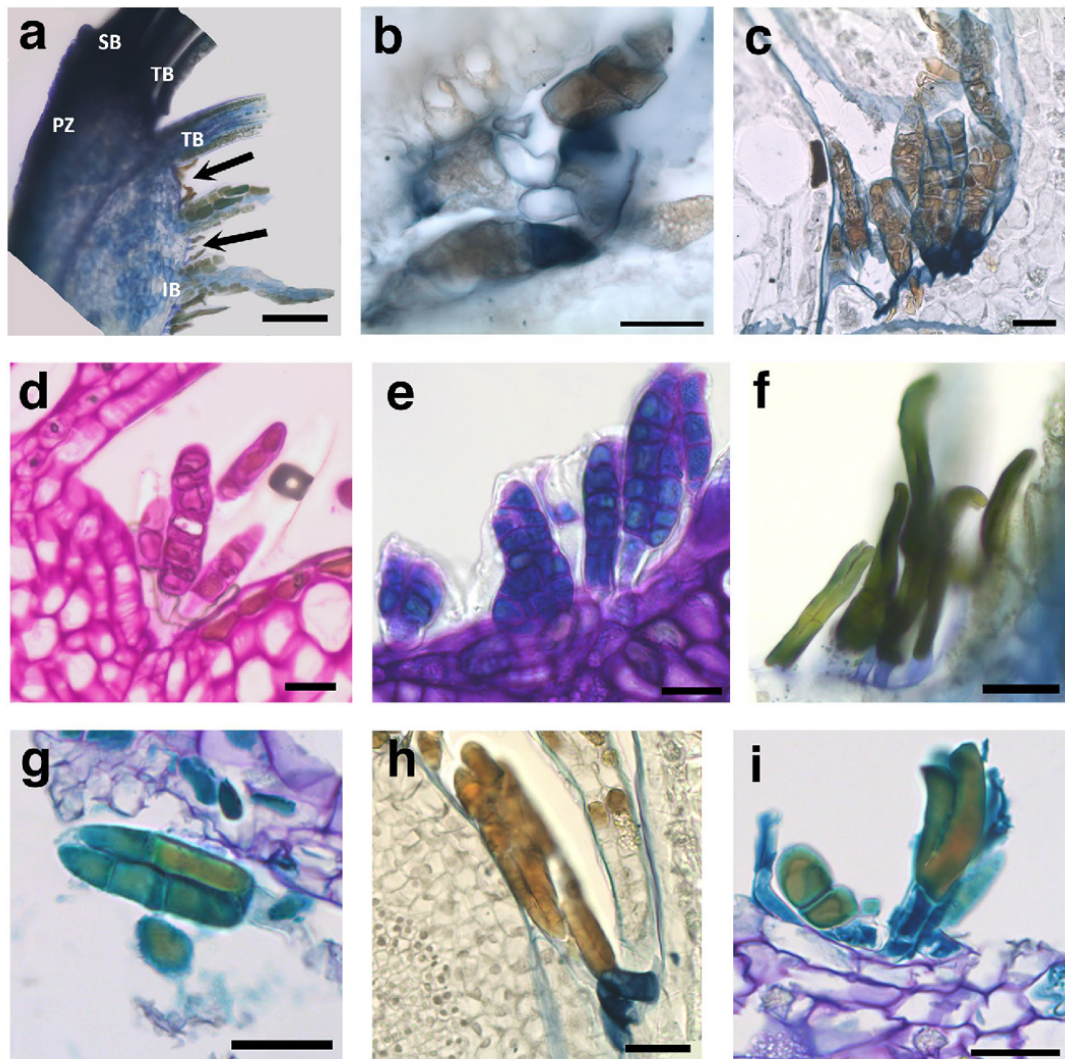
superficial bract. The mesophyll presents conspicuous nuclei (arrows) and druses (asterisks). **BB** basal bracts, **IB** internal bracts, **Me** mesophyll layers, **PE** palisade epidermis, **SB** superficial bract, **TB** transitional bracts. Staining **a, d, e, g**, safranin and fast green; **b**, 0.05% toluidine blue in phosphate buffer, pH 6.8; **j, k, l** toluidine blue; **c, f, i** Nadi Reagent. Scale bars: **h** = 500  $\mu$ m; **j** = 400  $\mu$ m; **a, b, d, g** = 200  $\mu$ m; **e** = 80  $\mu$ m; **l** = 20  $\mu$ m; **f, i** = 10  $\mu$ m; **k** = 8  $\mu$ m

### Colleters

Colleters were found in the seven studied species, with an

axillary distribution in all types of ostiolar bracts (Fig. 6a). These secretory structures are trichomes composed of a single basal cell smaller than the apical cells (Fig. 6b-h) except





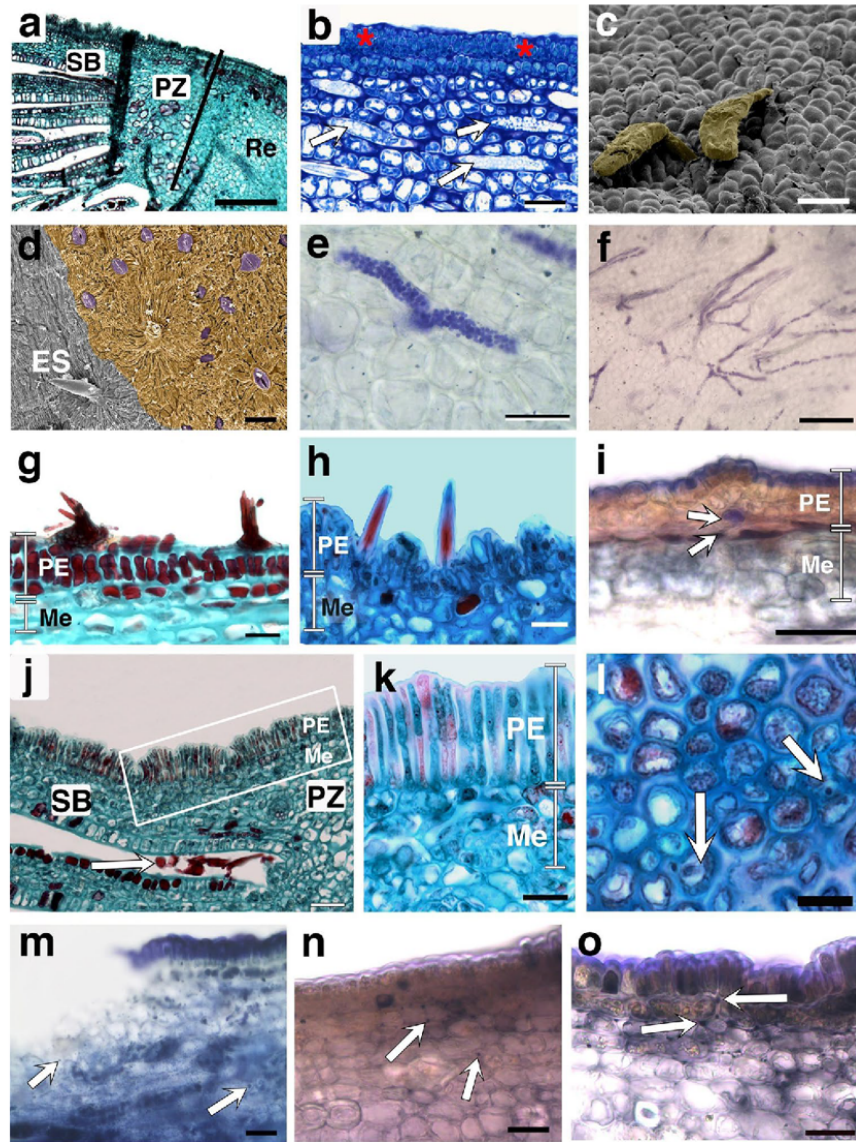
**Fig. 6** Histochemical tests applied to colleters on ostiolar bracts of *Ficus* species. **a, f** *F. americana*. **b** *F. apollinaris*. **c** *F. insipida*. **d-e** *F. yoponensis*. **g** *F. colubrinae*. **h** *F. isophlebia*. **i** *F. obtusifolia*. **a** Location of colleters in the bract axils (arrows). **IB** internal bracts, **PZ** perioستيolar

zone, **SB** superficial bract, **TB** transitional bracts. Staining: **a, f** Nadi Reagent; **b, c, h** Sudan black; **d** Periodic acid-Schiff; **e, g, i** 0.05% toluidine blue in phosphate buffer at pH 6.8. Scale bars: **a**=200  $\mu$ m; **b-i**=25  $\mu$ m

for *F. obtusifolia*, which presented two basal cells (Fig. 6i). The apex of the colleters varied in the number of cells and strata (one or two series; Fig. 6c-i). In the whole the species analyzed, the cell walls were thickened and had a cuticle (Fig. 6b-e), and the cytoplasm of the basal cells contained terpenes, polysaccharides, and/or lipids. The apical cells mainly contained phenolic substances (Fig. 6d).

#### Perioستيolar zone

In all species, the perioستيolar zone epidermis had smaller cells than the rest of the syconium, and sometimes had a rugose texture (Fig. 7a-d). In *Pharmacosycea*, this zone was flat to axially elongated, such that the superficial ostiolar bracts were slightly elevated (*F. insipida* and *F. yoponensis*; Figs. 1d-i and 2f and i) or depressed (*F.*

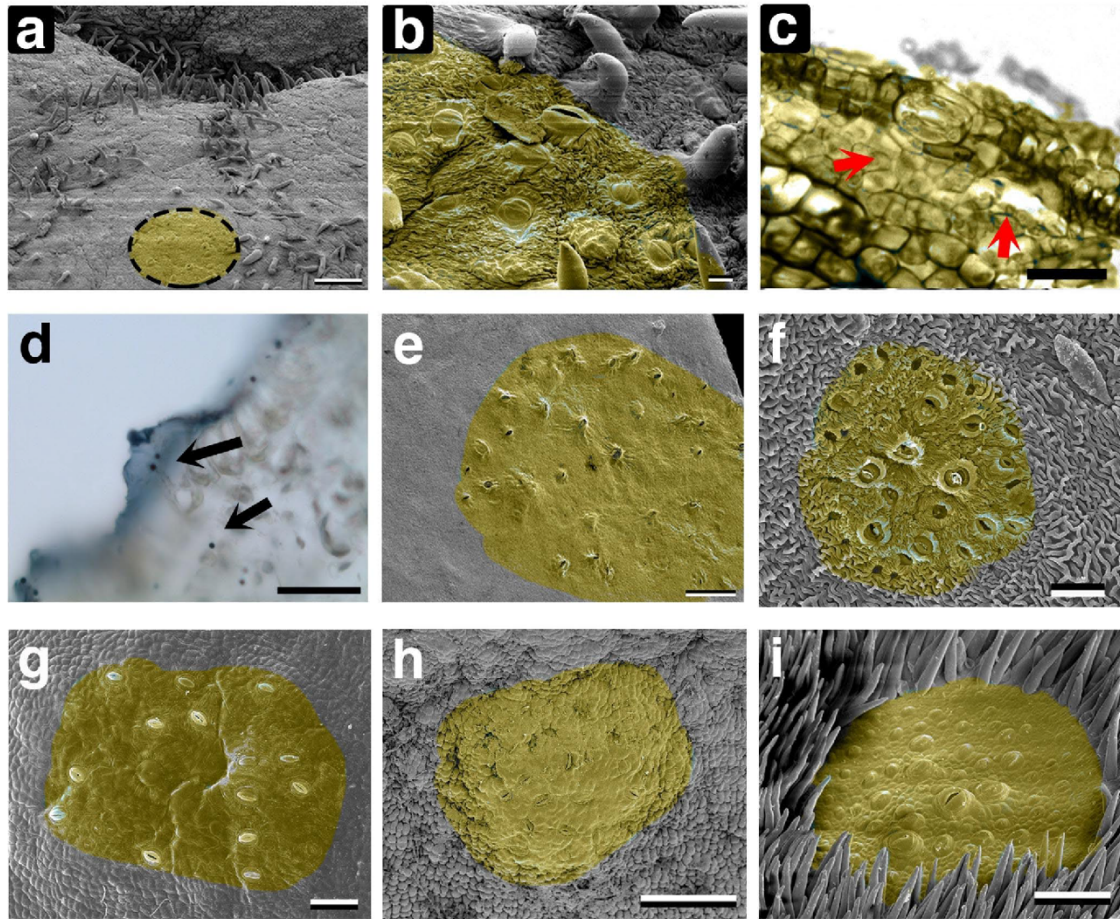


**Fig. 7** Periostolar zone of *Ficus*. **a, o** *F. americana*. **d** *F. apollinaris*. **c, i, j, n** *F. colubrinae*. **k, l, m, f** *F. isophlebia*. **f** *F. insipida*. **h** *F. obtusifolia*. **b, e, g** *F. yoponensis*. **a** Location of ostiolar bracts and periostolar zone. **b** Longitudinal section. Close-up of the epidermis, composed of small isodiametric cells with dense cytoplasm (asterisks), and mesophyll with abundant laticifer (arrows). **c** Panoramic view of the rugose epidermis of the periostolar zone (yellow shading). **d** Close-up of the rugose epidermis with trichomes glands (yellow shading). **e** Close-up of the stomas (purple shading). **e, f** Longitudinal sections and detail of the branched laticifer system. **g** Trichomes with acute apices. **h** Trichomes in the palisade epidermis. **i** Close-up the periostolar zone. Note the cell secreting terpenes between the epidermis and mesophyll (arrows). **j** Mesophyll osmophores of the superficial bracts and the periostolar zone, with

colleters visible between the bracts (arrow). **k** Detail of the mesophyll osmophore formed by two or three cell layers in palisade epidermis and mesophyll with cells with dense cytoplasm. **l** Cross section of the epidermis detailing the conspicuous nuclei (arrows). **m, n, o** Longitudinal section of the mesophyll osmophores between superficial bracts and periostolar zone, showing secretory cells with cytoplasm, large nuclei, and intercellular spaces with terpenes close to palisade epidermis (arrows). **ES** syconium epidermis, **Me** mesophyll layers, **PE** palisade epidermis, **PZ** periostolar zone, **Re** receptacle, **SB** superficial bract. Staining: **a, g, j, k, l** safranin and fast green; **b** toluidine blue; **c, d** scanning electron microscopy; **e, f, i, m, n, o** Nadi Reagent. Scale bars: **a, f**, = 200  $\mu$ m; **d, e, i, o** = 50  $\mu$ m; **b, j, c, n** = 25  $\mu$ m; **g, h, k, m** = 20  $\mu$ m; **l** = 8  $\mu$ m

*apollinaris*; Figs. 1a-c and 2a) relative to the syconium. In

addition, the periostolar zone sometimes had several strata



**Fig. 8** Diffuse osmophores of *Ficus syconia*. **a-d** *F. apollinaris*. **e** *F. insipida*. **f** *F. yoponensis*. **g** *F. americana*. **h** *F. colubrinae*. **i** *F. obtusifolia*. **a** Detail of rows of acicular trichomes oriented toward the ostiolar superficial bracts, and the osmophores located between them (yellow shading). **b** Osmophore composed of open stomata and acicular trichomes. **c** Tangential section of an osmophore showing a few secretory and

isodiametric cells (red arrows) below the stomata. **d** Longitudinal sections. A stoma, where terpene droplets in the mesophyll were observed (arrows). **e-i** Variation in the types of osmophores (yellow shading) found in the periostolar zone. Note that all types are characterized by groups of generally open stomata and epidermis that differs from the rest of the syconium. Scale bars: **a**, **e**, **h** = 100  $\mu$ m; **f**, **g**, **i** = 50  $\mu$ m; **c** = 25  $\mu$ m; **d** = 20  $\mu$ m; **b** = 10  $\mu$ m

of subepidermal parenchyma cells and an extensive laticifer system (Fig. 7e, f); nevertheless, in *F. apollinaris*, the laticifer system was less notable. Externally, some species presented multicellular trichomes (e.g., *F. yoponensis*; Fig. 7g) while others had acicular, unicellular, or rows of trichomes oriented toward the superficial bracts (e.g., *F. apollinaris*; Figs. 7d and 8a and b).

In the *Americanae* species, the periostolar zone was thickened at the base of the superficial bracts, forming a ring around the ostiole (Figs. 1j-r and 4b, f, j and n). Externally, this ring presented either unicellular trichomes (as in *F. isophlebia*; Fig. 4k) or acicular trichomes (as in *F. obtusifolia*;

Fig. 7h). The ring presented a palisade epidermis similar to that of the superficial bracts (Fig. 7h-L).

The periostolar zone had mesophyll and diffuse osmophores (Figs. 7a and j and 8g-i, Fig. S1). The mesophyll osmophores were composed of mesophyll layers, and it was common to find druses and other polygonal crystals in higher abundance than in the external epidermis of the syconium (Fig. 5h, 7g, j, k). The diffuse osmophores had several always-open stomata and subepidermal secretory tissue composed of one or a few cells layers (Fig. 8, Fig. S1). In all species, the diffuse osmophores were found a few layers below the external epidermis of the syconium; they were

isodiametric, with thin cell walls, dense cytoplasm, and intercellular spaces that facilitate the diffusion of substances (Fig. 8c, d). In *Pharmacosyceae*, the diffuse osmophores were in the periostiolar zone (Figs. 2a, d and g and 8a, b, e and f), while in *Americanae*, they were adjacent to the ostiolar ring, opposite the ostiolar bracts (Figs. 4b and f and 8 g-i). In addition, we identified terpene droplets in the mesophyll and diffuse osmophores of *F. apollinaris* (*Pharmacosyceae*) and all species of *Americanae* (Fig. 8d, Fig. S1).

## Discussion

This study contributes new detailed descriptive information on the ostiole which is consistent with hypothesized roles of the ostiole in fig-fig wasp mutualism. Previous descriptions of the ostiole have included only the ostiolar bracts (Machado et al. 2013; Ramirez 1974; Verkerke 1989). Here, we also consider the periostiolar zone as a structure related to the ostiole, given that its cells, structures, and substances likely contribute to the ostiole's functions. The presence of colleter among the ostiole bracts (Figs. 6a and 7f) had not been previously mentioned, and osmophores had been reported in only a small number of species of *Ficus* (Delgado-Pérez et al. 2020; Souza et al. 2015). This is also the first report in the genus (*F. isophlebia*) of the role of the basal bracts of the syconium as a physical barrier to entry by fig wasps (Fig. 1 m-o, 4 L, 5d).

## Secretory structures in the ostiolar bracts

The secretory structures that have been described in the syconium — scent glands, glandular trichomes, and laticifers—have high levels of activity during the receptive phase (Souza et al. 2015; Verkerke 1986, 1989). Secretory structures have been previously described in association with the superficial bracts (secretory bracts) of *F. enormis* (Machado et al. 2013), and in the ostiolar ring and the superficial bracts of *F. tuerckheimii* (Delgado-Pérez et al. 2020). The presence of scent glands (i.e., osmophores) on the superficial bracts of the ostiole corroborates previous results by Souza et al. (2015), who identified these structures in several *Ficus* sections. Mesophyll osmophores located on the superficial bracts are characterized mainly by multiple strata of terpene-secreting mesophyll (Figs. 3 and 5) and these volatile compounds are released through the epidermis. Volatile compounds production by vegetative structures and their liberation to the exterior through the epidermis have been reported previously (Maoz et al. 2020). On the contrary, diffuse osmophores have secretory tissue composed of one or few cell layers and present stomata (Fig. 8).

Both types of osmophores could produce a differential emission of volatile compounds (Hossaert-McKey et al. 2010; Souto-Vilarós et al. 2018; Souza et al. 2015; Vogel 1990; Wang et al. 2013) since it has been suggested that pollinating wasps can detect compounds that act in long-distances attraction and more precise guidance at short distances (Okamoto and Su 2021). In fact, mesophyll osmophores could contribute to detection of *Ficus* species by fig wasps, as has been suggested by the recognition behavior carried out around the ostiole by the pollinating wasps of *F. burtt-davyi* Hutch., *F. sur*, and *F. thomningii* Blume (Gibernau et al. 1998; van Noort 1989). Mesophyll osmophores have been reported in other plant families, such as Asteraceae (Katinas et al. 2020) and Fabaceae (Marinho et al. 2014), with similar functions in terpene secretion. Indeed, the location of the osmophores and the fact that they contained terpenes in our studied species are consistent with the hypothesis that they act as selective filters in the mutualistic interaction between *Ficus*-Agaonidae wasps.

Phenolic compounds had been considered protective secretions and are the result of secondary metabolism related to scent production (Castro and Demarco 2008; Jürgens et al. 2006; Silva-Batista et al. 2021). In *Ficus*, however, phenolic compounds have been linked to other functions, such as maintaining the temperature within the syconia and protecting the flowers and associated structures against herbivore attack. (Souza et al. 2015). Phenolic compounds probably perform these functions in *F. insipida* (Fig. 3d, e). Carrying out specific studies could provide results to corroborate or reject this hypothesis.

The colleter were defined as multicellular glandular trichomes containing terpenes or mucilaginous substances (Cragg 1950; Crang et al. 2019; Werker 2000) that provide defense against insects and fungi (Cragg 1950; Werker 2000). The colleter found in the peduncle of the syconium and among the floral bracts in *Ficus* species (Baijnath and Naicker 1989; Machado et al. 2013; Souza et al. 2015; Verkerke 1986) could also have defense functions. Another putative function of colleter could be the lubrication of fig wasps as they move toward the syconial cavity, which is illustrated here in *F. colubrinae* (Fig. S2). This is suggested by their location among the ostiolar bracts and their lipidic content in the study species (Fig. 6) and in *Ficus enormis* (Machado et al. 2013).

## Secretory structures in the periostiolar zone

Secretory trichomes had not been previously reported around the ostiolar bracts of *Ficus* species. They were present in all the species studied, and their cytoplasmic contents were mainly lipidic substances. Secretory trichomes could

have diverse functions. For instance, the arrangement of the trichomes in *F. apollinaris* could act as a tactile signal to guide fig wasps toward the ostiole (Fig. 8a). Another probable function is to provide a food source for ants, which guard against oviposition by non-pollinating wasps (Lin et al. 2018). Trichomes may also provide chemical protection, given the secondary metabolites they secrete (Santos-Tozin et al. 2016), as indicated in Moraceae species such as *Artocarpus heterophyllus* Lam. and *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. (Schnetzler et al. 2017). It would be interesting to carry out detailed studies of these secretory trichomes to identify their function in *Ficus*.

The diffuse osmophores described in this study contrast with mesophyll osmophores since the latter lack a secretory epidermis, although both release volatile compounds, as has been reported in *Philodendron adamantinum* Mart. ex Schott (Araceae) (Gonçalves-Souza et al. 2017) and in four species of *Acianthera* (Orchidaceae) (Melo et al. 2010). Although the abundance of these stomata in the studied species of *Ficus* could be relatively low, species of *Acianthera* with a similar stomatic density had normal pollinator visitation rates (Melo et al. 2010; Vogel 1963). Stomata have been reported near the ostiolar bracts of *F. ottonifolia* (Verkerke 1986), *F. asperifolia* (Verkerke 1987b), *F. sur* (Verkerke 1988) and *F. erecta* Thunb. var. *beecheana* (Hook. & Arn.) King (Tzeng et al. 2001), and although they were attributed no mutualistic function, these stomata could have the same role we mention here.

Mesophyll osmophores were another secretory structure found in the periostolar zone that may emit volatile compounds. Mesophyll osmophores are found in the ostiolar ring in *Americanae* species. Although trichomoids (which we consider mesophyll osmophores) were first mentioned in *F. enormis* (Machado et al. 2013), the histochemical methods used in that study were unable to identify the substances secreted. Here, we detected terpenes and phenolic compounds (Table 1). Similar structures had been previously illustrated for *F. ottonifolia* and *F. tuerckheimii* (Delgado-Pérez et al. 2020; Verkerke 1986); however, there no data to determine whether they are an important character in *Ficus*-fig mutualism.

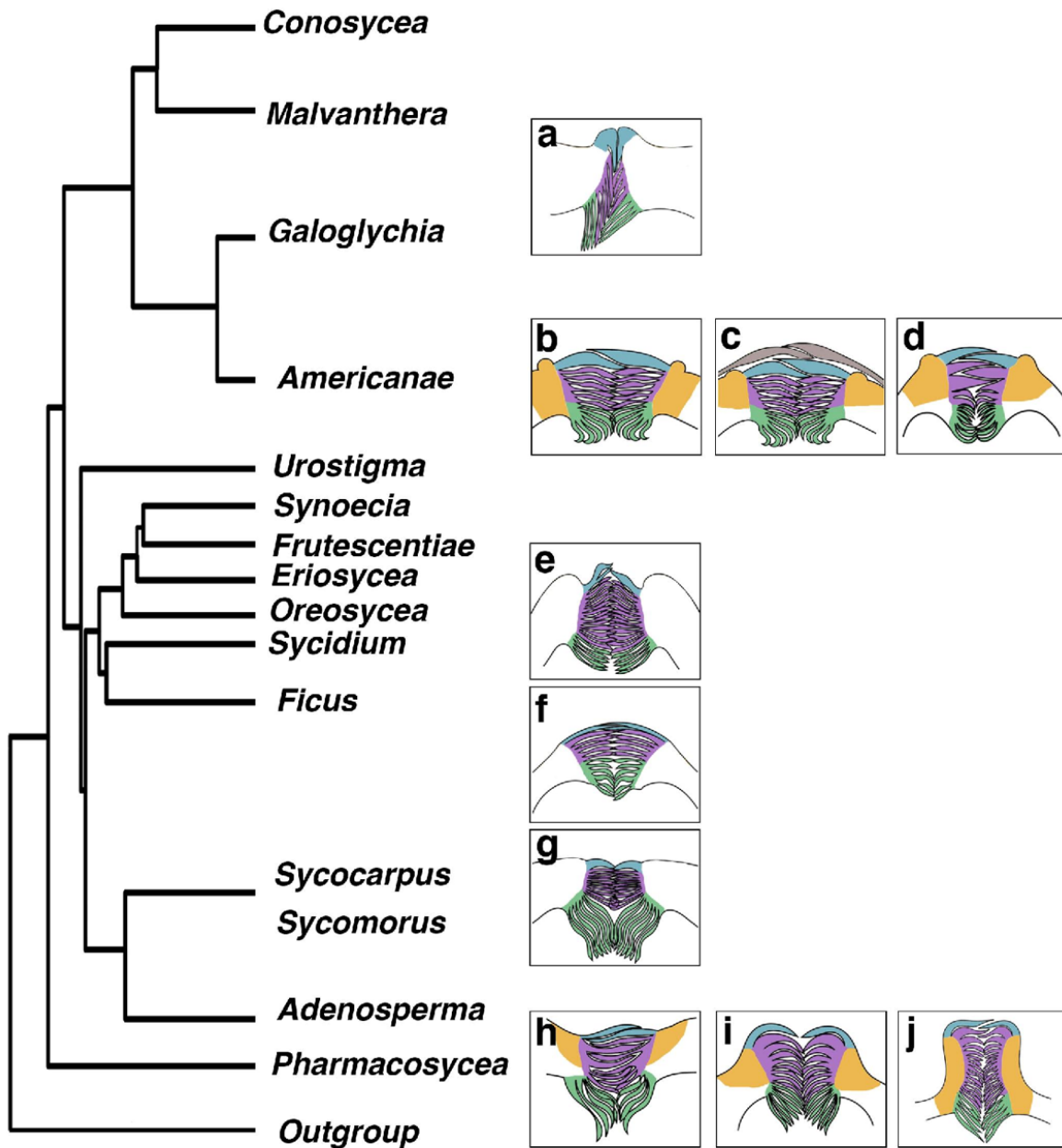
### Systematic significance of the periostolar zone and ostiolar bracts

We propose the periostolar zone as a new term to describe the area around the ostiolar bracts. The periostolar zone has only been registered in the *Pharmacosyceae* and *Americanae* sections (Fig. 9), and its presence must be verified in the other *Ficus* sections. The periostolar zone is easier to identify in some species than in others. In *Pharmacosyceae*, it is

possible to recognize two periostolar zone variants, which have been used as distinguishing characters of the recognized subsections *Pharmacosyceae* (Berg 2006): (i) elevated ostiole, which is visible externally as a tubular prolongation (subsect. *Bergianae*, as *F. insipida* y *F. yoponensis*, Fig. 2e, h) versus (ii) ostiole that is slightly depressed or level with the external wall of the syconium (subsect. *Petenenses* Carvajal & Shabes, to which *F. apollinaris* belongs; Fig. 2b). The descriptions of the subsections do not include more details about the ostiolar structures. Interestingly, similar variation in the position of the ostiole occurs in section *Oreosyceae* (Miq.) Corner (subg. *Pharmacosyceae*), which is restricted to the paleotropic, whose subsections are distinguished by a flattened (subsect. *Glandulosae* C. C. Berg) or prominent (subsect. *Pedunculatae* Sata) ostiole (Berg and Corner 2005). A more detailed characterization of the periostolar zone in these sections of *Ficus* could help determine its functional relevance in their interactions with pollinating wasps.

In *Americanae*, the presence of the ostiolar ring makes the periostolar zone generally identifiable with the naked eye, and differences among species are related to the abundance of trichomes on the external epidermis or the size of the syconium. Although it is possible to locate the ostiolar ring in some American species such as *F. crocata* (Miq.) Miq., *F. gomelleira* Kunth or *F. tuerckheimii* (Delgado-Pérez et al. 2020; Pederneiras et al. 2020), in others it is not as prominent, for example, in *F. obtusifolia* Kunth or *F. petiolaris* (Ibarra-Manríquez et al. 2012; Pederneiras et al. 2020; Piedra-Malagón et al. 2019). An interesting future study would be to determine whether the ostiolar ring is a distinguishing condition of *Americanae*, since it has not been studied in detail in the sister section *Galoglychia* (Gasp.) Endl. (Fig. 9a), nor in the other sections of the subgenus *Urostigma*, from the paleotropic (Berg and Corner 2005).

The species studied here did not fit the ostiole classification schemes proposed by Ramírez (1974) or Verkerke (1989) (Fig. 1). Considering the notable morphological diversity of the syconium (Berg and Corner 2005), it is likely that these categories do not represent the full range of variation in ostiolar bracts of the genus. This was illustrated by Verkerke's (1989) comments on the variants of the Type I ostiole that in the gynodioecious species of the subg. *Ficus* (sections *Neomorpha* King, *Sycidium* Miq. and *Sycocarpus* Miq.), the ostiolar bracts are arranged in a more lax manner, such that from the exterior, more than one superficial bract is observed. In contrast, for monoecious species of the section *Sycomorus*, the internal bracts are elongated and directed toward the syconial cavity (Fig. 9). In addition to these modifications, it should be noted that in *F. insipida*, the superficial bracts are small and do not overlap (Fig. 9i), leaving the ostiole partially open; even so, Verkerke (1989)



**Fig. 9** Phylogenetic hypothesis showing the arrangement of the ostiolar bracts and the location of the periostiolar zone in the *Ficus* species studied (modified from Cruaud et al. 2012). **a** *Galoglychia* and *Malvanthera*. **b-d** *Americanae*. **e** *Sycidium*. **f** *Ficus*. **g** *Sycomorus*

**h-j** *Pharmacosycea*. **a, e, f, g** Based on diagrams from Verkerke (1989). Basal bracts in brown; Superficial bracts in blue; transitional bracts in purple; internal bracts in green; periostiolar zone in yellow

designated it as a Type II ostiole. The open ostiole was pointed out as a characteristic of the subsection *Bergianae* Carvajal & Shabes (Berg 2006) since it was sometimes recorded in *F. adhatodifolia* Schott and *F. obtusiuscula* (Miq.) Miq. Also, in *F. apollinaris* (included in Type II in

Verkerke 1989), the curvature of the apex of the transitional and internal bracts leads to the formation of a helicoid tunnel, like that described for Type I (Fig. 4d). The *Americanae* species included in the current study generally had a Type I ostiole; the only modification was the curvature of the bract

apices, which leads to a much more defined tunnel than in *Pharmacosycea*. Nevertheless, in *F. obtusifolia*, the apex of the internal bracts is curved toward the transitional bracts.

Considering these points, this work shows that the diversity of the arrangement and position of the ostiolar bracts is broader than previously reported. In addition, this diversity was found in *Pharmacosycea* (Fig. 9), one of the first clades to diverge. Morphological studies of this structure may be useful for tracing possible evolutionary paths of the arrangement of the ostiolar bracts in the genus. However, to do this first requires further anatomical studies to help distinguish between transitional and internal bracts, since bract position is a qualitative and gradual criterion that is difficult to divide into discrete categories. Finally, describing the diversity of the ostiolar bracts provides information about the possible selective pressures on these structures and their degree of influence on the specificity of *Ficus* species' interactions with their pollinating wasps.

## Conclusion

This study provided new, detailed descriptions of the ostiole in the context of its potential roles in the fig-fig wasp mutualism. Our results support the hypothesis that the ostiole acts as a selective filter for mutualist interactions. We propose the inclusion of the periostiole zone as a part of the ostiole because it shares characteristics with the superficial ostiolar bracts and presents structures that are likely to be associated with the attraction of pollinating wasps. Trichomes and colleters on the ostiolar bracts, which may serve as tactile signals and lubricating structures, respectively, had not been previously mentioned, but could also play a role in species recognition and selection of their fig wasps. Also, for the first time in *Ficus*, we found that the syconia basal bracts completely covered the ostiole during the receptive phase of the syconia of *F. isophlebia*. Thus, these bracts act as an additional physical barrier to pollinating wasps. Finally, we recommend broadening this type of study to the subgenera and/or sections of the genus, since this could help improve understanding of the evolution of the ostiole as a selective filter and how it has helped to maintain the fig-fig wasp mutualism.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10265-022-01413-9>.

**Acknowledgements** This study is a partial fulfillment of the requirements for N. Castro-Cárdenas to obtain a doctoral degree from the Posgrado en Ciencias Biológicas (Universidad Nacional Autónoma de México; UNAM). A graduate fellowship was awarded to the first author by CONACyT. We are grateful to Silvia Espinosa Matias, Orlando Hernández Cristóbal, and Ana Isabel Bieler for technical support on

SEM and Light microscopy pictures. Also, thanks to Mónica Pérez-Pacheco and Edimárcio da Silva Campos for technical support. We are grateful to Santiago Sinaca Colín, Armando Navarrete Segueda, Iván Leonardo Ek Rodríguez, for their help in field work. Edna Arévalo Marín, Hernán Alvarado Sizzo, Jorge Cortés Flores, and Marcela Aragón Gómez for their priceless support during the whole manuscript preparation. Thanks to the Laboratorio Nacional de Análisis y Síntesis Ecológica of the ENES Morelia, UNAM, for their microscopy facilities and the Los Tuxtlas Tropical Biology Station, Instituto de Biología, UNAM for logistical support. S. P. Teixeira thanks CNPq (grant number 302806/2019-9), Fapesp (grant number 2018/03691-8) and CAPES (finance code 001) for research grants. The manuscript was translated by Lynna Kiere.

**Author contributions** N. C-C., S. V-S., and S. P. T. performed the treatments and histological tests of the syconia and analyzed the data. N. C-C. and G. I-M. conceived and designed the sampling and study. All authors wrote the manuscript.

Electronic supplementary material.

Additional supplementary information may be found online in the electronic supplementary information tab for this article.

## References

- Baijnath H, Naicker S (1989) Developmental anatomy of *Ficus ingens* syconia in relation to its wasp fauna. *S Afr J Bot* 55:409–421. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(16\)31164-4](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(16)31164-4)
- Basso-Alves JP, Pereira RAS, Peng YQ, Teixeira SP (2014) Different ontogenetic processes promote dichy in *Ficus* L. (Moraceae). *Acta Oecol* 57:5–16. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2013.02.012>
- Berg CC (1989) Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia* 45:605–611. <https://doi.org/10.1007/BF01975677>
- Berg CC (2006) The subdivision of *Ficus* subgenus *Pharmacosycea* section *Pharmacosycea* (Moraceae). *Blumea* 51:147–151. <https://doi.org/10.3767/000651906X622409>
- Berg CC, Corner EJM (2005) Moraceae: *Ficeae*. *Flora Malesiana*, ser. 1, vol 17/2. Erven P, Noordhoff, Groningen, pp 1–702
- Castro MM, Demarco D (2008) Phenolic compounds produced by secretory structures in plants: a brief review. *Nat Prod Commun* 3:1273–1284. <https://doi.org/10.1177/1934578X0800300809>
- Cragg JB (1950) The reactions of *Lucilia sericata* (Mg.) to various substances placed on sheep. *Parasitology* 40:179–186. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182000018011>
- Crang R, Lyons-Sobaski S, Wise R (2019) *Plant Anatomy. A concept-based approach to the structure of seed plants*. Springer, Switzerland
- Craud A, Ronsted N, Chantarasuwan B, Chou LS, Clement WL, Couloux A, Cousins B, Genson G, Harrison RD, Hanson PE, Hossaert-McKey M, Jabbour-Zahab R, Jouselin E, Kerdelhuc C, Kjellberg F, Lopez-Vaamonde C, Peebles J, Peng YQ, Santinelo Pereira RA, Schramm T, Ubaidillah R, van Noort S, Weiblen GD, Yang DR, Yodpinyanee A, Libeskind-Hadas R, Cook JM, Rasplus JY, Savolainen V (2012) An extreme case of plant-insect codiversification: Figs and fig-pollinating wasps. *Syst Biol* 61:1029–1047. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys068>
- David R, Carde JP (1964) Coloration différentielle des inclusions lipidiques et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritime* au moyen du reactif Nadi. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*. Paris D258:1338–1340
- Delgado-Pérez G, Vázquez-Santana S, Cornejo-Tenorio G, Ibarra-Manríquez G (2020) Morfoanatomía de las fases de desarrollo del sicón de *Ficus tuerckheimii* (subg. *Spherosuke*, sect. *Americanae*. Moraceae) *Bot Sci* 98:570–583. <https://doi.org/10.17129/botsci.2631>

- Endress PK (1994) Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge University Press, New York
- Feder N, O'Brien TP (1968) Plant microtechnique: Some principles and new methods. *Am J Bot* 55:123–142. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1968.tb06952.x>
- Galil J, Eisikowitch D (1968) On the pollination ecology of *Ficus sycamoros* in east Africa. *Ecology* 49:259–269. <https://doi.org/10.2307/1934454>
- Gibernau M, Hossaert-Mckey M, Frey J, Kjellberg F (1998) Are olfactory signals sufficient to attract fig pollinators? *Ecoscience* 5:306–331. <https://doi.org/10.1080/11956860.1998.11682474>
- Gonçalves-Souza P, Schlindwein C, Dötterl S, Paiva EAS (2017) Unveiling the osmophores of *Philodendron adamantinum* (Araaceae) as a means to understanding interactions with pollinators. *Ann Bot* 119:533–543. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw236>
- Hao-Yuan H, Li-Ming N, Guang-Chang M, Yue-Guan F, Zheng-Qiang P, Da-Wei H (2010) Permeability of receptive fig fruits and its effects on the re-emergence behaviour of pollinators. *Ecol Entomol* 35:115–125. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2009.01170.x>
- Harrison RD (2005) Figs and the diversity of tropical rainforests. *Bioscience* 55:1053–1064. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2005\)055\[1053:FATDOT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2005)055[1053:FATDOT]2.0.CO;2)
- Hossaert-Mckey M, Soler C, Schatz B, Proffit M (2010) Floral scents: Their roles in nursery pollination mutualisms. *Chemoecology* 20:75–88. <https://doi.org/10.1007/s00049-010-0043-5>
- Ibarra-Manríquez G, Cornejo-Tenorio G, González-Castañeda N, Piedra-Malagón EM, Luna A (2012) El género *Ficus* L. (Moraceae) en México. *Bot Sci* 90:389–452. <https://doi.org/10.17129/botsci.472>
- Janzen D (1979) How to be a Fig. *Ann Rev Ecol Syst* 10:13–51. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.10.110179.000305>
- Jensen WA (1962) Botanical Histochemistry: Principles and Practice. Freeman, London
- Johansen DA (1940) Plant microtechnique. McGraw-Hill, New York
- Jürgens A, Dötterl S, Meve U (2006) The chemical nature of fetid floral odours in stapeliads (Apocynaceae-Asclepiadoideae-Ceropegieae). *New Phytol* 172:452–468. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01845.x>
- Katinas L, Hernández MP, Sancho G (2020) Structural and histochemical characterization of the osmophores in corollas of Asteraceae (tribes Onoserideae and Famatinantheae). *Adansonia* 42:227–239. <https://doi.org/10.5252/adansonia2020v42a12>
- Lillie RD (1954) Histopathologic technic and practical histochemistry, 3rd edn. McGraw-Hill, New York
- Lin SY, Chou LS, Bain A (2018) Sugar secretion and ant protection in *Ficus benguetensis*: Toward a general trend of fig–ant interactions. *Acta Oecol* 90:168–172. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2017.06.006>
- Liu C, Yang DR, Peng YQ (2011) Body size in a pollinating fig wasp and implications for stability in a fig–pollinator mutualism. *Entomol Exp Appl* 138:249–255. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01096.x>
- Machado AFP, de Souza AM, Leitão CAE (2013) Secretory structures at syconia and flowers of *Ficus enormis* (Moraceae): A specialization at ostiolar bracts and the first report of inflorescence collectors. *Flora* 208:45–51. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2012.12.005>
- Marinho CR, Souza CD, Barros TC, Teixeira SP (2014) Scent glands in legume flowers. *Plant Biol* 16:215–226. <https://doi.org/10.1111/plb.12000>
- Maos I, Sun P, Haring MA, Schuurink RC, Dudareva N (2020) Emission and perception of plant volatiles. In: Pichersky E, Dudareva N (eds) *Biology of Plant Volatiles*, 2nd edn. CRC Press, pp 251–267. *In*
- Márquez-Guzmán J, Wong JG, Pérez-Pacheco M, Munguía G, Collazo M (2016) Técnicas de Laboratorio para el Estudio del Desarrollo de Angiospermas, 1 edn. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México
- Melo MC, Borba EL, Paiva EAS (2010) Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Syst Evol* 286:141–151. <https://doi.org/10.1007/s00606-010-0294-1>
- O'Brien TP, Feder N, McCully ME (1964) Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59:368–373
- Okamoto T, Su ZH (2021) Chemical analysis of floral scents in sympatric *Ficus* species: highlighting different compositions of floral scents in morphologically and phylogenetically close species. *Plant Syst Evol* 307:1–12. <https://doi.org/10.1007/s00606-021-01767-y>
- Pearse AGE (1980) Histochemistry, theoretical and applied: Preparative and optical technology, 4th edn. Churchill Livingstone, Edinburgh
- Pedemeiras LC, Carauta JPP, Neto SR, de Freitas-Mansano V (2015) An overview of the infrageneric nomenclature of *Ficus* (Moraceae). *Taxon* 64:589–594. <https://doi.org/10.12705/643.12>
- Pedemeiras LC, da Costa AF, Medeiros H, Rivera NM, Forzza RC, Romaniuc-Neto S, Mansano VF (2020) Species diversity of *Ficus* L. sect. *Americanae* (Moraceae) in Acre, Brazil. *Brittonia* 72:215–231. <https://doi.org/10.1007/s12228-020-09620-1>
- Piedra-Malagón EM, Hernández-Ramos B, Mirón-Monterrosas A, Cornejo-Tenorio G, Navarrete-Segueda A, Ibarra-Manríquez G (2019) Syconium development in *Ficus petiolaris* (*Ficus*, sect. *Americanae*, Moraceae) and the relationship with pollinator and parasitic wasps. *Botany* 97:190–203. <https://doi.org/10.1139/cjb-2018-0095>
- Ramírez BW (1974) Coevolution of *Ficus* and Agaonidae. *Ann Missouri Bot Gard* 61:770–780. <https://doi.org/10.2307/2395028>
- Rasplus JY, Soldati L (2005) Familia Agaonidae. In: Fernández F, Sharkey MJ (eds) *Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical*. Sociedad Colombiana de Entomología & Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, pp 683–698
- Rojas-Cortés AP, Cuervo-Robayo AP, Cornejo-Tenorio G, Ibarra-Manríquez G (2022) Reproductive biology and potential distribution of *Ficus pringlei* (Moraceae), a microendemic New World species. *Acta Bot Mex* 129: e2048. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.2048>
- Santos-Tozin LRD, Melo-Silva SC, Rodrigues TM (2016) Non-glandular trichomes in Lamiaceae and Verbenaceae species: morphological and histochemical features indicate more than physical protection. *New Zeal J Bot* 54:446–457. <https://doi.org/10.1080/0028825X.2016.1205107>
- Schnetzler NB, Teixeira SP, Marinho CR (2017) Trichomes that secrete substances of the mixed in the vegetative and reproductive organs of some species of Moraceae. *Acta Bot Brasil* 31:392–402. <https://doi.org/10.1590/0102-33062016abb0293>
- Silva-Batista IC, Costa FGCM, Assunção TS, Koschnitzke C, Vieira RC, Bove CP (2021) First report of osmophores and wet stigma in Podostemaceae with notes on floral biology and pollination of *Weddellina squamulosa* Tul. *Flora* 278:151799. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2021.151799>
- Souto-Vilarós D, Proffit M, Buatois B, Rindos M, Sisol M, Kuyaiva T, Isua B, Michalek J, Darwell CT, Hossaert-Mckey M, Weiblen GD, Novotny V, Segar ST (2018) Pollination along an elevational gradient mediated both by floral scent and pollinator compatibility in the fig and fig-wasp mutualism. *J Ecol* 106:2256–2273. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12995>
- Souza CD, Pereira RAS, Marinho CR, Kjellberg F, Teixeira SP (2015) Diversity of fig glands is associated with nursery mutualism in fig trees. *Am J Bot* 102:1564–1577. <https://doi.org/10.3732/ajb.1500279>
- Tzeng HY, Ou CH, Lu FY (2001) Morphological study on the syconia of *Ficus erecta* var. *beecheiana*. *Taiwan J For Sc* 16:295–306



- van Noort S (1989) Pollinator-specific volatile attractants released from the figs of *Ficus burrti-davyi*. Suid-Afrikaanse Tydskrif vir Wetenskap 85:323–324
- van Noort S, Compton SG (1996) Convergent Evolution of Aganome and Sycoecine (Agaonidae, Chalcidoidea) Head shape in response to the constraints of host fig morphology. J Biogeogr 23:415–424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.1996.tb00003.x>
- Verkerke W (1986) Anatomy of *Ficus ottonifolia* (Moraceae) syconia and its role in the fig-fig wasp symbiosis. Proc K Ned Akad Wet C 89:443–469
- Verkerke W (1987a) Syconial anatomy of *Ficus asperifolia* (Moraceae). Proc K Ned Akad Wet C 90:461–492
- Verkerke W (1987b) Ovule dimorphism in *Ficus asperifolia* Miquel. Acta Bot Gall 36:121–124
- Verkerke W (1988) Sycone morphology and its influence on the flower structure of *Ficus sur* (Moraceae). Proc K Ned Akad Wet C 91:319–344
- Verkerke W (1989) Structure and function of the fig. Experientia 45:612–622. <https://doi.org/10.1007/BF01975678>
- Vogel S (1963) Das sexuelle anlockungsprinzip der catasetinen-und stanhopeen-blüten und die wahre funktion ihres sogenannten futtergewebes. Österr Bot Z 110:308–337. <https://www.jstor.org/stable/43337279>
- Vogel S (1990) The role of scent glands in pollination: on the structure and function of osmophores, 1st edn. Smithsonian Institution Libraries, Washington D.C.
- Wang G, Compton SG, Chen J (2013) The mechanism of pollinator specificity between two sympatric fig varieties: A combination of olfactory signals and contact cues. Ann Bot 111:173–181. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs250>
- Werker E (2000) Trichome diversity and development. Adv Bot Res 31:1–35. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(00\)31005-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(00)31005-9)

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

### Capítulo III

## Tipos de polinización en especies neotropicales de *Ficus* (Moraceae) y su relación con los caracteres florales y las avispas polinizadoras

Artículo para ser sometido



Sicono de *Ficus tuerckheimii* con alas de avispas polinizadoras en el ostíolo y una avipa no polinizadora sobre la superficie del sicono. Fotografía: Nadia Castro Cárdenas.

Pollination modes in neotropical species of *Ficus* (Moraceae) and their relationships with floral characters and pollinating wasps

Nadia Castro-Cárdenas<sup>a,b</sup>, Silvana Martén-Rodríguez<sup>c</sup>, Sonia Vázquez-Santana<sup>d</sup>, Guadalupe Cornejo-Tenorio<sup>a</sup>, Guillermo Ibarra-Manríquez<sup>a,e</sup>

Manuscript received \_\_\_\_\_; revision accepted \_\_\_\_\_.

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Antigua carretera a Pátzcuaro 8701, Colonia Ex Hacienda de San José de La Huerta, Morelia, Michoacán, C.P. 58190, México. Nadia Castro-Cárdenas (ncastro@cieco.unam.mx), Guadalupe Cornejo-Tenorio (gcornejo@cieco.unam.mx), Guillermo Ibarra-Manríquez (gibarra@iies.unam.mx).

<sup>b</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México.

<sup>c</sup> Laboratorio Nacional de Análisis y Síntesis Ecológica, Escuela Nacional de Estudios Superiores, Universidad Nacional Autónoma de México, Antigua carretera a Pátzcuaro 8701, Colonia Ex Hacienda de San José de La Huerta, Morelia, Michoacán, C.P. 58190, México. Silvana Martén-Rodríguez: smarten@enesmorelia.unam.mx

<sup>d</sup> Laboratorio de Desarrollo en Plantas, Departamento de Biología Comparada. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, C.P. 04510, Ciudad de México, México. Sonia Vázquez-Santana (svs@ciencias.unam.mx)

<sup>e</sup> Author for correspondence (e-mail: gibarra@iies.unam.mx)

Short title: Pollination modes in *Ficus* species

## Abstract

The genus *Ficus* is characterized by the unisexual flowers grouped in an enclosed inflorescence, named a syconium, and wasps of the Agaonidae family strictly pollinate its pistillate flowers. Figs (*Ficus*, Moraceae) and their pollinating wasps (Agaonidae, Hymenoptera) are an example of obligate mutualisms. Passive and active pollination modes have been described in this mutualism, which is associated with a set morphological adaptation in both partners. We evaluate the variation in the morphological traits of figs and fig wasps with active and passive pollination modes in species belonging to Neotropical sections of the genus *Ficus* (*Americanae* and *Pharmacosycea*; three species each). Pollination mode was identified by floral morphology, and anther/ovule ratio (A/O ratio), as well as the specialized structures fig wasps use for pollen transport (corbiculae), using light microscopy and scanning electron microscopy. *Ficus* species in section *Americanae* are actively pollinated since pistillate flowers form a synstigma, staminate flowers have one anther, with ellipsoid pollen grains, A/O ratio lower than 0.15, and their pollinating wasps of the genus *Pegoscapus* have corbiculae. In contrast, passively pollinating is found in *Pharmacosycea* section, which produces syconia without synstigma, staminate flowers with two anthers, pollen with spherical and cylindrical forms, A/O ratio higher than 0.21, and pollination is carried out by wasps belonging to the genus *Tetrapus*, where corbiculae were not observed. Our results support the previous contributions which consider that reciprocal morphological traits between fig species and their pollinating wasps as evidence of a close evolutionary history.

**Keywords:** Active pollination, *Americanae* section, Fig, Fig wasp, Passive pollination, *Pharmacosycea* section.

## 1. Introduction

The genus *Ficus* comprises more than 750 species, which are strictly pollinated by wasps of the Agaonidae family (Bronstein and McKey, 1989; Cook and Rasplus, 2003; Weiblen, 2002). This interaction has been considered a classic example of strict mutualism, where figs and wasps require each other's services to reproduce (Bronstein, 1987; Dunn, 2020; Galil and Eisikowitch, 1968; Herre et al., 2008; Ramírez, 1969). A particularity of *Ficus* is that the flowers are grouped in an enclosed inflorescence, called a syconium, inside which unisexual flowers of both sexes develop at different times (Galil and Eisikowitch, 1968; Verkerke, 1989; Bronstein and Patel, 1992; Piedra-Malagón et al., 2017). The syconium also functions as the dispersal unit, and its development has been divided into five to eight phases (Galil and Eisikowitch, 1968; Smith and Bronstein, 1996).

The only access point to the syconium is an apical opening named the ostiole (Berg, 1989; Delgado-Pérez et al., 2020; Verkerke, 1989). Female wasps must pass through the ostiole to oviposit their eggs in the ovules of pistillate flowers and, in this process, they deposit pollen onto the stigmas (Galil and Eisikowitch, 1968; Jousselin et al., 2001). Fig wasps are attracted to syconia by volatile compounds (Grison-Pigé et al., 2002; Hossaert-McKey et al., 2016; Segar et al., 2019) and chemical signals on the surface of the syconium (Gibernau et al., 1998; van Noort, 1989; Wang et al., 2013). This close pollination mutualism has created remarkable morphological variation across *Ficus* species and their pollinating wasps (Berg, 1989; Dunn, 2020; Ramírez, 1974; Verkerke, 1989; Weiblen, 2002).

Morphological and biochemical trait variation in *Ficus* has been associated with attraction and effective pollen transfer by one or a few species of fig wasps (Cook and

Rasplus, 2003; Kjellberg et al., 2001). Nonetheless, floral trait variation in *Ficus* is also related to wasp behaviors, which underlie two central pollen transfer mechanisms (passive and active pollination), and they encompass a set of specialized morphological adaptations in both partners of the mutualism (Frank, 1984; Kjellberg et al., 2001). It has been estimated that two-thirds of *Ficus* species have active pollination, where wasps collect pollen directly from the anthers, store it in the corbiculae, and subsequently deposit it on the stigmas of flowers from another syconium (Jousselin et al., 2004; Ramírez, 1969). The remaining species have passive pollination, where pollen transfer occurs as the wasp body becomes impregnated with pollen from a syconium, which later detaches from the wasp body unintentionally as it seeks new oviposition sites (Herre et al., 2008; Jousselin et al., 2003a; Kjellberg et al., 2001).

Pollination modes are generally associated with particular sets of floral traits, including anther/ovule ratios, the stigma's morphology, and pollen production. For instance, in species with active pollination, it has been estimated that anther/ovule ratios are less than 0.16, and the stigmas of two or more flowers unite to form a continuous platform called the synstigma (Baijnath and Ramcharun, 1983; Galil and Eisikowitch, 1968; Teixeira et al., 2018; Verkerke, 1989). Moreover, actively pollinated species produce less pollen than passively pollinated species (Cook et al., 2004; Cook and Segar, 2010; Jousselin et al., 2004), possibly due to higher efficiency in active pollen transfer (Jousselin and Kjellberg, 2001; Pellmyr et al., 2020; Ramírez, 1969). In contrast, species with passive pollination have anther/ovule ratios greater than 0.21 (Kjellberg et al., 2001), and free stigmas have elongated stigmatic papillae that increase the contact surface with pollen that is scattered on the body of the female wasp (Jousselin et al., 2004; Teixeira et al., 2020,

2018). Morphological adaptations are also present in the wasps to effectuate active pollination. The fig wasps have specialized structures for pollen transfer in the coxae of the front legs (coxal combs) or in the mesosternum (corbiculae) (Kjellberg et al., 2001; Ramírez, 1969). Those structures are lacking in passive fig wasp species (Kjellberg et al., 2001; Ramírez, 1969).

The two pollination modes in *Ficus* have been traditionally associated with the distinct characteristics described above; however, some species display atypical characteristics not associated with pollination mode (Deng et al., 2016; Jousselin and Kjellberg, 2001; Verkerke, 1989; Zhang and Yang, 2017). For example, several species of the subgenus *Urostigma* have anthers that may or may not show lines of dehiscence (Berg and Wiebes, 1992; Kjellberg et al., 2005, 2001; Verkerke, 1989). In addition, in *F. tikoua*, the A/O ratio shows high variation throughout its geographic distribution, indicating a possible transition between passive-active pollination modes (Deng et al., 2016). According to Kjellberg et al. (2001), transitions in pollination modes could be more common than reported; however, little is known about morphological variation and pollination modes in Neotropical *Ficus* species. Therefore, studies that analyze the floral characteristics of *Ficus* and its pollinating wasps could help understand the relationship between floral variation, pollination mode, and pollinator behavior in the *Ficus*-Agaonidae wasp mutualism.

In the Neotropics, the genus *Ficus* is represented by the subgenera *Spherosuke* and *Pharmacosycea*, which include sections *Americanae* and *Pharmacosycea*, respectively. These sections are pollinated by different genera of wasps, which may or may not have pollen transport structures (Ramírez, 1969; Rasplus and Soldati, 2005). Section *Americanae* is pollinated by wasps of the genus *Pegoscapus* while wasps of the *Tetrapus* pollinate

section *Pharmacosycea*. *Pegoscapus* species have corbiculae, whereas *Tetrapus* does not (Kjellberg et al., 2001). However, information on the behavior and morphology of pollinating wasps, and their relationship with syconium morphology, is scarce. This study evaluates in Neotropical species of *Ficus* the variation in morphological traits of figs and wasps associated with active and passive pollination modes. The main goals of the study were: i) describe the morphology of the flowers and associated secretory structures, ii) determine the anther/ovule ratios of each species, and iii) characterize the morphology of the fig wasps of each species, particularly of the structures related to pollen transport.

## **2. Materials and methods**

### *2.1 Study area and study species*

The study was conducted during 2018 and 2019 in the reserve of the Los Tuxtlas Tropical Biology Station in Veracruz state, Mexico. *Ficus* species were collected from live trees at or near this reserve (18°45'37"-95°22'9" - 1680 m a.s.l.). The climate in the region is humid tropical with rainfall throughout the year (Af). The annual precipitation is 3928 mm, although there is a decrease in precipitation from March to May, during which evapotranspiration exceeds precipitation (Gutiérrez-García and Ricker, 2011).

The species studied belong to two Neotropical sections of the genus *Ficus*: *Pharmacosycea* (Miq.) Griseb. (*Ficus apollinaris* Dugand, *F. insipida* Willd. y *F. yoponensis* Desv.), and *Americanae* (Miq.) Corner (*F. colubrinae* Standl., *F. isophlebia* Standl. y *F. obtusifolia* Kunth). All species are monoecious and protogynous, i.e., pistillate flowers mature before staminate flowers (Berg, 1989; Galil and Eisikowitch, 1968; Piedra-



Malagón et al., 2017; Verkerke, 1989). A more detailed description of the species study can be found in Ibarra-Manríquez et al. (2012) and Cornejo-Tenorio et al. (2019).

## *2.2 Field methods*

### *2.2.1 Plants*

Ten syconia were collected from five individuals in female ( $n = 50$  syconia) and male ( $n = 50$  syconia) phases for each species. The syconia were cut in half, fixed in FAA, or buffered formalin for 48 h, then they were washed in water, dehydrated in a gradual ethanol series, and stored in 70% ethanol (Márquez-Guzmán et al., 2016). The material fixed in buffered formalin solutions was washed in 0.2 M phosphate and stored in 70% ethanol (Lillie, 1954).

### *2.2.2 Pollinators*

To determine pollinator identity and describe fig wasp morphology, for each species of *Ficus*, we collected 25 figs in the male phase; these figs were stored in hermetic bags until pollinating wasps emerged from the syconium. The wasps were extracted with a brush and preserved in 70% ethanol. The wasps were identified to genera using the identification keys by Bouček (1993), Rasplus, and Soldati (2005) and then sorted into morphospecies.

## *2.3 Anatomical and morphological analyses*

### *2.3.1 Plants*

For the anatomical examination, small portions of syconia were dehydrated in an ethanol series, embedded in Paraplast, Leica histological resin, and medium-grade LR-White Resin.

The Paraplast-embedded tissues were cut into 5  $\mu\text{m}$  thick sections with an American Optical 820 rotatory microtome and stained with safranin and fast green. Leica histological resin embedded material was sectioned at 4  $\mu\text{m}$  thick using a Leica RM 2245 rotary microtome and stained with 0.05% toluidine blue in phosphate buffer. LR-White Resin-embedded tissues were sectioned at 1  $\mu\text{m}$  thick using a RMC-MT 990 rotatory microtome and stained with aqueous toluidine blue.

For the morphological descriptions of flowers and pollen, flowers were dehydrated in an ethanolic series, critical point dried in an (Autosamdri-815) apparatus, mounted in metallic support on carbon tape, and sputtered with gold in a Denton Vacuum Desk-II apparatus. Observations were performed using JEOL JSM-5310 LV and JEOL JSM-IT300. Finally, we collected five syconia in the development phase C (interfloral) from five trees of each *Ficus* species. All the flowers in each syconium were counted to calculate anther-ovule ratios (Kjellberg et al., 2001).

### *2.3.2 Pollinators*

To infer whether the pollinating wasps presented structures for pollen transport, we took SEM photos of the metasome to detect the presence/absence of corbiculae or coxal combs with pollen grains (Kjellberg et al., 2001). Female individuals were mounted directly on metal sample holders and observed through the secondary electron technique under low vacuum conditions using a Jeol JSM-IT300 microscope. Some of the photographs were artificially colored using Adobe Photoshop 21.0.1 software.

## *2. 4 Data analysis*

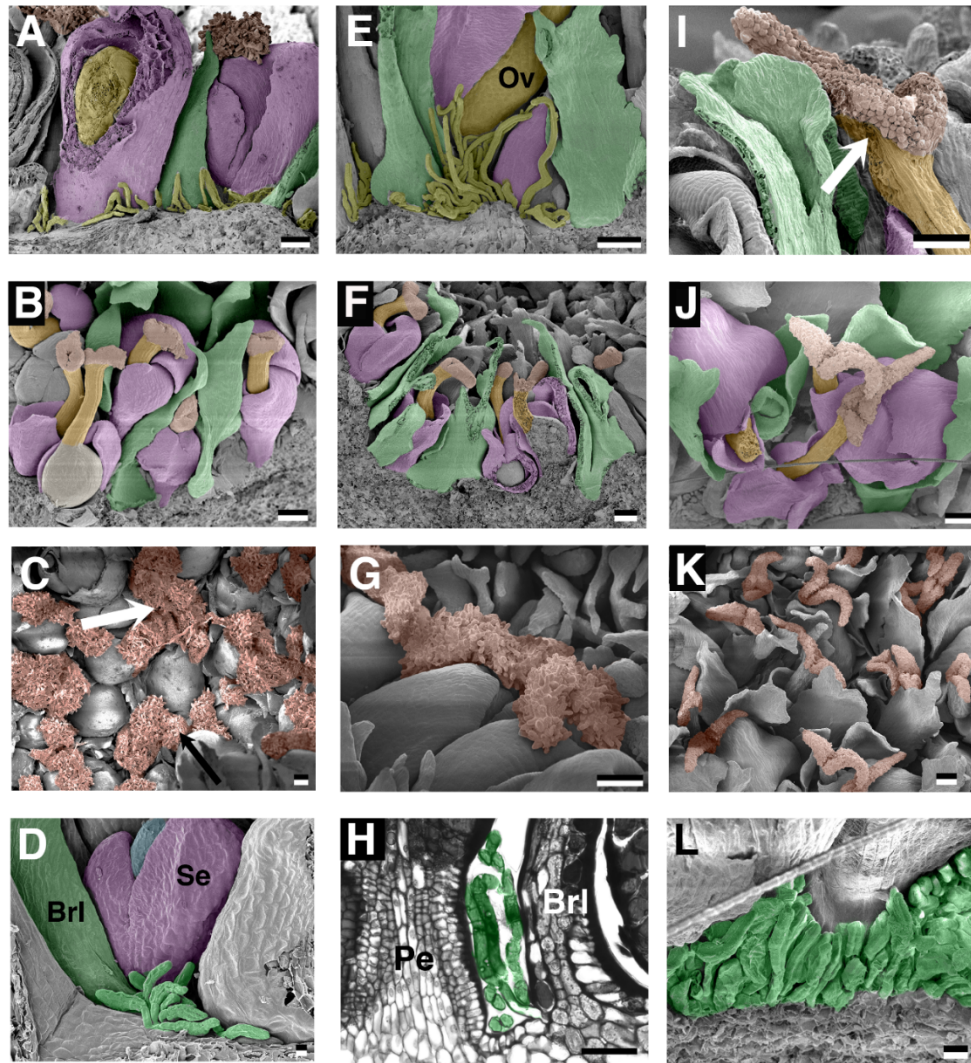
To determine if anther-ovule ratios differ between the two sections, a Student's t-test was performed, using the type of pollination as a factor. Subsequently, a generalized linear model (GLM) was performed to determine the relationship between the A/O ratio and species, assuming a gamma distribution of the residuals. Finally, the GLMs were followed by Tuckey tests to determine the differences in this ratio between species. All statistical analyses were performed using R (R Development Core Team, 2019).

### 3. Results

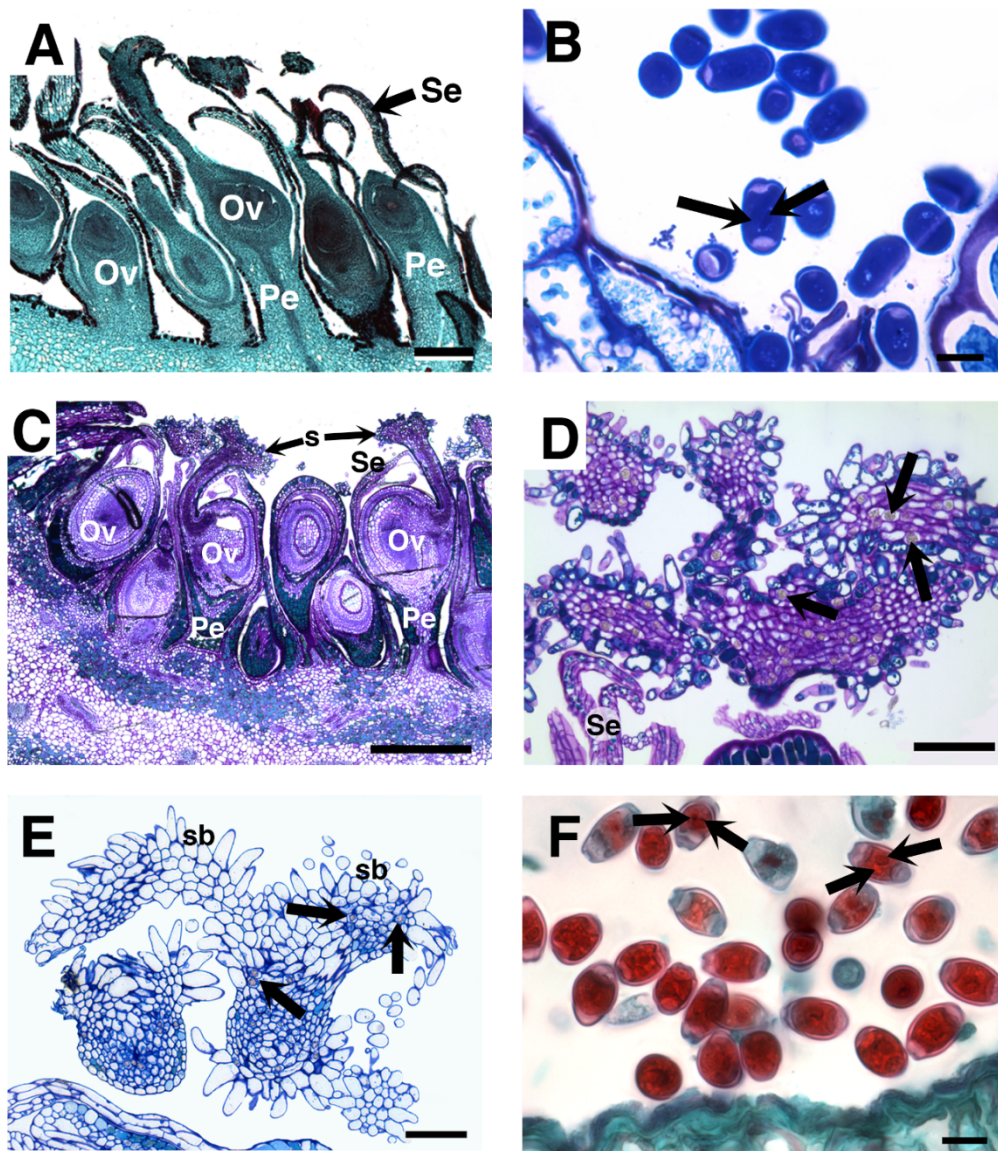
#### 3.1 Morphology of female and male flowers

During the female phase of the syconium (Phase B), all species studied contain immature staminate flowers, short- and long-styled pistillate flowers, interfloral bracts, and secretory trichomes. Short-styled pistillate flowers are interspersed with long-styled flowers (Figs. 1 B, F, J; 2 A, C; 3 A, D, E, H). Pistillate flowers have a syncarpous gynoecium, a lateral style, and a bifurcate stigma covered by papillae (Figs. 1 A, C, G, K; 2 A, C-E; 3 C, F, I). All flowers are surrounded by interfloral bracts with irregular margins (Figs. 1; 3 B, D).

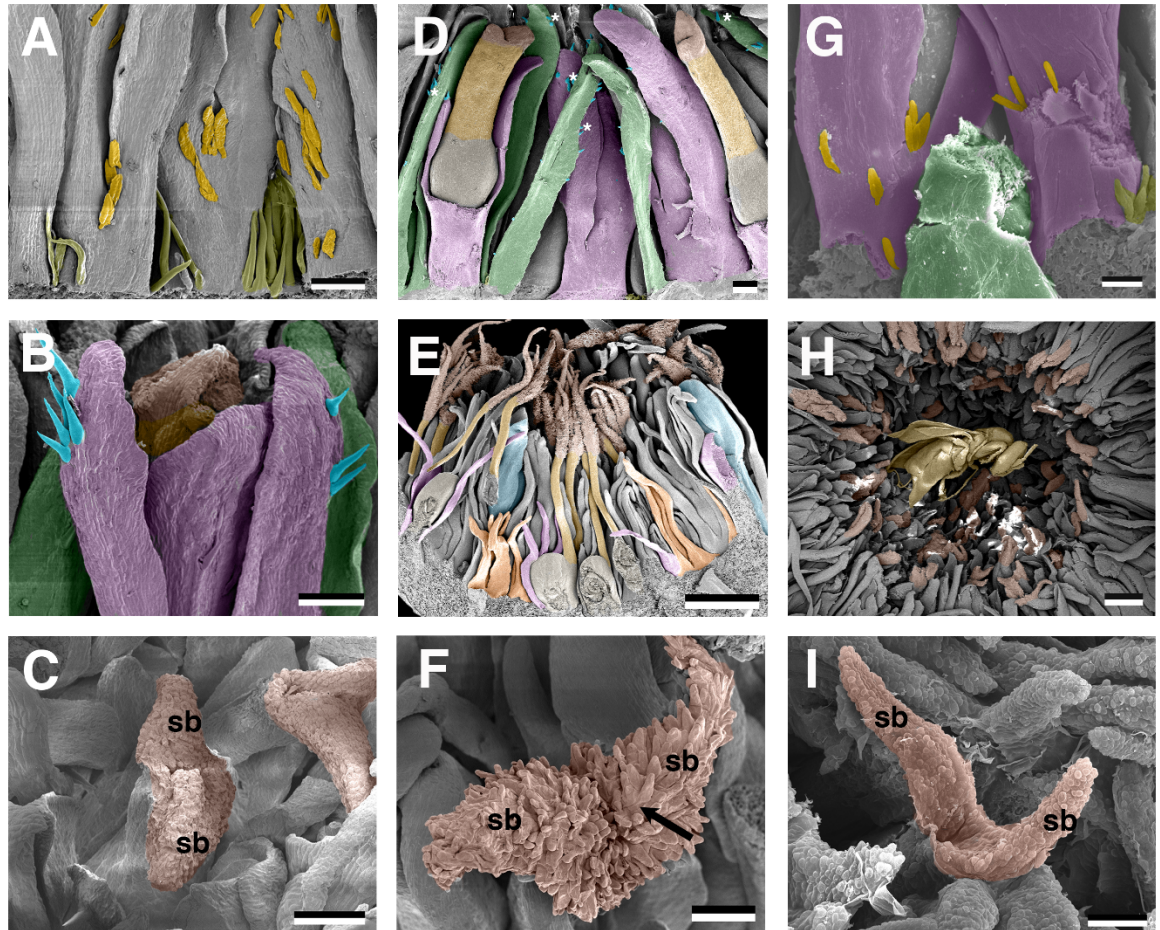
In sect. *Americanae*, both pistillate flower types, have three connate sepals with entire margins, completely covering the ovary, with the style and exerted stigma (Fig. 1 B, F, J). The stigma in pistillate flower types has two asymmetrical branches with short (*F. obtusifolia*; Fig. 1 I, K) or long (*F. colubrinae* and *F. isophlebia*; Figs. 1 C, F, G; 3 D, E) unicellular papillae. The synstigma is congested (*F. colubrinae*; Fig. 1 C) or spaced (*F. isophlebia*, *F. obtusifolia*; Fig. 1 G, K). The stigma has druses and phenolic compounds (Fig. 2 D, E). The colleterial cells are positioned between sepals and ovary (Fig. 1 D, H, L), and acicular trichomes are positioned between floral bract and sepals (Fig. 1 A, E). The staminate flowers have only one anther per flower, with longitudinal dehiscence lines (Fig. 4 A, B, D, E, G, H). The mature pollen grains are biporate or triporate, bicellular dispersed, ellipsoid, with rugulate to slightly rugulate exine ornamentation (Figs. 2 F; 4 C, F, I).



**Figure 1.** Pistillate flowers of sect. *Americanae* in female phase. (A-D) *F. colubrinae*. (E-H) *F. isophlebia*. (I-L) *F. obtusifolia*. (A, E, J) Close-up of the sepals (purple) surrounding the ovary (yellow) of pistillate flowers. The interfloral bracts have irregular edges (green). Acicular trichomes are detailed between the interfloral bracts and the flowers (light yellow). (B, F, J) Arrangement of pistillate floral morphs. (C, G, K) Synstigma (light pink) formed by the proximity of the stigmatic papillae of both floral morphs (arrow). A heterogeneous arrangement is present among the different species. (D, H, L) Floral colleter (green). (H) Longitudinal section of floral colleters (green). (I) Close-up of the short stigmatic papillae (arrow). Brl, interfloral bracts; Ov, ovary; Se, sepals. Scar bars: A-G, I-K = 100  $\mu$ m; H = 50  $\mu$ m; L = 10  $\mu$ m.



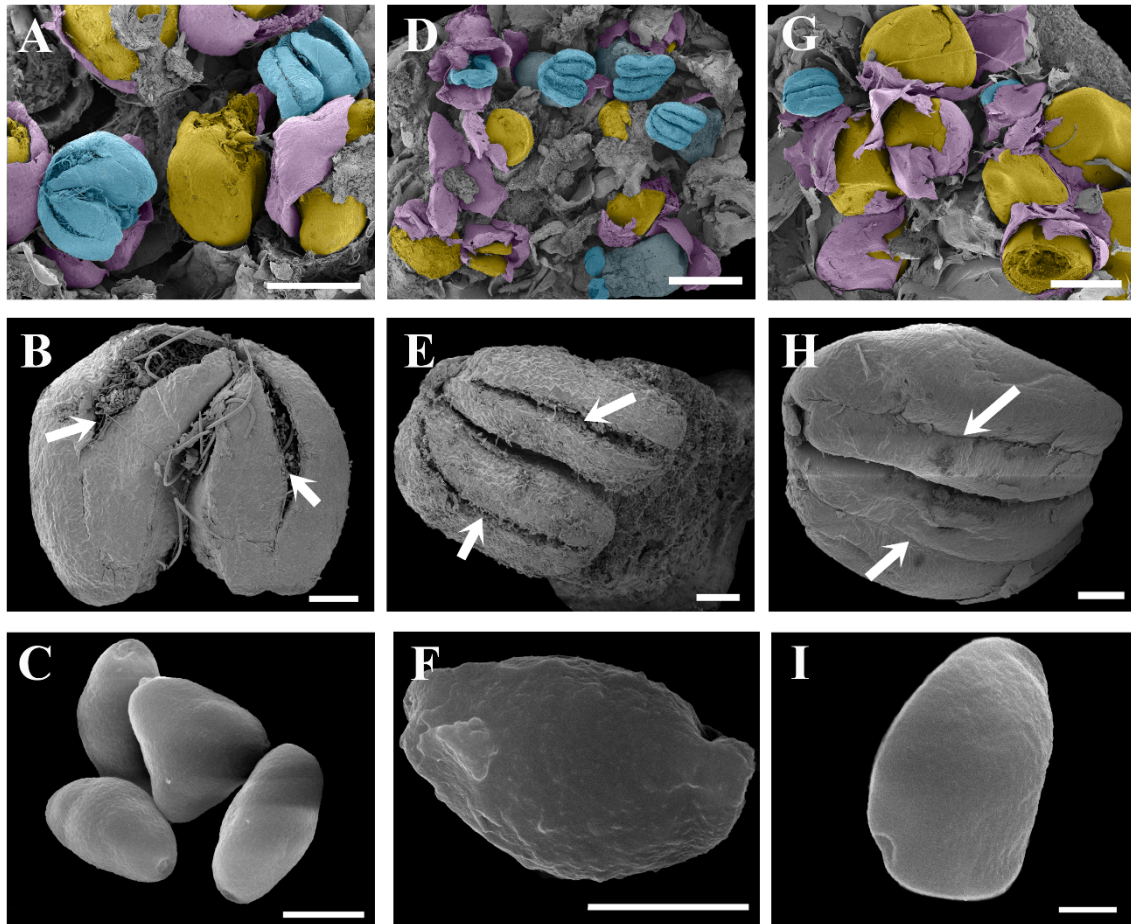
**Figure 2.** Anatomy floral of *Ficus* species in female and male phases. (A, B) *F. insipida*. (C, D, F) *F. isophlebia*. (E) *F. obtusifolia*. (A, C) Pedicellate and sessile pistillate flowers. (B, F). Bicellular pollen grains (arrows) with thick exine wall. (D, E) Close-up of the stigmas. (E) Stigma bilobed with elongated stigmatic papillae and style with druses (arrows) and tannins (dark blue). Staining: A, F, safranin, and fast green; B, E, toluidine blue; C-D, 0.05% toluidine blue in phosphate buffer, pH 6.8. Ov, ovary; Pe, pedicel; s, stigma; sb stigmatic branch; Se, sepals. Scar bars: C = 500  $\mu$ m; A = 200  $\mu$ m; D = 100  $\mu$ m; E = 80  $\mu$ m; B, F = 8  $\mu$ m.



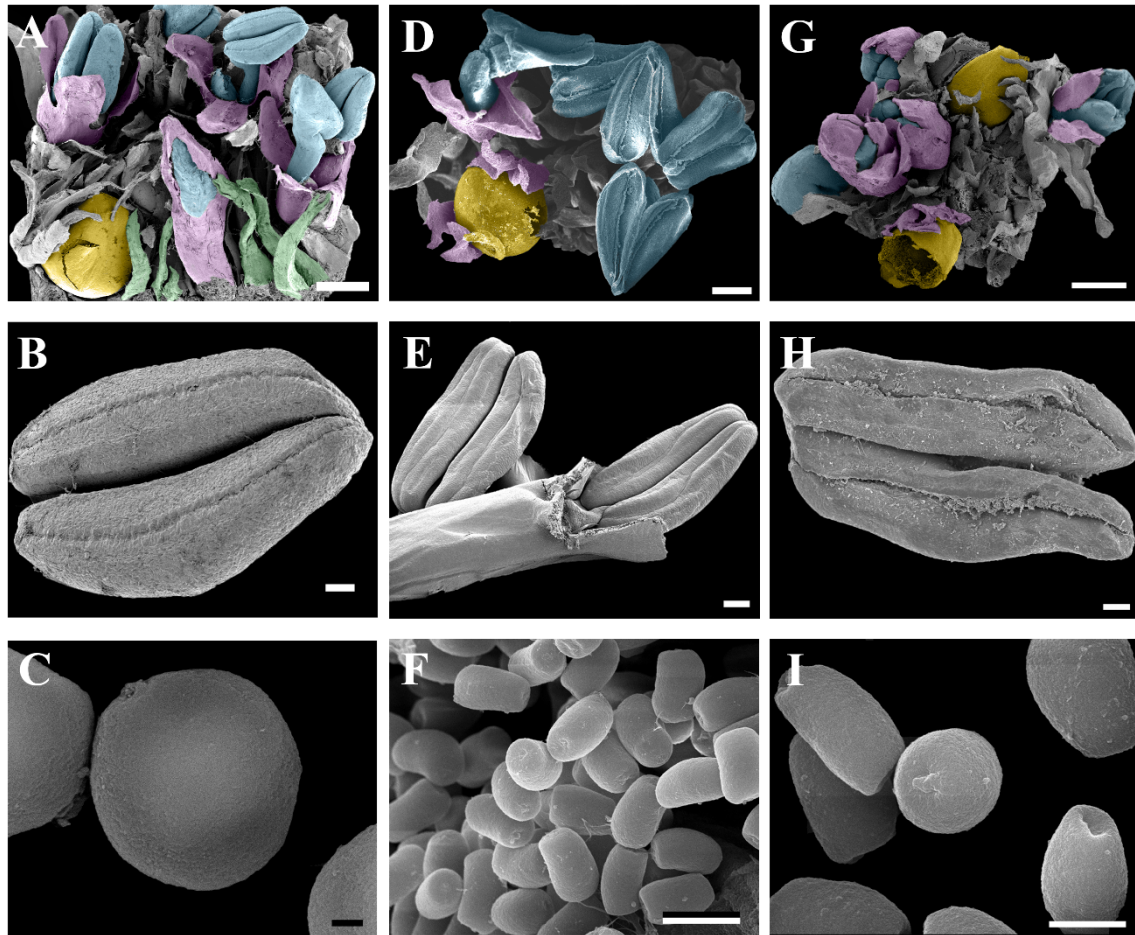
**Figure 3.** Pistillate flowers of sect. *Pharmacosyceae* in the female phase. (A-C) *F. apollinaris*. (D-F) *F. insipida*. (G-I) *F. yoponensis*. (A) Close-up of sepals and interfloral bracts. Acicular trichomes on the inner wall of the syconium (light yellow) and colleters on the sepals (yellow). (B) Acicular trichomes (blue) on the apical part of the sepals (purple). (C, I) Bilobed stigmas with short papillae (pink). (D) Close-up of flowers inside the syconium. Acicular trichomes (blue) are observed (asterisks) on the interfloral bracts (green). (E) Arrangement of both pistillate morphs and staminate flowers. Stigmatic branches are asymmetrical (light pink) protruding from sepals (pink) and interfloral bracts. Staminate flowers are covered by sepals at this stage (blue). (F) Bilobed stigma with elongated stigmatic papillae (arrow). (G) Colleters (yellow) above the sepals (purple). (H) View of the interior of the syconium. Stigma (light pink), sepals and interfloral bracts are at the same level. An ovipositing pollinating wasp (brown) can be seen. Sb, stigmatic brach. Scale bars. E = 1mm; H = 500  $\mu$ m; A, B, C, D, F, G, I = 100  $\mu$ m.

In sect. *Pharmacosycea*, the pistillate flowers, have three or four free sepals, which are at the same level as the style (*F. apollinaris*; Fig. 3 B) or are smaller (*F. insipida* and *F. yoponensis*; Fig. 3 E, H). Acicular trichomes are found at the apex of the sepals and interfloral bracts of all three species and toward the sepals of *F. insipida* and *F. yoponensis* collectors' base (Fig. 3 A, B, D, G). Stigmas have two stigmatic branches, filiform and asymmetric, with short (*F. apollinaris* and *F. yoponensis*; Fig. 3 C, I) or long (*F. insipida*; Fig. 3 F) unicellular stigmatic papillae. The stigmatic papillae contain phenolic compounds (Fig. 2 A). Staminate flowers have two anthers and more prominent than sect. *Americanae* species, with longitudinal dehiscence (Fig. 5 A, B, D, E, G, H). Pollen grains are biporate or triporate and bicellular dispersed (Figs. 2 B; 5 C, F, I). The pollen grains in *F. apollinaris* are spherical, with psilate ornamentation (Fig. 5 C). In contrast, they are cylindrical, with slightly rugulate ornamentation in *F. insipida* and *F. yoponensis* (Fig. 5 F, I).





**Figure 4.** Staminate flowers of sect. *Americanae* species in the male phase. (A-C) *F. colubrinae*. (D-F) *F. isophlebia*. (G-I) *F. obtusifolia*. (A, D, G) Spatial distribution of mature staminate flowers. The anthers (blue) are at the same level as the tepals (purple), interfloral bracts (green) and the remains of the styles. (D) Anthers completely dehiscent. (B, E, H) Anthers with longitudinal dehiscence lines (arrows). (C) Bi and triporate pollen grains with ellipsoid shape and slightly rugulate ornamentation. (F, I) Pollen grains biporate, ellipsoid, and rugulate ornamentation. Scale bars: D, G = 1 mm; A, B, E, H, 100  $\mu$ m; C, F = 5  $\mu$ m; I = 1  $\mu$ m.

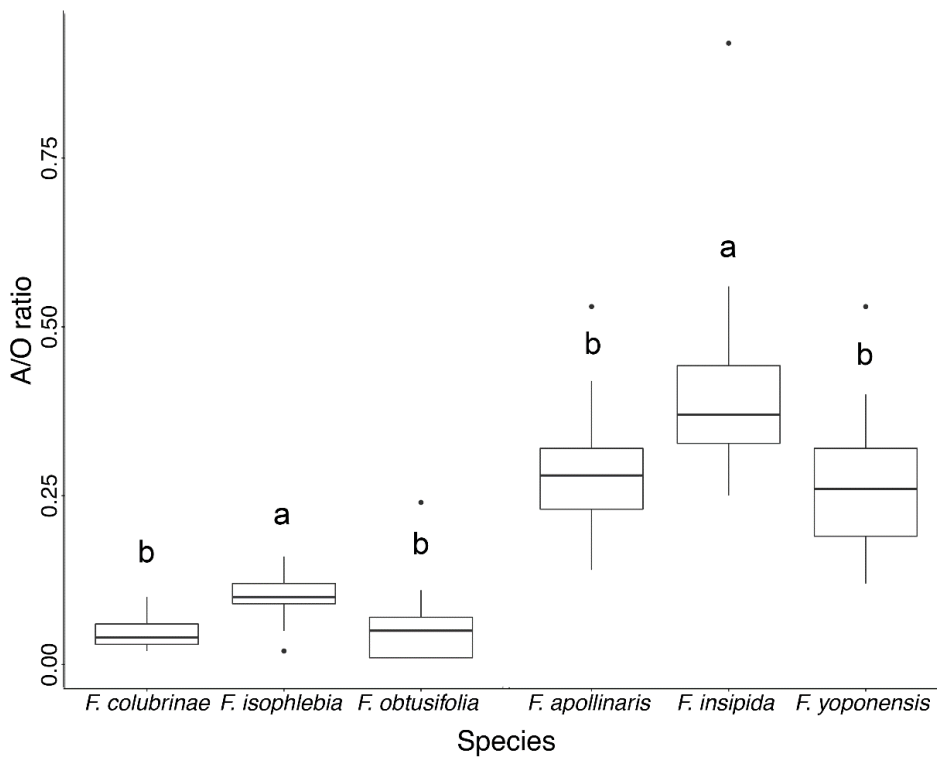


**Figure 5.** Staminate flowers of sect. *Pharmacosyceae* species in the male phase. (A-C) *F. apollinaris*. (D-F) *F. insipida*. (G-I) *F. yoponensis*. (A, D, G) Spatial distribution of mature staminate flowers (blue). Anthers (blue) protrude from sepals (purple), interfloral bracts (green), and ovaries (yellow) (D) Anthers completely dehiscent. (B, E, H) Anthers with longitudinal dehiscence lines. (C) Spherical pollen grains with psillate ornamentation. (F, G) Biporate, cylindrical pollen grains with rugulate ornamentation. Scale bars: A, G = 1 mm; D = 500  $\mu$ m; B, E, H, 100  $\mu$ m; F = 10  $\mu$ m; I = 5  $\mu$ m; C = 1  $\mu$ m.

### 3.2 Flower numbers and A/O ratios in the syconia

The average number and range of pistillate and staminate flowers of the studied species are presented in Table 1. For the species of sect. *Americanae* the staminate flowers represent, an average, between 4.7 and 9.1 % of the total flowers of the syconium, while in sect. *Pharmacosycea*, average values are higher (21.1-28.3%).

Anther-ovule ratios differed between sections *Americanae* and *Pharmacosycea* ( $t_{5,91.3} = 16.6, P < 0.001$ ). The three species of *Americanae* ranged between 0.05 and 0.10 (Table 1); *F. isophlebia* differed from the other two species (Fig. 6). In *Pharmacosycea*, A/O ratios ranged from 0.27 to 0.40, *F. insipida* differed from other species in the section (Fig. 6).



**Figure 6.** Multiple comparisons of means (Tuckey's post hoc test). Confidence intervals are based on the standard error for each species. Letters indicate significant differences between comparisons.

### 3. 3 Pollinator morphology

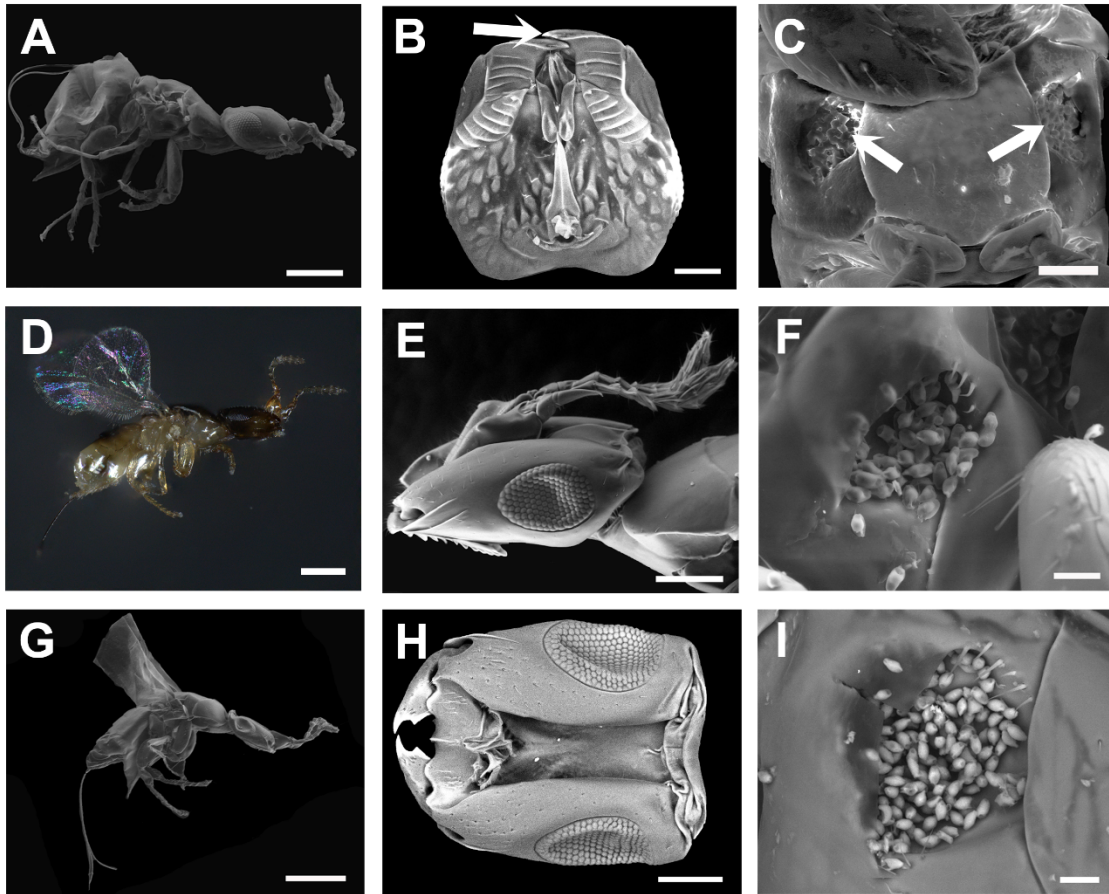
Collections of wasps inside male-phase syconia yielded six morphospecies of fig wasps belonging to the genera *Pegoscapus* and *Tetrapus*, each one associated with a single *Ficus* host species (Table 1). The fig wasps of section *Americanae* were classified into the genus *Pegoscapus* (Fig. 7 A, D, G). The morphospecies were assigned to this section by the number of transverse lamellae of the mandibles (11 in *Pegoscapus* sp. 1, 13 in *Pegoscapus* sp. 2, and 15 in *Pegoscapus* sp. 3), by the third segment of the antenna transformed (Fig. 7 B, E, H) and by presenting pollen grains in the mesosoma of the corbiculae (Fig. 7 C, F, I).

On the other hand, the fig wasps of the sect. *Pharmacosycea* belong to the genus *Tetrapus* (Fig. 8 A, D, G). Each morphospecies of this genus was characterized by having jaws with two apical teeth (*Tetrapus* sp. 2), two apical and two subapical teeth (*Tetrapus* sp. 3) or presenting a mandibular appendage with two parallel rows (*Tetrapus* sp. 1). All morphospecies have the teeth oriented towards the back of the head (Fig. 8 B, E, H) and do not have corbiculae. The analyzed specimens presented pollen grains adhered to the exoskeleton (Fig. 8 C, F, I).

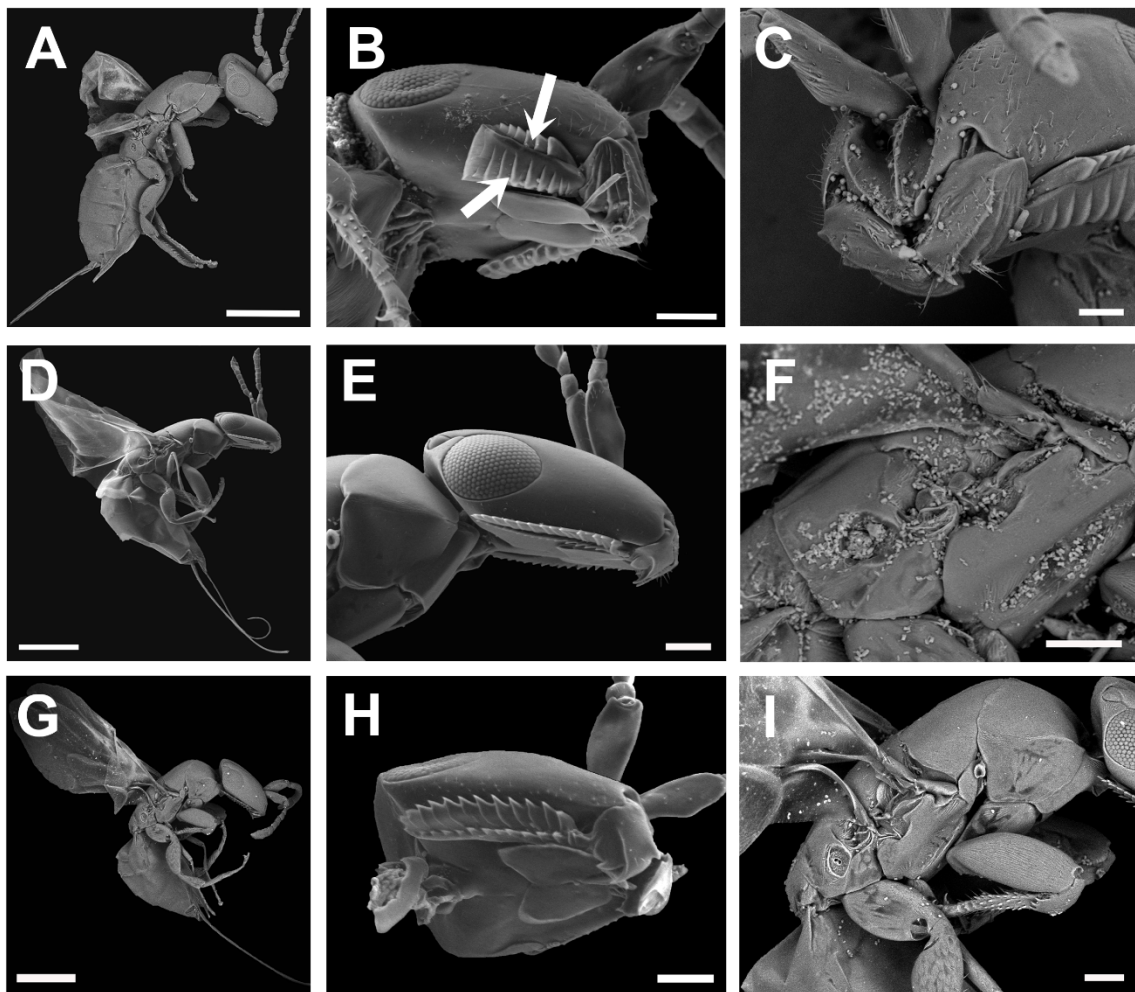
- 1 **Table 1.** Variation in number of flowers and anther-to-ovule ratio, species of fig wasps, presence or not of corbiculae, and pollination  
 2 mode to six Neotropical *Ficus* species.

<i>Ficus</i> species	Pistillate flowers mean	Staminate flowers mean	Anther-to-ovule ratio mean (SD)	Species fig wasps	Corbiculae	Pollination mode
<b><i>Sect. Americanae</i></b>						
<i>F. colubrinae</i>	241 (± 40)	12 (± 6)	0.05 (± 0.02)	<i>Pegoscapus</i> sp. 1	Yes	Active
<i>F. isophlebia</i>	311 (± 67)	31 (± 11)	0.10 (± 0.03)	<i>Pegoscapus</i> sp. 2	Yes	Active
<i>F. obtusifolia</i>	830 (± 262)	43 (± 36)	0.05 (± 0.04)	<i>Pegoscapus</i> sp. 3	Yes	Active
<b><i>Sect. Pharmacosycea</i></b>						
<i>F. apollinaris</i>	264 (±59)	74 (± 24)	0.29 (± 0.08)	<i>Tetrapus</i> sp. 1	No	Passive
<i>F. insipida</i>	2197 (± 544)	865 (± 277)	0.40 (± 0.13)	<i>Tetrapus</i> sp. 2	No	Passive
<i>F. yoponensis</i>	355 (± 123)	95 (± 48)	0.27 (± 0.09)	<i>Tetrapus</i> sp. 3	No	Passive

3



**Figure 7.** SEM and light microscopy view of female *Pegoscapus* (Agaonidae) from sect. *Americanae* (subg. *Spherosuke*). (A-C) *Pegoscapus* sp. 1. (D-F) *Pegoscapus* sp. 2. (G-I) *Pegoscapus* sp. 3. (A, D, G) Lateral view of pollinating wasp found in species of sect. *Americanae*. (B) Ventral view of female pollinating wasp mesosoma (arrows) from *F. colubrinae*. (C) Head, ventral view. Mandible with wide teeth at the apex one curved tooth (arrow). (E, H) Close-up of the corbiculae with pollen grains. (F) Lateral view of the head of the pollinating wasp of *F. isophlebia*. (I) Dorsal view of head. The head grooved with two apical teeth on the shape of a pincer. Scar bars: G = 500  $\mu\text{m}$ ; A, C, D = 200  $\mu\text{m}$ ; E, H, 100  $\mu\text{m}$ ; B = 50  $\mu\text{m}$ ; F, I = 20  $\mu\text{m}$ .



**Figure 8.** SEM view of female *Tetrapus* (Agaonidae) from sect. *Pharmacosyceae* (subg. *Pharmacosyceae*). (A-C) *Tetrapus* sp. 1. (D-F) *Tetrapus* sp. 2. (G-I) *Tetrapus* sp. 3. (A, D, G) Lateral view of pollinating wasp of sect. *Pharmacosyceae*. (B) Frontal part of the head of *Tetrapus* sp. 1. A large number of pollen grains are observed between the indentations of the head. (C, F, I) Lateral view of the head. The arrangement of the upper mandible is observed. (C) The mandible has two appendages (arrows). (E, F) Lateral close-up of the mesosoma, a large number of pollen grains are observed attached to the exoskeleton, without the presence of pollen. Scar bars: A, D, G = 500  $\mu$ m; B, E, F, I, H = 100  $\mu$ m; C = 50  $\mu$ m.

## 4 Discussion

### 4.1 Active pollination

Active pollination in angiosperms is rare in nature and has only been recorded in a few mutualistic systems (Cook et al., 2004; Cook and Rasplus, 2003; Dufaÿ and Anstett, 2003; Jousselin et al., 2003b; Kjellberg et al., 2001; Pellmyr et al., 2020; Weiblen, 2002). Our results corroborate that *Ficus* species in sect. *Americanae* are actively pollinated by wasps of the genus *Pegoscapus*, as indicated by the presence of corbiculae with pollen grains in them (Fig. 7 C, F, I). In contrast, species in sect. *Pharmacosycea*, were all pollinated by *Tetrapus* wasps, which do not have specialized structures to carry on pollen (Fig. 8 C, F, I).

Pollination by the two wasp genera was associated with a suite of characters that directly enhance the action of pollinating wasps, particularly the presence of the synstigma and pollen ovule ratio, but also the spatial presence of flowers has been observed to influence the behavior of their pollinating wasps (Zhang et al., 2009). The presence of a synstigma during the receptive stage is an attribute that is related to active pollination since it acts as a common surface for germination, growth, and pollen tube competition (Delgado-Pérez et al., 2020; Endress, 1982; Jousselin and Kjellberg, 2001; Rojas-Cortés et al., 2022; Teixeira et al., 2020, 2018). In this context, the synstigma could be considered an adaptation that allows equalizing the possibilities of pollination in all pistillate flowers (Jousselin and Kjellberg, 2001; Teixeira et al., 2020; Verkerke, 1989). *Ficus colubrinae* had a cohesive synstigma, while the synstigma was less compact in *F. isophlebia* and *F. obtusifolia* which could be due to the number of flowers per syconium and pollen tube



competition (Michaloud et al., 2005; Teixeira et al., 2018). The cohesiveness of stigmatic papillae has been related to the production of chemotrophic signals, which direct the growth of pollen tubes between flowers, regardless of floral morph (Teixeira et al., 2020).

Therefore, further studies that consider the diversity of synstigma and the cohesiveness of stigmatic papillae among different floral morphs will be necessary.

An important trait associated with active pollination is pollen production, which has been related to the efficient use of resources in systems where pollen is not wasted or consumed by floral visitors (Zhang and Yang, 2017). It has been proposed that when a biotic vector (fig wasps) is present, pollination is guaranteed (Borges, 2021; Dunn, 2020; Pellmyr et al., 2020); therefore, the overproduction of pollen grains is not necessary (Cruden, 1977). Our results indicate that there is an optimization of grains per syconium, as has been reported for other species where the reduction in staminate flowers is associated with a lower number of pollen grains per syconium (Borges, 2021; Cruden, 2000; Deng et al., 2016; Dunn, 2020; Jandér and Herre, 2010; Kjellberg et al., 2001; Pellmyr et al., 2020). The A/O ratios of *F. colubrinae*, *F. isophlebia* and *F. obtusifolia* were significantly lower than 0.15 (Tables 1, 2), which could be interpreted as a way to optimize resource allocation through a reduction in pollen production (Dunn, 2020; Jandér and Herre, 2010; Wang et al., 2014). In this context, selection should favor a match between the number of pollen grains each foundress collects and the average number of eggs it can lay since they have some control over pollen deposition on stigmas (Kjellberg et al., 2005; Weiblen, 2002). Such coincidence was reflected in the studied species since low A/O ratios are shared and the presence of pollen in the corbiculae confirm the search and collection behavior of pollen by their pollinators.

A crucial factor in active pollination is the behavior of the fig wasps, which break the anthers with their mandibles in order to collect the pollen and later transport it from one syconium to another, but in the species of sect. *Americanae*, the presence of dehiscence lines could mean that this behavior is not necessary. Our result coincides with Delgado-Pérez et al. (2022), which reported the presence of the longitudinal dehiscence in *F. tuerckheimii* Standl. (sect. *Americanae*). Thus, dehiscence lines in the anthers could be an attribute for the *Americanae* section and differ from its sister groups, such as *Galoglychia*, *Malvanthera* or *Urostigma* (Berg and Wiebes, 1992; Verkerke, 1989).

Similarly, the shape and ornamentation of the pollen could facilitate the collection and transport of pollen by the fig wasp (Wang et al., 2014). Species with active pollination have ellipsoid-shaped pollen and psilate to rugulate ornamentation, which makes it easier for pollinating wasps to place the pollen in their corbiculae, without it sticking to their legs (Wang et al., 2014; Weiblen, 2002), which could mean different strategies by the host plants for pollen collection.

#### 4.2 *Passive pollination*

Passive pollination was long considered the basal condition (Cruaud et al., 2012). However, in recent phylogenetic reconstructions, it has been recognized as a derived condition (Rasplus et al., 2020). Although active pollination has captured the attention of many studies, passive pollination exhibits adaptive characteristics that counteract the lack of directed fig wasp behavior to collect pollen (Cook et al., 2004; Weiblen, 2002). The most common adaptation in species with this system is the morphology of the stigma (Teixeira et al., 2018; Verkerke, 1989). In the studied species of sect. *Pharmacosyceae*, the stigmas are bifurcate, with long papillae (Fig. 3 F, I), projecting into the syconial cavity, which may act

as "brushes" over the bodies of fig wasps, to ensure pollination of female flowers (Jousselin et al., 2004; Jousselin and Kjellberg, 2001; Teixeira et al., 2018; Weiblen, 2002; Yu et al., 2004). The lack of stigmatic cohesiveness suggests that this structure is maintained by selection to increase pollen dispersal (Jousselin and Kjellberg, 2001).

Additionally, two spatial patterns in stigma presentation have been observed in the section (Berg, 2006) related to the length of the styles of both female floral morphs. In subsect. *Petenenses* Carvajal & Shebes, in which *F. apollinaris* is found, the stigmas of long-styled flowers may protrude further into the syconial cavity than those of short-styled flowers in easily observable strata, whereas in subsect. *Bergianae* Carvajal & Shebes, in which *F. insipida* and *F. yoponensis* are included (Fig. 3 E, H), the stigmas of long-styled and short-styled flowers can reach the same height without clearly forming different strata, thus may favor or prevent fig wasps from ovipositing the flowers (Zhang et al., 2009).

Anther-ovule ratios were higher in section *Pharmacosycea* species because large amounts of pollen grains are produced per syconium, possibly to facilitate the adherence to the exoskeleton of the fig wasps (Kjellberg et al., 2001). In this type of pollination, a significant energetic expenditure on the part of the host is expected as more resources should be allocated to pollen production to ensure that exiting fig wasps will carry pollen to the next syconium (Jousselin and Kjellberg, 2001; Kjellberg et al., 2005, 2001; Weiblen, 2002). The presence of pollen grains on the exoskeleton of the fig wasps supports this idea (Fig. 8 B, E, H). Additionally, it has been proposed that natural selection has favored pollen grains that present a larger surface area per unit volume to have a higher probability of adherence to the body of their fig wasps (Wang et al., 2014). According to Zhang and Yang (2017), passively fig wasps do not require specific adaptations to perform adequate

pollination since when they emerge from their galls, pollen that is available inside the syconium adheres to their bodies accidentally (Jandér and Herre, 2010; Verkerke, 1989). Passive pollination represents an occasional strategy in the genus, so starting to describe the most outstanding characteristics will allow us to understand some of the processes involved in plant-pollinator recognition.

Although there are distinct traits of passive and active fig wasps, species within the same genus have also been reported to participate in both types of pollination, including *Eupristina*, *Pegoscapus*, *Platyscapa*, *Pleistodontes*, *Valisia*, and *Wiebesia* (Kjellberg et al., 2014, 2005; Lopez-Vaamonde et al., 2002; Ramírez, 1970; Rojas-Cortés et al., 2022; Zhang and Yang, 2017). The fig wasps have been susceptible to changes by their host plants, which could drive morphological and behavioral changes in their pollinators (Lopez-Vaamonde et al., 2009). Therefore, studies analyzing morphological variation among closely related species could contribute to understanding strategies and constraints among species.

## **5. Conclusions**

This study provides a detailed analysis of attributes related to the two pollination modes present in the genus *Ficus*. In addition, we provide tools that allow contrasting floral structures related to the two pollination modes in two sections of *Ficus*, raising many questions that need further investigation. Furthermore, although the lack of genetic certainty of the morphospecies could be considered a limitation, the presence of only one wasp morphospecies per host species contributes to the hypothesis of high specificity in sympatric species (Moe et al., 2011; Wang et al., 2013). Indeed, studies with integrative

approaches such as this contribute to understanding the dynamics and evolution of the fig-fig wasps mutualism.

### **Author contributions**

All authors contributed to the article's conception. N. C-C., S. M-R, and G. I-M. conceived the study and drafted the manuscript. N. C-C. and S. V-S. performed the treatments and histological tests of the syconia and the fig wasp and analyzed the data. N. C-C. and G. C-T. provide the data for obtaining the A/O ratios. All authors gave final approval for publication.

### **Declaration of competing interest**

The authors declare that they have not known competing interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### **Acknowledgements**

This article is a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) for N. Castro-Cárdenas, who acknowledges scholarship and financial support provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). We are grateful to Silvia Espinosa Matías, Orlando Hernández Cristóbal, for technical support on SEM pictures. Also, thanks to Mónica Pérez-Pacheco for technical support. We are grateful to Santiago Sinaca Colín, Iván Leonardo Ek Rodríguez

and Armando Navarrete Segueda, for their help in field work. Thanks to the Laboratorio Nacional de Análisis y Síntesis Ecológica (LANASE) of the ENES Morelia, UNAM, for their microscopy facilities and the Los Tuxtlas Tropical Biology Station, Instituto de Biología, UNAM, for logistical support.

## References

- Baijnath, H., Ramcharun, S., 1983. Aspects of pollination and floral development in *Ficus capensis* Thunb. (Moraceae). *Bothalia* 14, 883–888.  
<https://doi.org/10.4102/abc.v14i3/4.1257>
- Berg, C., 1989. Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia* 45, 605–611.  
<https://doi.org/10.1007/BF01975677>
- Berg, C.C., 2006. The subdivision of *Ficus* subgenus *Pharmacosycea* section *Pharmacosycea* (Moraceae). *Blumea* 51, 147–151.  
<https://doi.org/10.3767/000651906X622409>
- Berg, C., Wiebes, J., 1992. African fig trees and fig wasps. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen Verhandelingen Afdeling Natuurkunde. Amsterdam.
- Borges, R.M., 2021. Interactions between figs and gall-inducing fig wasps: Adaptations, constraints, and unanswered questions. *Front. Ecol. Evol.* 9, 1–16.  
<https://doi.org/10.3389/fevo.2021.685542>
- Bouček Z., 1993. The genera of chalcidoid wasps from *Ficus* fruit in the New-World. *J. Nat. Hist.* 27:173-217. <http://dx.doi.org/10.1080/00222939300770071>
- Bronstein, J.L., 1987. Maintenance of species-specificity in a Neotropical fig-pollinator wasp mutualism. *Oikos* 48, 39–46.
- Bronstein, J.L., McKey, D., 1989. The fig/pollinator mutualism: A model system for comparative biology. *Experientia* 45, 601–604. <https://doi.org/10.1007/BF01975676>
- Bronstein, J.L., Patel, A., 1992. Causes and consequences of within-tree phenological patterns in the florida strangling fig, *Ficus aurea* (Moraceae). *Am. J. Bot.* 79, 41–48.  
<https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1992.tb12621.x>
- Cook, J.M., Bean, D., Power, S.A., Dixon, D.J., 2004. Evolution of a complex coevolved trait: Active pollination in a genus of fig wasps. *J. Evol. Biol.* 17, 238–246.  
<https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2003.00683.x>

- Cook, J.M., Rasplus, J.-Y., 2003. Mutualists with attitude: Coevolving fig wasps and figs. *Trends Ecol. Evol.* 18, 241–248. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00062-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00062-4)
- Cook, J.M., Segar, S.T., 2010. Speciation in fig wasps. *Ecol. Entomol.* 35, 54–66. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2009.01148.x>
- Cornejo-Tenorio, G., Ibarra-Manríquez, G., Sinaca-Colín, S., 2019. Flora de Los Tuxtlas. Guía Ilustrada. 1ª. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Cruaud, A., Ronsted, N., Chantarasuwan, B., Chou, L.S., Clement, W.L., Couloux, A., Cousins, B., Genson, G., Harrison, R.D., Hanson, P.E., Hossaert-Mckey, M., Jabbour-Zahab, R., Jousset, E., Kerdelhué, C., Kjellberg, F., Lopez-Vaamonde, C., Peebles, J., Peng, Y.Q., Pereira, R.A.S., Schramm, T., Ubaidillah, R., Van Noort, S., Weiblen, G.D., Yang, D.R., Yodpinyanee, A., Libeskind-Hadas, R., Cook, J.M., Rasplus, J.-Y., Savolainen, V., 2012. An Extreme case of plant-insect codiversification: Figs and fig-pollinating wasps. *Syst. Biol.* 61, 1029–1047. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys068>
- Cruden, R.W., 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 32–46. <https://doi.org/10.2307/2407542>
- Cruden, R.W., 2000. Pollen grains: why so many? *Pl. Syst. Evol.* 222: 143–165. <https://doi.org/10.1007/BF00984100>
- Delgado-Pérez, G., Vázquez-Santana, S., Cornejo-Tenorio, G., Ibarra-Manríquez, G., 2020. Morpho-anatomical traits of the sycone development phases of *Ficus tuerckheimii* (Subg. *Spherosuke*, Sect. *Americanae*, Moraceae). *Bot. Sci.* 98, 570–583. <https://doi.org/10.17129/botsci.2631>
- Deng, J.Y., Fu, R.-H., Compton, S.G., Hu, D.-M., Zhang, L.-S., Yang, F., Chen, Y., Kjellberg, F., 2016. Extremely high proportions of male flowers and geographic variation in floral ratios within male figs of *Ficus tikoua* despite pollinators displaying active pollen collection. *Ecol. Evol.* 6, 607–619. <https://doi.org/10.1002/ece3.1926>
- Dufaÿ, M., Anstett, M.C., 2003. Conflicts between plants and pollinators that reproduce within inflorescences: evolutionary variations on a theme. *Oikos* 100, 3–14. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2003.12053.x>
- Dunn, D.W., 2020. Stability in fig tree-fig wasp mutualisms: How to be a cooperative fig wasp. *Biol. J. Linn. Soc.* 130, 1–17. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa027>
- Endress, P.K., 1982. Syncarpy and alternative modes of escaping disadvantages of apocarpy in primitive angiosperms. *Taxon* 31, 48–52. <https://doi.org/10.2307/1220588>
- Frank, S., 1984. The behavior and morphology of the fig wasps *Pegoscapus assuetus* and *P. jimenezii*: descriptions and suggested behavioral characters for phylogenetic studies. *Psyche* (Camb. Mass.). 289–308. <https://doi.org/10.1155/1984/35653>

- Galil, J., Eisikowitch, D., 1968. On the Pollination Ecology of *Ficus sycomorus* in East Africa. *Ecology* 49, 259–269. <https://doi.org/10.2307/1934454>
- Gibernau, M., Hossaert-McKey, M., Frey, J., Kjellberg, F., 1998. Are olfactory signals sufficient to attract fig pollinators? *Ecoscience* 5, 306–311. <https://doi.org/10.1080/11956860.1998.11682474>
- Grisson-Pigé, L., Hossaert-McKey, M., Greeff, J.M., Bessière, J.M., 2002. Fig volatile compounds - A first comparative study. *Phytochemistry* 61, 61–71. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(02\)00213-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00213-3)
- Gutiérrez-García, G., Ricker, M., 2011. Climate and climate change in the region of Los Tuxtlas (Veracruz, Mexico): A statistical analysis. *Atmósfera* 24, 347–373.
- Herre, E., Jandér, K., Machado, C.A., 2008. Evolutionary ecology of figs and their associates: Recent progress and outstanding puzzles. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 39, 439–458. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110232>
- Hossaert-McKey, M., Proffit, M., Soler, C., Chen, C., Bessiere, J.M., Schatz, B., Borges, R.M., 2016. How to be a dioecious fig: Chemical mimicry between sexes matters only when both sexes flower synchronously. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep21236>
- Ibarra-Manríquez, G., Cornejo-Tenorio, G., González-Castañeda, N., Piedra-Malagón, E.M., Luna, A., 2012. El género *Ficus* L. (Moraceae) en México. *Bot. Sci.* 90, 389–452. <https://doi.org/10.17129/botsci.472>
- Jandér, D.K., Herre, E.A., 2010. Host sanctions and pollinator cheating in the fig tree-fig wasp mutualism. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 277, 1481–1488. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.2157>
- Jousselin, E., Hossaert-McKey, M., Herre, E., Kjellberg, F., 2003a. Why do fig wasps actively pollinate monoecious figs? *Oecologia* 134, 381–387. <https://doi.org/10.1007/s00442-002-1116-0>
- Jousselin, E., Hossaert-McKey, M., Vernet, D., Kjellberg, F., 2001. Egg deposition patterns of fig pollinating wasps : implications for studies on the stability of the mutualism. *Ecol. Entomol.* 26, 602–608. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2311.2001.00368.x>
- Jousselin, E., Kjellberg, F., 2001. The functional implications of active and passive pollination in dioecious figs. *Ecol. Lett.* 4, 151–158. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2001.00209.x>
- Jousselin, E., Kjellberg, F., Herre, E., 2004. Flower specialization in a passively pollinated monoecious fig: A question of style and stigma? *Int. J. Plant Sci.* 165, 587–593. <https://doi.org/10.1086/386558>
- Jousselin, E., Rasplus, J.-Y., Kjellberg, F., 2003b. Convergence and coevolution in a

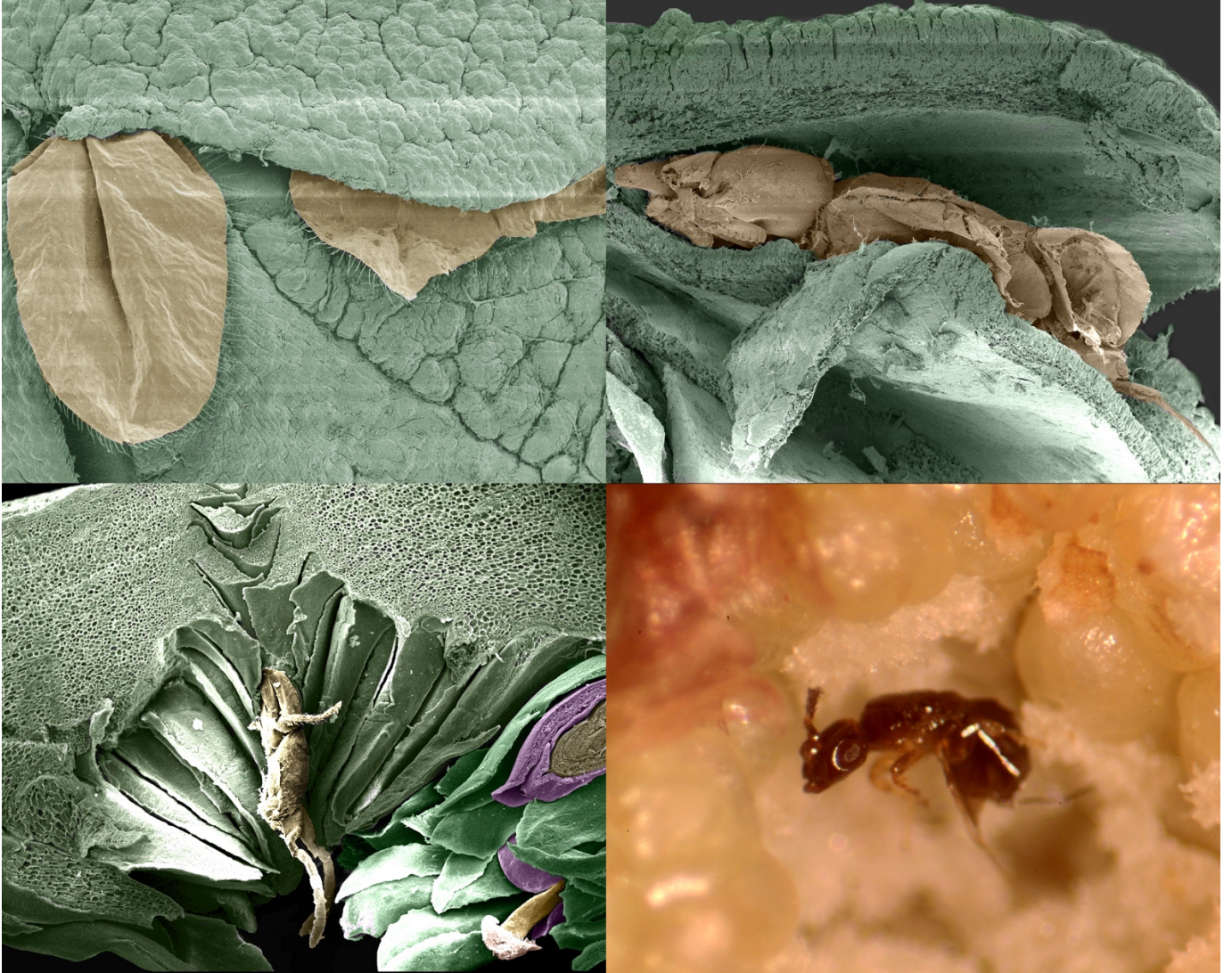


- mutualism: Evidence from a molecular phylogeny of *Ficus*. *Evolution*. 57, 1255–1269. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00334.x>
- Kjellberg, F., Joussetin, E., Bronstein, J.L., Patel, A., Yokoyama, J., Rasplus, J.-Y., 2001. Pollination mode in fig wasps: the predictive power of correlated traits. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 268, 1113–1121. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1633>
- Kjellberg, F., Joussetin, E., Hossaert-McKey, M., Rasplus, J.-Y., 2005. Biology, ecology and evolution of fig-pollinating wasps (Chalcidoidea, Agaonidae). In: Raman. A., Schaefer, C.W., Withers T.M., (eds.). *Biology, Ecology, and Evolution of Gall-inducing Arthropods*. Science Publishers, Michigan. pp. 539-572-
- Kjellberg, F., Suleman, N., Raja, S., Tayou, A., Hossaert-McKey, M., Compton, S.G., 2014. Some pollinators are more equal than others: Factors influencing pollen loads and seed set capacity of two actively and passively pollinating fig wasps. *Acta Oecologica* 57, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2013.11.002>
- Lillie, R., 1954. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. 3<sup>rd</sup> ed. McGraw-Hill, New York.
- Lopez-Vaamonde, C., Dixon, D.J., Cook, J.M., Rasplus, J.-Y., 2002. Revision of the Australian species of *Pleistodontes* (Hymenoptera: Agaonidae) fig-pollinating wasps and their host-plant associations. *Zool. J. Linn. Soc.* 136, 637–683. <https://doi.org/10.1046/j.1096-3642.2002.00040.x>
- Lopez-Vaamonde, C., Wikström, N., Kjer, K.M., Weiblen, G.D., Rasplus, J.-Y., Machado, C.A., Cook, J.M., 2009. Molecular dating and biogeography of fig-pollinating wasps. *Mol. Phylogenet. Evol.* 52, 715–726. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.05.028>
- Márquez-Guzmán, J., Wong, J., Pérez-Pacheco, M., López, M., Collazo, M., 2016. *Técnicas de Laboratorio para el Estudio del Desarrollo de Angiospermas*. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Michaloud, G., Bossu-Dupriez, N., Chevolut, M., Lasbleiz, C., 2005. Pollen waste and unrelated traits in a fig-fig wasp symbiosis: A new behaviour suggesting a host shift. *Comptes Rendus - Biol.* 328, 81–87. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2004.11.002>
- Moe, A.M., Rossi, D.R., Weiblen, G.D., 2011. Pollinator sharing in dioecious figs (*Ficus*: Moraceae). *Biol. J. Linn. Soc.* 103, 546–558. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01669.x>
- Pellmyr, O., Kjellberg, F., Herre, E., Kawakita, A., Hembry, D.H., Holland, J.N., Terrazas, T., Clement, W.L., Segraves, K.A., Althoff, D.M., 2020. Active pollination drives selection for reduced pollen-ovule ratios. *Am. J. Bot.* 107, 164–170. <https://doi.org/10.1002/ajb2.1412>

- Piedra-Malagón, E.M., Hernández-Ramos, B., Mirón-Monterrosas, A., Cornejo-Tenorio, G., Navarrete-Segueda, A., Ibarra-Manríquez, G., 2019. Syconium development in *Ficus petiolaris* (*Ficus*, sect. *Americanae*, Moraceae) and the relationship with pollinator and parasitic wasps *Botany* 97, 190–203. <https://doi.org/10.1139/cjb-2018-0095>.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Ramírez, W., 1969. Fig wasps: Mechanism of pollen transfer. *Science* 80, 163, 580–581. <https://doi.org/10.1126/science.163.3867.58>
- Ramírez, W., 1970. Host specificity of fig wasps (Agaonidae). *Evolution*. 24, 680–691. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1970.tb01804.x>
- Ramírez, W., 1974. Coevolution of *Ficus* and Agaonidae. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 61, 770–780. <https://doi.org/10.2307/2395028>
- Rasplus, J.-Y., Rodriguez, L.J., Sauné, L., Peng, Y.Q., Bain, A., Kjellberg, F., Harrison, R.D., Pereira, R.A.S., Ubaidillah, R., Tollon-Cordet, C., Gautier, M., Rossi, J.P., Cruaud, A., 2020. Exploring systematic biases, rooting methods and morphological evidence to unravel the evolutionary history of the genus *Ficus* (Moraceae). *Cladistics* 37, 402–422. <https://doi.org/10.1111/cla.12443>
- Rasplus, J.-Y., Soldati, L., 2005. Familia Agaonidae. Introducción a los Hymenoptera de la Región Neotropical, Sociedad Colombiana de Entomología y Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Rojas-Cortés, A.P., Cuervo-Robayo, A.P., Cornejo-Tenorio, G., Ibarra-Manríquez, G., 2022. Reproductive biology and potential distribution of *Ficus pringlei* (Moraceae), a microendemic New World species. *Acta Bot. Mex.* 129: e2048. <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.2048>
- Segar, S.T., Volf, M., Sisol, M., Pardikes, N.A., Souto-Vilarós, D., 2019. Chemical cues and genetic divergence in insects on plants: conceptual cross pollination between mutualistic and antagonistic systems. *Curr. Opin. Insect Sci.* 32, 83–90. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.11.009>
- Smith, C.M., Bronstein, J.L., 1996. Site variation in reproductive synchrony in three neotropical figs. *J. Biogeogr.* 23, 477–486. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.1996.tb00009.x>
- Teixeira, S.P., Costa, M.F.B., Basso-Alves, J.P., Kjellberg, F., Pereira, R.A.S., 2020. The synstigma turns the fig into a large flower. *Bot. J. Linn. Soc.* 93–105. <https://doi.org/10.1093/botlinnean/boaa061>

- Teixeira, S.P., Costa, M.F.B., Basso-Alves, J.P., Kjellberg, F., Pereira, R.A.S., 2018. Morphological diversity and function of the stigma in *Ficus* species (Moraceae). *Acta Oecologica* 90, 117–131. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2018.02.008>
- van Noort, S., 1989. Pollinator-specific volatile attractants released from the figs of *Ficus burrtt-davyi*. *Suid-Afrikaanse Tydsk. vir Wetenskap* 85, 323–324.
- Verkerke, W., 1989. Structure and function of the fig. *Experientia* 45, 612–622. <https://doi.org/10.1007/BF01975678>
- Wang, G., Chen, J., Li, Z.-B., Zhang, F.P., Yang, D.R., 2014. Has pollination mode shaped the evolution of *Ficus* pollen? *PLoS One* 9, 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086231>
- Wang, G., Compton, S.G., Chen, J., 2013. The mechanism of pollinator specificity between two sympatric fig varieties: A combination of olfactory signals and contact cues. *Ann. Bot.* 111, 173–181. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs250>
- Weiblen, G.D., 2002. How to be a fig wasp. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 299–330. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145213>
- Yu, D.W., Ridley, J., Jouselin, E., Herre, E., Compton, S.G., Cook, J.M., Moore, J.C., Weiblen, G.D., 2004. Oviposition strategies, host coercion and the stable exploitation of figs by wasps. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 271, 1185–1195. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2630>
- Zhang, F., Peng, Y.Q., Compton, S.G., Yang, D., 2009. Floral characteristics of *Ficus curtipes* and the oviposition behavior of Its pollinator fig wasp. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 102, 556–559. <https://doi.org/10.1603/008.102.0328>
- Zhang, X., Yang, D., 2017. Occurrence of internally ovipositing non-agaonid wasps and pollination mode of the associated agaonid wasps. *Plant Divers.* 39, 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.pld.2017.04.002>

## Capítulo IV



Superior izquierda, *Ficus colubrinae*. Ostíolo con alas de avispas polinizadoras. Superior derecha, *Ficus apollinaris*. Avispa polinizadora atrapada entre las brácteas ostiolares. Inferior izquierda, *Ficus apollinaris*, avispa polinizadora atravesando el ostíolo. Inferior derecha, avispa polinizadora de *Ficus colubrinae*, en la cavidad siconial. Se aprecia que ya no presenta una antena, ni alas. Fotografías: Nadia Castro Cárdenas.

## CAPÍTULO IV.

### DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

El género *Ficus* tiene ca. 800 especies que muestran una diversidad en formas de crecimiento (árboles, lianas y arbustos), sistemas reproductivos (monoecia y dioecia) y cuyos polinizadores manifiestan distintas maneras de polinizar (activa y pasiva) (Jousselin et al. 2003; Clement y Weiblen 2009; Cruaud et al. 2012). Se propone que la combinación de estos atributos proporcionó a los interactuantes de la interacción *Ficus*-avispa Agaonidae capacidades para colonizar nuevos nichos ecológicos (Pereira y Kjellberg 2021). Lo anterior, ha propiciado que el vínculo entre la coevolución de estos dos grupos de plantas y polinizadores, así como la especificidad del mutualismo, sigan siendo fenómenos complejos comprender (Althoff et al., 2014; Hembry et al., 2014). Con el objetivo de contribuir al entendimiento de estos temas, en el presente trabajo en el que se describen estructuras secretoras asociadas al ostíolo en especies Neotropicales de *Ficus*. Además, es el primer trabajo en el que se describen y asocian caracteres morfológicos en los siconos y en sus avispas polinizadoras, para determinar los modos de polinización.

Pese a que existen algunos trabajos en los que se han descrito estructuras claves en el sicono, e.g. sinestigma, brácteas ostiolares y pared del sicono (Machado et al., 2013; Teixeira et al., 2018, 2020; Fan et al., 2019), los resultados obtenidos mostraron tejidos complejos sin describir, como los osmóforos mesofílicos y coléteres entre las brácteas ostiolares. Los caracteres reproductivos, así como los cambios estructurales en el sicono, como el tamaño y la forma, pueden implicar cambios o fuerzas selectivas en sus avispas polinizadoras y conducir a la especiación (Pederneiras et al., 2017). Es por ello por lo que profundizar y representar dicha variación entre las secciones de *Ficus* con sus avispas polinizadoras, permitirá comparar los elementos clave del mutualismo.

La discusión general se divide en dos aspectos principales. Primero se analizó y profundizó sobre el papel del ostíolo como filtro selectivo en el mutualismo *Ficus*-

Agaonidae. Posteriormente, se compararon las características morfológicas en los siconos y en las avispas polinizadoras presentes en los modos de polinización (activa o pasiva), como prueba de las estrategias reproductivas que presentan ambos interactuantes.

### **1. El ostíolo como filtro selectivo en el mutualismo *Ficus*-avispa Agaonidae**

El ostíolo es una estructura compleja que actúa como filtro morfológico en el mutualismo *Ficus*-Agaonidae. En el Capítulo II se reconocieron dos zonas que conforman al ostíolo: las brácteas ostiolares y una zona periostiolar. Las brácteas ostiolares se clasificaron en tres tipos (superficiales, transicionales e internas). En el primer tipo de estas brácteas se identificó, por primera vez, la presencia de osmóforos, los cuales son los encargados de emitir compuestos volátiles florales (VOC's) para la atracción de sus polinizadores.

En la sección *Pharmacosycea*, las brácteas ostiolares en dos de las especies estudiadas en el presente estudio presentan un arreglo constante. Por el contrario, en *F. insipida* las brácteas superficiales, durante la fase receptiva, no se entrelazan, lo que propicia que se encuentre parcialmente abierto, lo que es compensado por el arreglo más compacto de las brácteas transicionales e internas. Con respecto a la forma del ostíolo, se encontró que cada especie presenta una forma particular, por lo que se ha sugerido que puede tener un valor taxonómico al ser un atributo que no cambia entre los individuos de la misma especie (Pederneiras y Romaniuc-Neto 2019). Es importante considerar que la clasificación en la sección *Pharmacosycea* considera la forma del ápice del sicono, el cual puede ser apiculado, sub-apiculado, redondeado, cóncavo y crateriforme (Pederneiras y Romaniuc-Neto 2019). De acuerdo con esta clasificación, *F. apollinaris* presenta una forma del ostíolo de tipo cóncava, *F. insipida*, sub-apiculada y *F. yoponensis*, apiculada. La clasificación de Pederneiras y Romaniuc-Neto (2019) está basada en ejemplares frescos, ya que en ocasiones el ostíolo se deforma en los ejemplares de herbario. Aunque no se comprobó el papel funcional del ostíolo como barrera física, la presencia de morfologías particulares sugiere que cada especie está asociada exclusivamente con una avispa polinizadora. Por lo tanto, análisis comparativos entre diferentes secciones del género son

esenciales para comprender la evolución del ostíolo como barrera morfológica en el mutualismo, los cuales también podrían estar asociados con la emisión de VOC's (compuestos volátiles florales).

En cuanto a la sección *Americanae*, se identificaron los tres tipos de brácteas antes mencionadas, y se observó alrededor de estas un anillo engrosado (anillo ostiolar). Al realizar un análisis minucioso de esta estructura, se determinó que presenta similitudes estructurales con las brácteas superficiales, siendo un continuo de tejido (Cap. II; Fig. 4 y 5), incrementando de esta manera la superficie de emisión de los compuestos volátiles florales. Sin embargo, se desconoce si el anillo ostiolar está presente en todas las especies de la sección *Americanae* o incluso si es un carácter presente en otras secciones del género *Ficus*. En el caso de que sea un carácter exclusivo de *Americanae* podría tratarse de una estrategia para el reconocimiento con sus avispas polinizadoras y con ello contribuir a la radicación y éxito de la sección en el Neotrópico (Clement et al., 2020; Perreira y Kjellberg, 2021).

La zona periostiolar, es una estructura asociada al ostíolo y se propone por primera vez en este trabajo. Esta estructura se encuentra localizada alrededor de las brácteas ostiolar y presenta una epidermis con células pequeñas, osmóforos difusos y tricomas. Durante la fase receptiva, los osmóforos difusos son estructuras emisoras de compuestos volátiles, constituidas por un par de capas de tejido subepidérmico y estomas abiertos sobre la superficie del sicono. La cantidad de estomas fue diferente en todas las especies, relacionándose con el tamaño del sicono y la cantidad de compuestos volátiles emitidos (Yu et al., 2015; Sun et al., 2022). En especies de *Acianthera* (Orchidaceae) la presencia de estomas se ha relacionado con la emisión de compuestos volátiles (Melo et al., 2010). Futuras investigaciones podrían contribuir a identificar la presencia de osmóforos en la zona periostiolar y en otras secciones del género y explorar su papel en el mutualismo.

Por otra parte, la forma y orientación de tricomas en la zona periostiolar podría ser parte de un sistema de señales táctiles o guías para las avispas polinizadoras. En este sentido, las avispas polinizadoras podrían presentar conductas positivas en el momento de



elección de su hospedero; sin embargo, esto es difícil de poner a prueba experimentalmente ya que las observaciones en condiciones *in situ* sobre la elección de las avispas polinizadoras son poco viables, debido a su tamaño pequeño, de hasta 2 mm (Ramírez 1970) y a la altura que llegan a alcanzar los árboles de *Ficus* (Ibarra-Manríquez et al., 2012).

## **2 Estructuras secretoras y compuestos volátiles florales asociados al ostiolo**

Entre las estructuras secretoras descritas para el género *Ficus*, se encuentran los laticíferos, idioblastos, epidermis secretoras, glándulas de aromas (osmóforos) y tricomas glandulares, las cuales tienen una alta actividad secretora durante la fase receptiva (Souza et al., 2015). En el capítulo II se determinó que existen dos tipos de osmóforos en el ostiolo, los cuales fueron localizados en las brácteas ostiolares (mesofilicos) y en la zona periostiolar (difusos). La presencia de estas dos estructuras emisoras en el ostiolo, podría contribuir con una emisión escalonada de los VOC's como lo han sugerido algunos autores (Proffit et al., 2020; Wang et al., 2020; Okamoto y Su et al., 2021). Si esta hipótesis se corrobora, se podría esperar que cada especie estudiada presente diferencias significativas en la emisión de VOC's, que refuercen el reconocimiento con sus avispas polinizadoras.

Finalmente, se describe, por primera vez, la presencia de coléteres entre las brácteas ostiolares. Este tipo de estructura secretora presentó sustancias lipídicas, las cuales podrían lubricar a las avispas polinizadoras, para que éstas puedan ingresar con más facilidad a la cavidad siconial (Castro-Cárdenas et al., 2022, Mat. Supl. 2). Se han reportado coléteres similares han sido reportados en siconos de *F. ottonifolia* (Verkeke, 1986), pero sin profundizar en su función, por lo que análisis más exhaustivos podrían ayudar a comprender su papel funcional en el mutualismo. Otro tipo de sustancias identificadas en los coléteres fueron los compuestos fenólicos. Este tipo de sustancias tienen una gran diversidad química y pueden desempeñar otras funciones además de la defensa contra los herbívoros (Souza et al., 2015). Por ejemplo, podrían estar implicadas en el mantenimiento

de la temperatura al interior del sicono, proporcionando las condiciones necesarias para el desarrollo de larvas de las avispas polinizadoras (Herre, 1996).

### **3 Tipos de polinización en *Ficus***

Los tipos de polinización han sido estudiados en varias especies del género *Ficus* (Jousselin y Kjellberg 2001; Cook et al., 2004; Raja et al. 2008; Pellmyr et al., 2020). En el capítulo III se contrastaron las características de los modos de polinización (activa y pasiva) en seis especies neotropicales, con base en datos directos e indirectos, tanto en la morfología floral de los siconos, como la morfología y conducta de sus avispas polinizadoras. Los resultados obtenidos proporcionan evidencia de las estrategias reproductivas que tienen las especies de *Ficus* con sus avispas polinizadoras, como es el arreglo del estigma, o las diferencias morfológicas en las avispas polinizadoras para el transporte de los granos de polen, lo cual concuerda con lo mencionado por varios autores (Verkerke, 1989; Jousselin y Kjellberg, 2001; Kjellberg et al., 2001).

De acuerdo con Bruun-Lund et al. (2018) las especies de *Ficus* polinizadas activamente (e.g. sect. *Americanae*, sect. *Galoglychia*, sect. *Conosycea*) se diversificaron más rápido y presentan tasas de extinción más bajas que las polinizadas pasivamente (e.g. sect. *Ficus*, sect. *Rhizocladus*, sect. *Malvanthera*). Esto podría explicarse por el hecho de que la polinización activa es la condición ancestral del género (Rasplus et al., 2020), así como la gran cantidad de especies que presentan este tipo de polinización (Jousselin y Kjellberg 2001; Cook y Rasplus 2003).

En contraste, las especies que presentan polinización pasiva han sido escasamente estudiadas (Weiblen, 2002). Una de las secciones donde es interesante estudiar este tipo de polinización es *Pharmacosycea* (subgénero *Pharmacosycea*) (Cruaud et al., 2012). Esta sección se encuentra distribuida desde el norte de México hasta el norte de Argentina (Pederneiras y Romaniuc-Neto, 2019). Dentro de las características que se destacan para esta sección están: i) la amplia distribución de algunas de sus especies (e.g. *F. apollinaris*, *F. insipida*, *F. máxima*, *F. tonduzzi*, *F. yoponensis* y ii) la alta diversidad morfológica de sus

siconos (Ibarra-Manríquez et al., 2012; Pederneiras y Romaniuc-Neto 2019). Documentar los elementos florales del sicono en la sección *Pharmacosycea* permitirá comprender la relación con los caracteres de sus avispas polinizadoras, y su permanencia en el Neotrópico.

Por otro lado, en especies monoicas, un sicono produce semillas, polen y avispas polinizadoras (Cook y Rasplus 2003), por lo que evaluar el éxito de la polinización activa o pasiva, permitirá analizar las contribuciones de cada socio en el mutualismo y esclarecer algunas de las restricciones en el mutualismo (Dunn, 2020). Las restricciones generalmente se reflejan en la adecuación en ambos socios mutualistas (Jandér y Herre, 2016; Dunn 2020). Una reducción en la adecuación del mutualismo *Ficus* -avispa Agaonidae, puede ser causado por la combinación de la aborción de los siconos no polinizados y por el decremento en el desarrollo de larvas de las avispas polinizadoras (Raja et al., 2014; Dunn 2020; Jandér 2021). En consecuencia, conocer los aspectos básicos de la polinización podría esclarecer las contribuciones de cada socio mutualista, la eficiencia de la polinización en términos de número de semillas (seed set) y el número potencial de sitios de oviposición para las avispas polinizadoras.

#### **4 Mecanismos que promueven la especificidad de las avispas polinizadoras**

Los resultados de los estudios morfológicos y la noción de una alta especificidad en la interacción *Ficus*-Agaonidae condujeron a considerar una coespeciación estricta entre los dos grupos (Ramírez, 1974; Wiebes, 1987; Berg, 1989), sin embargo, en varias especies estudiadas hasta el momento, no se cumple con este supuesto (Michaloud et al., 1985; Haine et al., 2006; Su et al., 2008). Lo anterior es afectado porque la identificación de avispas polinizadoras es complicada, debido a su diminuto tamaño y a la presencia de caracteres convergentes entre los grupos cercanamente emparentados (Bouček, 1993; Cook y Segar, 2010).

En el caso de las avispas polinizadoras estudiadas, las características morfológicas se conservaron entre los morfotipos (tipo de mandíbula, número de lamelas, forma de la

cabeza y presencia o ausencia de corbículas). La evidencia obtenida en esta tesis sugiere que las avispas polinizadoras en la región de Los Tuxtlas presentan una especificidad con sus hospederos, al menos a nivel poblacional. La presencia de una sola especie de avispa polinizadora por especie de *Ficus* se ha registrado a nivel poblacional para algunas especies (e. g. *F. aurea* Nutt, Hernández-Esquivel et al. 2020; *F. microcarpa* y *F. altissima*, Zhang et al. 2021). De igual forma, los marcadores mitocondriales (COI) y nucleares (factor de elongación) en las especies de estudio, confirman la identidad de un sólo grupo genético de avispa polinizadora por especie de *Ficus* (Castro-Cárdenas, N., *en preparación*). Sin embargo, existe un vacío en el conocimiento de las especies de avispas polinizadoras para la mayoría de los géneros de la familia Agaonidae, por lo que es necesario avanzar con las identificaciones de taxones para verificar y comprender el grado de especialización que presentan las avispas polinizadoras con sus hospederos.

Finalmente, el conocimiento sobre de la biología de las avispas polinizadoras aún es escaso y se requieren estudios donde se analice como estas se desarrollan dentro del sicono. De acuerdo con Vanderplanck et al. (2021), las modificaciones en el comportamiento de uno de los socios mutualistas, provoca cambios negativos en la adecuación del otro socio. En el caso de las avispas polinizadoras de la familia Agaonidae, los siconos han ejercido una presión de selección más prolongada, debido a los ciclos de vida más largos, a diferencia de los tiempos generacionales de sus avispas polinizadoras (Harrison et al., 2005). Por ende, la integración de los cambios en el comportamiento de las avispas polinizadoras permitirá predecir la estabilidad en las redes ecológicas y, por otro lado, contribuirá a establecer posibles estrategias para la conservación de una de las interacciones planta-animal más importantes de los trópicos.

## **CONCLUSIONES**

El género *Ficus* es uno de los grupos más diversos en los trópicos y su inflorescencia (sicono) presenta un mutualismo estricto con sus avispas polinizadoras de la familia Agaonidae. De las aproximadamente 800 especies que conforman al género *Ficus*, 25 están

presentes en México (Ibarra-Manríquez et al., 2012; Hernández-Esquivel et al., 2020). En el presente trabajo se describen aspectos de la biología reproductiva para seis especies simpátricas de *Ficus*, en los cuales se pueden encontrar patrones a nivel de secciones. Para la sección *Americanae*, se describe por primera vez la estructura y función del anillo ostiolar; mientras que, en la sección *Pharmacosycea* se pudo corroborar la presencia de un ostíolo semi-abierto en *F. insipida*.

Por otra parte, el sinestigma de las flores de *Americanae* no fue observado en las especies de la sección *Pharmacosycea*, quienes presentan estigmas libres. Se observó que ambas secciones coinciden las proporciones antera-óvulos establecidos para cada tipo de polinización, ya que las especies de *Americanae* presentaron valores inferiores a 0.15 (polinización activa), mientras que en *Pharmacosycea* los valores fueron superiores a 0.21 (polinización pasiva). Para todas las especies estudiadas el tamaño de los granos de polen es muy similar (aproximadamente 10  $\mu\text{m}$ ), por lo que se cataloga como polen pequeño. Por otro lado, se encontró que los polinizadores coinciden con los géneros de avispas reportados para cada sección: *Pegoscapus*, para la sección *Americanae* y *Tetrapus* para *Pharmacosycea*. En cada especie de *Ficus* estudiada sólo se encontró un morfotipo de avispa polinizadora, lo cual apoya el paradigma *one-to-one*, que supone que cada especie de *Ficus* es polinizada por una especie de avispa polinizadora.

En relación con las estructuras secretoras, en las seis especies se documentó por primera vez la presencia de dos tipos de osmóforos. Asimismo, se encontraron coléteres entre las brácteas ostiolares, con contenidos lipídicos y fenólicos, que posiblemente lubriquen a las avispas polinizadoras cuando se dirigen hacia el interior del ostíolo. Lo anterior podría ser parte de un complejo sistema de reconocimiento planta-polinizador.

Finalmente, el presente trabajo aborda parte de las adaptaciones morfológicas más relevantes en el mutualismo *Ficus*-Agaonidae. Con ello se espera contribuir a un mejor entendimiento de la biología reproductiva de este sistema modelo de coevolución. Asimismo, se abren nuevas preguntas en relación con la interacción en otras secciones

como posibles factores que contribuyen al mantenimiento del mutualismo y la especificidad entre los socios mutualistas.

## PERSPECTIVAS A FUTURO



Con base en la información generada en esta tesis, se proponen nuevas direcciones de investigación que pueden ser abordadas en futuros estudios:

1. Determinar la relación entre el ostíolo y la cabeza de las avispas polinizadoras como atributos que pudieran estar correlacionados en el mutualismo.
2. Analizar la presencia de estructuras secretoras (osmóforos y coléteres entre las brácteas ostiolares) en otras secciones del género *Ficus*, como elementos que contribuyen con el reconocimiento entre especies y con el mantenimiento del mutualismo. La presencia de dichas estructuras podría representar una ventaja que facilitó el mutualismo entre especies del Neotrópico.
3. Identificación y comparación de los compuestos volátiles emitidos por los siconos durante la fase receptiva para la atracción de las avispas polinizadoras para comprender los mecanismos de reconocimiento planta-polinizador y conocer el grado de especialización que presentan ambos socios mutualistas.
4. Identificación de las avispas polinizadoras y el papel de las interacciones antagonistas por parte de las avispas no polinizadoras. Este último punto, es de suma importancia, ya que existe un vacío de información al respecto de la taxonomía e interacciones antagonistas que se presentan en el mutualismo para la gran mayoría de las especies del Neotrópico.

## Referencias

- Althoff DM, Segraves KA, Johnson MTJ. 2014. Testing for coevolutionary diversification: Linking pattern with process. *Trends in Ecology and Evolution* 29: 82–89.
- Berg C. 1989. Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia* 45: 605–611.
- Bouček Z. 1993. The genera of chalcidoid wasps from *Ficus* fruit in the new world. *Journal of Natural History* 27: 173–217.
- Castro-Cárdenas N, Vázquez-Santana S, Teixeira SP, Ibarra-Manríquez G, 2022. The roles of the ostiole in the fig-fig wasp mutualism from a morpho-anatomical perspective. *Journal of Plant Research* 135(6): 739-755.
- Clement WL, Bruun-Lund S, Cohen A, Kjellberg F, Weiblen GD, Rønsted N. 2020. Evolution and classification of figs (*Ficus*, Moraceae) and their close relatives (Castilleae) united by involucre bracts. *Botanical Journal of the Linnean Society* 193: 316–339.
- Clement WL, Weiblen GD. 2009. Morphological evolution in the mulberry family (Moraceae). *Systematic Botany* 34: 530–552.
- Cook JM, Bean D, Power SA, Dixon DJ. 2004. Evolution of a complex coevolved trait: Active pollination in a genus of fig wasps. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 238–246.
- Cook JM, Rasplus J-Y. 2003. Mutualists with attitude: Coevolving fig wasps and figs. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 241–248.
- Cook JM, Segar ST. 2010. Speciation in fig wasps. *Ecological Entomology* 35: 54–66.
- Cruaud A, Ronsted N, Chantarasuwan B, et al. 2012. An Extreme case of plant-insect codiversification: Figs and fig-pollinating wasps. *Systematic Biology* 61: 1029–1047.
- Dunn DW. 2020. Stability in fig tree-fig wasp mutualisms: How to be a cooperative fig wasp. *Biological Journal of the Linnean Society* 130:1–17.
- Fan K, Bain A, Tzeng H, Chiang Y, Chou LS, Kou-Huang L-L. 2019. Comparative anatomy of the fig wall (*Ficus*, Moraceae). *Botany* 426: 417–426.
- Haine ER, Martin J, Cook JM. 2006. Deep mtDNA divergences indicate cryptic species in a fig-pollinating wasp. *BMC Evolutionary Biology* 6: 1–11.
- Harrison RD. 2005. Figs and the diversity of tropical rainforests. *BioScience* 55: 1053-1064.
- Hembry DH, Yoder JB, Goodman KR. 2014. Coevolution and the diversification of life. *The American Naturalist* 184:425–438.
- Hernández-Esquível KB, Piedra-Malagón EM, Cornejo-Tenorio G, et al. 2020. Unraveling the extreme morphological variation in the neotropical *Ficus aurea* complex (subg.



- Spherosuke*, sect. *Americanae*, Moraceae). *Journal of Systematics and Evolution* 58: 263–281.
- Herre E, Machado CA, Bermingham E, et al. 1996. Molecular phylogenies of figs and their pollinator wasps. *Journal of Biogeography* 23:521–530
- Ibarra-Manríquez G, Cornejo-Tenorio G, González-Castañeda N, Piedra-Malagón EM, Luna A. 2012. El género *Ficus* L. (Moraceae) En México. *Botanical Sciences* 90: 389–452.
- Jandér K, Dafoe A, Herre E. 2016. Fitness reduction for uncooperative fig wasps through reduced offspring size: A third component of host sanctions. *Ecology* 97:2491–2500.
- Jandér KC. 2021. Fitness costs for fig wasps that fail to pollinate their host *Ficus perforata*. *Symbiosis* 84:171–178.
- Jousselin E, Kjellberg F. 2001. The functional implications of active and passive pollination in dioecious figs. *Ecology Letters* 4: 151–158.
- Jousselin E, Rasplus J-Y, Kjellberg F. 2003. Convergence and coevolution in a mutualism: Evidence from a molecular phylogeny of *Ficus*. *Evolution* 57: 1255–1269.
- Kjellberg F, Jousselin E, Bronstein JL, Patel A, Yokoyama J, Rasplus J-Y. 2001. Pollination mode in fig wasps: the predictive power of correlated traits. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 268(1472): 1113–1121.
- Machado AFP, de Souza AM, Leitão CAE. 2013. Secretory structures at syconia and flowers of *Ficus enormis* (Moraceae): A specialization at ostiolar bracts and the first report of inflorescence colleter. *Flora: Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 208: 45–51.
- Melo MC, Borba EL, Paiva EAS. 2010. Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution* 286:141–151
- Michaloud G, Michaloud-Pelletier S, Wiebes J, Berg C. 1985. The co-occurrence of two pollinating species of fig wasp and one species of fig. *Proceedings - Nederlandse Akademie van Wetenschappen* 88: 93–119.
- Okamoto T, Su ZH. 2021. Chemical analysis of floral scents in sympatric *Ficus* species: highlighting different compositions of floral scents in morphologically and phylogenetically close species. *Plant Systematics and Evolution* 307:1–12.
- Pederneiras LC, Romaniuc-Neto S. 2019. Taxonomic revision of *Ficus* sect. *Pharmacosyceae* (Moraceae). *Phytotaxa* 313 (1): 001–022.

- Pederneiras LC, Romaniuc-Neto S, Mansano VDF. 2017. *Ficus latipedunculata* (Moraceae), a new species from Brazil, and taxonomic key for *Ficus* sect. *Pharmacosycea* occurring in Atlantic Forest. *Systematic Botany* 42(1), 185-190.
- Pellmyr O, Kjellberg F, Herre E, et al. 2020. Active pollination drives selection for reduced pollen-ovule ratios. *American Journal of Botany* 107: 164–170.
- Pereira RAS, Kjellberg F. 2021. Mutualism as a source of evolutionary innovation: Insights from insect-plant interactions In: Del-Claro K, Torezan-Silingardi H, eds. Plant-Animal Interactions. *Springer International Publishing*, 307–332.
- Proffit M, Lapeyre B, Buatois B, et al. 2020. Chemical signal is in the blend: bases of plant-pollinator encounter in a highly specialized interaction. *Scientific Reports* 10:1–11.
- Raja S, Suleman N, Compton SG. 2008. Why do fig wasps pollinate female figs? *Symbiosis* 45: 25–28.
- Raja S, Suleman N, Compton SG. 2014. Foundress fig wasps are more likely to re-emerge from older figs. *Journal of Insect Behavior* 27: 786–790.
- Ramírez W. 1970. Taxonomic and biological studies of Neotropical fig wasps (Hymenoptera: Agaonidae). *The University of Kansas Science Bulletin* 49: 1–44.
- Ramírez W. 1974. Coevolution of *Ficus* and Agaonidae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61: 770–780.
- Rasplus J-Y, Rodriguez LJ, Sauné L, et al. 2020. Exploring systematic biases, rooting methods and morphological evidence to unravel the evolutionary history of the genus *Ficus* (Moraceae). *Cladistics* 37: 402–422.
- Souza CD, Pereira RAS, Marinho CR, Kjellberg F, Teixeira SP. 2015. Diversity of fig glands is associated with nursery mutualism in fig trees. *American Journal of Botany* 102: 1564–1577.
- Su Z-HH, Lino H, Nakamura K, Serrato A, Oyama K. 2008. Breakdown of the one-to-one rule in Mexican fig-wasp associations inferred by molecular phylogenetic analysis. *Symbiosis* 45: 73–81.
- Sun P, Chen X, Chantarasuwan B, Zhu X, Deng X, Bao Y, Yu H. 2022. Composition diversity and expression specificity of the TPS gene family among 24 *Ficus* species. *Diversity* 14(9): 721.
- Teixeira SP, Costa MFB, Basso-Alves JP, Kjellberg F, Pereira RAS. 2018. Morphological diversity and function of the stigma in *Ficus* species (Moraceae). *Acta Oecologica* 90: 117–131.

- Teixeira SP, Costa MFB, Basso-Alves JP, Kjellberg F, Pereira RAS. 2020. The synstigma turns the fig into a large flower. *Botanical Journal of the Linnean Society*: 1–13.
- Vanderplanck M, Lapeyre B, Lucas S, Proffit M. 2021. Ozone induces distress behaviors in fig wasps with a reduced chance of recovery. *Insects* 12: 1–9.
- Verkerke W. 1989. Structure and function of the fig. *Experientia* 45: 612–622.
- Verkerke W. 1986. Anatomy of *Ficus ottoniifolia* (Moraceae) syconia and its role in the fig-fig wasp symbiosis. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen. Series C: Biological and Medical Sciences* 89:443–469.
- Wang TN, Clifford MR, Martínez-Gómez J, et al. 2019. Scent matters: Differential contribution of scent to insect response in flowers with insect vs. wind pollination traits. *Annals of Botany* 123:289–301.
- Weiblen GD. 2002. How to be a fig wasp. *Annual Review of Entomology* 47: 299–330.
- Wiebes J. 1987. Coevolution as a test of the phylogenetic tree. *Systematics and Evolution: A Matter of Diversity* 309–314.
- Yu H, Nason JD, Zhang L, Zheng L, Wu W, Ge X. 2015. De novo transcriptome sequencing in *Ficus hirta* Vahl. (Moraceae) to investigate gene regulation involved in the biosynthesis of pollinator attracting volatiles. *Tree Genetics and Genomes* 11.
- Zhang T, Charlotte Jandér K, Huang J-F, et al. 2021. The evolution of parasitism from mutualism in wasps pollinating the fig, *Ficus microcarpa*, in Yunnan Province, China. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118(32): e2021148118.