



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
ECOLOGÍA

Biología reproductiva de la holoparásita *Mitrastemon matudae*
(Mitrastemonaceae)

TESIS

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

PRESENTA:

VERÓNICA DELGADO RAMÍREZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN MANDUJANO SÁNCHEZ
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM
DR. JOSÉ ALBERTO BÚRQUEZ MONTIJO
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS
ECOLOGÍA

Biología reproductiva de la holoparásita *Mitrastemon matudae*
(Mitrastemonaceae)

TESIS

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

PRESENTA:

VERÓNICA DELGADO RAMÍREZ

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN MANDUJANO SÁNCHEZ
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

DR. JOSÉ ALBERTO BÚRQUEZ MONTIJO
INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO, 2023

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
OFICIO FCIE/DAIP/294/2023
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 **06 de marzo de 2023** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Ecología** de la estudiante **DELGADO RAMÍREZ VERÓNICA** con número de cuenta **313024212** con la tesis titulada "**Biología reproductiva de la holoparásita *Mitrostemon matudae* (Mitrostemonaceae)**", realizada bajo la dirección de la **DRA. SONIA VÁZQUEZ SANTANA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**
Vocal: **DR. EDUARDO CUEVAS GARCÍA**
Vocal: **M. EN C. IRENE PISANTY BARUCH**
Vocal: **DRA. ELLEN ANDRESEN**
Secretario: **DRA. MARÍA DEL CARMEN MANDUJANO SÁNCHEZ**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 23 de mayo de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación que me ha dado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico que me otorgó durante mis estudios de maestría.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento a los proyectos IN-223118 "Biología reproductiva de plantas endoparásitas de las familias Apodanthaceae, Mitrastemonaceae y Cytinaceae en México" e IN-222021 "Morfoanatomía reproductiva y polinización de plantas holoparásitas en México".

A mi comité tutor, la Dra. María del Carmen Mandujano Sánchez y al Dr. José Alberto Búrquez Montijo, por todas las sugerencias y comentarios sobre mi trabajo.

A mi tutora principal, la Dra. Sonia Vázquez Santana, por todo el apoyo brindado.

Agradecimientos a título personal

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación brindada.

Al Laboratorio de Desarrollo en Plantas por brindarme el material y el equipo necesarios para que este trabajo se llevara a cabo.

A la Dra. Sonia Vázquez Santana por todo el apoyo académico y moral que me brindó.

Al Biól. Francisco Hernández Najarro por su apoyo en el trabajo de campo, por el material que nos envió y por la ayuda que nos brindó durante el confinamiento.

Al Mtro. Domitilo Saldaña Santos por su apoyo en el trabajo de campo.

A la Dra. Sandra Rios Carrasco y al M. en C. Pactli Fernando Ortega González por toda la ayuda en el trabajo de campo y por sus comentarios y sugerencias sobre mi trabajo.

Al M. en C. Pactli Fernando Ortega González por su asesoría y ayuda en los análisis estadísticos.

A la Dra. Morayna Francisca Gutiérrez Luna por su apoyo en la identificación de los compuestos orgánicos del néctar.

Al Dr. Aldebaran Camacho Velázquez quien siempre me brinda su apoyo en el laboratorio y me da ideas para obtener más resultados y mejorar mi trabajo.

Al Biól. Daniel Dorantes Villalobos que me apoyó con la identificación de las aves.

Al Biól. Alfredo Andrés Gutiérrez González quien me ayudó con la identificación de mamíferos.

*Me dedico esta tesis a mí misma como
recordatorio de que hay que reconocer lo
que sabemos y de que somos capaces
de hacer muchas cosas si nos
tenemos confianza*

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
OBJETIVOS	7
OBJETIVO GENERAL.....	7
OBJETIVOS PARTICULARES	7
ANTECEDENTES	7
PLANTAS PARÁSITAS.....	7
BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LAS ANGIOSPERMAS.....	9
<i>Polinización y sistemas de cruza.....</i>	<i>11</i>
BIOLOGÍA REPRODUCTIVA EN PLANTAS ENDOPARÁSITAS.....	16
<i>Familia Mitrastemonaceae</i>	<i>18</i>
<i>Mitrastemon yamamotoi</i>	<i>19</i>
<i>Mitrastemon matudae</i>	<i>21</i>
MATERIALES Y MÉTODOS	22
ESPECIE DE ESTUDIO.....	22
SITIO DE ESTUDIO	23
BIOLOGÍA FLORAL	24
SISTEMA DE CRUZA	26
RECOMPENSAS FLORALES.....	29
<i>Volumen y concentración de néctar.....</i>	<i>29</i>
<i>Compuestos orgánicos del néctar</i>	<i>29</i>
VISITANTES FLORALES E IDENTIFICACIÓN DE POLINIZADORES	30
RESULTADOS.....	32
BIOLOGÍA FLORAL	32
SISTEMA DE CRUZA	35
RECOMPENSAS FLORALES.....	37
<i>Volumen y concentración de néctar.....</i>	<i>37</i>
<i>Compuestos orgánicos del néctar</i>	<i>39</i>

VISITANTES FLORALES E IDENTIFICACIÓN DE POLINIZADORES	42
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO I. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS ESTADÍSTICAS PARA DETERMINAR EL SISTEMA DE CRUZA	65
PROMEDIO DE SEMILLAS POR FRUTO DE LOS TRATAMIENTOS DE POLINIZACIÓN	65
COMPARACIONES MÚLTIPLES DE TUKEY	65
ANEXO II. CROMATOGRAMAS DE LOS COMPUESTOS ORGÁNICOS DEL NÉCTAR	66
NÉCTAR DILUIDO + HEXANO	66
NÉCTAR PURO + HEXANO.....	69
MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPME)	72

Resumen

La familia Mitrastemonaceae (Ericales) comprende sólo un género, *Mitrastemon*, el cual contiene dos especies, *Mitrastemon matudae* y *M. yamamotoi* que tienen una distribución disyunta a ambos lados del Océano Pacífico. Estas especies parasitan las raíces de algunos miembros de la familia Fagaceae. Las plantas de *Mitrastemon* se pueden observar sólo durante su periodo reproductivo, es decir sus flores y frutos, ya que su cuerpo vegetativo está reducido a unas pocas células que se encuentran embebidas dentro de las raíces del hospedero. Las especies del género *Mitrastemon* se caracterizan por poseer un sistema floral particular, puesto que los estambres están fusionados en un capuchón en forma de mitra que cubre por completo al gineceo, lo que separa las funciones sexuales masculina y femenina. Existe muy poca información sobre esta familia de plantas y para *Mitrastemon matudae*, presente en México, no existen estudios sobre su biología reproductiva. El objetivo principal de este trabajo fue conocer algunos aspectos de la biología reproductiva de *M. matudae*. En particular, se pretendió (i) determinar la duración de la antesis, analizando la dehiscencia de las anteras y la receptividad del estigma, (ii) evaluar los sistemas de cruce, (iii) identificar las recompensas florales, (iv) describir los compuestos orgánicos del néctar y (v) registrar a los visitantes florales e identificar a los polinizadores potenciales. Para esto se realizaron observaciones y mediciones en campo sobre la biología floral, la producción de néctar y los visitantes florales. Para determinar el sistema de cruce se realizaron polinizaciones controladas en una ladera del cerro Tres Picos en Chiapas, México. Además, se hizo un análisis para identificar los compuestos orgánicos del néctar. Se encontró que las flores de *M. matudae* presentan dicogamia, particularmente protandria. Tienen un sistema de cruce mixto, pueden producir semillas por autopolinización y por polinización cruzada y no

producen semillas por apomixis. Por otra parte, invierten muchos recursos en la producción de un gran volumen de néctar con baja concentración de azúcares. Además de azúcares, el néctar contiene sustancias tóxicas y repelentes para artrópodos y otras sustancias antibacteriales y antifúngicas. Las flores de *M. matudae* atraen a una gran diversidad de visitantes como insectos, aves y mamíferos que consumen néctar. Los polinizadores potenciales son aves de las familias Passerellidae y Turdidae, ratones de la familia Cricetidae y el tlacuachín (*Tlacuatzin canescens*, Didelphidae), un marsupial endémico de México.

Citar como: Delgado-Ramírez, V. 2023. Biología reproductiva de la holoparásita *Mitrastemon matudae* (Mitrastemonaceae). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, CDMX. 74 pp.

Abstract

The family Mitrastemonaceae (Ericales) is composed by only one genus, *Mitrastemon*, which contains two species, *Mitrastemon matudae* and *M. yamamotoi* with a disjunct distribution at both sides of the Pacific Ocean. These species parasitize the roots of some members of the family Fagaceae. The plants of *Mitrastemon* can only be found during their reproductive stage, namely the flowers and fruits, given that their vegetative body is reduced to a few strands of cells that are embedded inside the host's roots. The species of the genus *Mitrastemon* are characterized by having a particular floral system, since the stamens connate into a mitre-shaped tube that covers the gynoecium completely, which separates the male and female functions. There is very little information about this plant family, and for *Mitrastemon matudae*, which is found in Mexico, there are no studies on its reproductive biology. The objective of this study was to investigate some aspects of the reproductive biology of *M. matudae*. We aimed to (i) determine the duration of the anthesis by analyzing anther dehiscence and stigma receptivity, (ii) evaluate the mating systems, (iii) identify the floral rewards, (iv) describe the organic compounds, and (v) register the floral visitors and identify the potential pollinators. To accomplish this, we made observations and measurements in the field regarding the floral biology, nectar production, and floral visitors. To determine the mating system, we performed a series of controlled pollination treatments at the Tres Picos hill in Chiapas, Mexico. We also analyzed the nectar to identify organic compounds. We found that *M. matudae* flowers have dichogamy, particularly protandry. These plants have a mixed mating system, they can produce seeds through self-pollination and cross-pollination, but they do not produce seeds through apomixis. Nevertheless, they invest a considerable amount of resources to produce large quantities of nectar with low

sugar concentration. In addition to sugars, nectar contains substances that are toxic and repellent for arthropods, and other antibacterial and antifungal substances. Flowers of *M. matudae* attract a great diversity of floral visitors like insects, birds and mammals that forage for nectar. The potential pollinators are birds of the families Passerellidae and Turdidae, mice of the family Cricetidae, and a species of opossum (*Tlacuatzin canescens*, Didelphidae) that is endemic to Mexico.

Cite as: Delgado-Ramírez, V. 2023. Biología reproductiva de la holoparásita *Mitrastemon matudae* (Mitrastemonaceae). [Master's thesis, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México]. Mexico City, Mexico. 74 pp.

Introducción

La reproducción es el proceso por el cual se producen nuevos individuos, por lo cual es esencial en la supervivencia y mantenimiento de las poblaciones. Los estudios de biología reproductiva en plantas tienen una gran utilidad puesto que nos permiten manejar y utilizar los recursos vegetales de manera efectiva (e.g. extracción sustentable, control de especies dañinas; Ramawat *et al.*, 2014). En comparación con otras plantas, es menos el conocimiento que se tiene sobre la biología reproductiva de las plantas parásitas. Generalmente, las plantas parásitas reducen el crecimiento y la adecuación de sus hospederos y varias especies afectan negativamente los cultivos agrícolas (Těšitel *et al.*, 2021). Sin embargo, existen muchas otras especies de plantas parásitas que no afectan especies de importancia agrícola o forestal. Asimismo, sus funciones ecosistémicas pueden ser muy complejas y no necesariamente perjudiciales (Těšitel *et al.*, 2021).

Un subtipo de plantas parásitas son las plantas endoparásitas, las cuales no tienen cuerpo vegetativo visible, pues se encuentra completamente embebido dentro de los tejidos del hospedero (llamado endófito). Las endoparásitas solamente son visibles en el periodo reproductivo, cuando las flores o inflorescencias emergen de los tallos o raíces (denominado exófito). Estas plantas no presentan actividad fotosintética, por lo que dependen completamente de los recursos que obtienen del hospedero (Nickrent y Musselman, 2004). El endoparasitismo se encuentra en las familias Mitrastemonaceae, Apodanthaceae, Cytinaceae, Rafflesiaceae y en algunas especies del orden Santalales (Nickrent, 2020; Teixeira-Costa y Davis, 2021).

La familia Mitrastemonaceae comprende sólo un género (*Mitrastemon*) de plantas endoparásitas de árboles de la familia Fagaceae (Matuda, 1947). El

género *Mitrastemon* comprende dos especies que se distribuyen en ambos lados del Océano Pacífico. *Mitrastemon yamamotoi* Makino, que se distribuye en Asia y *M. matudae* Yamam., que se encuentra en México, América Central y el norte de Sudamérica (Matuda, 1947; Meijer y Veldkamp, 1993). Existe poca información sobre la biología reproductiva del género *Mitrastemon*. Las flores de ambas especies del género *Mitrastemon* son dicógamas (Nickrent *et al.*, 2004), es decir que la liberación de polen y la receptividad del estigma se dan en diferentes tiempos, lo que previene la autopolinización (Lloyd y Webb, 1986). De acuerdo con Suetsugu (2018), las flores de *M. yamamotoi* son polinizadas principalmente por avispas sociales que visitan las flores durante el día y contribuyen al entrecruzamiento, mientras que eventuales visitantes florales nocturnos, como los saltamontes y cucarachas, facilitan la autogamia. Sin embargo, no hay estudios sobre la biología reproductiva de la otra especie, *M. matudae*. En las descripciones de *M. matudae*, Matuda (1947) describe que las flores son visitadas por insectos y aves que forrajean por néctar, pero no los identificó ni evaluó más información sobre su comportamiento.

Debido a la escasez de información sobre la biología reproductiva de *Mitrastemon matudae*, el principal propósito de este trabajo fue ayudar a llenar este vacío. Se realizaron observaciones en campo, se describió la biología floral, se realizaron tratamientos de polinización para determinar el sistema de cruce, se describió la producción de néctar, se registraron los visitantes florales y se identificaron los polinizadores. Este estudio nos puede dar información sobre el papel ecológico que tiene *Mitrastemon matudae* en los bosques de encino. Asimismo, si en el futuro se descubriera que esta planta parásita causa daños importantes a sus hospederos, la información recabada en este estudio sería de gran utilidad para controlar sus poblaciones y mitigar los daños.

Objetivos

Objetivo general

Conocer algunos aspectos de la biología reproductiva de *Mitrastemon matudae*.

Objetivos particulares

1. Describir la biología floral de *M. matudae*.
2. Evaluar los sistemas de cruce que presenta *M. matudae*.
3. Identificar las recompensas florales ofrecidas a los visitantes.
4. Describir los compuestos orgánicos del néctar.
5. Registrar los visitantes florales e identificar a los polinizadores de *M. matudae*.

Antecedentes

Plantas parásitas

Las plantas parásitas son aquellas que penetran los tejidos vivos de otra planta (su hospedera) para obtener algunos o todos los nutrientes que necesitan para sobrevivir. El parasitismo en plantas evolucionó varias veces, por lo que no son un grupo monofilético. Existen 4,750 especies de plantas parásitas que representan sólo el 1.6% de las angiospermas y se encuentran repartidas en 28 familias (Heide-Jørgensen, 2008; Nickrent, 2020). La característica distintiva de las plantas parásitas es el haustorio, una conexión estructural y fisiológica con el hospedero, a través de la cual obtienen los nutrientes y el agua (Heide-Jørgensen, 2008). El haustorio tiene una o dos partes: una zona de unión que ayuda a la sujeción externa, que no siempre está presente; y un órgano intrusivo que penetra y se conecta con el tejido vascular del hospedero (Heide-Jørgensen, 2008; Rubiales y Heide-Jørgensen, 2011).

Las plantas parásitas se distribuyen en todos los tipos de ambientes terrestres y en todos los continentes, excepto en la Antártida (Heide-Jørgensen, 2008, 2013; Nickrent, 2020; Těšitel, 2016). Son clasificadas en hemiparásitas y holoparásitas de acuerdo con su grado de dependencia del hospedero, o bien en parásitas de tallo y parásitas de raíz de acuerdo con el órgano al que se anclan (Heide-Jørgensen, 2008). La mayoría de las plantas parásitas son hemiparásitas (90%) y las parásitas de raíz son más comunes (60%) que las de tallo (Heide-Jørgensen, 2013). Las hemiparásitas son parásitas facultativas, pues tienen clorofila y hacen fotosíntesis. Pueden sobrevivir sin un hospedero durante cierto tiempo, pero les va mejor cuando obtienen agua con nutrientes disueltos del xilema del hospedero a través del haustorio. Por otro lado, las holoparásitas son parásitas obligadas puesto que carecen de clorofila y dependen por completo de los recursos que se encuentran en el xilema y floema del hospedero (Nickrent y Musselman, 2004). En las holoparásitas más especializadas, las endoparásitas, el órgano intrusivo comprende todo el tejido vegetativo de la planta parásita, ya que carecen de hojas, tallos y raíces. Las endoparásitas sólo pueden verse fuera del hospedero cuando se encuentran en periodo reproductivo, es decir, las flores e inflorescencias. El tejido que se encuentra dentro del hospedero se denomina endófito, mientras que el que se encuentra fuera del hospedero se denomina exófito (Heide-Jørgensen, 2008; Rubiales y Heide-Jørgensen, 2011).

La clasificación más reciente de las plantas parásitas toma en cuenta varias características, como la presencia de haustorios laterales o terminales, y si los órganos vegetativos (tallos y/o hojas) son aéreos o crecen dentro del hospedero. Además, la clasificación toma en cuenta aspectos del ciclo de vida de las plantas, como la presencia o ausencia de una fase de crecimiento independiente. De acuerdo con esta clasificación, existen cinco grupos funcionales de plantas

parásitas: parásitas eufitoides, muérdagos, enredaderas parásitas, parásitas obligadas de raíz y endoparásitas (Teixeira-Costa y Davis, 2021).

El parasitismo es una interacción biótica que genera beneficios para la planta parásita y perjudica de manera moderada a grave el crecimiento y reproducción del hospedero (Těšitel *et al.*, 2021). Varias especies de plantas parásitas atacan cultivos agrícolas o recursos forestales (Parker, 2013). Las especies que provocan más daños para la agricultura pertenecen a especies de los géneros *Cuscuta* (Convolvulaceae), *Striga*, *Orobanche* y *Phelipanche* (Orobanchaceae) (Rubiales *et al.*, 2009). Sin embargo, existen muchas otras especies de plantas parásitas que no causan daños a cultivos, y que, al contrario, pueden ser un componente esencial del ecosistema en el que se desarrollan (Watson, 2001; Těšitel *et al.*, 2021). Se ha demostrado que algunas especies de plantas parásitas alteran las interacciones de competencia en las comunidades y facilitan el ciclaje de nutrientes. Otras especies ofrecen recursos alimenticios para los animales, como néctar, polen, frutos y semillas (Watson, 2001; Press y Phoenix, 2005; Těšitel *et al.*, 2021).

Biología reproductiva de las angiospermas

La reproducción es el proceso biológico por el cual se generan nuevos individuos y es esencial en el ciclo de vida de los seres vivos. En las angiospermas, la flor es la unidad estructural y funcional para la reproducción (Cruz-Durán y Rosas-López, 2016). El concepto de sistemas reproductivos (*'reproductive systems'* en inglés) en plantas comprende todos los eventos y características relacionados con la producción de nuevos individuos e incluyen tanto la reproducción sexual como la asexual (Ramawat *et al.*, 2014; Shivanna, 2014; Cardoso *et al.*, 2018). La reproducción asexual comprende los sistemas apomícticos, en donde las plantas

pueden producir semillas sin que haya fusión de gametos. Por otro lado, la reproducción sexual incluye los mecanismos que las plantas utilizan para la fusión de gametos. Estos mecanismos comprenden los sistemas sexuales, los sistemas florales, los sistemas de incompatibilidad y los sistemas de cruza.

Los sistemas sexuales de las plantas (*'sexual systems'* en inglés) incluyen la expresión funcional de los verticilos sexuales en diferentes niveles de organización (intrafloral, individual, poblacional y hasta nivel de especie) (Cardoso *et al.*, 2018). La mayoría de las angiospermas presentan un sistema sexual hermafrodita, es decir que los dos verticilos sexuales (gineceo y androceo) se encuentran en una sola flor (Barrett, 2002). Esto puede traer desventajas, como la interferencia física entre las funciones sexuales, la saturación del estigma con polen propio y el descuento de polen o semillas. El descuento de polen o semillas (*'pollen discounting'* en inglés) se refiere a la disminución del número de granos de polen u óvulos disponibles para entrecruzarse, debido a que fueron utilizados para la autopolinización (Barrett, 2002; Cardoso *et al.*, 2018). Una estrategia que ayuda a evitar la interferencia sexual es que las funciones sexuales se encuentren en flores separadas del mismo individuo (monoicismo) o en individuos diferentes (dioicismo) (Abarca-García y López-Villalobos, 2007).

Otra estrategia para evitar la interferencia sexual en flores hermafroditas son los sistemas florales, que son características que optimizan el éxito reproductivo a través de mecanismos que promueven la polinización cruzada (Cardoso *et al.*, 2018). Dos sistemas florales que evitan la interferencia sexual son la separación espacial (hercogamia) y la separación temporal (dicogamia) de los verticilos sexuales. La dicogamia se puede clasificar en dos tipos: (i) protoginia, cuando la función femenina se presenta antes que la masculina, y protandria, cuando la

función masculina es previa a la femenina (Lloyd y Webb, 1986; Webb y Lloyd, 1986).

Aunque la hercogamia y la dicogamia favorecen la entrecruza, no impiden por completo la autofecundación. Si la autofecundación ocurre constantemente, a largo plazo puede provocar depresión por endogamia, que se expresa como la reducción en la viabilidad y/o fertilidad de la progenie endogámica en comparación con la progenie exogámica. La depresión por endogamia ocurre principalmente por la expresión de alelos deletéreos recesivos en genotipos homocigos (Charlesworth y Charlesworth, 1987; Barrett, 2014; Cardoso *et al.*, 2018). Las plantas con flores desarrollaron otro mecanismo genético-bioquímico que previene la autofecundación. Este mecanismo se conoce como sistema de autoincompatibilidad sexual (*'self-incompatibility system'* en inglés), haciendo referencia a la incapacidad de una planta hermafrodita fértil de formar cigotos por medio de la autopolinización. La autoincompatibilidad ocurre mediante reacciones bioquímicas que interrumpen la germinación del polen, el crecimiento del tubo polínico, la fecundación o la embriogénesis (De Nettancourt, 1977; Rea y Nasrallah, 2008; Jiménez-Durán y Cruz-García, 2011; Goring *et al.*, 2022).

Polinización y sistemas de cruza

El sistema sexual, los sistemas florales y los sistemas de autoincompatibilidad influyen directamente en el flujo de polen y por lo tanto en la polinización y en el sistema de cruza (*'mating system'* en inglés). La polinización es la transferencia de polen de las anteras a un estigma receptivo de la misma especie (Shivanna, 2014), mientras que el sistema de cruza es la manera en la que los genes se transmiten de una generación a otra a través de la reproducción sexual. En plantas

hermafroditas el sistema de cruce se basa en la frecuencia relativa de autofecundación y fecundación cruzada (Barrett, 2014).

De acuerdo con el origen del polen existen tres tipos de polinización: la autogamia, la geitonogamia y la xenogamia. La autogamia es la transferencia de polen al estigma de la misma flor. La geitonogamia es la deposición de granos de polen en el estigma de una flor diferente, pero del mismo individuo o de otro individuo con el mismo genotipo (clon). Existe otro sub-tipo de autogamia que se denomina cleistogamia, en donde la autofecundación es obligada, ya que las flores no entran en anthesis. Estos tipos de cruce permiten a las plantas asegurar su reproducción cuando los polinizadores son escasos o ineficientes. Sin embargo, la variabilidad genética se ve reducida e incrementa la depresión por endogamia (Lloyd y Schoen, 1992; Orozco-Arroyo y Vázquez-Santana, 2016). Por otra parte, la xenogamia es la transferencia de polen al estigma de flores de diferentes individuos. En este tipo de cruce hay un incremento en la diversidad genética, puesto que genera nuevas combinaciones de alelos, lo que les permite a las plantas adaptarse a nuevas condiciones ambientales (Charlesworth, 2006; Orozco-Arroyo y Vázquez-Santana, 2016). Los tres tipos de polinización pueden ocurrir en plantas con flores hermafroditas; en especies monoicas ocurre geitonogamia y xenogamia y en especies dioicas solamente puede ocurrir xenogamia. Los sistemas florales de hercogamia y dicogamia previenen la autogamia, pero no la geitonogamia. Por último, la presencia de un sistema de incompatibilidad permite solamente la xenogamia (Shivanna, 2014).

Cruden (1977) argumenta que las diferentes características florales permiten predecir el sistema de cruce. Él propone dos métodos para determinar el sistema de cruce. En el primero, las características que se evalúan son el diámetro de la

corola, y la presencia de dicogamia y hercogamia. Cada caracter tiene un valor (Tabla 1A), se suma el puntaje y se obtiene un índice de entrecruzamiento (OCI, por sus siglas en inglés) que corresponde a un sistema de cruza (Tabla 1B). El segundo método para determinar el sistema de cruza toma en cuenta la relación entre los granos de polen y óvulos que hay en una flor, lo que se denomina proporción o cociente polen/óvulo (P/O). La proporción P/O se obtiene al dividir el número de granos de polen presentes en una flor entre el número total de óvulos de la misma. Dependiendo del valor obtenido se le asigna el sistema de cruza (Tabla 1B).

Tabla 1. Métodos que propuso Cruden (1977) para predecir el sistema de cruza con base en características florales y en la proporción de gametos masculinos y femeninos en una flor. A. Predicción del sistema de cruza por medio de puntajes asignados a características florales para determinar el índice de entrecruzamiento (OCI). Cada característica tiene un valor asignado y la suma corresponde al valor del OCI, que equivale a un sistema de cruza. B. Predicción del sistema de cruza por medio de la proporción polen/óvulo (P/O); cada rango de valores de P/O equivale a un sistema de cruza.

A)

Diámetro de la corola (mm)	Valor	Dicogamia	Valor	Hercogamia	Valor
< 1	0	Homogamia	0	Ausente	0
1-2	1	Protoginia	0	Presente	1
2-6	2	Protandria	1		
> 6	3				

B)

Proporción P/O	OCI	Sistema de cruza
2.7 - 5.4	0	Cleistogamia
18.1 - 39.0	1	Autogamia obligada
31.9 - 396.0	2	Autogamia facultativa
244.7 - 2588.0	3	Xenogamia facultativa
2108.0 - 195,525.0	4	Xenogamia obligada

Debido a que las plantas son sésiles, estas no pueden transportar sus gametos a otras flores por sí solas y requieren de un vector que realice la polinización cruzada. Algunas plantas son polinizadas por vectores abióticos, como el agua o el aire, pero en la mayoría de las angiospermas (85%) la polinización es biótica, es decir, se da por medio de animales (Ollerton *et al.*, 2011). La polinización biótica es más eficiente debido a que, en general, los animales buscan flores y transportan el polen a mayores distancias. Además, en el caso de la polinización biótica, las plantas destinan menos recursos a la producción de polen, ya que el desperdicio es mucho menor que en la polinización abiótica (Shivanna, 2014; Domínguez y Pérez-Ishiwara, 2016). Entre los animales, los insectos son los principales polinizadores, en particular los órdenes Hymenoptera (abejas, avispas y hormigas), Lepidoptera (mariposas y polillas), Coleoptera (escarabajos) y Diptera (moscas) (Shivanna y Tandon, 2014; Domínguez y Pérez-Ishiwara, 2016). Las aves y los murciélagos también son polinizadores importantes (Armbruster, 2012; Fleming *et al.*, 2009). Por último, se han reportado otros polinizadores menos frecuentes, como cucarachas (*Ulvaria elmeri*; Nagamitsu y Inoue, 1997), ratones, musarañas (*Cytinus visseri*; Johnson *et al.*, 2011), ardillas (*Butea monosperma*; Tandon *et al.*, 2003) y lagartijas (*Melocactus ernestii*; Gomes *et al.*, 2014).

Para la polinización biótica se requiere que las plantas atraigan a los animales adecuados y que puedan mantener sus visitas de manera constante. Por ello, las plantas invierten en atrayentes y recompensas florales. Los atrayentes florales anuncian la presencia de recompensas florales, lo que motiva a los animales a visitar las flores frecuentemente. Las flores o partes de estas actúan como anuncios a través de señales visuales y olfativas (Dafni, 1992; Domínguez y Pérez-Ishiwara, 2016). Las señales visuales involucran el tamaño, el color y la forma de

las flores. Por otra parte, las señales olfativas se encuentran en forma de compuestos volátiles aromáticos que en su mayor parte son emitidos por los pétalos o por todo el perianto; otros órganos, como los estambres, también pueden contribuir al aroma floral. Las señales olfativas actúan como atrayentes a largas distancias y cuando los polinizadores se acercan, las señales visuales y los aromas los guían hacia la recompensa (Dafni, 1992; Shivanna, 2014).

Las recompensas que las flores ofrecen pueden ser alimenticias (e.g., polen, néctar, algunos aceites) y no alimenticias (e.g., algunos aceites, resinas, fragancias, sitios de calor y cría; Armbruster, 2012; Shivanna, 2014). La mayoría de las angiospermas ofrecen polen y/o néctar como recompensa. El polen es muy nutritivo, pues contiene almidón, lípidos, proteínas, vitaminas, minerales y aminoácidos. Sin embargo, el polen es muy valioso para las plantas que lo producen, pues contiene a los gametos masculinos que, si son consumidos, representan genes que no serán transmitidos a la siguiente generación (Armbruster, 2012). Es por esto que muchas plantas producen néctar, que es una solución acuosa compuesta principalmente de azúcares (sucrosa, glucosa y fructosa) con concentraciones desde 7 hasta 70 °Bx (grados Brix). El néctar también puede contener aminoácidos y proteínas de bajo peso molecular (Pacini y Nicolson, 2007). Incluso se ha encontrado que el néctar puede tener compuestos aromáticos que contribuyen al aroma floral y a la atracción de polinizadores (Raguso, 2004). Asimismo, el néctar contiene enzimas y antioxidantes que ayudan a mantener su homeostasis (Carter y Thornburg, 2004). Otros compuestos como los alcaloides y los fenoles pueden afectar el sabor del néctar y disuadir a cierto tipo de animales de visitar las flores (Baker, 1977; González-Teuber y Heil, 2009).

Biología reproductiva en plantas endoparásitas

El endoparasitismo en las plantas (*sensu* Teixeira-Costa y Davis, 2021) es característico de las familias Apodanthaceae, Cytinaceae, Mitrastemonaceae, Rafflesiaceae y algunas especies del orden Santalales. De acuerdo con Teixeira-Costa y Davis (2021), las características del ciclo de vida que definen a este grupo de plantas parásitas son (i) la ausencia de crecimiento autónomo ocasionada por la pérdida del epicótilo, (ii) el cuerpo vegetativo reducido al endófito y (iii) un exófito constituido únicamente de estructuras reproductivas. Estas plantas dependen de los fotosintatos, los nutrientes y el agua que obtienen del hospedero desde etapas muy tempranas de su desarrollo. El cuerpo vegetativo de estas plantas, llamado endófito, está reducido a filamentos celulares que se encuentran embebidos por completo en el hospedero, por lo que generalmente sólo pueden detectarse cuando están en etapa reproductiva (flores y frutos; exófito) (Teixeira-Costa y Davis, 2021).

Las flores de las plantas endoparásitas pueden encontrarse en inflorescencias como en Cytinaceae (Alvarado-Cárdenas, 2009; Rios-Carrasco y Vázquez-Santana, 2021; Rios-Carrasco, 2022; Rios-Carrasco *et al.*, 2022). Otras especies tienen flores solitarias, como en Apodanthaceae (Bellot y Renner, 2013; Blarer *et al.*, 2004), Mitrastemonaceae (Matuda, 1947; Meijer y Veldkamp, 1993) y Rafflesiaceae (Meijer, 1997). Las flores pueden ser bisexuales, es decir que tienen los verticilos sexuales masculino y femenino en la misma flor, como ocurre en *Pilostyles maya* (Apodanthaceae; Ortega-González *et al.*, 2020) y los miembros de la familia Mitrastemonaceae (Matuda, 1947; Meijer y Veldkamp, 1993) o pueden ser unisexuales. En este último caso, las flores masculinas y femeninas pueden estar en un mismo individuo (sistema sexual monoico) o en individuos diferentes

(sistema sexual dioico). Estos sistemas con flores unisexuales han sido reportados en Apodanthaceae (Blarer *et al.*, 2004; Bellot y Renner, 2013; González y Pabón-Mora, 2014; Ortega-González *et al.*, 2022), Cytinaceae (Watanabe, 1936b; Nickrent, 2007) y Rafflesiaceae (Bänziger, 1991; Meijer, 1997; Bänziger y Hansen, 2000). Además, en algunas endoparásitas se han encontrado sistemas sexuales más complejos. Por ejemplo, *Bdallophytum caesarea* (sinonimia de *Sanguisuga caesarea*, Cytinaceae) tiene un sistema andromonocio, con flores hermafroditas y flores unisexuales masculinas en el mismo individuo (Fernández-Alonso y Cuadros-Villalobos, 2012), mientras que *B. oxylepis* tiene un sistema ginomonoico, es decir que tiene flores hermafroditas y flores unisexuales femeninas en el mismo individuo (Rios-Carrasco *et al.*, 2022).

Las plantas endoparásitas que son hermafroditas pueden autopolinizarse, ya que tienen los dos verticilos sexuales en la misma flor. Sin embargo, debido a las desventajas que presenta la endogamia, estas plantas poseen sistemas florales que evitan la autopolinización, como la dicogamia en sus dos variantes. Por ejemplo, la protandria se ha observado en *Mitrastemon matudae* y *M. yamamotoi* (Meijer y Veldkamp, 1993; Suetsugu, 2018) y la protoginia en *Cytinus hypocystis* (Cytinaceae; De Vega *et al.*, 2009).

Las plantas endoparásitas que poseen sistemas florales que evitan la autopolinización, así como las que no tienen sistemas sexuales hermafroditas necesitan de vectores que transporten el polen de las anteras al estigma de otras flores. Las flores de las plantas endoparásitas son visitadas por diversos grupos de animales, incluyendo insectos (Croat, 1978; Bänziger y Pape 2004; Bellot y Renner, 2013), aves (Matuda, 1947; Hobbhahn y Johnson, 2015) y mamíferos no voladores (Johnson *et al.*, 2011; Hobbhahn y Johnson, 2015). Sin embargo, hay pocos estudios que comprueban que estos visitantes llevan a cabo la polinización,

puesto que muchos de los visitantes florales reportados se registraron al hacer las descripciones de las especies sin tomar en cuenta si transfieren el polen de las anteras al estigma. No obstante, algunas de las polinizadoras comprobadas son las abejas sin aguijón (*Trigona fulviventris*, Meliponini) que polinizan las flores de *Bdallophytum oxylepis*. Esta endoparásita tiene inflorescencias rojas, aroma fétido y ofrece polen como recompensa (Rios-Carrasco *et al.*, 2021). También se han reportado hormigas que polinizan las flores de *Cytinus hypocistis* que emiten un aroma dulce y ofrecen néctar como recompensa (De Vega *et al.*, 2014). Asimismo, se han identificado roedores y musarañas que polinizan las inflorescencias de la endoparásita de raíces *Cytinus visseri*, cuyas flores producen una gran cantidad de néctar diluido (Johnson *et al.*, 2011). *C. sanguineus* también es visitada por roedores, pero los polinizadores efectivos son aves que son atraídas por el color rojo de las flores y que consumen el néctar diluido (Hobbhahn y Johnson, 2015). Por último, existen interacciones más especializadas en la familia Rafflesiaceae. En general, en esta familia las flores son endotérmicas y emiten aromas fétidos que atraen a moscas carroñeras. Las moscas son atraídas porque el olor y la textura de las flores simula carne en descomposición, donde las moscas usualmente ovipositan. En estas plantas la polinización es por engaño, puesto que las flores no ofrecen ninguna recompensa (Beaman *et al.*, 1988; Bänziger, 1991; Bänziger, 1996; Bänziger y Hansen, 2000; Patiño, 2000).

Familia Mitrastemonaceae

La familia Mitrastemonaceae Makino (Ericales) está compuesta por plantas holoparásitas que son endoparásitas de raíz. Los hospederos comprenden varias especies de árboles de la familia Fagaceae. Esta familia endoparásita está conformada por un solo género, *Mitrastemon* Makino, el cual posee dos especies que se distribuyen en ambos lados del Océano Pacífico. *Mitrastemon yamamotoi*

Makino se distribuye en Asia y *M. matudae* Yamam. se encuentra en México, América Central y el norte de Sudamérica (Matuda, 1947; Idárraga-Piedrahita, 2011; Mir *et al.*, 2016; Amoroso *et al.*, 2018).

Las flores de ambas especies de *Mitrastemon* son duras, tienen textura cerácea y son de color blanco-rosado en *M. yamamotoi* y blanco-crema en *M. matudae*. Además, son hermafroditas y dicógamas (protándricas). El perigonio es tetrámero y está connado en un verticilo tubular truncado. El tallo del eje floral está cubierto por varios pares de brácteas y su longitud depende de la profundidad a la que se encuentre la raíz del hospedero (Matuda, 1947; Nickrent *et al.*, 2004). Los estambres están connados en un sinandrio o tubo estaminal que forma un capuchón mitriforme que cubre al gineceo. La zona apical del sinandrio es estéril y tiene una apertura pequeña. Más abajo, por la parte externa, se encuentra una serie de anillos con alrededor de diez sacos polínicos cada uno. El anillo del perigonio sujeta por la base al sinandrio, el cual se desprende desde la base de los filamentos de manera circuncísil y es empujado hacia arriba conforme el gineceo crece. La flor es hipógina, con ovario súpero, el estigma es grueso y redondeado, el ovario es unilocular y tiene placentación parietal. Los óvulos son anátropos, numerosos y pequeños (miden alrededor de 190 por 120 μm). El estigma se encuentra cubierto por el sinandrio, que por la parte interna es estéril, lo que en teoría evita la autopolinización (Meijer y Veldkamp, 1993; Nickrent *et al.*, 2004). Asimismo, se ha reportado que las flores emiten aromas y producen néctar que atraen a aves e insectos (Matuda, 1947).

Mitrastemon yamamotoi

Mitrastemon yamamotoi se distribuye en los bosques tropicales y subtropicales de Borneo, Sumatra, Indochina, Japón (Matuda, 1947; Meijer y Veldkamp, 1993)

y Meghalaya (Mir *et al.*, 2016). Sus hospederos pertenecen a varios géneros de la familia Fagaceae (*Castanopsis*, *Lithocarpus*, *Quercus* y *Trigonobalanus*) (Matuda, 1947). Florece desde finales del otoño hasta principios del invierno, en la temporada seca, y completa su ciclo de vida entre noviembre y abril (Mir *et al.*, 2016; Suetsugu, 2018). En las primeras descripciones que se hicieron de esta planta, se reportó que sus flores son visitadas por aves como *Zosterops japonicus*, *Melidectes torquatus*, *M. belfordi*, *Melisteles megarhynchus* y *Oedistoma iliolophus* e insectos como *Vespa magnifica* y *Drosophila* sp., que forrajean el néctar diluido. Sin embargo, no se comprobó que fueran polinizadores efectivos (Beehler, 1994; Matuda, 1947).

Por otra parte, Suetsugu (2018) estudió una población de *M. yamamotoi* en el sur de Japón. La formación de frutos (*fruit set*) fue alta en los tratamientos de polinización cruzada y autopolinización artificial, por lo que es posible que no tengan un sistema de autoincompatibilidad. A pesar de que los verticilos sexuales están separados estructuralmente, se encontró que se formaron frutos y semillas por medio de autopolinización natural (sin manipulación), aunque fue menor que en los tratamientos de polinización cruzada y autopolinización artificial. El autor propuso que esto puede deberse a intrusión de hormigas en las flores embolsadas, o bien que estos frutos y semillas se formaron por apomixis (Suetsugu, 2018). En dicha población, las avispas sociales (Vespidae) fueron visitantes diurnos frecuentes y los polinizadores más efectivos. No se observó que las avispas colectaran activamente el polen, pero este se quedaba adherido a sus patas, abdomen, cabeza y partes bucales mientras forrajeaban el néctar. Además, se observó que visitaron secuencialmente varias flores durante el forrajeo, contribuyendo así a la polinización cruzada. También se observaron aves en el sitio de estudio, pero rara vez visitaron los parches florales y nunca forrajearon

néctar. Los visitantes nocturnos como grillos (Orthoptera), cucarachas (Blattodea) y escarabajos (Coleoptera) fueron menos frecuentes, pero también forrajearon néctar. Estos insectos visitaron varias flores de manera secuencial, pero debido a sus capacidades limitadas de vuelo, no se desplazaron mucho entre parches, por lo que contribuyeron principalmente a la geitonogamia (Suetsugu, 2018).

Mitrastemon matudae

Mitrastemon matudae se distribuye en México, Guatemala (Matuda, 1947; Steyermark, 1950) y Colombia (Idárraga-Piedrahita, 2011) y se ha reportado como endoparásita de raíces de dos especies de encinos (Fagaceae), *Quercus lancifolia*, reportado por Matuda (1947) y *Q. skinneri*, observado en el sitio de estudio del presente trabajo. *M. matudae* florece en la temporada seca, entre febrero y abril. Las flores son de color blanco-crema y son visitadas por insectos y aves, pero no se ha determinado si son polinizadores efectivos (Matuda, 1947; Meijer y Veldkamp, 1993; Teixeira-Costa y Suetsugu, 2022). *M. matudae* tiene características florales y reproductivas muy particulares que sólo han sido reportadas en la familia Mitrastemonaceae. Además, es una especie rara con distribución muy limitada y sólo puede ser localizada en ciertas épocas del año. No hay información sobre su biología reproductiva, por lo que en este trabajo nos centramos en ello y describimos varios aspectos sobre la biología reproductiva de *Mitrastemon matudae* en una población encontrada en el cerro Tres Picos, Chiapas.

Materiales y métodos

Especie de estudio

Mitrastemon matudae es una planta endoparásita de raíz. En México, *M. matudae* se ha encontrado en tres localidades de Chiapas, dos dentro de la Reserva de la Biósfera "La Sepultura" y una en la Reserva de la Biósfera "El Triunfo". Sólo se le encuentra entre febrero y abril, durante su periodo reproductivo, ya que el resto del año su cuerpo vegetativo se encuentra dentro de las raíces de nueva formación del hospedero (*Q. skinneri*), lo que dificulta su estudio (Matuda, 1947; Meijer y Veldkamp, 1993).

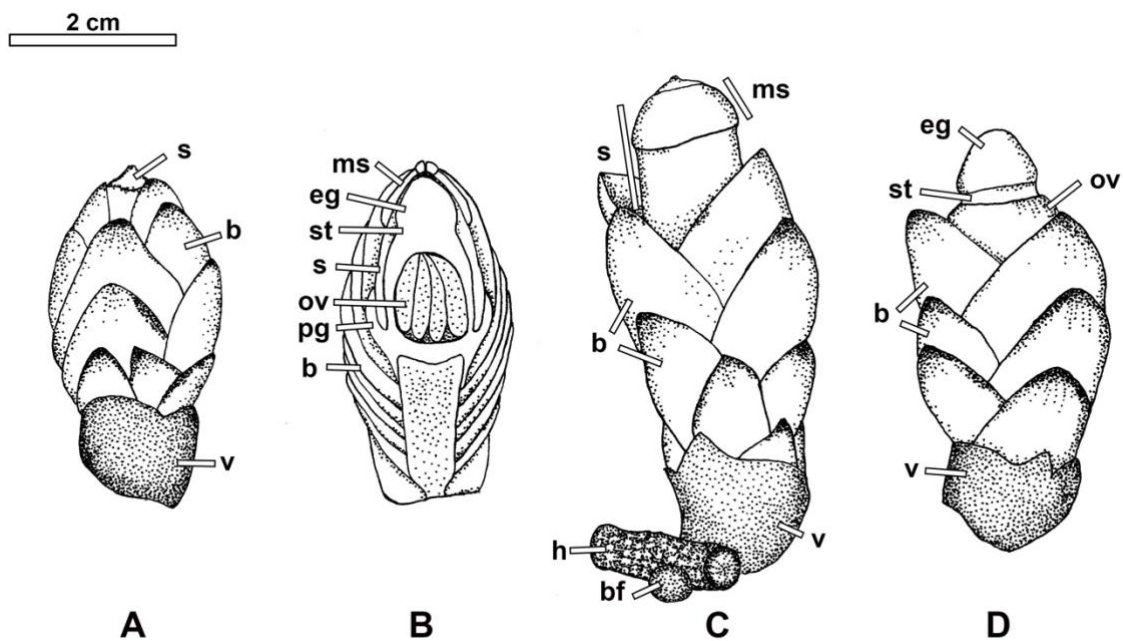


Figura 1. Esquema de *Mitrastemon matudae* en las diferentes etapas florales. A. Botón floral. B. Corte longitudinal de un botón floral. C. Fase masculina con sinandrio evidente. D. Fase femenina, se ha caído el sinandrio dejando expuesto el estigma. b, bráctea; bf, botón floral; eg, estigma; h, raíz del hospedero; ms, microsporangios; ov, ovario; pg, perigonio; s, sinandrio; st, estilo; v, volva. Elaborado por Verónica Delgado Ramírez.

Las flores de *M. matudae* (Fig. 1) son rígidas y su textura es cerosa; son hermafroditas y miden de 3 a 3.5 cm de ancho por 4 a 12 cm de alto, dependiendo de la profundidad a la que estén las raíces del hospedero. Cuando los botones florales emergen del hospedero están cubiertos por una estructura denominada volva, compuesta por tejido cortical del hospedero. La volva es de color café oscuro y se rompe cuando los botones maduran. Las flores tienen de 6 a 7 pares de brácteas; el tubo estaminal mide de 2 a 2.8 cm de largo y el anillo donde se fusionan las anteras mide de 6 a 12 mm de diámetro (Matuda, 1947; Meijer y Veldkamp, 1993). Las flores son dicógamas (protándricas): la antesis comienza con la fase masculina, el capuchón mitriforme cubre al estigma por completo y conforme el gineceo se desarrolla va empujando al capuchón hasta que se cae y da lugar a la fase femenina (Nickrent *et al.*, 2004).

Sitio de estudio

La población estudiada se localiza en una ladera del Cerro Tres Picos, el cual se encuentra en el municipio de Villaflores, Chiapas. El área en la que se hicieron las observaciones mide alrededor de 0.216 ha y se encuentra a una distancia aproximada de 4 km de la cima del cerro. Este territorio pertenece a la Reserva de la Biósfera "La Sepultura" y se encuentra en la región fisiográfica de la Sierra Madre de Chiapas a 1458 msnm (Fig. 2).

El sitio es un bosque de encino, donde predomina *Quercus skinneri*, aunque en esta zona también se pueden encontrar plantas epífitas como bromelias (Bromeliaceae), orquídeas (Orchidaceae) y helechos (Pteridophyta) (Breedlove, 1978; Wolf y Flamenco, 2003). El clima es semicálido húmedo con abundantes lluvias en verano (A(C)m(w)), la temperatura media anual ronda entre 20 y 22 °C y la precipitación total anual está entre 2,000 y 2,500 mm (Ruiz-López, 2010).

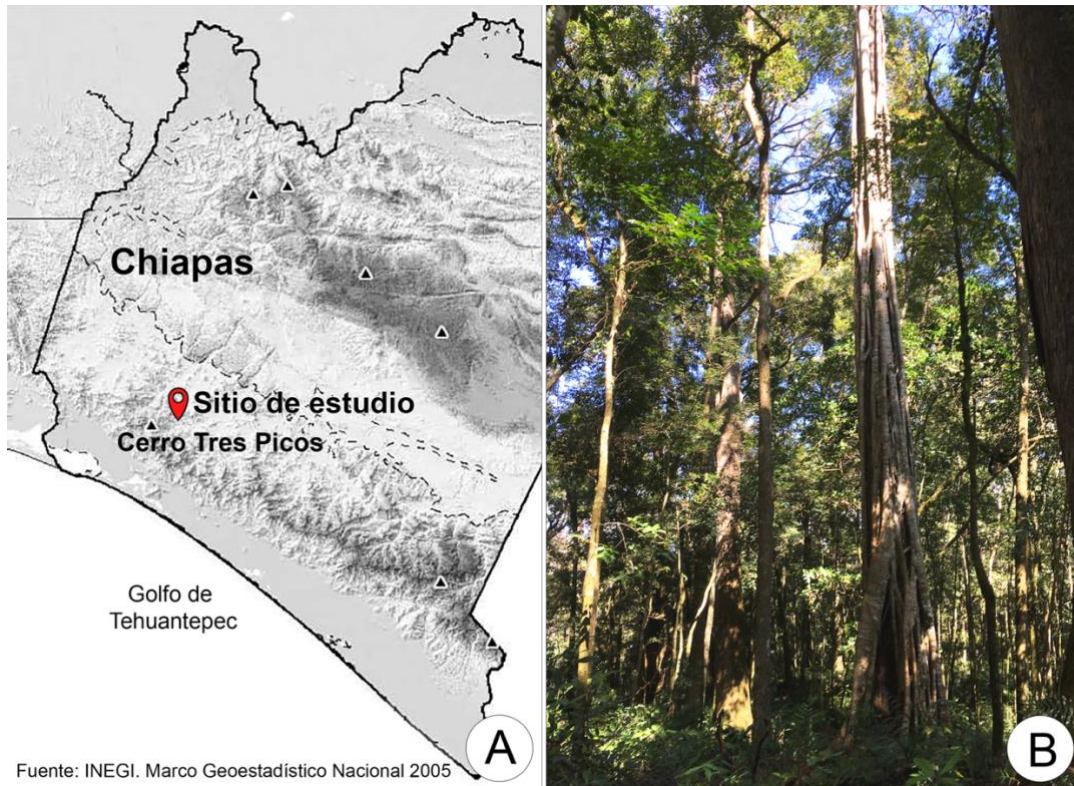


Figura 2. Sitio de estudio Tres Picos, en el municipio de Villaflores, Chiapas, México. A. Localización del sitio de estudio (INEGI, 2005). B. Vegetación donde crece *M. matudae*.

Biología floral

En febrero de 2019 se montaron 14 cuadros de 1 m², cada uno sobre las raíces de nueva formación de un hospedero; no se encontraron plantas de *M. matudae* creciendo sobre los contrafuertes o raíces grandes. Se colocó cada cuadro en zonas con una alta densidad de flores (exófitos) de *M. matudae*. Se consideró a una flor como un individuo; sin embargo, se desconoce si cada exófito (eje con una flor solitaria) corresponde a un individuo o si varios exófitos se encuentran unidos en el interior del hospedero. Se hizo el conteo del número total de flores, de flores en fase masculina, de flores en fase femenina y de botones florales. Debido a las condiciones climatológicas no se pudo realizar el segundo conteo de flores al día siguiente, sino hasta dos días después, cuando se contaron las

flores en diferentes fases en siete de los cuadros para observar los cambios en la proporción de flores en fase masculina, femenina y botones florales. El conteo se hizo sólo en siete de los cuadros debido al poco tiempo con que se contaba para hacer las observaciones, los cuadros faltantes estaban más alejados del sitio donde se hicieron las observaciones de visitantes florales. También se registraron los cambios morfológicos de las flores y se realizaron mediciones en campo de la apertura floral (cada hora por 7 horas por 2 días; $n = 15$ flores) con un vernier digital Mitutoyo Absolute Digimatic; también de la receptividad del estigma con peróxido de hidrógeno (H_2O_2 ; $n = 26$ flores), y de la viabilidad del polen con reactivo de Alexander ($n = 4$ flores) (Dafni, 1992; Márquez-Guzmán *et al.*, 2016). También se colectaron flores y botones cercanos a la antesis; varios se disectaron longitudinalmente y se fijaron en FAA (formaldehído, ácido acético, etanol y agua). Después, las flores y los botones se deshidrataron en una serie de soluciones de etanol en concentraciones graduales (30%, 50% y 70%) para realizar un conteo de óvulos y granos de polen (Márquez-Guzmán *et al.*, 2016).

Para el conteo de óvulos se disectó la flor longitudinalmente, se extrajeron todos los óvulos del ovario, se colocaron en un tubo Falcon y este se aforó con 10 mL de etanol al 70%, se agitaron para una mejor distribución de los óvulos en el líquido que los contenía. Se obtuvo una muestra de 1 mL y se contaron todos los óvulos con ayuda de un microscopio estereoscópico. En total fueron dos muestras de 1 mL por cada tubo ($n = 6$ tubos), se obtuvo el promedio de óvulos en cada tubo y se multiplicó el promedio por 10 para obtener el total de óvulos por flor.

Para el conteo de granos de polen se seleccionaron sinandrios que aún no eran dehiscentes y se disectaron para dejar solo el anillo de microsporangios.

Posteriormente, el anillo de microsporangios se seccionó en ocho pedazos iguales, se tomó un pedazo por flor y se trituró dentro de un tubo Eppendorf con 100 μ L de agua con detergente para extraer los granos de polen. Se contó el número total de granos de polen en cada tubo dos veces, se obtuvo el promedio y se multiplicó por ocho (el número total de pedazos) para obtener el número total de granos de polen por flor ($n = 4$ flores). Finalmente, se calculó la proporción polen/óvulo (P/O) dividiendo el número total de granos de polen por flor entre el número total de óvulos (Cruden, 1977).

Sistema de cruce

Para determinar el sistema de cruce se realizaron polinizaciones controladas en cinco tratamientos (Dafni, 1992; Fig. 3). El número de repeticiones realizadas por tratamiento se muestra entre paréntesis (cada flor polinizada se contó como una repetición).

1. **Testigo** ($n = 9$). Se recolectaron frutos producidos por polinización abierta (sin manipulación).
2. **Entrecruza manual** ($n = 25$). Se removió el sinandrio a las flores en etapa masculina, se depositó polen de diferentes individuos en el estigma receptivo y se cubrieron con una bolsa de organza. Para asegurar que fueran diferentes individuos, se entrecruzaron plantas que tuvieran por lo menos cinco metros de separación.
3. **Autocruza manual** ($n = 20$). Se cubrieron flores en fase masculina, se esperó a que el sinandrio se cayera naturalmente para depositar polen sobre el estigma receptivo de esta misma flor y se volvieron a cubrir inmediatamente.

4. **Autocruza natural** ($n = 33$). Se cubrieron flores en fase masculina sin polinizarlas manualmente.
5. **Apomixis** ($n = 16$). Se retiró el sinandrio a flores jóvenes (emasculación), en fase masculina y se cubrieron inmediatamente sin ser polinizadas.

Cabe mencionar que se perdieron muchas de las repeticiones de cada tratamiento, ya que varias de las bolsas fueron removidas por animales que visitan constantemente las flores, como roedores, ardillas, zarigüeyas, etc., posiblemente para su consumo. Las repeticiones también fueron afectadas por las actividades de los pobladores. Además, debido a las condiciones de pandemia, a conflictos internos entre los pobladores de la zona y a que *M. matudae* sólo florece una vez al año, no se pudieron volver a hacer las repeticiones de los tratamientos en los años siguientes. Por lo tanto, el número de repeticiones que quedaron al final fueron los siguientes: Testigo: $n = 9$; Entrecruza manual: $n = 9$; Autocruza manual: $n = 4$; Autocruza natural: $n = 4$ y Apomixis: $n = 2$.

Para cada flor en cada tratamiento se realizó el conteo de semillas por fruto. Debido a que los conteos son unidades discretas y por lo tanto no tienen una distribución normal, se construyó un modelo lineal generalizado con distribución Poisson con enlace logarítmico (Crawley, 1993), usando el número de semillas como variable dependiente y el tratamiento como variable independiente. Posteriormente, se aplicó la prueba de χ^2 (Dytham, 2011) para corroborar si existen diferencias entre tratamientos, y se complementó con comparaciones múltiples de Tukey con la función *ghlt* con el software R versión 4.1.2 (R Core Team, 2021).

También se calculó la tasa de entrecruza (te) a partir del número de semillas producidas en los tratamientos de autocruza y entrecruza manuales. Se utilizó la

ecuación: $te = Wx / (Wx + Ws)$, donde Ws es el número de semillas formadas por autocruza y Wx el número de semillas formadas por entrecruza. Los valores de la tasa de entrecruza van de 0 a 1, donde 0 equivale a una especie con autocruza estricta, 1 a una especie únicamente con entrecruza y 0.5 a una especie con sistema mixto (Mandujano *et al.*, 2010).



Figura 3. Tratamientos de polinización hechos en el sitio de estudio de Tres Picos, Chiapas. A y B. Vista general de un parche floral en donde se aplicaron tratamientos. C. Acercamiento a flores de los tratamientos de apomixis, autocruza natural y entrecruza manual. D. Flor en fase femenina con el estigma lleno de polen (flecha) del tratamiento de autocruza manual.

Recompensas florales

Volumen y concentración de néctar

Para evitar el consumo del néctar por parte de los visitantes, se cubrieron las flores con bolsas de organza ($n = 25$). Cada hora, iniciando a las 9:00 h y culminando a las 18:00 h se cuantificó el volumen de néctar de flores en fase masculina y femenina con jeringas de insulina y se midió la concentración de azúcares con un refractómetro (Shivanna y Tandon, 2014). Por último, se compararon el volumen y la concentración de néctar entre las fases femenina y masculina para determinar si habían diferencias significativas. El volumen se comparó con una prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon debido a que no tenían una distribución normal, mientras que la concentración se comparó con una prueba de *t-student* con corrección de Welch (Dytham, 2011). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software R versión 4.1.2 (R Core Team, 2021).

Compuestos orgánicos del néctar

Para conocer los compuestos orgánicos del néctar se realizaron extracciones con hexano y una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Las muestras de néctar fueron colectadas en febrero de 2018, se mantuvieron en hielo y posteriormente se congelaron a -70°C en un ultracongelador hasta su análisis químico. Se realizaron tres tipos de extracciones:

1. **Hexano + néctar diluido:** Se realizó la extracción de compuestos en hexano. Se tomaron $300\ \mu\text{L}$ de néctar puro y $700\ \mu\text{L}$ de agua, se mezclaron vigorosamente por un minuto. Se le agregaron $700\ \mu\text{L}$ más de hexano y la mezcla se dejó reposar hasta que se formaron dos fases: hexano-néctar. Una vez que la fase de hexano estuvo totalmente separada, se tomó y se inyectó en el cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas.

2. **Hexano + néctar sin diluir:** Se realizó la extracción de compuestos en hexano. Se tomaron 300 μ L de néctar (sin disolver) y 700 μ L de hexano, la mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto y se dejó reposar hasta que se formaron las dos fases, hexano-néctar. Una vez que la fase de hexano estuvo totalmente separada, se tomó y se inyectó en el GC-MS.
3. **SPME (microextracción en fase sólida):** Se realizó la extracción de compuestos con la técnica de SPME. Se tomaron 300 μ L de néctar a los que se agregaron 2 mL de hexano. La mezcla se agitó vigorosamente durante un minuto y se puso en baño María durante 5 minutos, exponiendo la fibra del SPME durante ese tiempo, se retiró la fibra y se inyectó en el GC-MS.

En los tres tipos de extracción se utilizó el programa de búsqueda de espectro de masas v. 2.3 (NIST Mass Spectrometry Data Center, 2017) para identificar los compuestos.

Visitantes florales e identificación de polinizadores

En el sitio de estudio se hicieron observaciones directas de los visitantes florales en tres zonas con una gran densidad de flores. Estas observaciones se realizaron por tres días consecutivos, de las 9:00 a las 18:00 h en febrero de 2019. Por otra parte, se colocaron tres cámaras trampa apuntando a zonas con una gran concentración de flores para detectar la actividad de animales más grandes, como mamíferos y aves. Se colocaron las cámaras durante dos días en febrero de 2019, por un mes entre marzo y abril de 2021 y por tres meses entre diciembre del 2021 y febrero del 2022. Debido a la situación sanitaria, en 2021 y 2022 no se realizaron observaciones directas. Para determinar si los visitantes eran casuales, florívoros o polinizadores se observó su comportamiento, registrando si tocaban

las anteras o el estigma, el número de veces que visitaban las flores y la recompensa que buscaban (Shivanna y Tandon, 2014).

Además, se colectaron algunos de los insectos (avispa) que visitaban las flores. De los insectos colectados, algunos se montaron con alfileres entomológicos y otros se utilizaron para determinar la carga de polen que tenían en el cuerpo. Para la determinación de la carga de polen, los insectos colectados se colocaron en tubos Eppendorf, los cuales se rellenaron con agua con jabón para reducir la tensión superficial. Después, los tubos se agitaron en el vórtex para desprender el polen de su cuerpo y éstos se extrajeron de los tubos. Los tubos con solución de polen y agua con jabón se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 100 μL de agua con detergente. Se contaron todos los granos de polen de dos muestras de 10 μL de esta solución. Se calculó el promedio de ambos conteos, el cual se multiplicó por 10 para obtener el número total de granos de polen en la muestra de 100 μL , es decir el número total de granos de polen que llevaban en el cuerpo los insectos. Para estar seguros de que los granos de polen eran de la especie de estudio, primero se observó polen tomado directamente de las flores colectadas y se comparó con el que portaban los visitantes. No se pudo determinar la carga de polen de las moscas ni de otro tipo de visitantes más grandes (aves y mamíferos) debido a que no se contó con el material adecuado para su captura.

Por último, los visitantes florales se clasificaron, de acuerdo con su horario de actividad predominante, en diurnos (5:00 a 19:00 h) y nocturnos (19:00 a 5:00 h). Para descartar a los visitantes casuales e identificar a los polinizadores más probables, se tomaron en cuenta la tasa de visitas, la carga de polen de los insectos y el contacto con anteras o estigma (Shivanna y Tandon, 2014).

Resultados

Biología floral

Se contó un total de 582 individuos (exófitos) de *M. matudae* y 41.57 ± 37.92 individuos en cada hospedero (promedio \pm Desviación Estándar; $n = 14$). Se observó un mayor número de flores en fase masculina que en fase femenina en ambos días del conteo. Sin embargo, no hubo un cambio notable en la proporción de individuos en fase masculina, femenina ni en botón en los días observados (Fig. 4).

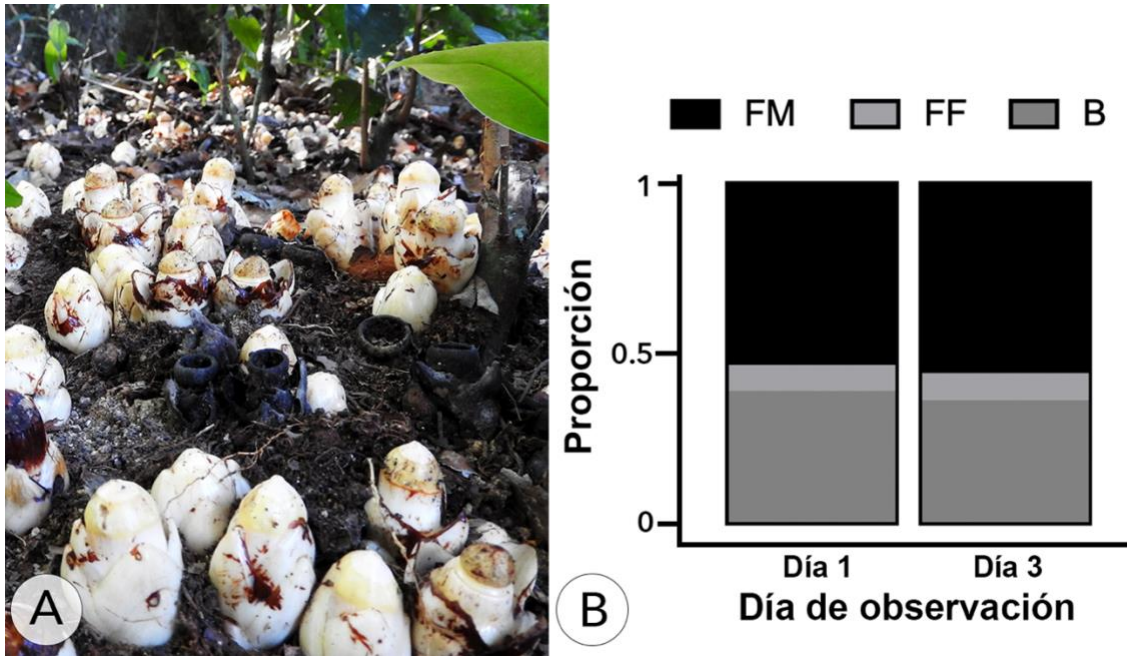


Figura 4. Parche floral de *M. matudae* en la localidad de Tres Picos, Chiapas. A. Fotografía *in situ* de un parche floral. B. Proporción de flores en las diferentes fases de *M. matudae*. Hubo un mayor número de flores en fase masculina que en fase femenina en ambos días del conteo. FM: Fase masculina; FF: Fase femenina; B: Botones florales.

Se observó que los botones florales más pequeños de *Mitrastemon matudae* son de color café porque están cubiertos por la volva que después se rompe. Los botones más maduros son de color blanco y se encontraron en la superficie del

suelo. Pasaron de dos a tres meses desde que salieron a la superficie hasta que se abrieron las brácteas que cubren los verticilos sexuales ($n = 219$). Las flores maduras ($n = 363$) son de color blanco y se oxidan fácilmente con el sol. El color de las flores contrasta con el color oscuro del suelo y la hojarasca donde se encuentran. Las flores tienen dos pares de brácteas que cubren a los verticilos sexuales en etapa de botón floral, mientras que el perigonio (formado de tépalos) no cubre a los verticilos sexuales ya que son más cortos que el androceo y gineceo. Una vez en fase masculina, las flores permanecen abiertas hasta la formación de los frutos. La velocidad de apertura de las brácteas fue de 4.25 ± 3.04 mm (promedio \pm DE) cada 24 h ($n = 15$).

Se observó que el sinandrio forma un capuchón (compuesto por los estambres fusionados), el cual cubre completamente al estigma, excepto por un pequeño orificio en la parte apical. La antesis inicia con la fase masculina ($n = 325$; Fig. 5A-D). Los microsporangios fusionados del androceo están cubiertos por una pared; en esta etapa, el polen presenta 50% de viabilidad ($n = 4$; Fig. 5A-B). Después de un tiempo, la pared de los microsporangios se rompe, dejando al descubierto el polen, que es pegajoso (Fig. 5C). En esta etapa el polen estaba cubierto de mucha secreción que impidió que el reactivo de Alexander actuara, por lo que no se logró determinar su viabilidad.

En etapa pre-antesis de la flor, el gineceo está cubierto por el sinandrio, el cual está sujeto por el perigonio en la base de la flor. Conforme madura la flor, el perigonio deja de sujetar por la base al sinandrio a través de un desprendimiento circunscísil provocado por el crecimiento y ensanchamiento del gineceo y con ayuda de la gran cantidad de secreción que tiene la flor, el capuchón se va elevando hasta que se cae, dejando expuesto al estigma, lo que da lugar a la fase

femenina ($n = 363$; Fig. 5D-H). En los sinandrios caídos el polen tuvo 0% de viabilidad ($n = 4$).

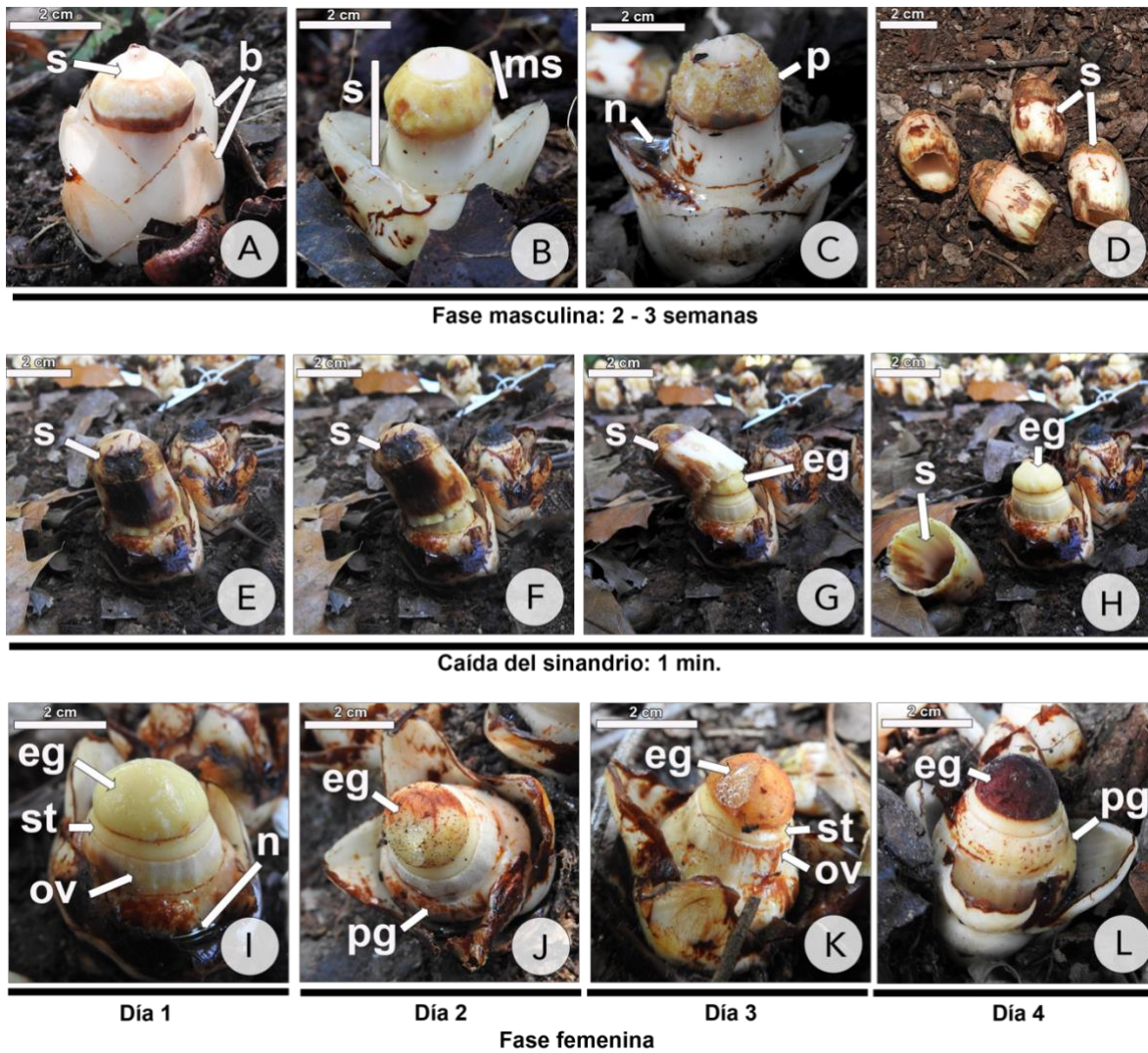


Figura 5. Fases florales de *M. matudae* en la localidad de Tres Picos, Chiapas. A - D: fase masculina, E - H: fase de transición, I - L: fase femenina. b. bráctea; eg, estigma; ms, microsporangios; n, néctar; ov, ovario; p, polen; pg, perigonio; s, sinandrio; st, estilo.

Apenas el sinandrio se cae, el estigma se observa de color amarillo crema, húmedo, con exudado abundante y receptivo cuando se aplica la prueba de peróxido de hidrógeno ($n = 363$); las células papilosas son secretoras y pegajosas (Fig. 5I). Conforme pasa el tiempo, el estigma cambia de color a naranja y se va

secando poco a poco. La parte del estigma que sigue de color amarillo crema es receptiva, pero en menor grado con respecto a la parte de color naranja, la cual es muy receptiva, pues presenta mayor burbujeo que la parte amarilla del estigma ($n = 363$; Fig. 5J). Aproximadamente al tercer día de la caída del sinandrio, el estigma se torna completamente naranja y es muy receptivo ($n = 363$; Fig. 5K). Alrededor de cuatro días después de la caída del sinandrio, el estigma cambia de color a café, se deshidrata aún más y ya no es receptivo (Fig. 5L), por lo que la receptividad del estigma dura cuatro días ($n = 363$). Debido al tiempo restringido de observación no se pudo determinar cuánto tiempo tarda una flor en fase masculina para llegar a la fase femenina, pero se estima que toma de dos a tres semanas en cambiar de fase.

Con base en la morfología floral, se obtuvo un índice de entrecruzamiento (OCI) de cuatro, ya que el diámetro de la corola mayor a 6 mm equivale a tres puntos y la presencia de dicogamia (protandria) le suma otro punto. El OCI igual a cuatro indica xenogamia obligada de acuerdo con una de las propuestas de Cruden (1977; Tabla 1). Por otra parte, con base en la relación polen-óvulo, las flores de *M. matudae* tuvieron $26,824 \pm 2235$ óvulos por flor (promedio \pm DE; $n = 6$) y $589,800 \pm 441,658$ granos de polen por flor (promedio \pm DE; $n = 4$). La proporción polen-óvulo resultó de 21.98, que corresponde a autogamia obligada de acuerdo con la otra propuesta de Cruden (1977; Tabla 1).

Sistema de cruce

Mitrastemon matudae produjo entre 8,000 y 35,000 semillas por fruto en el grupo testigo (polinización abierta). El resultado de la tasa de entrecruza fue de 0.4, lo que indica un sistema de cruce mixto. *M. matudae* solamente se reprodujo por la vía sexual, ya que no hubo formación de semillas en ningún fruto del tratamiento

de apomixis ($n = 2$). En el resto de los tratamientos de polinización (entrecruza manual, autocruza natural y manual) sí hubo producción de semillas, lo que corrobora que *M. matudae* tiene un sistema de cruce mixto (Fig. 6A).

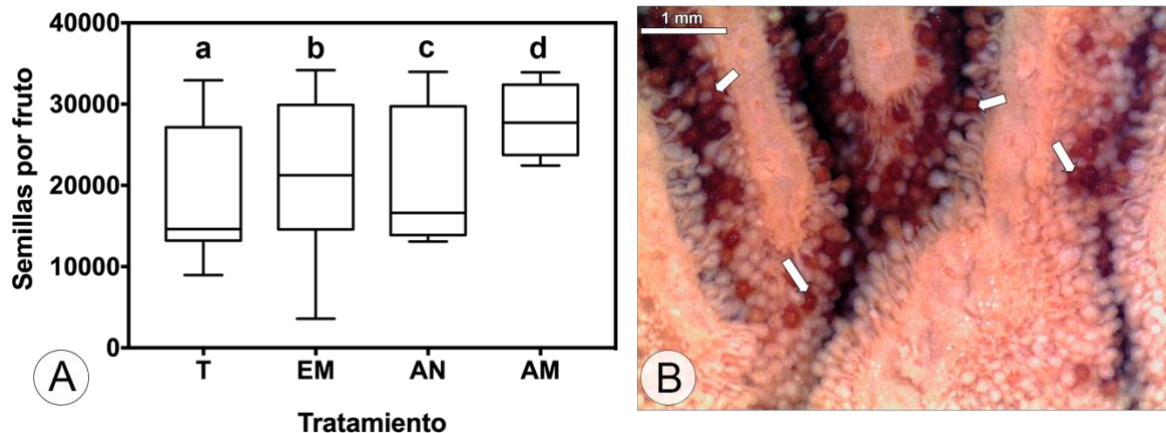


Figura 6. Sistema de cruce en *M. matudae* en la localidad de Tres Picos, Chiapas. A. Comparación entre el número de semillas por fruto en los tratamientos de polinización controlada. T, testigo ($n = 9$); EM, entrecruza manual ($n = 9$); AN, autocruza natural ($n = 4$); AM, autocruza manual ($n = 4$). En el tratamiento de apomixis ($n = 2$) no se formaron semillas, por lo que no se muestra en la gráfica. Las letras minúsculas encima de las cajas indican las diferencias significativas entre los tratamientos (Anexo I). B. Ovario de una flor de *M. matudae* que mantiene aún el sinandrio (fase masculina), se observa una gran cantidad de óvulos (blanquecinos) y también semillas en color café (flechas).

Por otra parte, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ($X^2 = 11.488$; g.l.= 22; $p < 0.001$; Fig. 6A) comparados con el control (Anexo I). En el grupo testigo los frutos tuvieron el menor promedio de semillas por fruto, seguido por el tratamiento de entrecruza manual, en este tratamiento la desviación estándar fue muy grande. Hubo un mayor número de semillas por fruto en el tratamiento de autocruza manual, seguido por el de autocruza natural (Fig. 6A). La formación de semillas en los tratamientos de autocruza natural y manual indica que pueden formar semillas por medio de la autopolinización, por

lo que no tienen un sistema de incompatibilidad. Una evidencia que refuerza esto es que se encontraron semillas en flores que todavía conservaban el sinandrio y cuyo estigma no había sido expuesto a los polinizadores (Fig. 6B).

Recompensas florales

Volumen y concentración de néctar

Las flores de *Mitrastemon matudae* produjeron 1.82 ± 1.52 mL (promedio \pm DE) de néctar por flor ($n = 25$), siendo 6 mL el máximo observado (Fig. 7A). La concentración de azúcares fue de 10.81 ± 3.52 °Bx (promedio \pm DE; $n = 21$; Fig. 7B). La producción de néctar se presentó tanto en la fase floral masculina como en la femenina. No se encontraron diferencias significativas en el volumen de néctar ($U = 458$; $p = 0.184$; fase masculina: $\bar{x} = 2.097 \pm 0.3$ mL, fase femenina: $\bar{x} = 1.621 \pm 0.23$ mL), pero sí en la concentración ($t = 2.63$; g.l. = 35.82; $p = 0.0126$), siendo mayor la concentración en el néctar de la fase femenina (fase masculina: $\bar{x} = 9.469 \pm 0.8493$ °Bx, fase femenina: $\bar{x} = 11.85 \pm 0.317$ °Bx).

Por otra parte, la producción de néctar durante el día fue fluctuante (Fig. 7C y D). Por la mañana (8:00-10:30 h) produjeron alrededor de 2 mL de néctar. Posteriormente, alrededor de las 11:00 h, el volumen y la concentración de néctar de las flores en fase masculina aumentó ($n = 4$ flores en las cuales esto ocurrió). Ocurrió lo mismo en las flores en fase femenina, pero una hora después, alrededor de las 12:00 h ($n = 5$ flores). Después, el volumen de néctar disminuyó en ambas fases, aunque de manera más pronunciada en la fase femenina ($n = 7$ flores). En cambio, la concentración de néctar en las flores en fase masculina disminuyó más drásticamente ($n = 4$ flores) que el de las flores en fase femenina ($n = 5$ flores; Fig. 7 C y D). Alrededor de las 15:30 h, el volumen de néctar de las flores en fase masculina disminuyó a menos de 1 mL ($n = 3$ flores) y así se mantuvo

hasta el final del día (18:00 h) y la concentración aumentó de las 15:30 a las 18:00 h ($n = 3$ flores). Por otra parte, entre las 13:00 y las 16:00 h, el volumen de néctar de las flores en fase femenina aumentó ($n = 3$ flores) y a las 18:00 h volvió a disminuir a menos de 1 mL ($n = 5$ flores). A las 13:00 h, la concentración del néctar en las flores en fase femenina también aumentó ($n = 5$ flores), pero volvió a disminuir alrededor de las 15:00 h ($n = 1$ flores) y disminuyó a menos de 10 °Bx a las 16:00 h ($n = 8$ flores; Fig. 7 C y D).

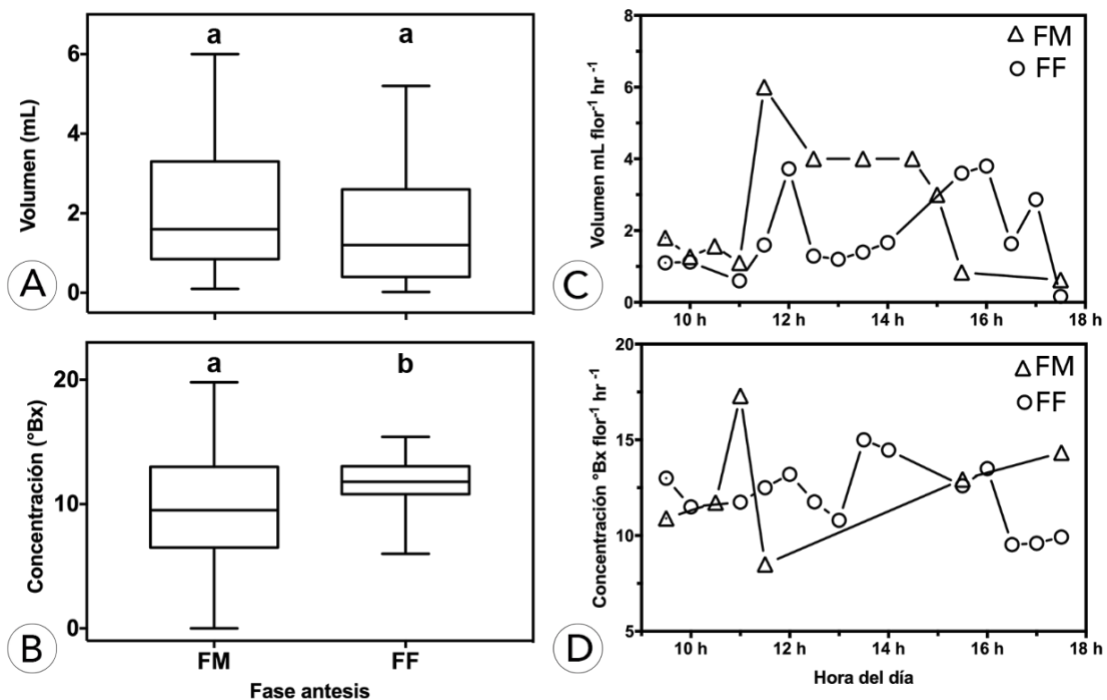


Figura 7. Volumen y concentración del néctar de las flores de *M. matudae* en la localidad de Tres Picos, Chiapas. A. Promedio de volumen de néctar de flores en fase masculina ($n = 11$) y femenina ($n = 14$). B. Promedio de concentración de azúcares del néctar de flores en fase masculina ($n = 7$) y femenina ($n = 14$). C y D: Fluctuación del volumen y la concentración de néctar de las 9:00 h a las 18:00 h. FM, Fase masculina; FF, Fase femenina.

Compuestos orgánicos del néctar

Los análisis mostraron que además de los azúcares detectados con el refractómetro, el néctar de las flores de *M. matudae* tiene compuestos orgánicos que son polares, puesto que se unieron al hexano que se utilizó como disolvente. Entre los compuestos encontrados por la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) figuran alcanos, alcoholes, cetonas, fenoles, peróxidos, furanos y ácidos carboxílicos (Tabla 2). En cada tipo de extracción se obtuvo un cromatograma general de los compuestos (Fig. 8A) y la identificación del compuesto de acuerdo a su espectro de masas (Fig. 8B). Los espectros de masas de algunos de los compuestos orgánicos del néctar de *M. matudae* coincidieron con el espectro de dos compuestos registrados en la librería NIST. Al ser tan similares no se pudieron diferenciar y se señalan con un asterisco (*), por esta razón dichos compuestos tienen el mismo tiempo de retención y la misma área bajo la curva (Tabla 2; Anexo II).

Se encontró que el néctar además de azúcares se compone de diez sustancias principales, de las cuales algunas tienen propiedades antibacteriales y/o antifúngicas, otras son tóxicas y otras repelen a ciertos animales (Tabla 3). Las sustancias tóxicas y repelentes predominaron en las muestras analizadas, como el 1-etilbutil hidroperóxido, el 1-metilpentil hidroperóxido y el fenol (Tabla 2). Otra sustancia que fue predominante en una de las muestras fue el 2,5-dimetiltetrahidrofurano, sustancia que es utilizada como agente saborizante (Barroso, 2012). Otra sustancia de interés fue el 2-vinilfurano, que se encontró en baja proporción (4.2%) dentro del aroma floral fétido de *Photinia serrulata* (Rosaceae; Zhang *et al.*, 2018). Del resto de las sustancias no se encontraron propiedades de interés para el presente estudio.

Tabla 2. Compuestos orgánicos identificados en el néctar de *M. matudae* en la localidad de Tres Picos, Chiapas. Se muestra el nombre del compuesto, su fórmula condensada, el tiempo de retención en segundos y el área bajo la curva del compuesto (el pico) con respecto al total de la muestra, es decir el porcentaje que se encontró del compuesto en la muestra. Los compuestos con espectros de masas similares que no se lograron diferenciar se señalan con un asterisco (*). La prueba de SPME no arrojó datos concluyentes del porcentaje de los compuestos en la muestra, por lo que no se presentan.

Compuesto	Fórmula	Tiempo de retención (s)	Área %
Néctar diluido + hexano			
2,5-dimetiltetrahidrofurano	C ₆ H ₁₂ O	122.22	41.53
Fenol	C ₆ H ₅ O	346.77	20.33
1-etilbutil hidroperóxido*	C ₆ H ₁₄ O ₂	324.72	12.67
3,4-epoxi-2-hexanona*	C ₆ H ₁₀ O ₂	324.72	12.67
3-metil-1,4-pentadien-3-ol	C ₆ H ₁₀ O	337.27	11.75
2-butiltetrahidrofurano	C ₈ H ₁₆ O	169.92	7.72
2,2,4-trimetilpentano	C ₆ H ₁₂ O	139.12	5.99
Néctar puro + hexano			
1-etilbutil hidroperóxido	C ₆ H ₁₄ O ₂	324.46	45.48
1-metilpentil hidroperóxido	C ₆ H ₁₄ O ₂	331.21	31.39
Fenol*	C ₆ H ₅ O	346.31	12.58
2-vinilfurano*	C ₆ H ₆ O	346.31	12.58
5-(2-isopropil-2-propenil)-2(5H)-furanona	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	337.31	10.55
Microextracción en fase sólida (SPME)			
Biciclo [2.2.1] hept-5-eno-2-carboxilato de metilo	C ₉ H ₁₂ O ₂	348.66	-
Fenol	C ₆ H ₅ O	350.96	-
2-vinilfurano	C ₆ H ₆ O	351.81	-
2-butiltetrahidrofurano	C ₈ H ₁₆ O	169.92	-
1-etilbutil hidroperóxido*	C ₆ H ₁₄ O ₂	324.72	-
3,4-epoxi-2-hexanona*	C ₆ H ₁₀ O ₂	324.72	-

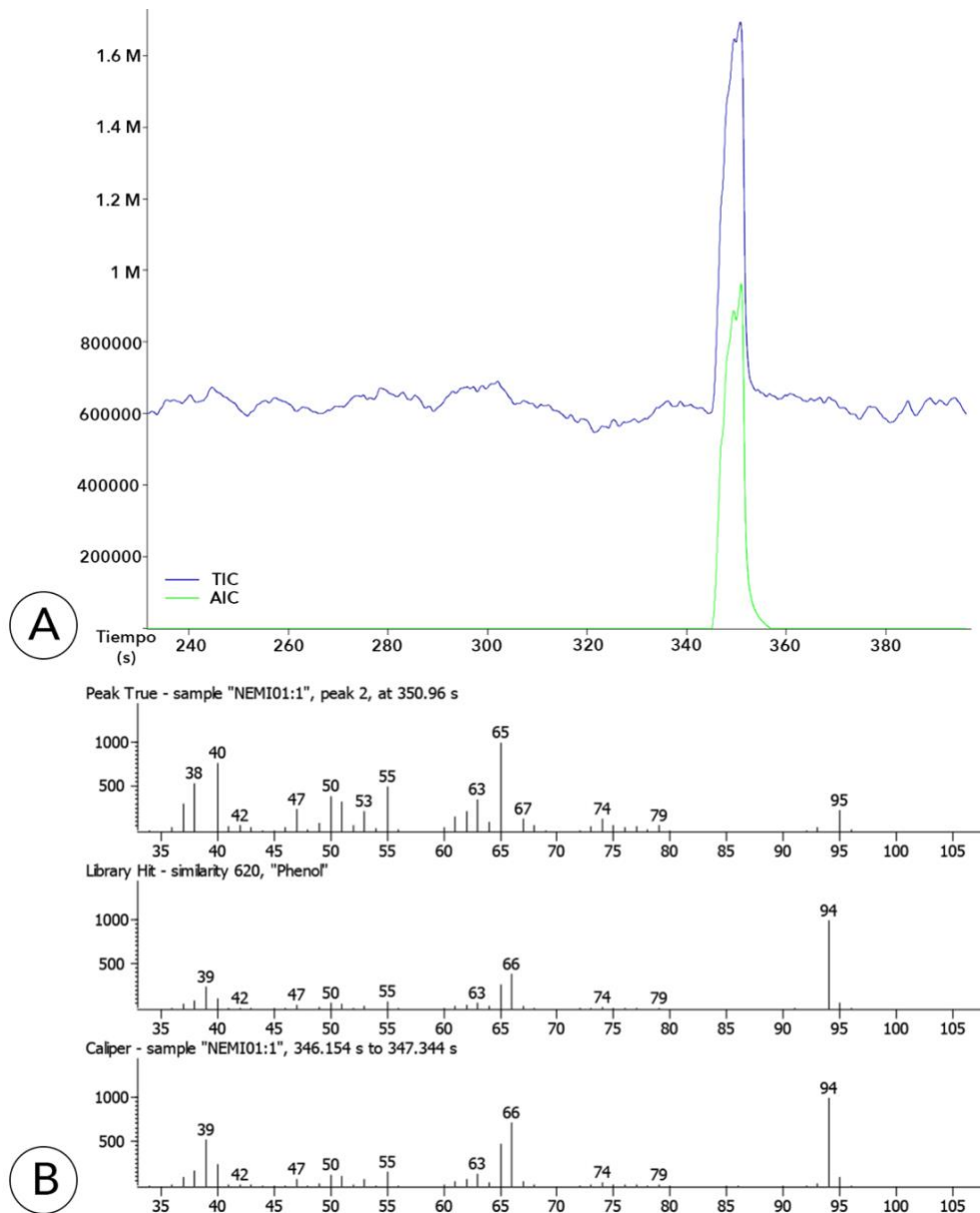


Figura 8. Cromatograma de los componentes del néctar de *M. matudae* con la técnica de SPME. A. Cromatograma general de todos los compuestos. En el eje X se representa el tiempo de retención, es decir el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima, mientras que el eje Y representa la abundancia de los compuestos. Cada pico representa un compuesto extraído de la muestra de néctar. B. Identificación del compuesto; se presenta la comparación de las muestras de néctar con la base de datos de la librería NIST para identificar el compuesto. TIC: cromatograma total de iones, que se obtiene al sumar las intensidades de todos los picos que están en la muestra, incluyendo el solvente; AIC: cromatograma analítico de iones, que corresponde al espectro de la muestra sin incluir el solvente. El resto de las gráficas se muestran en el Anexo II.

Tabla 3. Propiedades de los compuestos orgánicos identificados en el néctar de *M. matudae* en la localidad de Tres Picos, Chiapas.

Compuesto	Propiedades	Cita
1-etilbutil hidroperóxido	tóxico para artrópodos	D'Armas Regnault, 2015
1-metilpentil hidroperóxido	tóxico para artrópodos	D'Armas Regnault, 2015
2-butiltetrahidrofurano	–	–
2-vinilfurano	presente en aroma floral fétido	Zhang <i>et al.</i> , 2018
2,2,4-trimetilpentano	–	–
2,5-dimetiltetrahidrofurano	agente saborizante	Barroso, 2012
3-metil-1,4-pentadien-3-ol	–	–
3,4-epoxi-2-hexanona	antibacterial y antifúngico	Vega-Avila <i>et al.</i> , 2012
5-(2-Isopropil-2-propenil)-2(5H)-furanona	–	–
biciclo [2.2.1] hept-5-eno-2-carboxilato de metilo	–	–
fenol	tóxico y repelente para abejas	Adler, 2000; Hagler y Buchmann, 1993

Visitantes florales e identificación de polinizadores

Se obtuvo un total de 81 h de observación directa y 768 h por medio de cámaras trampa. Durante el día, las flores de *M. matudae* fueron visitadas por dos especies de avispas sociales (Vespidae, Polistinae), *Agelaia yepocapa* (Fig. 9A) y *A. panamaensis* (Fig. 9B), moscas (Muscidae; Fig. 9C), una especie de ardilla (*Sciurus deppei*, Sciuridae; Fig. 9I) y tres especies de aves, *Chlorospingus flavopectus* (Passerellidae; Fig. 9D), *Hylocichla mustelina* (Turdidae; Fig. 9E) y *Catharus ustulatus* (Turdidae; Fig. 9F). Por otra parte, en la noche se registraron las visitas

de una especie de ratón del género *Peromyscus* (Cricetidae; Fig. 9G) y una especie de tlacuache endémico de México, *Tlacuatzin canescens* (Didelphidae; Fig. 9H).

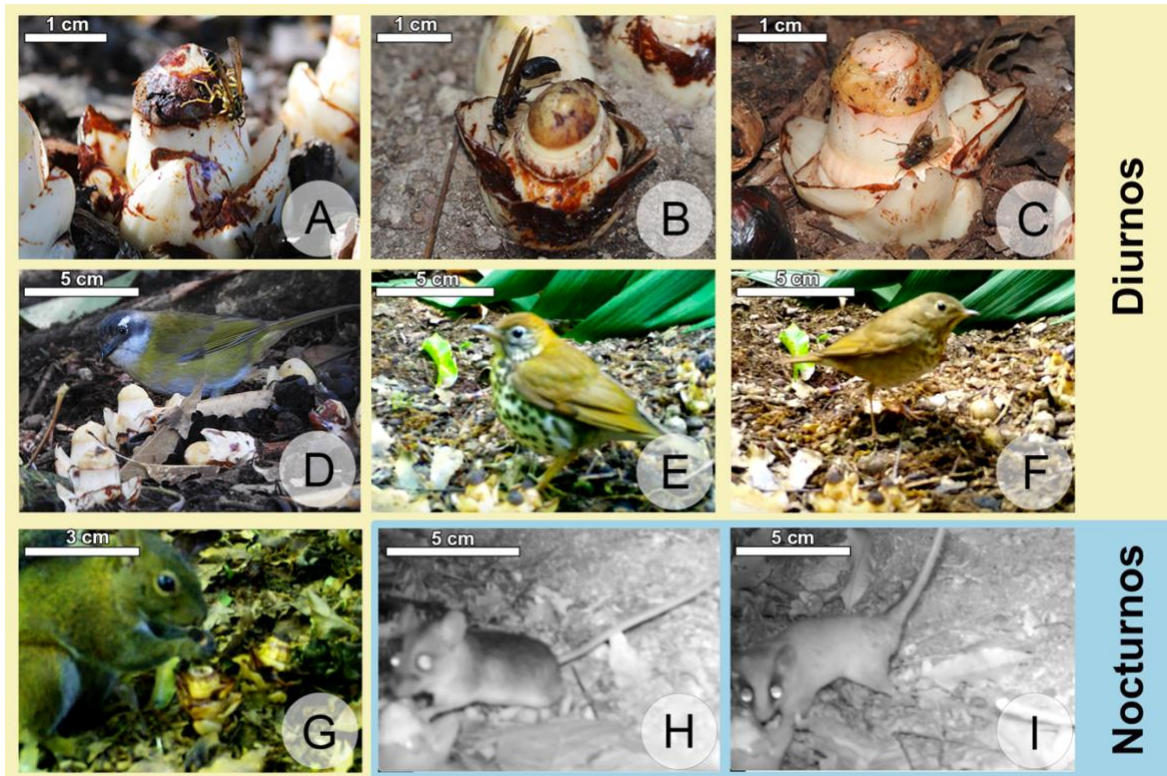


Figura 9. Visitantes florales diurnos (A-G) y nocturnos (H-I) de *M. matudae* en la localidad de Tres Picos, Chiapas. A. avispa, *Agelaiidae*. B. avispa, *Agelaiidae*. C. mosca, Muscidae. D. ave, *Chlorospingus flavopectus*. E. ave, *Hylocichla mustelina*. F. ave, *Catharus ustulatus*. G. ardilla, *Sciurus deppei*. H. ratón, *Peromyscus* sp. I. tlacuache, *Tlacuatzin canescens*.

La frecuencia de los visitantes diurnos fue mayor que la de los visitantes nocturnos. Los visitantes diurnos más frecuentes fueron las avispas, quienes tuvieron un pico de visitas a las 13:00 h (89 individuos visitantes; Fig. 10A); posteriormente, de las 14:00 h a las 17:00 h, su actividad disminuyó hasta llegar a cero (104 individuos visitantes). Las aves comenzaron su actividad a las 5:00 h (38 individuos visitantes) y se mantuvieron constantes a lo largo del día (193

individuos visitantes; Fig. 10A). Las moscas fueron menos frecuentes (21 individuos visitantes) y sólo se registraron ardillas en cuatro ocasiones (9 individuos visitantes). Los ratones fueron los visitantes nocturnos más frecuentes, con un pico de visita a las 21:00 h (13 individuos visitantes) y otro más pequeño a las 24:00 h (9 individuos visitantes; Fig. 10B). Los tlacuaches fueron menos frecuentes que los ratones y tuvieron mayor actividad a las 19:00 h (4 individuos visitantes) y de nuevo a las 2:00 h (6 individuos visitantes; Fig. 10B).

En cuanto al comportamiento de los visitantes florales, se observó que las avispas aterrizaban en cualquier parte de la flor y se posicionaban boca abajo hacia la base interna de las brácteas, donde se deposita el néctar, el cual consumían. La mayoría de las veces tocaron el estigma o los microsporangios con las patas. Sin embargo, el conteo de polen en los cuerpos de las avispas resultó ser de cero ($n = 11$), es decir que no actúan como polinizadoras. También se observó que cuando las avispas consumían mucho néctar, tenían un comportamiento errático, no volaban bien y algunas veces se caían. Las moscas aterrizaban en cualquier parte de la planta, algunas veces tocaban el estigma o los microsporangios dehiscentes con polen, pero no se observó que tomaran néctar ni polen. No se pudieron atrapar moscas para el conteo de carga de polen.

Por otra parte, las aves de la especie *Chlorospingus flavopectus*, llegaban entre las 5:00 y las 15:00 h en parvadas de alrededor de 10 individuos y tomaban néctar tocando con la frente los microsporangios o el estigma de las flores. Las otras dos especies de aves, *Catharus ustulatus* e *Hylocichla mustelina*, llegaban solas, pero también tomaban néctar y tocaban con la frente los microsporangios dehiscentes o el estigma receptivo. Los ratones y los tlacuaches también tomaban néctar y tocaban los órganos sexuales con la frente, con el hocico y con las patas, transfiriendo el polen de una flor al estigma de diferentes flores. Por último, las

ardillas no tomaban néctar y rara vez tocaban los verticilos sexuales pero sí se comportaron como florívoros y frugívoros, ya que consumieron parcialmente las flores y los frutos. Las ardillas removieron el estigma de las flores (que se convierte en el opérculo de los frutos), dejando al descubierto los óvulos o las semillas y por lo tanto afectando negativamente su desarrollo normal.

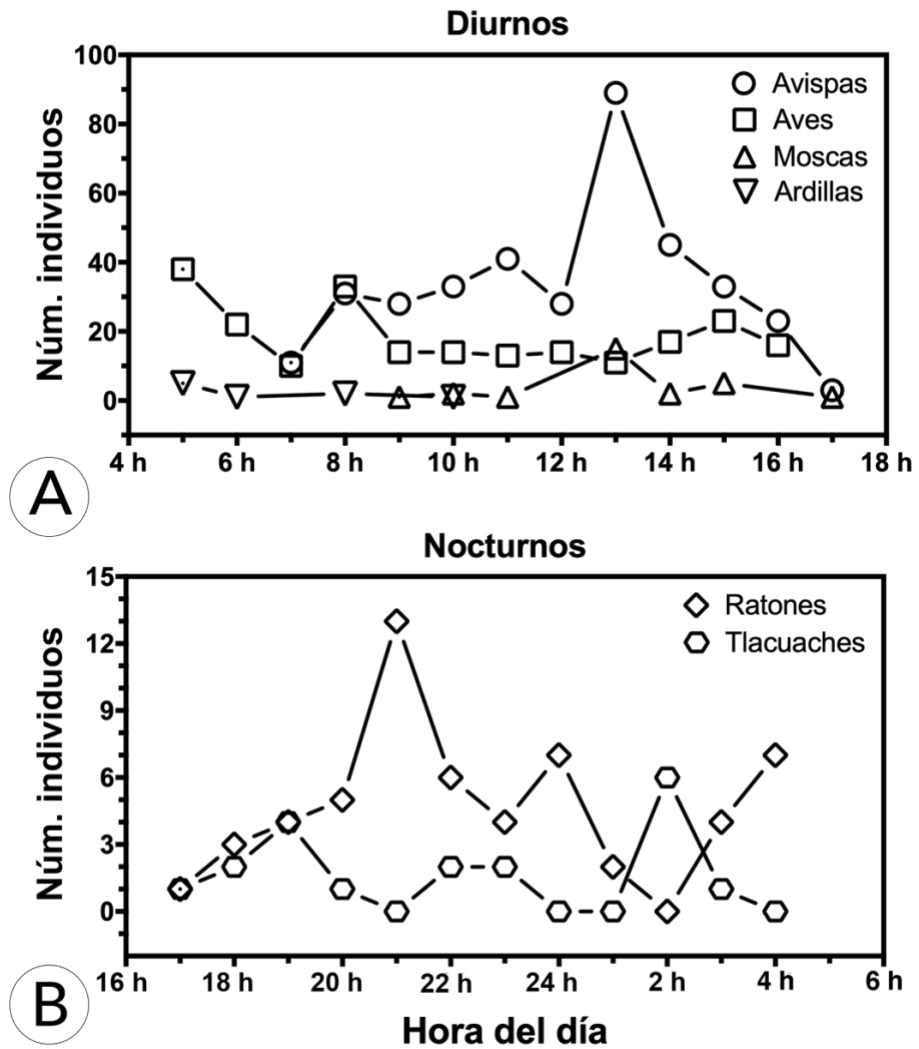


Figura 10. Frecuencia de visitas diurnas (A) y nocturnas (B) a flores de *M. matudae* a lo largo del día en la localidad de Tres Picos, Chiapas.

Discusión

Este estudio ofrece la primera descripción de la biología reproductiva de *Mitrastemon matudae* (Mitrastemonaceae, Ericales). Se encontró que las flores son solitarias, hermafroditas y dicógamas. A pesar de presentar dicogamia, las flores de *M. matudae* pueden autopolinizarse, por lo que esta especie tiene un sistema de cruce mixto. Las flores de *M. matudae* producen néctar diluido que contiene varios compuestos tóxicos, repelentes, antibacteriales y antifúngicos y que es consumido por varios tipos de animales como avispas, moscas, aves, roedores y tlacuaches.

Las flores de *M. matudae* son solitarias como ocurre en otras familias de endoparásitas (Apodanthaceae, Croat, 1978; Rafflesiaceae, Meijer, 1997). En cuanto a los sistemas florales de las plantas endoparásitas sólo se ha reportado protandria en las especies de la familia Mitrastemonaceae (Matuda, 1947) y se ha encontrado protoginia en especies de la familia Cytinaceae (De Vega *et al.*, 2009). En cuanto al sistema de cruce, de acuerdo con la proporción polen/óvulo propuesta por Cruden (1977) debería ser por autogamia obligada, lo cual no ocurrió en la población de *M. matudae* estudiada. Esto podría deberse a que el tamaño de muestra para conteo de óvulos y polen fue muy pequeño y no fuera representativa. El otro método que propone Cruden (1977), que toma en cuenta características florales, indicó que el sistema de cruce es por xenogamia obligada. Este resultado es congruente con lo observado, puesto que el sinandrio de *M. matudae* es completamente cerrado, excepto por un pequeño orificio en la zona apical del tubo, lo que en teoría separa las funciones sexuales. Sin embargo, en los tratamientos de polinización se formaron semillas por medio de autopolinización manual, natural y por entrecruza, por lo que se concluye que *M. matudae* tiene un sistema de cruce mixto. La producción de semillas fue variable

en todos los tratamientos de polinización, siendo la producción más alta por medio de autopolinización tanto manual como natural y la menor producción por medio de entrecruza manual, por lo que *M. matudae* tiende a la autopolinización. Esto implica que pueden producir una gran cantidad de semillas sin la ayuda de vectores que transporten el polen de una flor a otra, sin embargo, si esta es su principal forma de producir semillas su adecuación puede verse disminuida a largo plazo (Charlesworth y Charlesworth, 1987). Esto es similar a lo observado en la otra especie de la familia, *M. yamamotoi*. En esa especie también se formaron semillas en ambos tratamientos de autopolinización; los autores atribuyeron esto a la intrusión de hormigas o a la apomixis, pero no se corroboró (Suetsugu, 2018). En este estudio, en ninguna flor del tratamiento de apomixis se formó fruto ni se encontraron semillas, lo que sugiere que la formación de semillas se da solamente por la vía sexual. Por otra parte, la apomixis es un evento poco común en las angiospermas, pues sólo ocurre en alrededor del 2.2% de los géneros de plantas con flores (Hojsgaard *et al.*, 2014), por lo que es poco probable que esto ocurra en *M. matudae*. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que, debido a la pérdida de muestras durante el estudio de campo, el tamaño de muestra de los tratamientos fue muy pequeño, por lo que es necesario repetir el experimento para poder concluir con más certeza.

Entonces, queda la interrogante de cómo es que las flores se autopolinizan si aparentemente existe una barrera tanto física como temporal entre las funciones sexuales. Recientemente, nuestro grupo de trabajo encontró evidencias de que el polen de *M. matudae* puede germinar dentro de los microsporangios, incluso antes de la caída del sinandrio (Romero-Gutiérrez, datos no publicados). Es posible, entonces, que sean los tubos polínicos y no los granos de polen los que llegan al estigma o a los óvulos. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis es

necesario realizar estudios que rastreen la ruta de los tubos polínicos hasta llegar a los óvulos.

Por otra parte, es importante que se hagan estudios genéticos para distinguir si las flores de las plantas endoparásitas que están dentro de un mismo hospedero son del mismo individuo o de individuos diferentes. Un escenario es que si en un mismo hospedero hay más de un individuo de *M. matudae*, la transferencia de polen entre flores del mismo parche podría propiciar el entrecruzamiento y la diversidad genética. Pero otro escenario es que las flores de *M. matudae* dentro del mismo hospedero sean de un mismo individuo, lo que reduciría el número de posibles parejas con las cuales cruzarse. La autopolinización puede ayudarlas a mantener su población a corto plazo, pero a largo plazo puede perjudicar su permanencia por la pérdida de diversidad genética (Barrett, 1998). Esto, aunado a la pérdida del hábitat por el cultivo de diferentes productos agrícolas, podría llevar a la extinción local de esta especie. Es así que la presencia de polinizadores que transporten el polen entre flores de diferentes parches puede ayudar a mantener la diversidad genética, evitando así la depresión por endogamia (Barrett, 2002; Charlesworth y Charlesworth, 1987).

En la población estudiada, se observó que las flores de *M. matudae* invierten una gran cantidad de recursos para atraer y mantener la constancia de sus visitantes florales y así promover la polinización cruzada. En el sitio de estudio, *M. matudae* produce néctar como principal atractivo de las flores. El néctar tuvo bajas concentraciones de azúcares (alrededor de 10 °Bx), lo que probablemente se debe a que durante el periodo en el que se hizo el trabajo de campo llovió repetidas veces. El néctar se acumula en los dos pares superiores de las brácteas, que tienen forma de cisterna, por lo que está expuesto a las condiciones

ambientales que pueden afectar su concentración (Corbet *et al.*, 1979). En este estudio no se midió la producción de néctar durante la noche, pero en los videos captados por las cámaras trampa se observó que los visitantes nocturnos lamían la zona donde se almacena el néctar, lo que sugiere que las flores sí producen néctar por la noche. Aunque la producción de néctar disminuyó a las 18:00 h, es probable que el néctar se reabsorba para volver a ser secretado más tarde, cuando comienzan a aumentar las visitas de los polinizadores nocturnos y así evitar su consumo por robadores de néctar (Burquez y Corbet, 1991). La producción de néctar por periodos prolongados sería muy costosa si la planta fuera autótrofa, pero al ser una planta que obtiene todos los nutrientes y el agua de su hospedero, la producción de néctar no representa un gasto tan grande.

Además de azúcares, el néctar de *M. matudae* contiene una serie de compuestos antibacteriales, tóxicos y repelentes. Los compuestos antibacteriales se han registrado en el néctar de varias especies de plantas, puesto que evitan que los microorganismos lo degraden (Brudzynski, 2021; Nicolson y Thornburg, 2007). Otros compuestos, como los fenoles, repelen a ciertos visitantes florales, como a las abejas (Hagler y Buchmann, 1993), lo cual explica que en este estudio no se hayan observado abejas visitando las flores de *M. matudae*. Se ha visto que estos compuestos repelentes ayudan en la defensa de las flores contra robadores de néctar o para disminuir las visitas de los visitantes que transportan menos polen (Baker, 1977; Detzel y Wink, 1993).

Por otro lado, los compuestos tóxicos del néctar pueden alterar el comportamiento de los visitantes florales, como se ha observado en las orquídeas *Epipactis purpurata* y *E. helleborine*, cuyo néctar contiene etanol (Ehlers y Olesen, 1997). Aunque en este último caso la intoxicación fue causada por el etanol, se ha

sugerido que otros compuestos como los alcaloides, derivados del indol, los morfinanos y los derivados del fenol pueden ocasionar este estado de "ebriedad", alterando el comportamiento de los visitantes florales, causando adicción para mantener la constancia de los visitantes (Jakubská-Busse *et al.*, 2005). En el presente trabajo, se observó que después de que las avispas consumieron el néctar de *M. matudae*, tuvieron un comportamiento lento y parecían "ebrias". Sería interesante analizar si el comportamiento de los visitantes florales más grandes, como las aves y los mamíferos, también se ve afectado por los compuestos que contiene el néctar de *M. matudae*. Probablemente la alteración del comportamiento no perjudique la transferencia de polen entre flores de *M. matudae*, ya que el polen es pegajoso y se adhiere al cuerpo de los polinizadores. Al contrario, podría aumentar el tiempo que los visitantes pasan forrajeando las flores buscando la recompensa, y así aumentar la probabilidad de que el polen llegue al estigma.

La floración masiva de *M. matudae* que se da al final del invierno, el color blanco de sus flores que contrasta con el sustrato cargado de horarasca, y la gran cantidad de néctar que producen, atrae a una gran cantidad de visitantes florales. Las flores de *M. matudae* fueron visitadas por insectos, aves y mamíferos no voladores. De manera similar, se ha observado que las flores de *M. yamamotoi* son visitadas principalmente por insectos (avispa, cucarachas y ortópteros; Suetsugu, 2018). Sin embargo, también se ha reportado que aves de la especie *Zosterops japonica* consumen el néctar de *M. yamamotoi* (Matuda, 1947). En la población de *M. matudae* estudiada, las tres especies de aves (*Chlorospingus flavopectus*, *Hylocichla mustelina* y *Catharus ustulatus*) y dos de las tres especies de mamíferos no voladores (*Peromyscus* sp. y *Tlacuatzin canescens*) podrían estar funcionando como polinizadores. Varios estudios han mostrado que las flores que

son polinizadas por vertebrados, es decir, animales que por su tamaño tienen mayores requerimientos energéticos, producen más néctar que las flores que son polinizadas por animales más pequeños como los insectos (Cruden *et al.*, 1983). Las flores de *M. matudae* producen grandes cantidades de néctar diluido, lo que apoya la hipótesis que las aves y los mamíferos podrían ser importantes polinizadores de esta especie. Un caso similar se da en la endoparásita de raíces *Cytinus visseri*. Las flores de esta especie están al nivel del suelo, emiten compuestos volátiles como la 3-hexanona que atraen a mamíferos terrestres (e.g., ratones y musarañas) los cuales consumen el abundante néctar (Johnson *et al.*, 2011).

Por otra parte, es probable que las moscas sólo sean visitantes casuales, ya que no se mostraron interesadas en el polen ni en el néctar. Las ardillas consumieron las flores y los frutos y si bien es posible que sean dispersoras de las semillas de *M. matudae*, ocasionan daños cuando consumen las flores y los frutos inmaduros. Ahora bien, en el estudio de Suetsugu (2018) las avispas fueron los visitantes más frecuentes y polinizadores de *M. yamamotoi*, sin embargo en *M. matudae* las avispas colectados que visitaron las flores de *M. matudae* no tenían granos de polen pegados a sus cuerpos, por lo que es probable que no sean polinizadores efectivos. En otras especies de plantas que son polinizadas por avispas, éstas forrajean el néctar y el polen se queda adherido a su cuerpo mientras caminan por la flor y logran llevar a cabo la polinización de manera exitosa (De Brito *et al.*, 2017; Suetsugu, 2018; Vislobokov y Galinskaya, 2018). Es por esto que no se descartan por completo como polinizadoras, pero sería necesario llevar a cabo experimentos con exclusiones de polinizadores para comprobar si las avispas transportan o no el polen de una flor a otra. No obstante, las avispas podrían llevar a cabo otras funciones ecológicas como la dispersión

de semillas. La dispersión de semillas por avispas (vespícoria) no es un mecanismo de dispersión muy común, pero en *Stemona tuberosa* (Stemonaceae) las principales dispersoras de semillas son avispas de la especie *Vespa velutina* (Chen, *et al.*, 2017). Además, tres especies del género *Trillium* (Melanthiaceae) son dispersadas por *Vespula* sp. (Zettler *et al.*, 2001). Durante la observación de visitantes florales se avistaron avispas visitando los frutos e incluso manipulando las semillas (obs. pers.).

M. matudae produce una gran cantidad de semillas y lo más probable es que estas sean dispersadas por animales. Aún cuando el estigma deja de ser receptivo, las flores siguen produciendo néctar y siguen atrayendo animales durante el proceso de fructificación. Para estudiar la dispersión se podrían hacer observaciones directas o colocar cámaras trampa en sitios donde haya frutos maduros para determinar qué tipos de animales los consumen. Después, se podrían capturar y analizar sus heces para comprobar que se encuentran semillas viables en su tracto digestivo. Posteriormente, se podría analizar su comportamiento y los lugares donde anidan, buscar las semillas y así determinar la distancia a la que las dispersaron y si el lugar es idóneo para que germinen y se establezcan (Shivanna, 2014). Para que la germinación ocurra, la semilla debe estar en la cercanía del hospedero, ya que, como otras plantas endoparásitas, *M. matudae* no tiene crecimiento autónomo por la pérdida del epicótilo. Por consiguiente, las semillas tienen que ser dispersadas hacia sitios donde puedan encontrar raíces jóvenes y no muy profundas de su hospedero específico (*Quercus* sp.). A diferencia de las plantas no parásitas, cuyas semillas necesitan las condiciones de luz y temperatura óptimas para romper la dormancia e iniciar su germinación, se ha estudiado que las plantas parásitas necesitan la presencia de señales químicas que indiquen que hay un hospedero cerca para que se induzca

la germinación (Brun, *et al.*, 2018; Bouwmeester *et al.*, 2021). También se ha sugerido que las semillas de la familia Mitrastemonaceae, así como las de otras plantas parásitas, se asocian con hongos simbiotes que influyen en su germinación (Watanabe, 1936a, De Vega *et al.*, 2010), aunque aún no se ha comprobado. En caso de ser cierto, esto implicaría otro paso más para poder establecerse en las raíces del hospedero, lo que dificultaría su éxito en la colonización de nuevos hospederos.

Para finalizar, *M. matudae*, al ser una planta parásita, puede ser percibida como una especie poco deseable. Sin embargo, aunque todavía falta hacer estudios que evalúen su efecto a largo plazo, en un estudio hecho dentro del equipo de trabajo se encontró que los individuos de *M. matudae* prefieren establecerse en árboles viejos o grandes y su establecimiento no tiene un efecto negativo en el crecimiento de su hospedero a corto plazo (Rivera-Reyes, datos no publicados). Lo que sí es un hecho, es que *M. matudae* forma parte de las interacciones bióticas que son la base del funcionamiento de los ecosistemas. Es por esto que deben llevarse a cabo acciones para proteger su hábitat y con ello proteger las poblaciones de *Mitrastemon matudae*.

Conclusiones

En resumen, la población de *M. matudae* estudiada posee flores solitarias y hermafroditas, las cuales presentan un sistema particular de protandria que separa las funciones sexuales. A pesar de presentar protandria, las flores también pueden producir semillas mediante autopolinización. Es decir, esta especie se reproduce tanto por autogamia como por xenogamia, por lo que *M. matudae* tiene un sistema de cruce mixto que podría garantizar la reproducción aún cuando la autogamia genera una pérdida de diversidad genética. Las flores de *M. matudae* producen copioso néctar diluido que contiene sustancias con propiedades antibacteriales, antifúngicas, tóxicas y repelentes para ciertos animales. Dada la forma de las flores, el néctar es fácil de adquirir por cualquier tipo de visitante floral. Las flores de *M. matudae* son visitadas por varios grupos de animales que consumen su néctar, incluyendo avispas, moscas, aves y pequeños mamíferos no voladores. Entre los animales que visitan las flores para consumir el néctar, se consideran potenciales polinizadores a las aves *Chlorospingus flavopectus*, *Hylocichla mustelina* y *Catharus ustulatus*, a los ratones del género *Peromyscus* sp. y al tlacuache *Tlacuatzin canescens*. Por otro lado, las ardillas consumen partes de las flores y de los frutos, y no se observó que los insectos tuvieran granos de polen en sus cuerpos.

Dado que *M. matudae* es una especie rara, de distribución limitada, además de que forma parte importante de las interacciones bióticas del bosque de encino en el que se encuentra, es de gran importancia llevar a cabo acciones para conservar su hábitat y sus poblaciones.

Referencias bibliográficas

- Abarca-García, C. A. y A. López-Villalobos. (2007). La estimación de la endogamia y la relación entre la tasa de fecundación cruzada y los sistemas reproductivos en plantas con flores: Una interpretación de su significado evolutivo. En L. E. Eguiarte, V. Souza, y X. Aguirre (Eds.), *Ecología Molecular* (pp. 183-213). Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT. CONABIO.
- Adler, L. S. (2000). The ecological significance of toxic nectar. *Oikos* 91(3), 409-420. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.910301.x>
- Alvarado-Cárdenas, L. O. (2009). Sistemática del género *Bdallophytum* (Cytinaceae). *Acta Botanica Mexicana*, 87, 1-21.
- Amoroso, V. B., N. P. Mendez y N. E. Lagunday. (2018). Mitrastemonaceae: A new family record for the Philippines. *Philippine Journal of Science*, 147(4), 775-779.
- Armbruster, W. S. (2012). Evolution and ecological implications of "specialized" pollinator rewards. En S. Patiny (Ed.), *Evolution of plant pollinator relationships* (pp. 44-57). Cambridge University Press.
- Baker, H. G. (1977). Non-Sugar Chemical Constituents of Nectar. *Apidologie*, 8(4), 349-356. <https://doi.org/10.1051/apido:19770405>
- Bänziger, H. (1991). Stench and fragrance: unique pollination lure of Thailand's largest flower, *Rafflesia kerrii* Meijer. *Natural History Bulletin of the Siam Society*, 39(1), 19-52.
- Bänziger, H. (1996). Pollination of a flowering oddity: *Rhizanthus zippelii* (Blume) Spach (Rafflesiaceae). *Natural History Bulletin of the Siam Society*, 44(1), 113-142.
- Bänziger, H. y B. Hansen. (2000). A New Taxonomic *Rhizanthus* Revision of a Deceptive Flower, Dumortier (Rafflesiaceae). *Natural History Bulletin of the Siam Society*, 48(1), 117-143.
- Bänziger, H., y T. Pape. (2004). Flowers, faeces and cadavers: Natural feeding and laying habits of flesh flies in Thailand (Diptera: Sarcophagidae, *Sarcophaga* spp.). *Journal of Natural History*, 38(13), 1677-1694. <https://doi.org/10.1080/0022293031000156303>
- Barrett, S. C. H. (1998). The evolution of mating strategies in flowering plants. *Trends in Plant Science*, 3(9), 335-341. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01299-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01299-0)
- Barrett, S. C. H. (2002). The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews Genetics*, 3(4), 274-284. <https://doi.org/10.1038/nrg776>
- Barrett, S. C. H. (2014). Evolution of mating systems: Outcrossing versus selfing. En D. A. Baum, D. J. Futuyma, H. E. Hoekstra, R. E. Lenski, A. J. Moore, C. L. Peichel, D. Schluter, y M. J. Whitlock (Eds.), *The Princeton Guide to Evolution*

- (pp. 356–362). Princeton University Press.
- Barroso, J. M. (2012). Reglamento de Ejecución (UE) no 872/2012. L 267/164. Diario Oficial de la Unión Europea.
https://doi.org/https://doi.org/10.3000/19770685.L_2012.267.spa
- Beaman, R. S., P. J. Decker y J. H. Beaman. (1988). Pollination of *Rafflesia* (Rafflesiaceae). *American Journal of Botany*, 75(8), 1148–1162.
- Beehler, B. M. (1994). Canopy-Dwelling Honeyeater Aggressively Defends Terrestrial Nectar Resource. *Biotropica*, 26(4), 459–461.
<https://doi.org/10.2307/2389240>
- Bellot, S., y S. S. Renner (2013). Pollination and mating systems of Apodanthaceae and the distribution of reproductive traits in parasitic angiosperms. *American Journal of Botany*, 100(6), 1083–1094. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200627>
- Blarer, A., D. L. Nickrent y P.K. Endress. (2004). Comparative floral structure and systematics in Apodanthaceae (Rafflesiales). *Plant Systematics and Evolution*, 245(1–2), 119–142. <https://doi.org/10.1007/s00606-003-0090-2>
- Bouwmeester, H., C. Li, B. Thiombiano, M. Rahimi y L. Dong. (2021). Adaptation of the parasitic plant lifecycle: germination is controlled by essential host signaling molecules. *Plant Physiology*, 185(4), 1292–1308.
<https://doi.org/10.1093/PLPHYS/KIAA066>
- Breedlove, D. E. (1978). The phytogeography and vegetation of Chiapas (Mexico). En A. Graham (Ed.), *Vegetation and vegetational history of northern Latin America* (pp. 149–165). California Academy of Sciences.
- Brudzynski, K. (2021). Honey as an Ecological Reservoir of Antibacterial Compounds Produced by Antagonistic Microbial Interactions in Plant Nectars, Honey and Honey Bee. *Antibiotics*, 10(5), 551.
<https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS10050551>
- Brun, G., L. Braem, S. Thoiron, K. Gevaert, S. Goormachtig y P. Delavault. (2018). Seed germination in parasitic plants: what insights can we expect from strigolactone research? *Journal of Experimental Botany*, 69(9), 2265–2280.
<https://doi.org/10.1093/JXB/ERX472>
- Burquez, A. y S. A. Corbet. (1991). Do Flowers Reabsorb Nectar? *Functional Ecology*, 5(3), 369–379. <https://doi.org/10.2307/2389808>
- Cardoso, J. C. F., M. Lacerda Viana, R. Matias, M. T. Furtado, A. P. de Souza Caetano, H. Consolaro y V. L. Garcia de Brito. (2018). Towards a unified terminology for angiosperm reproductive system. *Acta Botanica Brasílica*, 32(3), 329–348. <https://doi.org/10.1590/0102-33062018abb0124>
- Carter, C. y R. W. Thornburg. (2004). Is the nectar redox cycle a floral defense against microbial attack? *Trends in Plant Science*, 9(7), 320–324.
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.05.008>

- Charlesworth, D. y B. Charlesworth. (1987). Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1), 237-268. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.18.1.237>
- Charlesworth, D. (2006). Evolution of Plant Breeding Systems. *Current Biology*, 16(17). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.068>
- Chen, G., Z. W. Wang, Y. Qin y W. B. Sun. (2017). Seed dispersal by hornets: An unusual insect-plant mutualism. *Journal of Integrative Plant Biology*, 59(11), 792-796. <https://doi.org/10.1111/JIPB.12568/SUPPINFO>
- Corbet, S. A., P. G. Willmer, J. W. Beament, D. M. Unwin y O. E. Prÿs-Jones. (1979). Post-secretory determinants of sugar concentration in nectar. *Plant, Cell and Environment*, 2(4), 293-308. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1979.tb00084.x>
- Crawley, M. J. (1993). *GLIM for ecologists (Ecological methods and concepts)*. Blackwell Scientific Publications.
- Croat, T. B. (1978). *Flora of Barro Colorado Island*. Stanford University Press.
- Cruden, R. W. (1977). Pollen-Ovule Ratios: A Conservative Indicator of Breeding Systems in Flowering Plants. *Evolution*, 31(1), 32-46. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1977.tb00979.x>
- Cruden, R. W., S. M. Hermann y S. Peterson. (1983). Patterns of nectar production and plant-pollinator coevolution. En B. Bentley, T. Elias y T. S. Elias (Eds.), *The biology of nectaries* (pp. 80-125). Columbia University Press.
- Cruz-Durán, R. y U. Rosas-López. (2016). La flor. En J. Márquez-Guzmán, M. Collazo-Ortega, M. Martínez-Gordillo, A. Orozco-Segovia, y S. Vázquez-Santana (Eds.), *Biología de las angiospermas* (pp. 109-110). Universidad Nacional Autónoma de México.
- D'Armas Regnault, H. T. (2015). *Evaluación de productos naturales orgánicos con posible actividad biológica, de las plantas medicinales Hierbaluisa (Lyppia citriodora, familia Verbenaceae) y Toronjil (Melissa officinalis, familia Labiatae)*. Universidad Técnica de Machala. Periodo de Vinculación: 18/02/2014 13/02/2015. <https://www.utmachala.edu.ec/archivos/planificacion/2014/prometeos/Dr.%20Haydelba%20D%C2%B4Armas/FIN%20VINCULACION%20Dra.%20D%20Armas/INFORME-FINAL-VINCULACION HTDA.pdf>
- Dafni, A. (1992). *Pollination Ecology: A practical approach*. Oxford University Press.
- De Brito, V. L. G., A. R. Rech, J. Ollerton y M. Sazima. (2017). Nectar production, reproductive success, and the evolution of generalised pollination within a specialised pollen-rewarding plant family: a case study using *Miconia theizans*. *Plant Systematics and Evolution*, 303(6), 709-718.

- <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1405-z>
- De Nettancourt, D. (1977). *Incompatibility in Angiosperms*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- De Vega, C., M. Arista, P. L. Ortiz, C. M. Herrera y S. Talavera. (2009). The ant-pollination system of *Cytinus hypocistis* (Cytinaceae), a Mediterranean root holoparasite. *Annals of Botany*, 103(7), 1065-1075.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcp049>
- De Vega, C., M. Arista, P. L. Ortiz y S. Talavera. (2010). Anatomical relations among endophytic holoparasitic angiosperms, autotrophic host plants and mycorrhizal fungi: A novel tripartite interaction. *American Journal of Botany*, 97(5), 730-737. <https://doi.org/10.3732/AJB.0900147>
- De Vega, C., C. M. Herrera y S. Dötterl. (2014). Floral volatiles play a key role in specialized ant pollination. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 16(1), 32-42. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2013.11.002>
- Detzel, A. y M. Wink. (1993). Attraction, deterrence, or intoxication of bees (*Apis mellifera*) by plant allelochemicals. *Chemoecology*, 4(1), 8-18.
<https://doi.org/10.1007/BF01245891>
- Domínguez, C. y J. R. Pérez-Ishiwara. (2016). La biología de la polinización. En J. Márquez-Guzmán, M. Collazo-Ortega, M. Martínez-Gordillo, A. Orozco-Segovia y S. Vázquez-Santana (Eds.), *Biología de angiospermas* (pp. 269-296). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Dytham, C. (2011). *Choosing and using statistics. A biologist's guide* (3ra ed.). Wiley-Blackwell.
- Ehlers, B. K. y J. M. Olesen. (1997). The fruit-wasp route to toxic nectar in *Epipactis* orchids? *Flora*, 192(3), 223-229.
[https://doi.org/10.1016/S0367-2530\(17\)30787-9](https://doi.org/10.1016/S0367-2530(17)30787-9)
- Fernández-Alonso, J. L. y H. Cuadros-Villalobos. (2012). *Sanguisuga*, a neotropical new genus of Cytinaceae and a South American connection in the family. *Caldasia*, 34(2), 291-308.
- Fleming, T.H., C. Geiselman y W. John Krees. (2009). The evolution of bat pollination: a filogenetic perspective. *Annals of Botany*, 104(6), 1017-1043.
- Gomes, V. G., Z. G. Quirino e I. C. Machado. (2014). Pollination and seed dispersal of *Melocactus ernestii* Vaupel subsp. *ernestii* (Cactaceae) by lizards: An example of double mutualism. *Plant Biology*, 16(2), 315-322.
<https://doi.org/10.1111/plb.12063>
- González-Teuber, M. y M. Heil. (2009). Nectar chemistry is tailored for both attraction of mutualists and protection from exploiters. *Plant Signaling and Behavior*, 4(9), 809-813. <https://doi.org/10.4161/psb.4.9.9393>
- González, F. y N. Pabón-Mora. (2014). *Pilostyles boyacensis*, A new species of

- Apodanthaceae (Cucurbitales) from Colombia. *Phytotaxa*, 178(2), 138–145. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.178.2.5>
- Goring, D., F. Cruz-García y V. Franklin-Tong. (2022). Self-Incompatibility, eLS, Vol. 3: 1–12. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0029513>
- Hagler, J. R. y S. L. Buchmann. (1993). Honeybee (Hymenoptera: Apidae) foraging responses to phenolic-rich nectars. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 66(2), 223–230. <http://www.jstor.org/stable/25085437>
- Heide-Jørgensen, H. S. (2008). *Parasitic flowering plants*. Brill.
- Heide-Jørgensen, H. S. (2013). Introduction. The parasitic syndrome in higher plants. En D. M. Joel, J. Gressel y L. J. Musselman (Eds.), *Parasitic Orobanchaceae. Parasitic mechanisms and control strategies* (pp. 1–18). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-38146-1>
- Hobbhahn, N. y S. D. Johnson. (2015). Sunbird pollination of the dioecious root parasite *Cytinus sanguineus* (Cytinaceae). *South African Journal of Botany*, 99, 138–143. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.04.003>
- Hojsgaard, D., S. Klatt, R. Baier, J. G. Carman. y E. Hörandl. (2014). Taxonomy and Biogeography of Apomixis in Angiosperms and Associated Biodiversity Characteristics. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33(5), 414–427. <https://doi.org/10.1080/07352689.2014.898488>
- Idárraga-Piedrahita, A. (2011). Mitrastemonaceae. En A. Idárraga-Piedrahita, R. del C. Ortiz, R. Callejas-Posada y M. Merello (Eds.), *Flora de Antioquia: Catálogo de las plantas vasculares Vol. II*. (pp. 629–631). Universidad de Antioquia, Missouri Botanical Garden y Oficina de planeación departamental de la gobernación de Antioquia, Editorial D’Vinni.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2005). Chiapas, Relieve sin nombres blanco y negro. Marco Geoestadístico Nacional. Recuperado de: <https://cuentame.inegi.org.mx/mapas/chiap.aspx?tema=M>
- Jakubská-Busse, A., D. Prządło, M. Steininger, J. Anioł-Kwiatkowska y M. Kadej. (2005). Why do pollinators become “sluggish”? Nectar chemical constituents from *Epipactis helleborine* (L.) crantz (Orchidaceae). *Applied Ecology and Environmental Research*, 3(2), 29–38. https://doi.org/10.15666/aeer/0302_029038
- Jiménez-Durán, K. y F. Cruz-García. (2011). Incompatibilidad sexual, un mecanismo genético que evita la autofecundación y contribuye a la diversidad vegetal. *Revista Fitotécnica Mexicana*, 34(1), 1–9. <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/34-1/1a.pdf>
- Johnson, S. D., P. M. Burgoyne, L. D. Harder y S. Dötterl. (2011). Mammal pollinators lured by the scent of a parasitic plant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1716), 2303–2310.

- <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2175>
- Lloyd, D. G. y D. J. Schoen. (1992). Self and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Developmental Biology*, 153(3), 358-369. <https://doi.org/10.1086/297040>
- Lloyd, D. G. y C. J. Webb. (1986). The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms I. Dichogamy. *New Zealand Journal of Botany*, 24(1), 135-162. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1986.10409725>
- Mandujano, M. C., I. G. Carrillo-Angeles, C. Martínez-Peralta y J. Golubov. (2010). Reproductive Biology of Cactaceae. En K. G. Ramawat (Ed.), *Desert Plants: Biology and Biotechnology* (pp. 197-230). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-02550-1>
- Márquez-Guzmán, J., R. Wong, L. López y G. Murguía. (2016). *Técnicas de laboratorio para el estudio del desarrollo en angiospermas*. Las prensas de Ciencias.
- Matuda, E. (1947). On the Genus *Mitrastemon*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 74(2), 133-141. <https://doi.org/10.2307/2481465>
- Meijer, W. (1997). Rafflesiaceae. En P. C. Van Welzen (Ed.), *Flora Malesiana-Series 1, Spermatophyta* (Vol. 13, pp. 1-42). Rijksherbarium. <https://doi.org/10.2307/3994491>
- Meijer, W. y J. F. Veldkamp. (1993). A revision of *Mitrastema* (Rafflesiaceae). *Blumea: Journal of Plant Taxonomy and Plant Geography*, 38(1), 221-229. <https://doi.org/10.1016/J.COSE.2017.01.010>
- Mir, A., K. Upadhaya y C. G. Khonglah. (2016). A note on *Mitrastemon yamamotoi* (Mitrastemonaceae): A root parasite of rare occurrence in Northeast India. *Journal of Japanese Botany*, 91(3), 179-183.
- Nagamitsu, T. y T. Inoue. (1997). Cockroach pollination and breeding system of *Uvaria elmeri* (Annonaceae) in a Lowland mixed-dipterocarp forest in Sarawak. *American Journal of Botany*, 84(2), 208-213. <https://doi.org/10.2307/2446082>
- Nickrent, D. L. y L. J. Musselman. (2004). Introduction to Parasitic Flowering Plants. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/DOI:10.1094/PHI-I-2004-0330-01>
- Nickrent, D. L. (2020). Parasitic angiosperms: How often and how many? *Taxon*, 69(1), 5-27. <https://doi.org/10.1002/tax.12195>
- Nickrent, D. L., A. Blarer, Y. L. Qiu, R. Vidal-Russell y F. E. Anderson. (2004). Phylogenetic inference in Rafflesiales: The influence of rate heterogeneity and horizontal gene transfer. *BMC Evolutionary Biology*, 4(40), 1-17. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-4-40>
- Nickrent, D. L. (2007). Cytinaceae are sister to Muntingiaceae (Malvales). *Taxon*,

- 56(4), 1129–1135. <https://doi.org/10.2307/25065907>
- Nicolson, S. W. y R. W. Thornburg. (2007). Nectar chemistry. En S. W. Nicolson, M. Nepi y E. Pacini (Eds.), *Nectaries and Nectar* (pp. 215–264). Springer.
- NIST Mass Spectrometry Data Center. (2017). NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST 17) and NIST Mass Spectral Search Program (Version 2.3). <https://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=chemdata:nistlibs>
- Ollerton, J., R. Winfree y S. Tarrant. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120(3), 321–326. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>
- Orozco-Arroyo, G. y S. Vázquez-Santana. (2016). Sistemas de reproducción sexual. En J. Márquez-Guzmán, M. Collazo-Ortega, M. Martínez-Gordillo, A. Orozco-Segovia y S. Vázquez-Santana (Eds.), *Biología de angiospermas* (pp. 219–232). Las prensas de Ciencias.
- Ortega-González, P. F., S. Rios-Carrasco, C. A. González-Martínez, N. Bonilla-Cruz, y S. Vázquez-Santana. (2020). *Pilostyles maya*, a novel species from Mexico and the first cleistogamous species in Apodanthaceae (Cucurbitales). *Phytotaxa*, 440(4), 255–267. <https://doi.org/10.11646/PHYTOTAXA.440.4.1>
- Ortega-González, P. F., S. Rios-Carrasco, M. C. Mandujano, D. Sánchez y S. Vázquez-Santana. (2022). Reproductive aspects and pollination biology in endoparasitic *Pilostyles thurberi* (Apodanthaceae). *Plant Species Biology*, 1–14. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12395>
- Pacini, E. y S. W. Nicolson. (2007). Introduction. En S. W. Nicolson, M. Nepi y E. Pacini (Eds.), *Nectaries and Nectar* (pp. 1–18). Springer.
- Parker, C. (2013). The parasitic weeds of the Orobanchaceae. En D. M. Joel, J. Gressel y L. J. Musselman (Eds.), *Parasitic Orobanchaceae* (pp. 313–344). Springer-Verlag.
- Patiño, S., J. Grace y H. Bänziger. (2000). Endothermy by flowers of *Rhizanthus lowii* (Rafflesiaceae). *Springer*, 124(2), 149–155.
- Press, M. C. y G. K Phoenix. (2005). Impacts of parasitic plants on natural communities. *New Phytologist*, 166(3), 737–751. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.2005.01358.X>
- R CoreTeam (2021). *R: A language and environment for statistical computing* (Version 4.1.2). R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Raguso, R. A. (2004). Why are some floral nectars scented? *Ecology*, 85(6), 1486–1494. <https://doi.org/10.1890/03-0410>
- Ramawat, K. G., J. M. Mérillon y K. R. Shivanna. (2014). *Reproductive Biology of Plants*. CRC Press. https://doi.org/10.1007/978-3-642-50133-3_1
- Rea, A. C. y J. B. Nasrallah. (2008). Self-incompatibility systems: Barriers to self-

- fertilization in flowering plants. *International Journal of Developmental Biology*, 52(5-6), 627-636. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072537ar>
- Rios-Carrasco, S. (2022). *Biología de la polinización y embriología del género Bdallophytum (Cytinaceae)*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, CDMX. 157 pp.
- Rios-Carrasco, S., L. de Jesús-Celestino, P. F. Ortega-González, M. C. Mandujano, F. Hernández-Najarro y S. Vázquez-Santana. (2021). The pollination of the gynomonoecious *Bdallophytum oxylepis* (Cytinaceae, Malvales). *Plant Species Biology*, 37(1), 66-77. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12354>
- Rios-Carrasco, S., C. A. González-Martínez y S. Vázquez-Santana. (2022). Floral visitors of the holoparasite *Bdallophytum andrieuxii* Eichler: A new report of brood-site pollination and thermogenesis for Cytinaceae (Malvales). *Revista Brasileira de Botânica*, 45(3), 1047-1055. <https://doi.org/10.1007/s40415-022-00816-1>
- Rios-Carrasco, S. y S. Vázquez-Santana. (2021). Comparative morphology and ontogenetic patterns of *Bdallophytum* species (Cytinaceae, malvales): Insight into the biology of an endoparasitic genus. *Botany*, 99(4), 221-238. <https://doi.org/10.1139/cjb-2020-0025>
- Rivera-Reyes, A. (datos no publicados). Endoparasitismo de *Mitrastemon matudae* (Mitrastemonaceae): un estudio sobre la interacción con su hospedero, su prevalencia y distribución. Tesis de licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX.
- Romero-Gutiérrez, R. D. (datos no publicados). Morfología floral y embriología de la holoparásita *Mitrastemon matudae* Yamam. (Mitrastemonaceae). Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (Sistemática). Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX.
- Rubiales, D., J. Verkleij, M. Vurro, A. J. Murdoch, y D. M. Joel. (2009). Parasitic plant management in sustainable agriculture. En *Weed Research* (Vol. 49, Issue SUPPL. 1, pp. 1-5). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2009.00741.x>
- Rubiales, D. y H. S. Heide-Jørgensen. (2011). Parasitic plants. En *Encyclopedia of Life Sciences* (p. 9). John Wiley & Sons, Ltd.
- Ruiz-López, R. (2010). *Estimación y actualización al 2009 de la tasa de transformación del hábitat de las Áreas Naturales Protegidas SINAP I y SINAP II del FANP. Reserva de la Biósfera la Sepultura*. Fondo Mexicano para la Conservación de la Naturaleza A.C. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.
- Shivanna, K. R. (2014). Biotic pollination: How plants achieve conflicting demands

- of attraction and restriction of potential pollinators. En K. G. Ramawat, J. M. Mérillon y K. R. Shivanna (Eds.), *Reproductive biology of plants* (pp. 218-267). CRC Press.
- Shivanna, K. R. y R. Tandon. (2014). Pollination Ecology. En K. R. Shivanna y R. Tandon (Eds.), *Reproductive ecology of flowering plants: A manual* (pp. 63-96). Springer.
- Shivanna, K. R. y R. Tandon. (2014). Seed dispersal. En K. R. Shivanna y R. Tandon (Eds.), *Reproductive ecology of flowering plants: A manual* (pp. 135-143). Springer.
- Steyermark, J. A. (1950). Flora of Guatemala. *Ecology*, 31(3), 368-372.
<https://doi.org/10.2307/1931491>
- Suetsugu, K. (2018). Social wasps, crickets and cockroaches contribute to pollination of the holoparasitic plant *Mitrastemon yamamotoi* (Mitrastemonaceae) in southern Japan. *Plant Biology*, 21(1), 176-182.
<https://doi.org/10.1111/plb.12889>
- Tandon, R., K. R. Shivanna y H. Y. Mohan Ram. (2003). Reproductive Biology of *Butea monosperma* (Fabaceae). *Annals of Botany*, 92(5), 715-723.
<https://doi.org/10.1093/AOB/MCG193>
- Teixeira-Costa, L. y C. C. Davis. (2021). Life history, diversity, and distribution in parasitic flowering plants. *Plant Physiology*, 187(1), 32-51.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiab279>
- Teixeira-Costa, L. y K. Suetsugu. (2022). Neglected plant parasites: Mitrastemonaceae. *Plants People Planet*, 1-9.
<https://doi.org/10.1002/ppp3.10322>
- Těšitel, J. (2016). Functional biology of parasitic plants: A review. *Plant Ecology and Evolution*, 149(1), 5-20. <https://doi.org/10.5091/plecevo.2016.1097>
- Těšitel, J., A. R. Li, K. Knotková, R. McLellan, P. C. Bandaranayake y D. M. Watson. (2021). The bright side of parasitic plants: what are they good for? *Plant Physiology*, 185(4), 1309-1324. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab069>
- Vega-Avila, E., R. Tapia-Aguilar, R. Reyes-Chilpa, S. L. Guzmán-Gutiérrez, J. Pérez-Flores y R. Velasco-Lezama. (2012). Actividad antibacteriana y antifúngica de *Justicia spicigera*. *Revista Latinoamericana de Química*, 40(2), 75-82.
- Vislobokov, N. A. y T. V. Galinskaya. (2018). Pollination ecology of two co-occurring species of *Balanophora*: Differences in range of visitors and pollinators. *International Journal of Plant Sciences*, 179(5), 341-349.
<https://doi.org/10.1086/697320>
- Watanabe, K. (1936a). Morphologisch-biologische Studien über die Gattung *Mitrastemon* (IV). *The Journal of Japanese Botany*, 12(12), 848-858.
- Watanabe, K. (1936b). On a new genus of Cytinaceae. *Shokubutsugaku Zasshi*,

50(600), 676-680.

- Watson, D. M. (2001). Mistletoe. A keystone resource in forests and woodlands worldwide. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32, 219-249. <https://www.jstor.org/stable/2678640>
- Webb, C. J. y D. G. Lloyd. (1986). The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. *New Zealand Journal of Botany*, 24(1), 163-178. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1986.10409726>
- Wolf, J. H. D. y S. A. Flamenco. (2003). Patterns in species richness and distribution of vascular epiphytes in Chiapas, Mexico. *Journal of Biogeography*, 30(11), 1689-1707. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2003.00902.x>
- Zettler, J. A., T. P. Spira y C. R. Allen. (2001). Yellow jackets (*Vespula* spp.) disperse *Trillium* spp. seeds in Eastern North America. *American Midland Naturalist*, 146(2), 444-446. [https://doi.org/10.1674/0003-0031\(2001\)146](https://doi.org/10.1674/0003-0031(2001)146)
- Zhang, X., K. Chingin, D. Zhong, L. Luo, V. Frankevich y H. Chen. (2018). Deciphering the chemical origin of the semen-like floral scents in three angiosperm plants. *Phytochemistry*, 145, 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.11.001>

Anexo I. Resultados de las pruebas estadísticas para determinar el sistema de cruce

Promedio de semillas por fruto de los tratamientos de polinización

	Control	Entrecruza manual	Autocruza natural	Autocruza manual	Apomixis
Promedio semillas por fruto	18,979.44	19,230	20,076.25	27,946.25	0
Desviación estándar (DE)	8316.23	11469.82	9422.36	4692.83	0

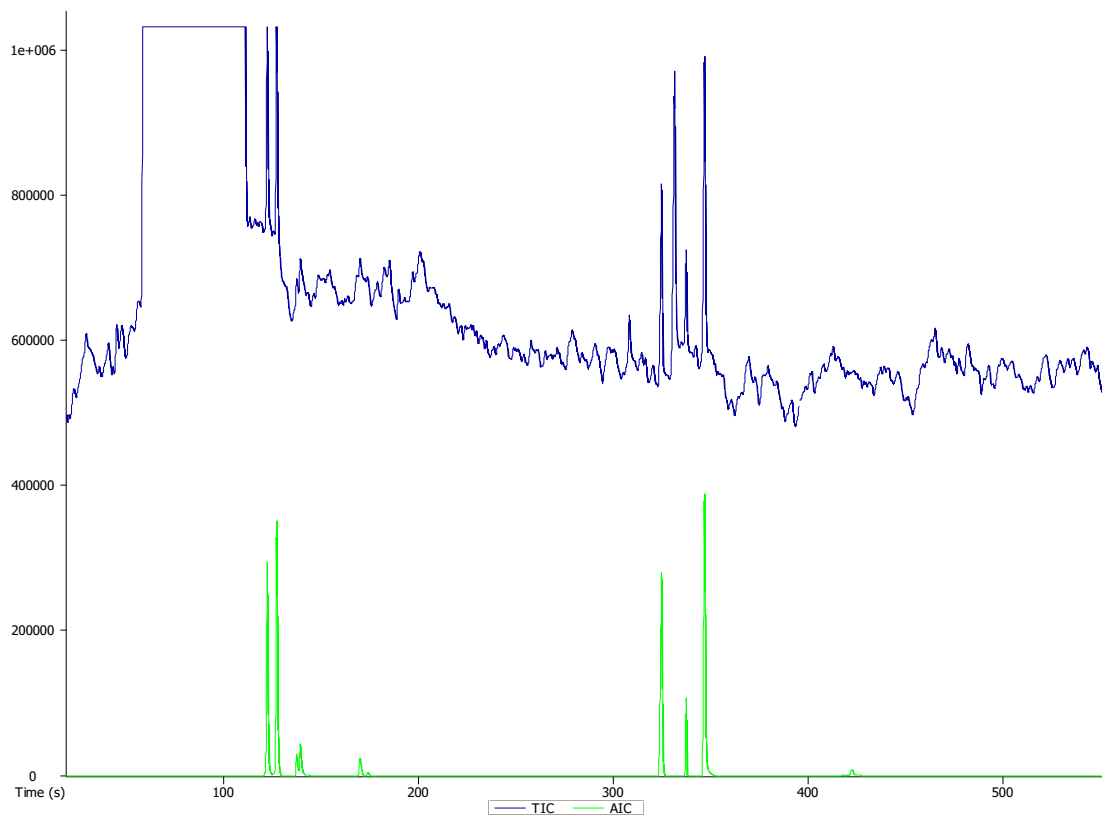
Comparaciones múltiples de Tukey

Resultados estadísticos de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Se muestra el valor z y el valor p. T, Testigo (n = 9); EM, Entrecruza manual (n = 9); AN, Autocruza natural (n = 4); AM, Autocruza manual (n = 4).

Tratamientos comparados	Valor z	Valor p
AM - T	100.577	$< 1 \times 10^{-4}$
AN - T	13.131	$< 1 \times 10^{-4}$
EM - T	3.845	0.000639
AN - AM	-71.500	$< 1 \times 10^{-4}$
EM - AM	-97.419	$< 1 \times 10^{-4}$
EM - AN	-10.086	$< 1 \times 10^{-4}$

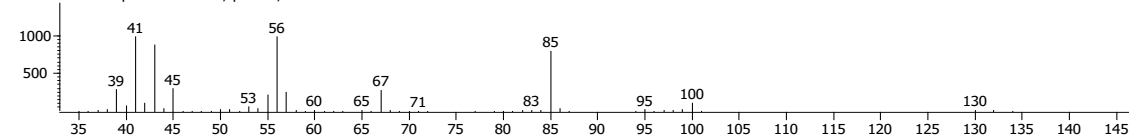
Anexo II. Cromatogramas de los compuestos orgánicos del néctar

Néctar diluido + hexano

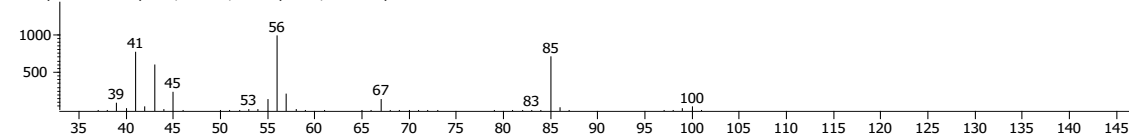


Pico 1

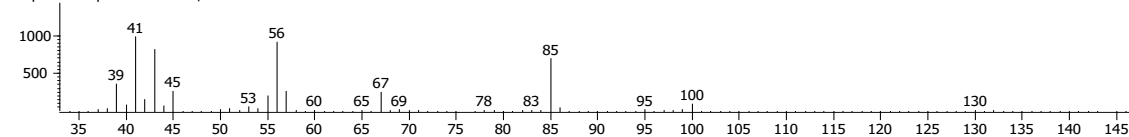
Peak True - sample "NEM102:1", peak 1, at 122.225 s



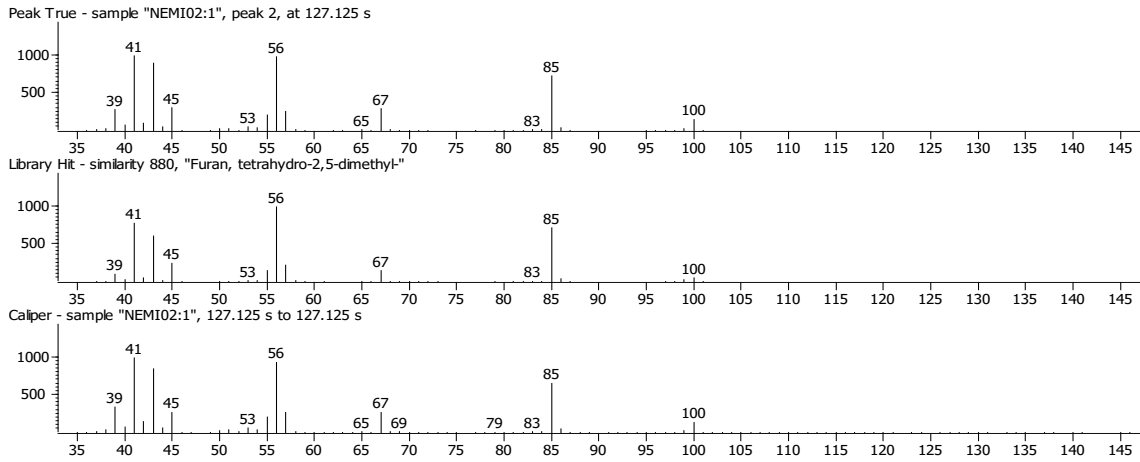
Library Hit - similarity 893, "Furan, tetrahydro-2,5-dimethyl-"



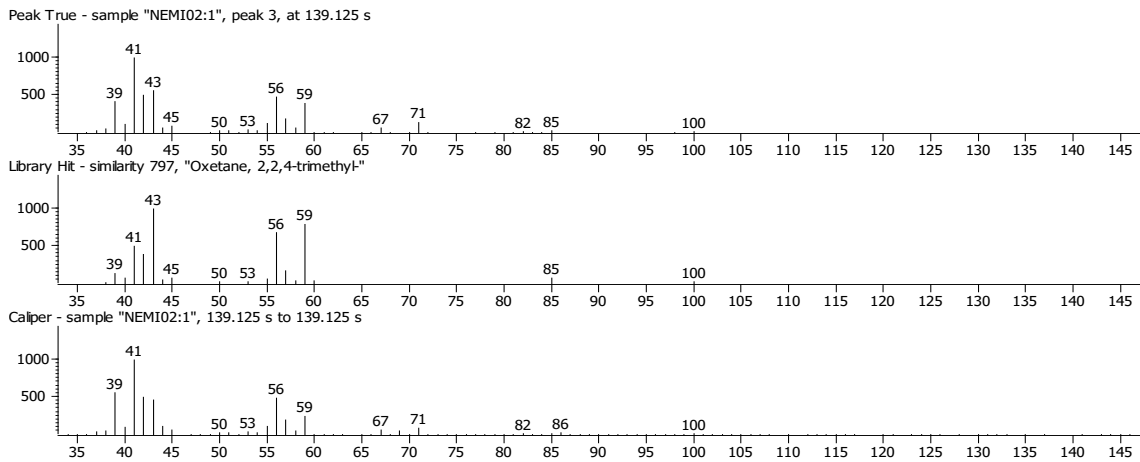
Caliper - sample "NEM102:1", 122.225 s to 122.225 s



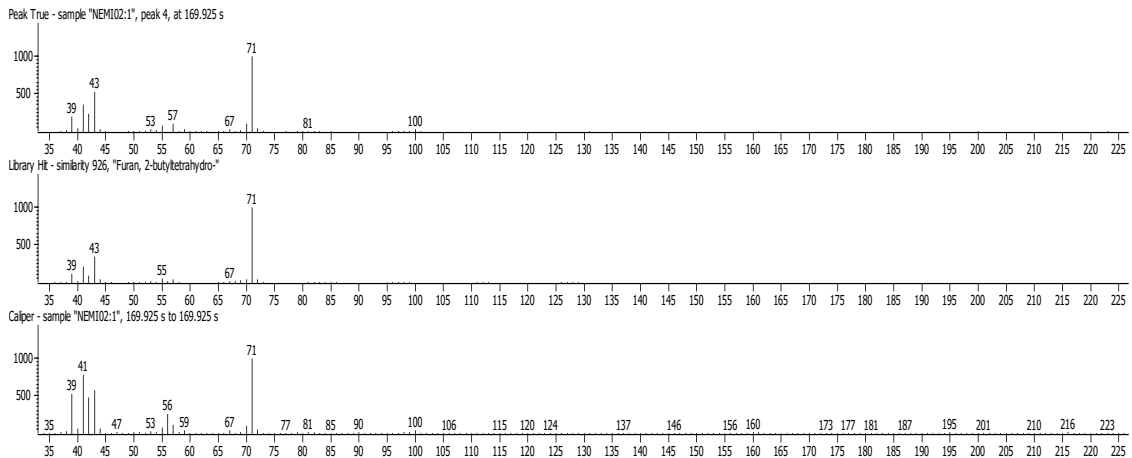
Pico 2



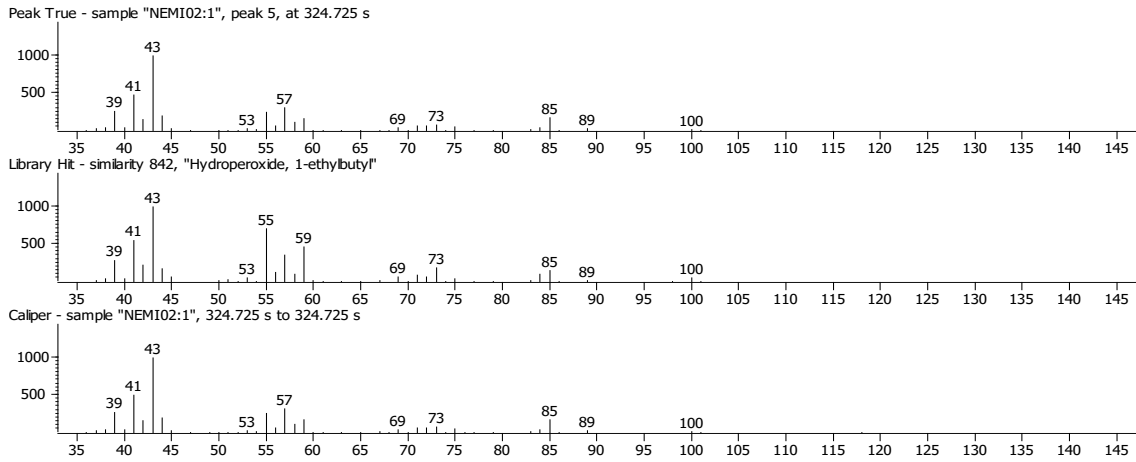
Pico 3



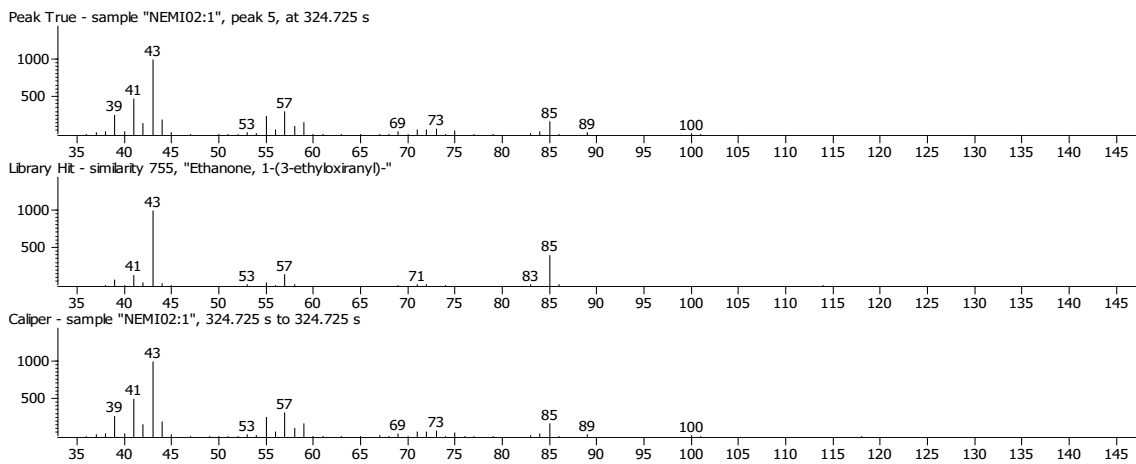
Pico 4



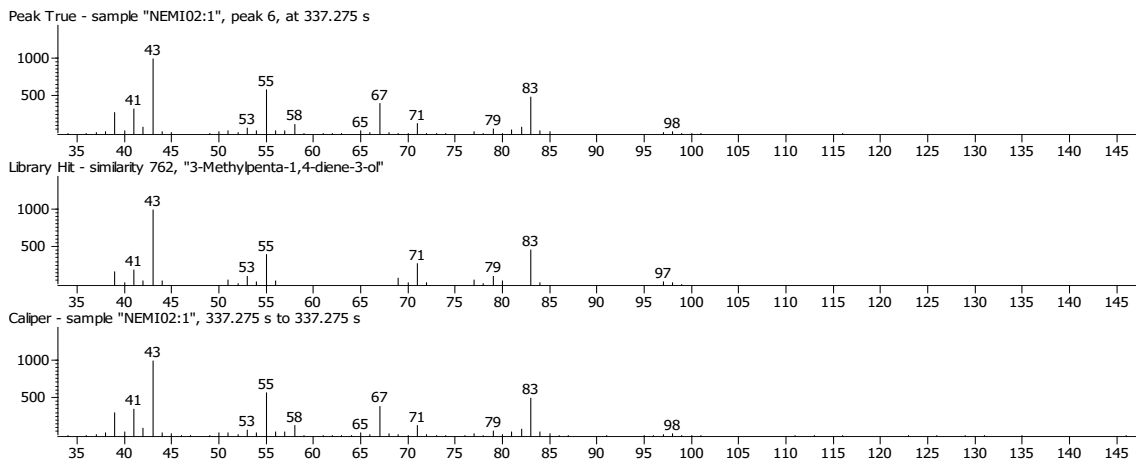
Pico 5.1



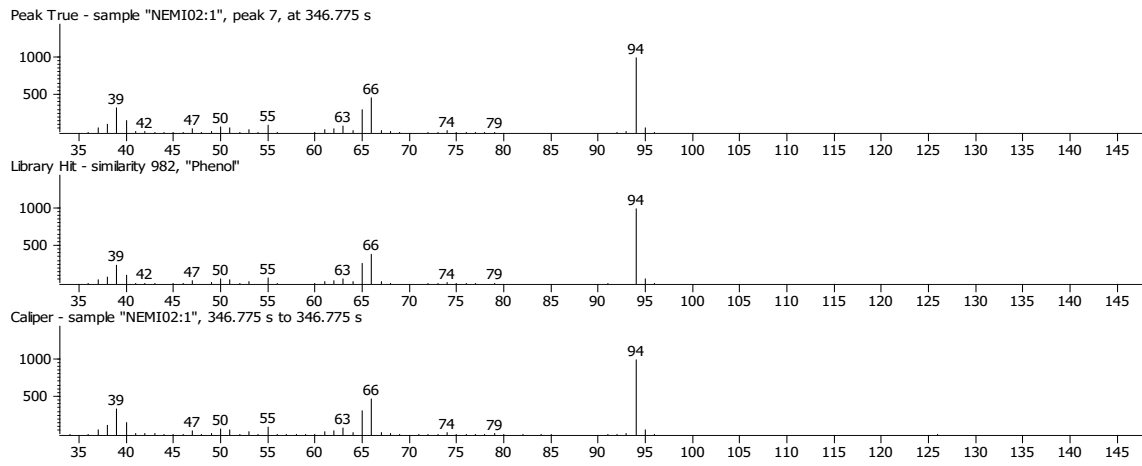
Pico 5.2



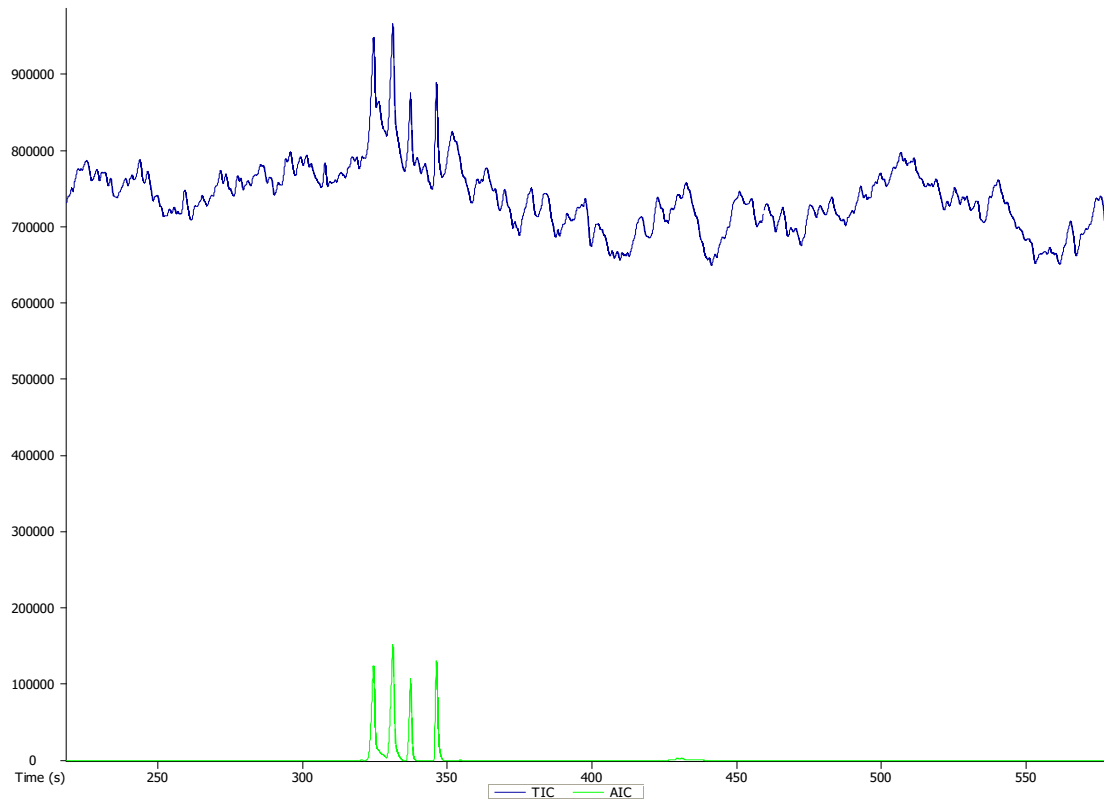
Pico 6



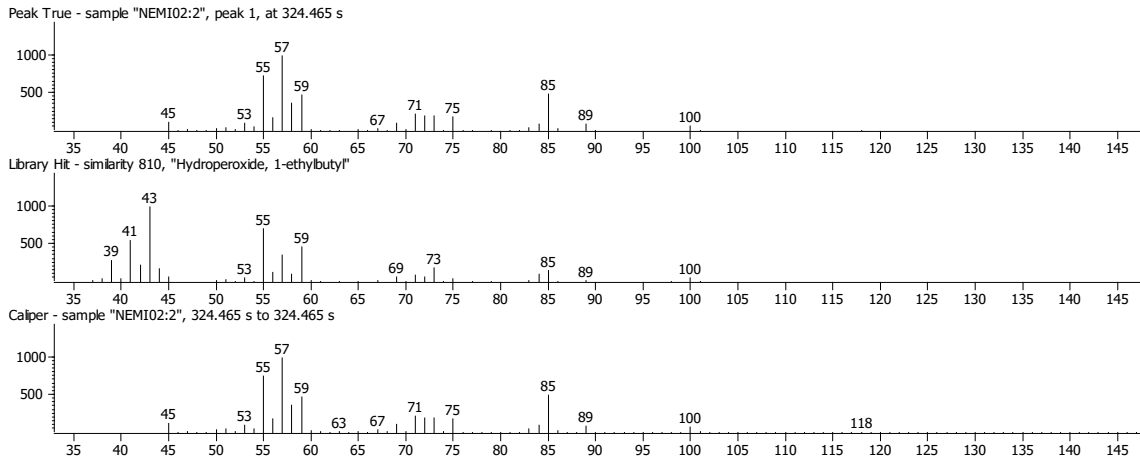
Pico 7



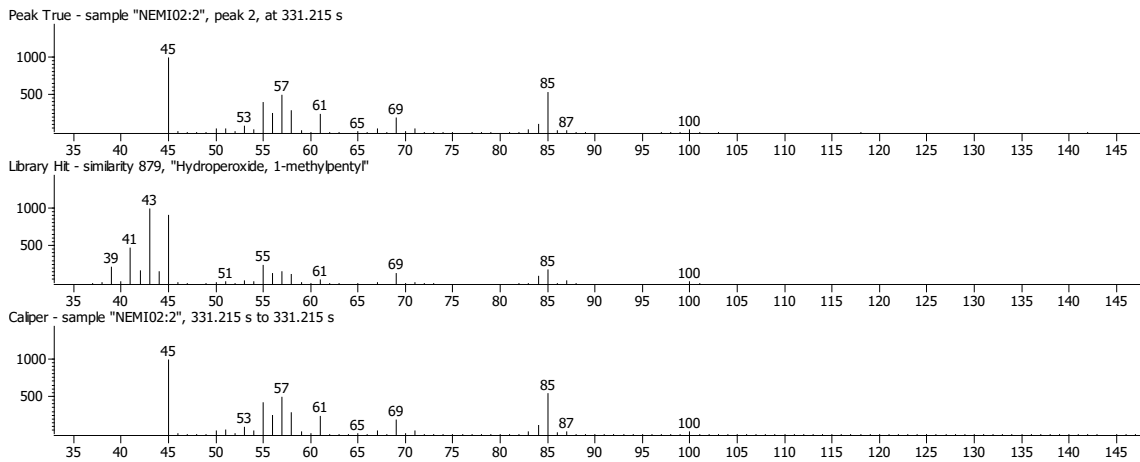
Néctar puro + hexano



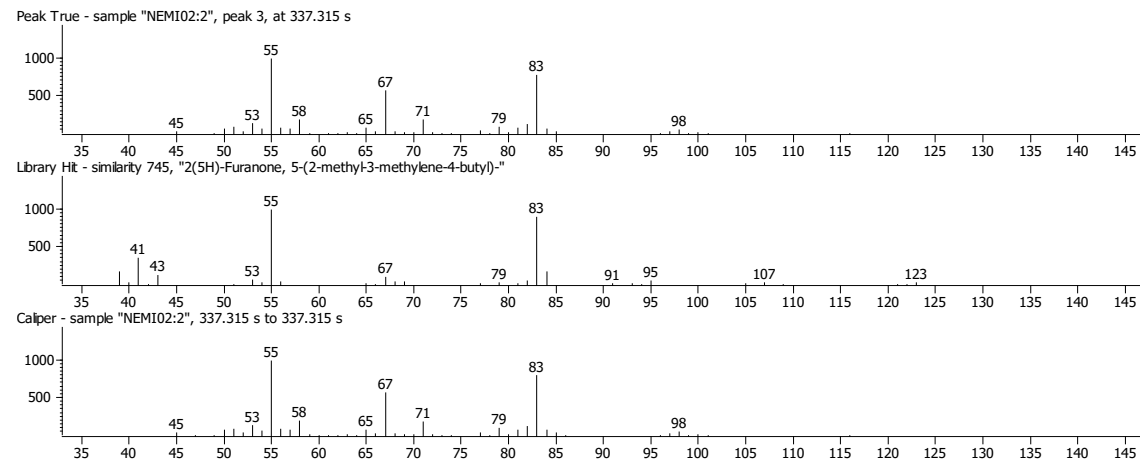
Pico 1



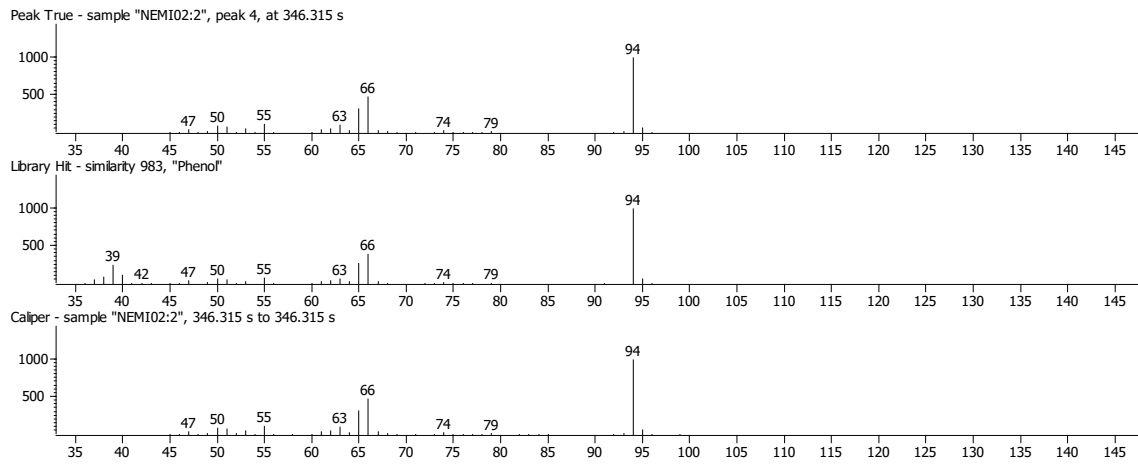
Pico 2



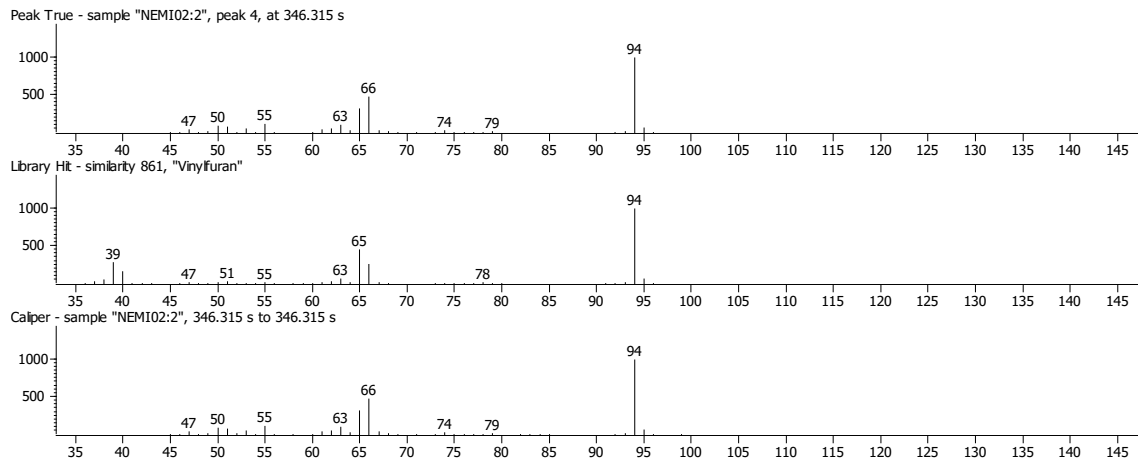
Pico 3



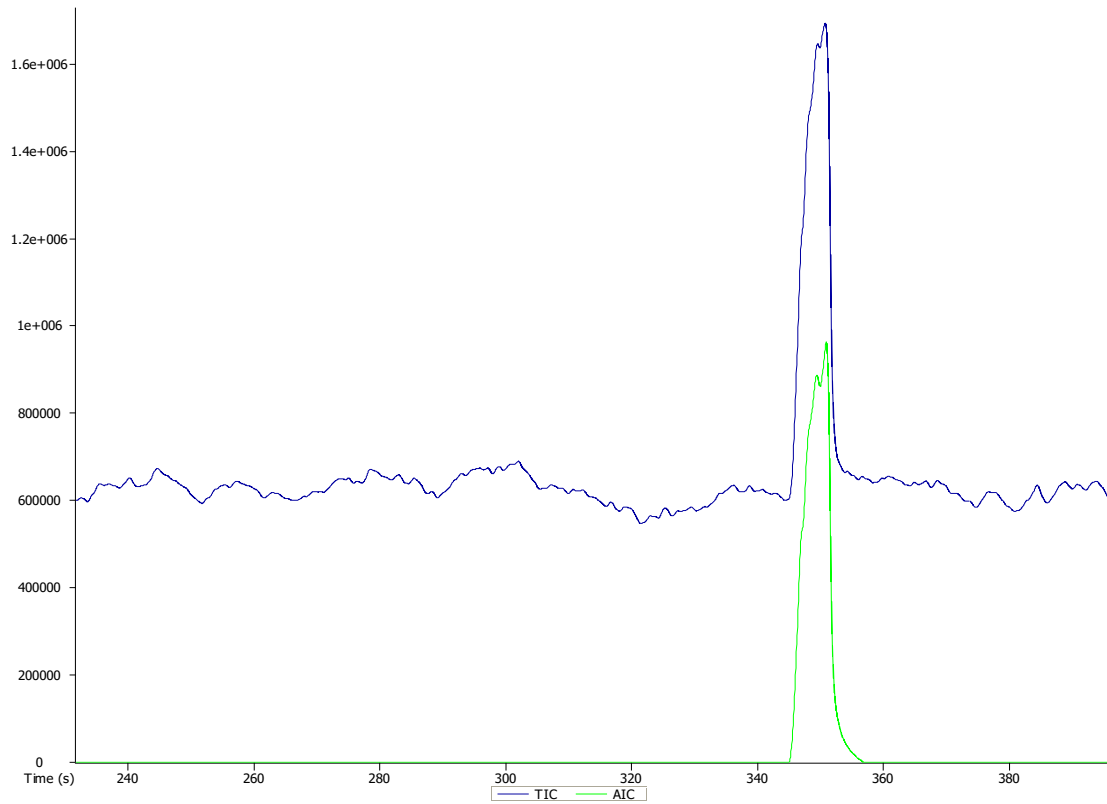
Pico 4.1



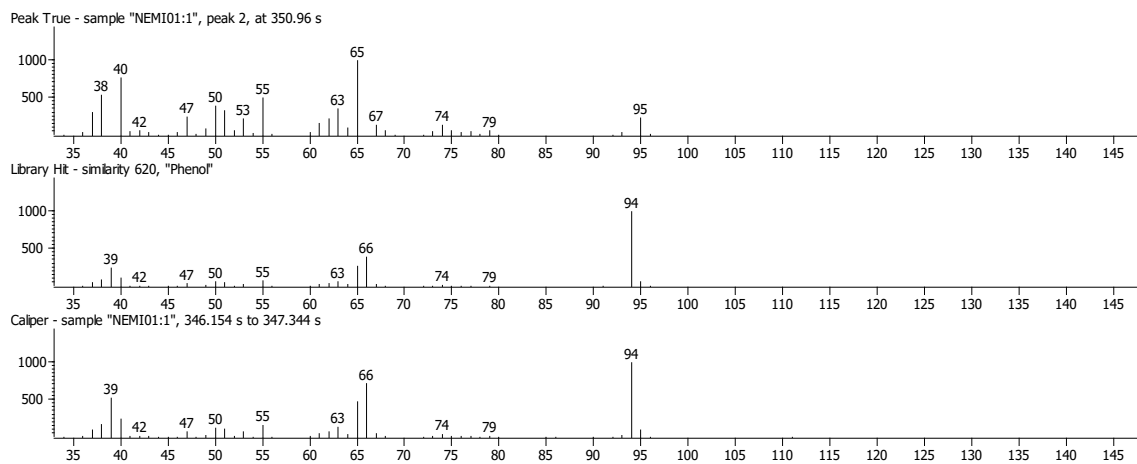
Pico 4.2



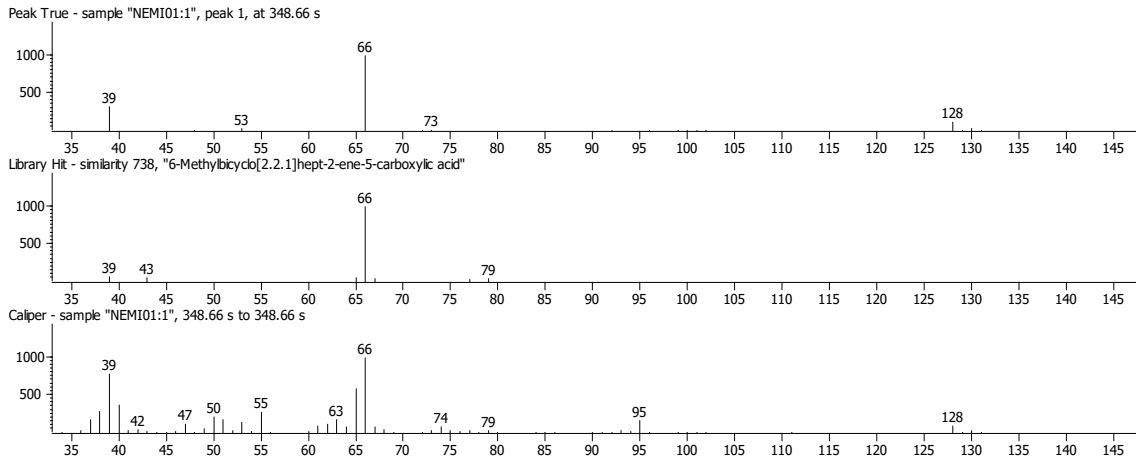
Microextracción en fase sólida (SPME)



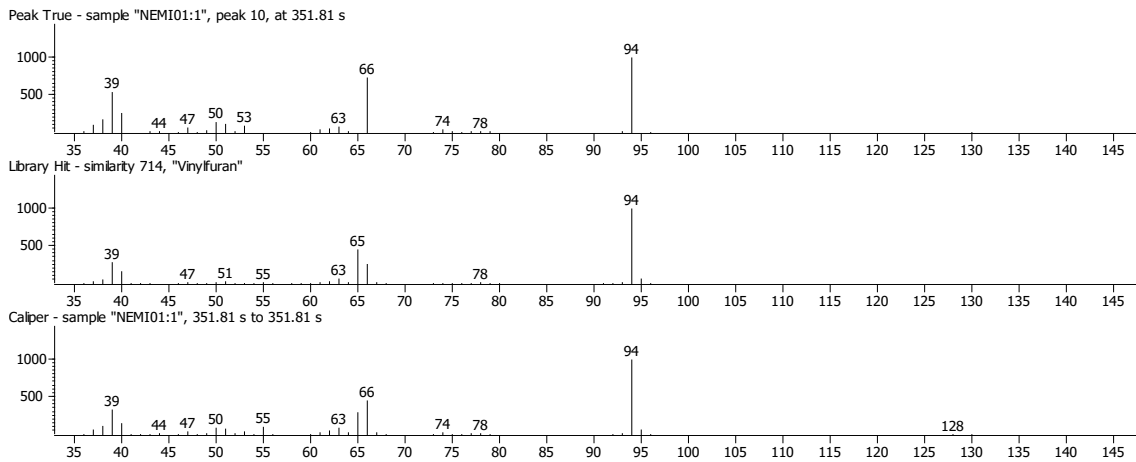
Pico 1



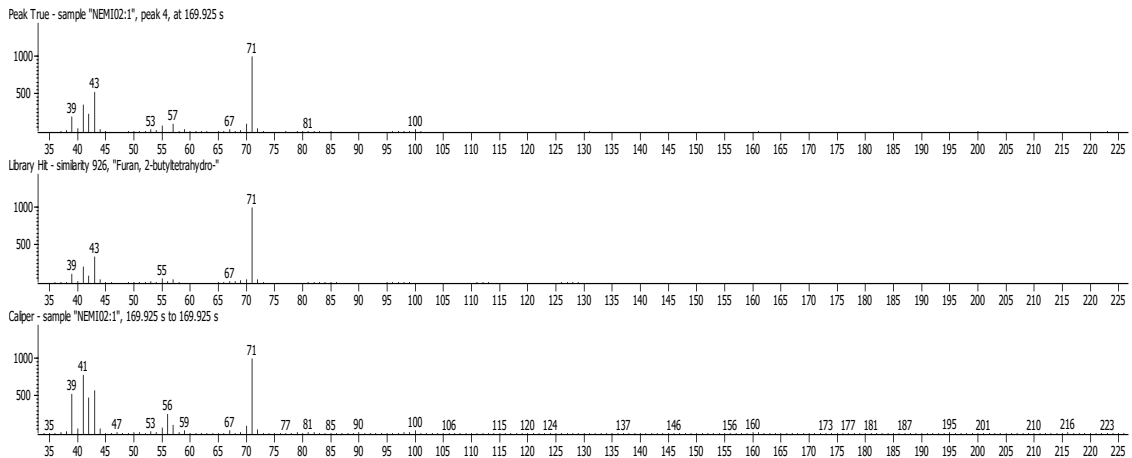
Pico 2



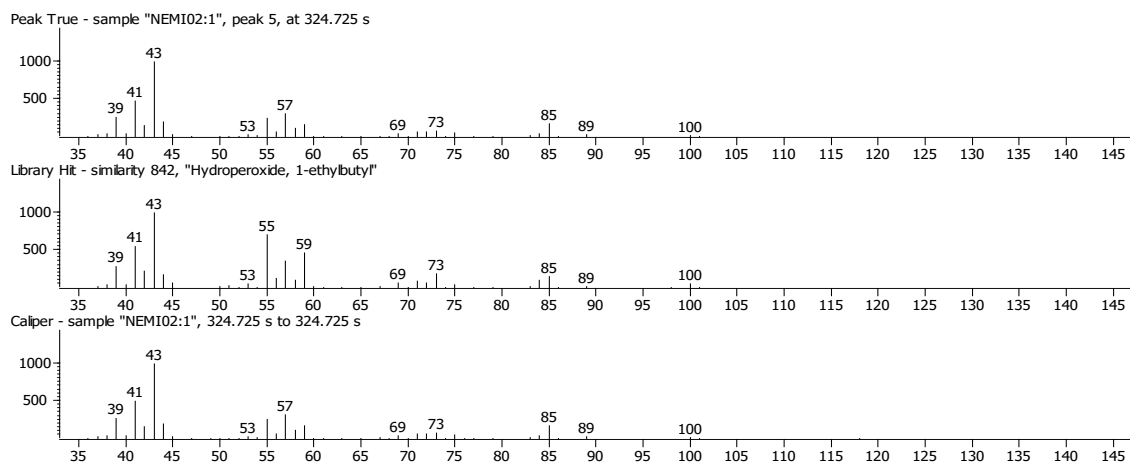
Pico 3



Pico 4



Pico 5.1



Pico 5.2

