



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
INSTITUTO DE CIENCIAS AMBIENTALES Y
ECOLÓGICAS
POSTGRADO EN ECOLOGÍA TROPICAL



DIESTILIA Y ECOLOGÍA DE LA POLINIZACIÓN DE *Palicourea demissa*
Standl. (RUBIACEAE) EN UNA SELVA NUBLADA DE LOS ANDES
VENEZOLANOS

Trabajo de grado para optar al título de Magister Scientiae en Ecología Tropical.

Estudiante:

Biólogo, HAMLETH VALOIS CUESTA

Tutor:

Dr. PASCUAL J. SORIANO

Universidad de Los Andes (Mérida – Venezuela)

Cotutor:

Dr. JUAN FRANCISCO ORNELAS

Instituto de Ecología A. C (Xalapa – México)

Mérida, Noviembre de 2008

PRESENTACIÓN

Las especies diestílicas se caracterizan por presentar poblaciones con dos morfos florales que exhiben hercogamia recíproca y generalmente son autoincompatibles. Estos dos atributos (polimorfismo y autoincompatibilidad) de la diestilia se han interpretado como mecanismos independientes que favorecen la fertilización cruzada. Sin embargo, dado que la transferencia de polen en estas especies depende en gran medida de la actividad de forrajeo de animales generalmente nectarívoros, es razonable pensar que variaciones morfo-específicas en la producción de néctar puedan afectar el éxito de polinización en estas especies. En el presente trabajo abordamos estas hipótesis desde un enfoque observacional y experimental usando como modelo de estudio a la especie *Palicourea demissa* Standl. (Rubiaceae), un arbusto diestílico que constituye un recurso alimenticio para varias especies de aves nectarívoras y frugívoras en selvas nubladas de Los Andes venezolanos. Hemos partido de la premisa de que si la diestilia en esta especie promueve una eficiente fertilización cruzada, entonces *i*) polinizaciones intramórficas deben ser inviables y por otra parte, la posición de anteras y estigmas entre morfos debe ser altamente recíproca. Como consecuencia de ello, *ii*) el flujo de polen debe ser predominantemente intermorfo. Adicionalmente, si variaciones en la oferta de néctar afectan drásticamente el comportamiento de los polinizadores, entonces *iii*) en *P. demissa* los patrones de producción y oferta de néctar deben ser independientes del morfo floral y, en consecuencia, los morfos florales deberán experimentar tasas de visita y de deposición de polen similares. Los resultados y nuestros comentarios sobre la evaluación de estas hipótesis se muestran a continuación en tres capítulos sucesivos estructurados a manera de artículo científico.

VEREDICTO

Quienes suscriben, integrantes del jurado designado por el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad de los Andes para conocer y emitir veredicto sobre el **Trabajo de Grado de Maestría** presentado por **Hamleth Valois Cuesta**, realizada bajo la tutoría del Dr. **Pascual Soriano** y presentada como requisito para optar al título de **Magister Scientiae en Ecología Tropical** que se titula:

“Diestia y Ecología de la Polinización de *Palicourea demissa Standl.* (RUBIACEAE) en una Selva Nublada de los Andes Venezolanos”

Hacen constar lo siguiente:

PRIMERO: que hoy 25 de noviembre de 2008 a las 3:00 p.m., nos constituimos como jurado en el salón de reuniones del Postgrado en Ecología Tropical, siendo el Presidente del Jurado el Dr. Pascual Soriano. **SEGUNDO:** a continuación procedimos a discutir si se lleva a cabo su defensa pública. Luego de considerar las observaciones críticas de cada miembro del jurado, acordamos por unanimidad autorizar su presentación. **TERCERO:** A las 4:00 p.m. de este mismo día, se dio curso al Acto Público de sustentación del Trabajo de Grado de Maestría presentada a requerimiento del jurado en el Salón A-08 de la Facultad de Ciencias. **CUARTO:** Una vez concluida la sustentación correspondiente, el jurado interrogó al aspirante sobre los diversos aspectos a que el Trabajo se refiere. **QUINTO:** Seguidamente el Presidente del Jurado invitó al público asistente a formular preguntas y observaciones sobre el Trabajo presentado. **SEXTO:** Una vez concluido el acto de presentación y discusión, el jurado procedió a su deliberación final y decidió aprobar el Trabajo de Grado de Maestría con mención Honorífica.

Dr. Pascual J. Soriano
Tutor



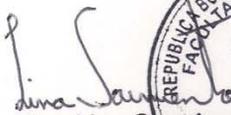
Dr. Javier Estrada
Jurado

Dr. Carlos García Núñez
Jurado

CONSTANCIA

Quien suscribe Coordinadora del Postgrado en Ecología Tropical de la Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, por medio de la presente hace constar que **Hamleth Valois Cuesta**, portador de la Cédula de Ciudadanía Colombiana N° 11.807.170, aprobó con **MENCIÓN HONORÍFICA** su Trabajo de Grado de Maestría titulado: **Diestilia y Ecología de la Polinización de *Palicourea demissa* Standl. (Rubiaceae) en una Selva Nublada de Los Andes Venezolanos**, el día 25 de noviembre de 2008.

En la ciudad de Mérida a los veintiocho (28) días del mes de noviembre de 2008.


Dra. Lina Sarmiento
Coordinadora del Postgrado en
Ecología Tropical



LS/ Nancy Garrido
c.c archivo
28-11-08



POSTGRADO EN ECOLOGÍA TROPICAL
Instituto de Ciencias Ambientales y Ecológicas

Núcleo "Pedro Rincón Gutiérrez", Edificio "A", La Hechicera, Mérida 5101 - República Bolivariana de Venezuela
Telefax: (58 - 274) 240 1255 / 240 1219 / 244 1575 - Web: www.web.ula.ve/ciencias/webicae Correo_e: icae@ula.ve

***Dedicada a mi hijo Fabio Hams
por ser el motor de mis inspiraciones,
a mi esposa Heidy y a mis padres
por su apoyo incondicional***

CONTENIDO

	Pag.
Presentación	v
Capítulo 1.	
Dimorfismos e incompatibilidad en <i>Palicourea demissa</i> (Rubiaceae), una especie diestílica de selvas nubladas en Venezuela.	
Resumen	1
1. Introducción	2
2. Materiales y métodos	4
2.1. Área de estudio	4
2.2. Especie estudiada	5
2.3. Características florales asociadas a la función de la diestilia	5
2.4. Morfometría y producción de polen.....	7
2.5. Características morfo-específicas de frutos y semillas	8
2.6. Sistema reproductivo	9
2.7. Análisis de datos	10
3. Resultados	10
3.1. Características florales asociadas a la función de la diestilia	10
3.2. Relaciones morfo-específicas entre atributos florales	11
3.3. Características morfo-específicas de frutos y semillas	13
3.4. Sistema reproductivo	13
4. Discusión	15
4.1. Características florales asociadas a la función de la diestilia	15
4.2. Dimorfismo en frutos y semillas	22
4.3. Sistema reproductivo	24

Capítulo 2.

Flujo de polen y producción de frutos entre morfos florales de *Palicourea demissa* (Rubiaceae) en una selva nublada venezolana

Resumen	26
1. Introducción	27
2. Materiales y métodos	29
2.1. Área de estudio	29
2.2. Especie estudiada	29
2.3. Disposición espacial de los morfos en la población	30
2.4. Auto-deposición espontánea de polen	30
2.5. Patrones naturales de deposición de polen	31
2.6. Producción de frutos y semillas bajo condiciones naturales	32
2.7. Expresión de la función sexual entre los morfos florales	33
2.8. Análisis de datos	36
3. Resultados	37
3.1. Disposición espacial de los morfos en la población	37
3.2. Auto-deposición espontánea de polen	37
3.3. Patrones naturales de deposición de polen y producción de frutos	37
3.4. Expresión de la función sexual de los morfos	42
4. Discusión	44
4.1. Disposición espacial de los morfos en la población	44
4.2. Auto-deposición espontánea de polen	44
4.3. Expresión sexual de los morfos florales de <i>P. demissa</i>	45

Capítulo 3.

Producción de néctar en flores brevistiladas y longistiladas de *Palicourea demissa* (Rubiaceae): implicaciones sobre la tasa de visita y polinización.

Resumen	52
1. Introducción	53
2. Materiales y métodos	54
2.1. <i>Área de estudio</i>	54
2.2. <i>Especie estudiada</i>	55
2.3. <i>Patrones naturales de producción de néctar</i>	55
2.4. <i>Efecto de los visitantes florales sobre la producción de néctar</i>	56
2.5. <i>Patrones naturales de disponibilidad néctar</i>	56
2.6. <i>Polinización cruzada legítima, producción de néctar y polinizadores</i>	56
2.7. <i>Comportamiento de visitantes florales</i>	57
2.8. <i>Análisis de datos</i>	57
3. Resultados	58
3.1. <i>Efecto de los visitantes florales sobre la producción de néctar</i>	58
3.2. <i>Patrones naturales de disponibilidad de néctar</i>	58
3.3. <i>Comportamiento de visitas florales</i>	59
3.4. <i>Polinización cruzada legítima - el papel del néctar y los colibríes</i>	67
4. Discusión	68
4.1. <i>Producción de néctar, forrajeo de polinizadores y deposición de polen</i>	68
4.2. <i>El papel de los colibríes como mediadores de polinización legítima</i>	74
Agradecimientos	77
Literatura citada	78

DIMORFISMOS E INCOMPATIBILIDAD EN *Palicourea demissa* (RUBIACEAE), UNA ESPECIE DIESTÍLICA DE SELVAS NUBLADAS EN VENEZUELA.

RESUMEN

La diestilia es un dimorfismo caracterizado por que dentro de una población ciertas plantas exhiben flores con estilo largo y estambres cortos (longiestiladas) y otras presentan el patrón opuesto (breviestiladas). Generalmente, estos morfos florales son autoincompatibles y sólo desarrollan semillas cuando ocurren cruces intermorfo (legítimos). Estos dos componentes de la diestilia se han interpretado como mecanismos que favorecen la fertilización cruzada. En este trabajo exploramos el rol funcional de la diestilia (incluyendo dimorfismo en frutos y semillas) usando como modelo a *Palicourea demissa* Standl. (Rubiaceae), una planta diestílica de selvas nubladas en Los Andes venezolanos. Los morfos florales de *P. demissa* son autoincompatibles y sólo presentaron estrecha reciprocidad entre los órganos sexuales (anteras y estigma) que se ubican en la posición más baja en sus flores, ello podría generar diferencias en el éxito de polinización de los morfos. Las plantas breviestiladas exhibieron frutos y semillas más grandes que las planas longiestiladas, sugiriendo que las plantas breviestiladas podrían tener mayor potencial de establecerse dentro de la población estudiada. Sin embargo, dado que los morfos presentan una relación de 1:1, se hace necesario estudiar a futuro el efecto de las asimetrías en frutos y semillas, al igual que el efecto de depredadores y dispersores de semilla sobre la adecuación de los morfos de *P. demissa* en sus poblaciones naturales.

Palabras clave: hercogamia recíproca, exogamia, heteroestilia, *Palicourea*, selva nublada

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas con flores son predominantemente hermafroditas (Bawa *et al.* 1985, Fetscher 2001, Barrett 2002 a y b, Cesaro *et al.* 2004). Esta condición sexual, en la que ambos órganos sexuales se ubican dentro de la misma flor, puede representar algunos costos reproductivos ya que facilita la interferencia física entre anteras y estigmas, promoviendo así, imprecisiones en la transferencia de polen (Lloyd & Webb 1986, Webb & Lloyd 1986, Fetscher 2001, Barrett 2002 a y b) y aumentos en su autodeposición, lo cual puede impedir que polen proveniente de plantas coespecíficas fecunde óvulos (Galen *et al.* 1989, Waser & Price 1991, Broyles & Wyatt 1993, Dinnézt 1997, Sage *et al.* 1999). De esta manera, se pueden aumentar los niveles de desperdicio de gametos masculinos a través de autopolinizaciones y acarrear posibles consecuencias negativas sobre la adecuación de las especies como consecuencia de la endogamia (Charlesworth & Charlesworth 1987, Barrett 2002 a y b, Cesaro *et al.* 2004, Bailey & McCauley 2006). A pesar de ello, una estrategia que permite a especies hermafroditas reducir tales costos reproductivos, es la separación espacial de anteras y estigmas dentro de la misma flor (hercogamia) (Lloyd & Webb 1986, Webb & Lloyd 1986, Fetscher 2001, Barrett 2002 a y b, Murcia 2002).

La heteroestilia es un polimorfismo floral donde las poblaciones de una especie pueden estar compuestas por dos (diestilia) o tres (triestilia) morfos que difieren recíprocamente en la altura a la cual se posicionan las anteras y los estigmas (hercogamia recíproca) (Ganders 1979, Lloyd & Webb 1992, Barrett 2002 a). En el caso de la diestilia, las flores que presentan el estigma a una altura inferior a la posición de las anteras son denominadas breviestiladas o “thrum” y aquellas con el patrón invertido, se designan longiestiladas o “pin”. Este dimorfismo usualmente está acompañado por otras diferencias morfológicas accesorias (los morfos pueden

diferir también en: tamaño y forma del estigma y papilas estigmáticas, tamaño de anteras y cantidad de granos de polen/antera) y por un sistema de autoincompatibilidad (Ganders 1979, Dulberger 1992, Barrett *et al.* 2000, Barrett 2002 a), que permite el desarrollo de frutos y semillas solamente en cruces intermorfos (Dulberger 1992, Teixeira & Machado 2004 a y b, Lopes & Buzato 2005). Darwin (1877) llamó a este tipo de cruce “legítimo” y a aquellos intramorfos “ilegítimos”.

Actualmente se reconocen dos roles funcionales para explicar el significado adaptativo de la diestilia; por un lado, el polimorfismo promueve una mayor precisión en la transferencia de polen y por otro, el sistema de autoincompatibilidad evade pasivamente autofecundaciones y endogamia (Barrett 2002 a). A pesar de ello, algunas de las características morfológicas asociadas a la diestilia pueden no manifestarse o presentar considerables variaciones entre especies (Ganders 1979, Dulberger 1992, Faivre & McDade 2001); por su parte, la autoincompatibilidad es un atributo que no se expresa en algunas especies heterostílicas (Dulberger 1992, Castro y Oliveira 2001), en otras lo hace parcialmente (Sobrevila *et al.* 1983) y en una gran mayoría se desconoce su manifestación (Barrett 1992). Adicionalmente, poco conocemos sobre posibles asimetrías en atributos de fruto y semillas en especies diestílicas, siendo este, un aspecto que podría darnos luces para interpretar la coexistencia de los morfos en sus poblaciones naturales, especialmente en aquellas especies que no manifiestan reproducción clonal.

Palicourea demissa (Rubiaceae) es una especie diestílica polinizada por colibríes en selvas nubladas de Los Andes venezolanos y la hemos tomado como modelo de estudio para abordar algunas hipótesis en torno a la función de la diestilia en Angiospermas. Hemos partido de la premisa que si la hercogamia recíproca presente en *P. demissa* favorece su óptima polinización cruzada; entonces, *i*) las flores de los diferentes morfos deberán exhibir estrecha reciprocidad en

la posición de sus órganos sexuales. Por otra parte, si el sistema de autoincompatibilidad se expresa en esta especie, entonces, *ii*) el desarrollo de frutos deberá darse solamente en cruces intermorfos. Para evaluar estas hipótesis, examinamos varios atributos florales asociados a la facilitación de la polinización cruzada en especies heterostílicas y evaluamos experimentalmente el efecto de la polinización intra e intermórfica sobre la producción de frutos en ambos morfos. Además de ello, exploramos posibles asimetrías en atributos de frutos y semillas en las plantas de cada morfo en esta especie.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio: Los experimentos de polinización manual y muestreos de material vegetal para análisis morfométrico, se llevaron a cabo en la selva nublada La Mucuy (8°, 38' N y 71°, 02' W; 2300-2400 m.s.n.m), Parque Nacional Sierra Nevada, Mérida – Venezuela. En esta zona la temperatura media anual es de 14° C y la precipitación anual presenta entre 2800 y 3400 mm con picos en abril - mayo y en octubre – noviembre; además, la entrada de agua por neblina representa cerca de 300 mm (Ataroff & Rada 2000). Estructuralmente, esta selva nublada está conformada por tres estratos bien marcados: un sotobosque dominado por Rubiáceas, Pteridofitos, Aráceas y Acantáceas (0 - 4 m), un estrato con árboles de hasta 20 m y un estrato de árboles emergentes que pueden alcanzar hasta de 35 m (Rengifo *et al.* 2005). Uno de los rasgos más característicos de esta selva, es la presencia de helechos arborescentes de la familia Cyatheaceae y de plantas epífitas, las cuales en este ambiente, alcanzan su máxima expresión en biomasa y diversidad si se compara con otros bosques andinos (Ataroff & Sarmiento 2004).

2.2. Especie estudiada: *Palicourea demissa* Standl. (Rubiaceae) está representada por arbustos de 3-8 metros de altura que se desarrollan en sitios en regeneración secundaria dentro de las selvas nubladas de Los Andes venezolanos (obs. pers., Figura 1.1A). Las inflorescencias de esta especie exhiben raquis rojizo y flores amarillas, pediceladas y gamopétalas (Figuras 1.1B-D), las cuales inician su antesis entre las 0530 y 0730 h y tienen una longevidad de 12 a 14 horas aproximadamente (Valois-Cuesta & Novoa-Sheppard 2006). En la selva nublada La Mucuy esta especie está compuesta por individuos diestílicos que presentan una relación proporcional de 1:1 (Valois-Cuesta & Novoa-Sheppard 2006) y florecen desde enero hasta octubre con un pico entre mayo y junio (Valois-Cuesta & Soriano, datos sin publicar). Los frutos son drupas de forma elíptica y color verde con ligeras líneas blancas cuando inmaduros y, globosos, succulentos de color azul oscuro cuando maduran totalmente, éstos contienen dos semillas de párenos planoconvexos con canales en la superficie dorsal (Figuras 1.1 E - F).

2.3. Características florales asociadas a la función de la diestilia: Seleccionamos 60 plantas al azar ($n = 30$ plantas/morfo) y recolectamos varias flores de diferentes inflorescencias/planta, las cuales preservamos en etanol (70%). En el laboratorio, con la ayuda de un vernier digital Mitutoyo CD – 8” (0,01 mm de precisión) medimos en cada una de ellas la longitud de la corola, diámetro del espacio de entrada al tubo de la corola, altura a las anteras y al estigma, longitud de anteras y lóbulos estigmáticos, así como también la separación espacial antera-estigma (Figura 1.2). Además, calculamos la hercogamia intramórfica e intermórfica (reciprocidad relativa) así: Hercogamia intramórfica = $(\text{altura antera} - \text{altura estigma}) / (\text{altura antera} + \text{altura estigma})$; Reciprocidad relativa = $(\text{altura antera} - \text{altura estigma recíproco}) / (\text{altura antera} + \text{altura estigma recíproco})$ (Richards & Koptur 1993, Hernández & Ornelas 2007a).

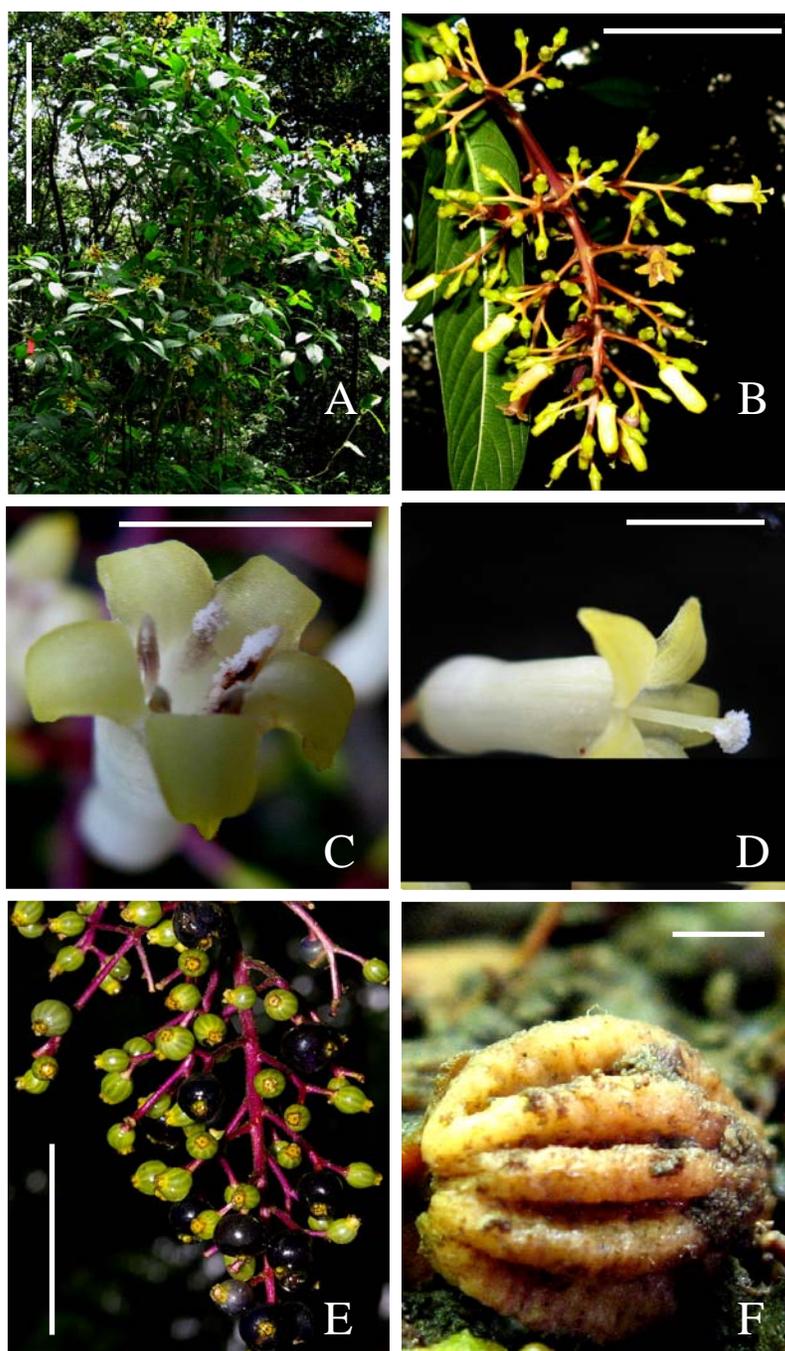


Figura 1.1. *Palicourea demissa* (Rubiaceae): A - Hábito de crecimiento; B - Inflorescencia, C - Flor breviestilada, D - Flor longiestilada, E - Infrutescencia con frutos en desarrollo y maduros, F - Semilla. Barra: 1 m en A, 5 cm en B y E, 5 mm en C y D, 1 mm en F.

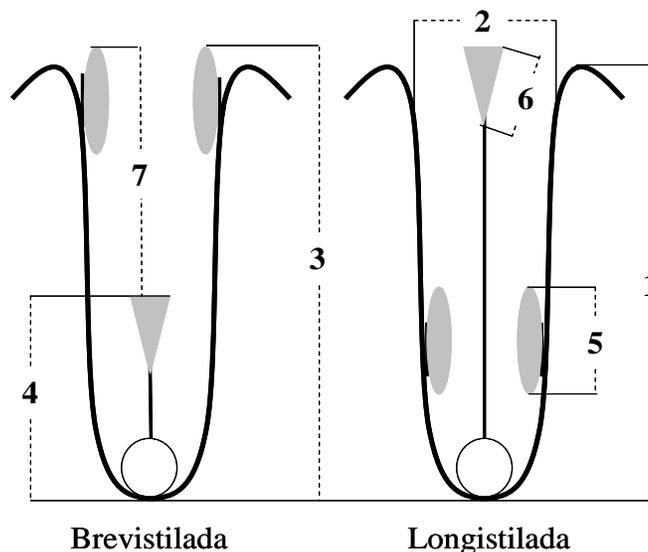


Figura 1.2. Atributos florales de *Palicourea demissa* (Rubiaceae): 1 - Longitud de la corola, 2 - Apertura del tubo de la corola, 3 - Altura a las anteras, 4 - Altura al estigma, 5 - Longitud de anteras, 6 - Longitud de lóbulos estigmáticos, 7 - Separación antera - estigma. Todas las medidas fueron realizadas en ambos morfos florales.

2.4. Morfometría y producción de polen: Siguiendo el mismo tratamiento de colecta y conservación del material vegetal descrito en la sección 2.3, examinamos botones florales en un estereoscopio Wild Heerbrugg M5A, en este proceso, seleccionamos una antera por botón floral y un grano de polen por antera, estos fueron observados en un microscopio Leite Dialux 20 EB y medidos con un micrómetro ocular (Kearns & Inouye 1993). El número de granos de polen por antera, fue contabilizado a partir de 54 botones florales (una antera por botón floral de 27 plantas por morfo), para ello, las anteras fueron estrujadas sobre un porta objetos en una gota de glicerina y luego bajo el microscopio procedimos a realizar el conteo con un contador manual. El número de granos de polen por flor, fue estimado multiplicando el promedio de granos de polen por antera \times número de anteras por flor (Cruden 1977, Kearns & Inouye 1993).

2.5. Características morfo-específicas de frutos y semillas: Dado que el tamaño de los frutos se puede relacionar positivamente con su porcentaje de remoción por dispersores y el tamaño de la semilla se asocia positivamente con su porcentaje de germinación e incluso con el porcentaje de supervivencia de las plántulas (Smith & Fretwell 1974, Charlesworth 1988, Wheelwright 1993, Dalling & Hubbell 2002, de Jong & Klinkhamer 2005), exploramos posibles asimetrías en tamaño de frutos y semillas en ambos morfos como una medida indirecta para analizar el potencial de establecimiento de cada uno de ellos en la población. Para ello, seleccionamos varias plantas al azar ($n = 30$ /morfo) y recolectamos frutos completamente maduros. En el laboratorio, los frutos (largo, ancho) y las semillas (largo, ancho transversal y ancho lateral; Figura 1.3) fueron medidos con la ayuda de un vernier digital (0,01 mm de precisión). Adicionalmente, en un horno deshidratamos la pulpa y las semillas de cada fruto hasta que ambas partes alcanzaran un peso constante (balanza electrónica Shimadzu Libror EB – 280; 0,001 g. de precisión).



Figura 1.3. Atributos medidos en las semillas de ambos morfos de *Palicourea demissa* (Rubiaceae): 1 - Largo, 2 - Ancho transversal y 3 - Ancho lateral.

2.6. Sistema reproductivo: Con el fin de evaluar si la autoincompatibilidad se expresa en *P. demissa*, realizamos los siguientes experimentos de polinización manual en diez plantas de cada morfo: *i*) agamospermia (flores en preantesis fueron emasculadas y excluidas de visitantes florales con bolsas de tul “tela sintética con orificios < 1,0 mm”, *ii*) autopolinización espontánea (flores en preantesis fueron excluidas de visitantes florales hasta que se marchitaron), *iii*) autopolinización manual (flores en preantesis fueron excluidas y posteriormente las autopolinizamos), *iv*) polinización cruzada legítima (flores en preantesis fueron excluidas y posteriormente las polinizamos con polen del morfo floral opuesto), *v*) polinización cruzada ilegítima (flores en preantesis fueron excluidas y posteriormente las polinizamos con polen de otra planta del mismo morfo) y *vi*) control (flores polinizadas naturalmente fueron marcadas al final del día) (Kearns & Inouye 1993). En *P. demissa* los estigmas son receptivos al momento de la apertura floral (Valois-Cuesta & Soriano, datos sin publicar, obtenidos bajo el método de la reacción peroxidasa, Kearns & Inouye 1993); por ello, realizamos los experimentos cuando las flores estuvieron plenamente abiertas. En los tratamientos de polinización cruzada, las flores donadoras de polen fueron excluidas en preantesis y aquellas receptoras fueron emasculadas con el fin de evitar contaminación con polen no deseado. Las flores manipuladas fueron marcadas con hilos de diferentes colores que indicaban su respectivo tratamiento dentro de la planta y las mantuvimos excluidas hasta un día después de su senescencia. Dado que los frutos de *P. demissa* tardan cerca de ocho meses en madurar desde que la flor es polinizada (Valois-Cuesta & Soriano, datos sin publicar) y que además, frutos en proceso de maduración pueden ser consumidos ó depredados (Kearns & Inouye 1993, González *et al.* 2005), evaluamos los tratamientos dos meses después de haberlos aplicado con la siguiente relación: (frutos en desarrollo/flores tratadas) × 100 (Cohelho & Barbosa 2004, Consolaro *et al.* 2005, Rossi *et al.* 2005).

2.7. Análisis de datos: Con el fin de evaluar diferencias entre los morfos en los atributos de sus flores, frutos y semillas usamos estadísticas paramétrica dado que los datos cumplieron los supuestos (normalidad y homogeneidad de varianza) para tales pruebas. Sin embargo, para la aplicación de análisis de asociación entre variables los datos fueron transformados al log (x+1) para incrementar su homoscedasticidad. Para el caso de la evolución del sistema reproductivo usamos la prueba no paramétrica Chi-cuadrado con la finalidad de evaluar diferencias entre el número de frutos observados y esperados dentro de cada tratamiento (eficiencia del tratamiento). Datos sin transformar (media \pm error estándar) y las pruebas estadísticas usadas en cada caso, se indican sobre el texto, tablas y figuras. Los análisis fueron realizados en el programa SPSS 12.0.

3. RESULTADOS

3.1. Características florales asociadas a la función de la diestilia: La población de *P. demissa* examinada en este trabajo, es típicamente diestílica pues identificamos individuos que exhiben flores con el estigma a una altura superior a la posición de las anteras (flores longiestiladas) e individuos con este patrón en forma inversa (flores breviestiladas). Estos dos morfos florales no presentaron diferencias en el número de anteras por flor y ambos exhibieron estigmas bilobulados. Sin embargo, encontramos que ésta y otras estructuras variaron en tamaño según el morfo floral; p. e., las corolas, anteras, granos de polen y lóbulos estigmáticos presentaron mayor longitud en las flores breviestiladas que en las flores longiestiladas; en contraste, las flores longiestiladas exhibieron mayor longitud en el estilo (altura hasta el estigma). En muchas especies diestílicas la producción de granos de polen/flor es un atributo diferencial entre los morfos. Sin embargo, en *P. demissa* no observamos diferencias al respecto (Tabla 1.1).

Además de lo anterior, encontramos que la separación espacial anteras-estigma (hercogamia) fue diferente entre morfos, siendo significativamente mayor en las flores breviestiladas que en las longiestiladas (Tabla 1.1). A pesar de ello, observamos una mayor reciprocidad (valor cercano a cero) entre la posición de las anteras de las flores longiestiladas y los estigmas de las flores breviestiladas ($t = 0,37$, $P = 0,70$), que entre las anteras de las flores breviestiladas y los estigmas flores longiestiladas ($t = 8,31$, $P < 0,0001$; Tabla 1.1, Figura 1.4).

3.2. Relaciones morfo-específicas entre atributos florales: Encontramos un gran número de relaciones morfo-específicas (44 de 110 exploradas) entre los atributos florales asociados a la función de la diestilia en *P. demissa*. Estas asociaciones se expresaron en mayor número entre flores breviestiladas que en las flores longiestiladas. Sin embargo, en ambos casos, encontramos correlaciones positivas entre la longitud de la corola y aquellos atributos florales que definen la reciprocidad en la posición de los órganos sexuales entre los morfos. Además, fue interesante observar que solamente en las flores breviestiladas, la longitud de la corola se relacionó significativamente con el espacio de entrada a la misma (orificio por donde los polinizadores acceden legítimamente al interior de las flores), atributo que a su vez, se relacionó fuertemente con la altura de las anteras y su relativa separación con el estigma dentro de las flores de éste morfo (Tabla 1. 2).

Estas relaciones en particular, fueron exploradas posteriormente mediante análisis de regresión lineal, el cual indicó que la posición relativa de las anteras y estigma dentro y entre los morfos, así como también, el espacio por el cual los polinizadores acceden hacia el interior de las flores breviestiladas, pueden ser explicados fuertemente por variaciones en el tamaño del tubo de la corola. Sin embargo, las pendientes de las regresiones mostraron que aunque en ambos morfos

el tamaño de la corola predice fuertemente la posición de las anteras, hay diferencias entre los morfos en el caso de la posición del estigma, siendo mayor la relación en las flores longiestiladas (Tabla 1.3, Figura 1.5).

Tabla 1.1. Valores y resultados de prueba *t* para las características de las flores, frutos y semillas de plantas longiestiladas y breviestiladas de *Palicourea demissa* (Rubiaceae). Valores expresados en unidad diferente a mm se indica en la tabla. NS = No significativo ($P > 0.05$), * $P < 0,01$, ** $P \leq 0,001$, *** $P < 0,0001$.

Atributo de las flores	Morfo floral, Media \pm E.E (n)		Prueba <i>t</i>
	Breviestiladas	Longiestiladas	
Longitud de la corola	19,0 \pm 0,28 (100)	14,5 \pm 0,17 (100)	13,83 ***
Apertura de la corola	2,9 \pm 0,04 (100)	2,6 \pm 0,03 (100)	5,76***
Altura a la antera	19,6 \pm 0,23 (100)	13,3 \pm 0,15 (100)	23,76***
Longitud de la antera	4,6 \pm 0,05 (100)	3,9 \pm 0,04 (100)	10,55***
Altura al estigma	13,4 \pm 0,14 (100)	17,1 \pm 0,20 (100)	-14,83***
Longitud del estigma	4,7 \pm 0,10 (100)	1,2 \pm 0,02 (100)	48,40***
Diámetro del polen	119,8 \pm 1,49 (100)	92,7 \pm 0,79 (100)	17,13***
Polen/antera	377,0 \pm 11,77 (54)	379,0 \pm 10,46 (54)	-0,29 NS
Polen/flor	1886,0 \pm 58,83 (54)	1896,0 \pm 52,32 (54)	-0,29 NS
Hercogamia	0,2 \pm 0,005 (100)	-0,1 \pm 0,004 (100)	48,66***
Reciprocidad relativa	0,07 \pm 0,01 (100)	-0,003 \pm 0,01 (100)	5,69***
Atributos de los frutos			
Largo	8,8 \pm 0,06 (150)	8,4 \pm 0,08 (150)	3,49**
Ancho	9,6 \pm 0,08 (150)	9,5 \pm 0,1 (150)	0,60 NS
Masa de pulpa (g)	0,03 \pm 0,001 (150)	0,02 \pm 0,001 (148)	4,05***
Atributos de las semillas			
Largo	5,8 \pm 0,04 (150)	5,7 \pm 0,05 (150)	1,19 NS
Ancho transversal	4,7 \pm 0,05 (150)	4,6 \pm 0,04 (150)	3,05*
Ancho lateral	2,8 \pm 0,04 (150)	2,8 \pm 0,03 (150)	1,09 NS
Masa (g)	0,025 \pm 0,0005 (150)	0,022 \pm 0,0005 (150)	4,39***

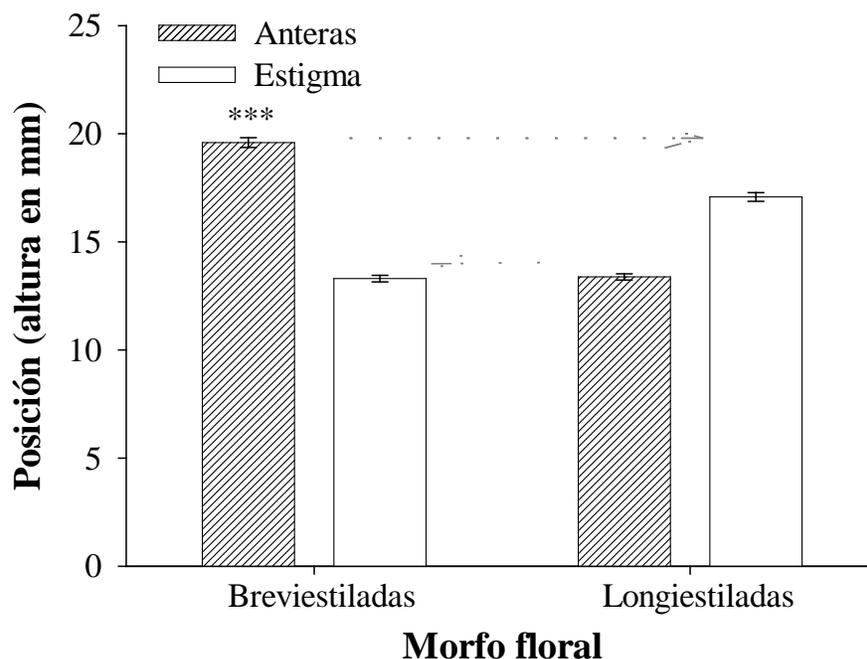


Figura 1.4. Hercogamia intramórfica y recíproca entre flores breviestiladas y longiestiladas de *Palicourea demissa* (Rubiaceae). La línea discontinua indica la dirección del flujo de polen legítimo entre los morfos. Diferencias en la posición de órganos recíprocos *** $P < 0,0001$.

3.3. Características morfo-específicas de frutos y semillas: Las plantas con flores breviestiladas exhibieron frutos más largos y con mayor masa de pulpa que los frutos producidos por las plantas longiestiladas; igualmente, el ancho transversal y la masa de las semillas fue mayor en frutos provenientes de plantas breviestiladas (Tabla 1.1).

3.4. Sistema reproductivo: Encontramos que *P. demissa* es una especie autoincompatible (auto e intra morfo) ya que flores polinizadas manualmente desarrollaron frutos solamente en cruces intermorfo, en este caso, las diferencias entre los morfos no fueron amplias en la cantidad de frutos desarrollados por flores tratadas. Sin embargo, bajo condiciones naturales (flores

control) las diferencias entre los morfos en éxito reproductivo femenino fueron mucho más amplia; en este sentido, las plantas breviestiladas presentaron un mayor número de frutos en comparación a lo observado en las plantas longiestiladas (Tabla 1.4).

Tabla 1.2. Coeficiente de correlación de Pearson para rasgos de flores breviestiladas (B) y longiestiladas (Lda) de *Palicourea demissa* (Rubiaceae). LC = Longitud de la corola, AC = Apertura de la corola, AA = Altura a las anteras, AE = Altura al estigma, LE = Longitud de lóbulos estigmáticos, LA = Longitud de anteras, TGP = Tamaño de granos de polen, P/A = Granos de polen/antera, P/F = Granos de polen/flor, H = Hercogamia intramórfica, HR = Hercogamia recíproca. Para P/A y P/F, $n = 54$ flores; casos restantes, $n = 100$ flores. NS = No significativo ($P > 0,05$), * $P < 0,05$, ** $P \leq 0,001$, *** $P < 0,0001$.

Bda	LC	AC	AA	AE	LE	LA	TGP	P/A	P/F	H
AC	0,37***	-----								
AA	0,94***	0,45***	-----							
AE	0,70***	0,13 NS	0,65***	-----						
LE	-0,16 NS	0,28*	-0,06 NS	-0,44***	-----					
LA	0,49***	0,26*	0,36***	0,33**	0,11 NS	-----				
TGP	0,02 NS	0,32**	0,10 NS	-0,12 NS	0,23*	-0,03 NS	-----			
P/A	-0,13 NS	-0,29*	-0,16 NS	-0,22 NS	-0,01 NS	-0,04 NS	-0,35*	-----		
P/F	-0,13 NS	-0,29*	-0,16 NS	-0,22 NS	-0,01 NS	-0,04 NS	-0,35*	1,00***	-----	
H	0,33**	0,39***	0,46***	-0,36**	0,45***	0,09 NS	0,27*	0,07 NS	0,07 NS	-----
HR	0,67***	0,23*	0,78***	0,47***	-0,07 NS	0,19 NS	0,15 NS	-0,13 NS	-0,13 NS	0,41***
Lda	LC	AC	AA	AE	LE	LA	TGP	P/A	P/F	H
AC	0,09 NS	-----								
AA	0,91***	0,09 NS	-----							
AE	0,82***	0,07 NS	0,74***	-----						
LE	0,29**	0,05 NS	0,24*	0,20*	-----					
LA	0,05 NS	0,08 NS	0,02 NS	-0,04 NS	0,12 NS	-----				
TGP	-0,08 NS	-0,03 NS	-0,03 NS	-0,01 NS	-0,08 NS	0,10 NS	-----			
P/A	-0,03 NS	0,09 NS	0,11 NS	-0,10 NS	0,09 NS	-0,09 NS	-0,11 NS	-----		
P/F	-0,03 NS	0,09 NS	0,11 NS	-0,10 NS	0,09 NS	-0,09 NS	-0,11 NS	1,00***	-----	
H	0,05 NS	0,01 NS	0,29**	-0,43***	0,05 NS	0,06 NS	-0,03 NS	0,25 NS	0,25 NS	-----
HR	0,74***	0,17 NS	0,77***	0,57***	0,23*	0,05 NS	0,01 NS	0,38*	0,38*	0,21*

Tabla 1.3. Análisis de regresión lineal para la apertura de la corola, altura a las anteras, altura al estigma y hercogamia recíproca en función de la longitud de la corola en flores brevistiladas (Bda) y longistiladas (Lda) de *Palicourea demissa* (Rubiaceae). Los datos usados para las regresiones fueron transformados al log (x+1). NS = No significativo ($P > 0,05$), ** $P = 0,0001$, *** $P < 0,0001$.

Variables de contraste	Número de flores	Regresión lineal		Intersección	Prueba <i>t</i>
		r ²	Pendiente		
Apertura de la corola					
Bda	100	0,13	0,27 **	0,25	3,89
Lda	100	0,05	0,05 NS	0,50	0,74
Altura a las anteras					
Bda	100	0,87	0,73***	0,36	26,48
Lda	100	0,82	0,88***	0,09	21,79
Altura al estigma					
Bda	100	0,47	0,49***	0,51	9,31
Lda	100	0,67	0,86***	0,22	14,17
Hercogamia recíproca					
Bda	100	0,46	0,41***	-0,50	9,22
Lda	100	0,54	0,57***	-0,69	10,81

4. DISCUSIÓN

4.1. Características florales asociadas a la función de la diestilia: Una de las principales características que define a las especies heteroestílicas (diestílicas o triestílicas) es la presencia de hercogamia recíproca (Darwin 1877, Webb & Lloyd 1986, Barrett 2002a). Nuestro examen a las estructuras florales de *P. demissa*, describe a esta especie como diestílica, ya que la misma presenta dos morfos florales que exhiben reciprocidad en la altura de anteras y estigmas, tal como se ha documentado en varias familias de angiospermas y especialmente en muchas especies de Rubiaceae (Anderson 1973, Ganders 1979, Barrett 1992, 2002a, Taylor 1989, 2002).

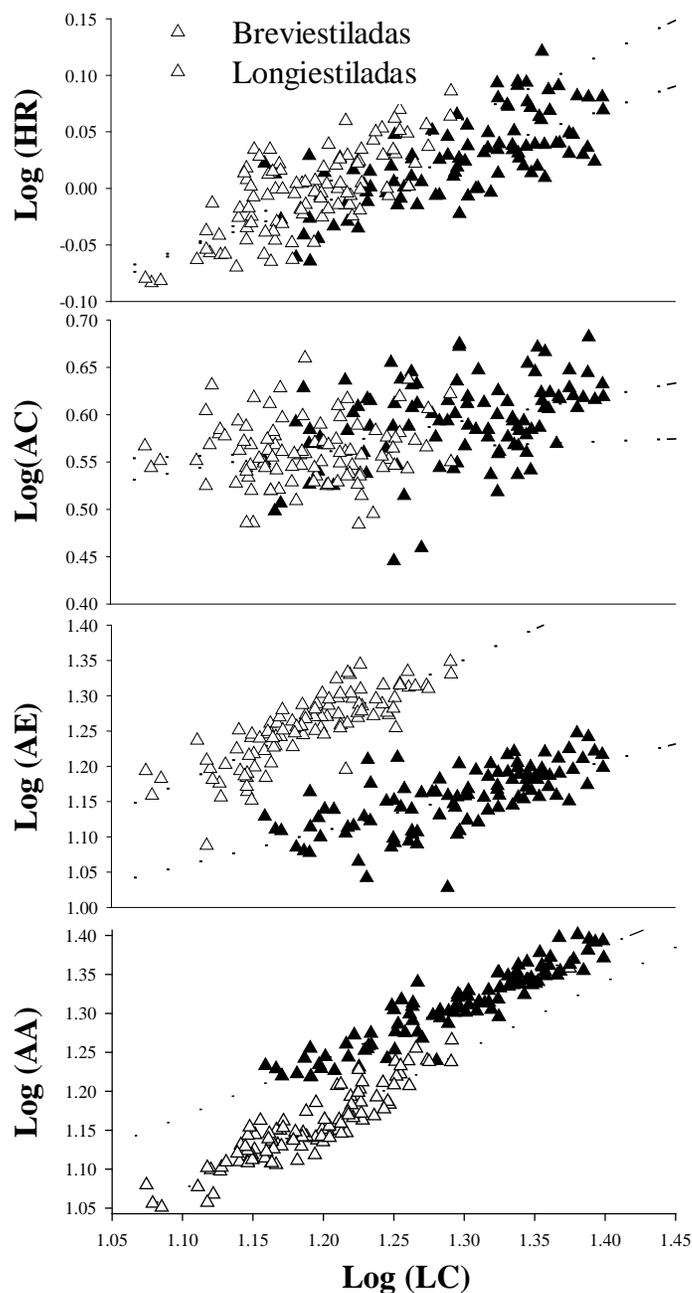


Figura 1.5. Relaciones entre la longitud de la corola (LC) con rasgos florales que definen la diestilia (AA = Altura a la antera, AE = Altura al estigma. AC = Apertura de entrada a l tubo de la corola y HR = Hercogamia recíproca) en flores breviesticiladas y longiestiladas de *Palicourea demissa* (Rubiaceae). Los datos fueron transformados al $\log(x+1)$.

Tabla 1.4. Verificación del sistema de autoincompatibilidad en *Palicourea demissa* (Rubiaceae) y prueba Chi-cuadrado para evaluar diferencias dentro de los tratamientos. ♂ = antera, ♀ = estigma. NS = No significativo ($P > 0,05$), ** $P \leq 0,02$, *** $P = 0,0001$.

Tratamientos (♂ → ♀)	Frutos/flores	Éxito reproductivo	χ^2
	(n)	(%)	
Agamospermia			
Flores breviestiladas	0/29	0
Flores longiestiladas	0/29	0
Autopilinización espontánea			
Flores breviestiladas	0/50	0
Flores longiestiladas	0/35	0
Autopolinización manual			
Flores breviestiladas	0/27	0
Flores longiestiladas	0/32	0
Polinización cruzada ilegítima			
Flores breviestiladas → breviestiladas	0/31	0
Flores longiestiladas → longiestiladas	0/32	0
Polinización cruzada legítima			
Flores longiestiladas → breviestiladas	18/21	85,7	10,71**
Flores breviestiladas → longiestiladas	20/22	90,9	14,72***
Polinización natural (control)			
Flores breviestiladas	36/50	72,0	9,68**
Flores longiestiladas	26/50	52,0	0,08 NS

En *P. demissa* la longitud de la corola al igual que la separación anteras-estigma (hercogamia) fue mayor en las flores breviestiladas que en las flores longiestiladas; por otro lado, la posición relativa de las anteras de las flores breviestiladas con relación a la posición de los estigmas en las longiestiladas, no fue estrictamente recíproca, mientras que en el patrón opuesto si lo fue (Tabla 1.1). Estos patrones espaciales en la posición de los órganos sexuales entre los morfos, quizás podrían estar influenciados por diferencias en el tamaño de la corola en cada morfo (ver Richards & Koptur 1993). Esta idea podría explicar el hecho de haber encontrado en

ambos morfos fuertes relaciones alométricas entre el tamaño de la corola y aquellos atributos florales que definen la diestilia en esta especie (Tablas 1.2 y 1.3, Figura 1.5). A pesar de ello, con relación a la posición relativa del estigma, es difícil explicar cómo posibles restricciones en el desarrollo del tubo de la corola podrían influenciar la posición de este órgano dentro de las flores en ambos morfos, ya que el estilo es una estructura floral que no se encuentra unida al tubo de la corola (ver Hernández & Ornelas 2003). Sin embargo, es probable que diferencias en las tasas de crecimiento de los estilos durante la fase de desarrollo de las flores influya en ello. En este sentido, Hernández & Ornelas (2007b) encontraron que en *Palicourea padifolia* el estilo de las flores breviestiladas cesa su crecimiento en etapas tempranas del desarrollo de las yemas florales, mientras que el estilo de las flores longiestiladas lo incrementa. Así, los estigmas de las flores longiestiladas podrían disponerse a una altura mayor que los estigmas de las flores breviestiladas.

Aunque existe evidencia sobre ciertos controladores genéticos asociados al componente morfológico de la heteroestilia (Ganders 1979, Lewis & Jones 1992, Richards & Barrett 1992), virtualmente nos falta mucho por conocer sobre la genética del desarrollo de este síndrome (ver Barrett 2002a). Sin embargo, desde el punto de vista funcional y adaptativo, existe consenso en que el dimorfismo en la altura del estigma en especies diestílicas, es el resultado de presiones selectivas que favorecen la transferencia de polen entre los morfos (Ganders 1979, Lloyd & Webb 1992, Barrett 2002a).

Con relación a la posición relativa de las anteras en las flores ambos morfos, una posible explicación al hecho de que la altura de las anteras aumente conforme el tamaño de la corola en ambos morfos, puede apoyarse en el hecho que los filamentos de los estambres, en esta especie, se encuentran soldados al tubo de la corola (Hernández & Ornelas 2003, 2007b), lo cual podría permitir que limitaciones en el desarrollo del tubo de la corola determinen la posición relativa de

las anteras dentro de las flores de cada morfos en plantas diestílicas (Pailler & Thomsom 1997). Al respecto Hernández & Ornelas (2007b) encontraron que las diferencias en la altura de la anteras entre los morfos de *P. padifolia* (Rubiaceae) están asociadas a divergencias en la tasa de crecimiento de las yemas florales en la fases tempranas de su desarrollo (ver también Richards & Koptur 1993). Según Pailler & Thomsom (1997) tal relación entre la longitud de la corola y la altura de anteras puede ser de importancia fundamental para explicar la evolución de plantas breviestiladas con corolas de mayor tamaño que las plantas longiestiladas, tal como fue observado para el caso de *P. demissa*.

El posicionamiento recíproco de anteras y estigmas en plantas diestílicas se ha interpretado hipotéticamente como un mecanismo que facilita la polinización cruzada entre los morfos (Darwin 1877, Lloyd & Webb 1992, Barrett 2002a, de Jong & Klinkhamer 2005), ello sugiere que a mayor reciprocidad en la posición de los órganos sexuales, las flores de cada morfo deberían experimentar mayores niveles de polinización legítima. Al respecto, Stone & Tompson (1994) usando flores artificiales, encontraron que la probabilidad de transferencia de polen legítimo entre los morfos de especies heteroestílicas, se relaciona negativamente con asimetrías en la posición recíproca de anteras y estigmas (ver también Lau & Bosque 2003, Ornelas *et al.* 2004a), ello se debe a que la falta de reciprocidad entre anteras y estigmas, genera imprecisiones en la transferencia de polen legítimo entre los morfos (Lloyd & Webb 1992, Barrett 2002a). Acorde con estas evidencias, es razonable pensar que en la población de *P. demissa* objeto de estudio, el flujo de polen entre los morfos florales sea predominantemente asimétrico ya que en esta población, las plantas breviestiladas podrían ser más eficientes receptoras de polen legítimo mientras que las longiestiladas quizás podrían ser más eficaces donadoras de polen (ver Figura 1.4).

Patrones de transferencia de polen como el que predecimos aquí para *P. demissa*, se han documentado bajo condiciones naturales y experimentales en otras especies diestílicas de la familia Rubiaceae, las cuales, exhiben hercogamia recíproca imperfecta (Lau & Bosque 2003, Ornelas *et al.* 2004a, Hernández & Ornelas 2007a, García-Robledo 2008). Bajo este escenario, la mayor separación espacial anteras-estigma (hercogamia) que observamos en las flores breviestiladas de *P. demissa*, aunada a la mayor apertura del tubo corola que apreciamos en este mismo morfo, podrían ser el producto de presiones selectivas que favorecen el éxito de polinización de este morfo, a través de la reducción de la interferencia física entre anteras y estigma, disminución de la probabilidad de autodeposición espontánea de polen y facilitación del contacto entre los polinizadores efectivos y los estigmas menos accesibles en este morfo floral (ver Lloyd & Webb 1992, Barrett 2002a y b); este último aspecto, explica el hecho de haber encontrado solamente en las flores breviestiladas, fuerte relaciones alométricas entre el orificio de entrada al tubo de la corola, la altura de las anteras y su relativa separación espacial con los estigmas (hercogámia) (Tablas 1.2 y 1.3, Figura 1.5).

Además del posicionamiento recíproco de anteras y estigma, los morfos florales de especies heterostílicas también pueden diferir en otros atributos florales tales como la cantidad de granos de polen por flor, tamaño de anteras, granos de polen, lóbulos estigmáticos y papilas estigmáticas (Anderson 1973, Ganders 1979, Barrett 1992, Dulberger 1992). En la mayoría de los casos, el morfo breviestilado exhibe corolas, anteras, granos de polen y estigmas de mayor tamaño que el morfo longiestilado (Anderson 1973, Ganders 1979, Sobrevilla *et al.* 1983, Dulberger 1992, Pailler & Thomsom 1997, Contreras & Ornelas 1999, Thompson & Dommee 2000, Ornelas *et al.* 2004, Texeira & Machado 2004b), tal como fue documentado en *P. demissa*; en contraste, el morfo longiestilado generalmente produce más granos de polen por flor (Ganders

1979, Sobrevilla *et al.* 1983, Dulberger 1992, Paillet & Thomsom 1997, Ree 1997, Contreras & Ornelas 1999, Ornelas *et al.* 2004a), aunque se han documentado casos opuestos (Feinsinger & Busby 1987, Dulberger 1992, Texeira & Machado 2004a). Estos patrones sobre los dimorfismos en especies diestílicas, ponen de manifiesto que en cuanto a la producción de granos de polen por flor, *P. demissa* podría ser considerada como una especie atípica, ya que sus morfos florales no difieren en ese sentido (ver también Ornduff 1980, Swamy & Habadur 1984). Sin embargo, dado que la producción de polen por flor al igual que otros atributos asociados a la diestilia puede variar entre las poblaciones de una misma especie (Ornduff 1980, Paillet & Thomsom 1997, Faivre & MacDade 2001), es prematuro asumir que la relación en producción de polen registrada en este estudio para los morfos de *P. demissa*, sea una condición que se mantiene constante en todas las poblaciones de esta especie en los Andes venezolanos.

En especies diestílicas el tamaño de los granos de polen generalmente se relaciona negativamente con su cantidad por antera o flor; p. e., las flores longiestiladas usualmente producen más granos de polen por flor pero de menor tamaño que las flores breviestiladas (Dulberger 1992). Ganders (1979) sugirió que el reducido tamaño de los granos de polen del morfo longiestilado podría ser una manera de desarrollo que permite incrementar su producción y, de esta manera, aumentar la probabilidad de transferencia hacia los estigmas menos accesibles de las flores breviestiladas (ver también Barrett 1992), los cuales a su vez, son generalmente más grandes en Rubiaceae (Sobrevilla *et al.* 1983, Paillet & Thomsom 1997, Hernández & Ornelas 2007a, este estudio). Al respecto Ree (1997) interpretó el mayor tamaño de los estigmas en las flores breviestiladas como una adaptación que permite a este morfo aumentar su capacidad de recepción de polen.

En cuanto al dimorfismo en tamaño de polen, Dulberger (1992) sugirió que éste podría estar relacionado a diferencias en el esculpido de la exina o en el número y forma de sus aperturas; además, este autor citó que desde el punto de vista funcional, este dimorfismo podría jugar un importante rol en la interacción polen-pistilo en polinizaciones legítimas e ilegítimas. Al respecto, Darwin (1877) planteó que el mayor tamaño de los granos de polen de las flores breviestiladas podría estar asociado a mayores requerimientos de reserva energética, pues en polinizaciones legítimas estos granos de polen deben desarrollar tubos polínicos de mayor longitud a través de los largos estilos de las flores longiestiladas.

4.2. Dimorfismo en frutos y semillas: Los morfos florales de especies diestílicas además de diferir en sus atributos florales, también pueden exhibir diferencias en algunos atributos de sus frutos y semillas; p. e. en la especie diestílica *P. padifolia* las plantas longiestiladas producen frutos más grandes que las plantas breviestiladas (Contreras y Ornelas 1999, Ornelas *et al.* 2004a). En nuestro caso, el patrón es totalmente diferente, pues las plantas breviestiladas de *P. demissa*, producen frutos y semillas con mayor volumen y masa que las plantas longiestiladas. Las razones del por qué los morfos difieren en el tamaño de los frutos y las semillas, no son claras. Sin embargo, algunos autores han encontrado que la masa de los frutos decrece conforme aumenta la proporción de daño foliar (Ornelas *et al.* 2004b); a partir de esta evidencia, podríamos inferir que tasas diferenciales de herbivoría entre los morfos, quizás podría generar diferenciaciones en la eficiencia fotosintética de cada uno de ellos y, en consecuencia, los morfos podrían presentar diferencias en su capacidad de asignar asimilados fotosintéticos destinados al desarrollo de sus frutos y semillas.

Las posibles implicaciones reproductivas de estas asimetrías en frutos y semillas sobre la adecuación de cada morfo dentro de la población, no fueron exploradas en este trabajo y, requieren por si solas un estudio detallado en el futuro. A pesar de ello, podemos inferir de manera preliminar que tales asimetrías en frutos y semillas probablemente cumplen un rol fundamental en aquellos procesos que regulan el establecimiento de las plantas de cada morfo dentro de la población. Al respecto Charlesworth (1988) sugirió que el tamaño y el peso de la semilla son indicadores de la adecuación de la progenie (ver también de Jong & Klinkhamer 2005); en este sentido, algunos trabajos señalan que dentro de una especie los frutos y semillas de menor tamaño tienden a ser ignoradas por algunos dispersores (Wheelwright 1993); igualmente, semillas con menor masa tienden a presentar menores porcentajes de germinación (Arista *et al.* 1992, Ayala-Cordero *et al.* 2004) y si germinan, sus plántulas generalmente presentan menor vigor (masa y tamaño) y menores posibilidades de establecerse que aquellas originadas desde semillas con mayor masa (Jakobsson & Ericsson 2000, Dalling & Hubbell 2002, Aráoz *et al.* 2004). A partir de estas evidencias, podríamos inferir hipotéticamente que en *P. demissa* la progenie (semillas) resultante de la fecundación de plantas breviestiladas (las cuales producen frutos y semillas más grandes que las plantas longiestiladas), probablemente tienen un mayor potencial de establecerse dentro de la población que la progenie producida por las plantas longiestiladas. Sin embargo, el hecho de encontrar en esta población una relación entre morfos cercana a 1:1 (Valois-Cuesta & Novoa-Sheppard 2006, ver también capítulo 2, sección 3,1), sugiere que otros factores tales como la viabilidad de las semillas, depredación pre y postdispersión, al igual que la susceptibilidad de las plántulas a la herbivoría, podrían estar jugando un rol quizás más importante que el del tamaño de las semillas a favor del establecimiento equilibrado de ambos morfos dentro de la población estudiada.

4.3. Sistema reproductivo: Los resultados de nuestros experimentos señalan que *P. demissa* es una especie incompatible (auto e intra morfo) pues las flores de ambos morfos desarrollaron frutos solamente cuando sus estigmas fueron polinizados con polen proveniente del morfo opuesto; bajo estas condiciones, los morfos no presentaron diferencias marcadas en cuanto a la cantidad de frutos que desarrollaron por flores tratadas, dejando en evidencia que ambos morfos tienen el mismo potencial de transferir genes a la progenie a través de su función femenina y, que además, los vectores de polen juegan un rol fundamental dentro del sistema reproductivo de esta especie diestílica. Aunque aquí no examinamos los mecanismos que gobiernan el sistema de autoincompatibilidad en *P. demissa*, seguramente la no fecundación de óvulos en cruces ilegítimos se debió a la inhibición bioquímica del desarrollo de tubos polínicos cuando los granos de polen son depositados sobre pistilos que presentan su mismo genotipo, tal como se ha reportado en muchas especies heteroestílicas (Dulberger 1992).

A pesar de que bajo condiciones controladas los morfos de *P. demissa* no presentaron diferencias marcadas en su éxito reproductivo femenino, bajo condiciones naturales las plantas brevistiladas desarrollan más frutos que las plantas longiestiladas (Tabla 1.3). Con relación a ello, es probable que tal diferencia en el éxito reproductivo de los morfos esté asociada a posibles asimetrías en la transferencia de polen legítimo entre ellos (ver Figura 1.4).

En términos generales, desde el punto de vista funcional, nuestros resultados sugieren que en *P. demissa* se cumple parcialmente los supuestos para que ocurra una eficiente polinización cruzada entre los morfos florales de esta especie (ver Darwin 1877, Webb & Lloyd 1986, Lloyd & Webb 1992), pues es posible que la falta de reciprocidad entre las anteras de las flores brevistiladas y los estigmas de las flores longiestiladas aunada a la estrecha reciprocidad observada en el patrón opuesto, genere que bajo condiciones de polinización natural las plantas

breviesticiladas sean más eficientes como receptoras de polen legítimo, mientras que las longiesticiladas podrían ser más eficientes como donación de polen (un posible caso de dioecia funcional). Evaluar esta posibilidad requiere del análisis detallado de los patrones naturales de deposición de polen y producción de semillas en las plantas de ambos morfos de esta especie diestífica (ver Capítulo 2).

**FLUJO DE POLEN Y PRODUCCIÓN DE FRUTOS ENTRE MORFOS FLORALES DE
Palicourea demissa (RUBIACEAE) EN UNA SELVA NUBLADA VENEZOLANA.**

RESUMEN

La diestilia es un dimorfismo donde las poblaciones de una especie se componen de dos morfos florales que difieren recíprocamente en la altura a la cual se ubican las anteras y los estigmas (hercogamia recíproca). La diestilia ha sido sugerida como una de las rutas evolutivas hacia la separación de los sexos (dioecia), ello implica la especialización sexual de los morfos al punto que funcionen como plantas femeninas o masculinas. En este trabajo examinamos si los morfos florales de *Palicourea demissa* (Rubiaceae), un arbusto diestílico de selvas nubladas en Los Andes venezolanos, difieren en sus patrones de deposición de polen legítimo y en su producción de frutos y semillas bajo condiciones naturales. El polen de las flores breviestiladas es transferido en mayor proporción hacia los estigmas de las flores breviestiladas, mientras que los estigmas de las flores breviestiladas son más eficientes en recepción de polen legítimo que los estigmas de las flores longiestiladas. Además, las plantas breviestiladas producen más frutos por inflorescencia y semillas aparentemente viables que las plantas longiestiladas bajo condiciones naturales. Estos resultados sugieren que las plantas breviestiladas podría estar transfiriendo más genes a la progenie a través de su función femenina (óvulo), mientras que las plantas longiestiladas podrían estarlo haciendo primordialmente a través de su función masculina (polen). De ser así, podría soportarse la idea de la evolución de la dioecia a partir de la diestilia.

Palabras clave: diestilia, especialización sexual, exogamia, flujo de polen, *Palicourea*

1. INTRODUCCIÓN

La heteroestilia es un polimorfismo genéticamente controlado donde dos o tres morfos florales (diestilia y triestilia respectivamente) coexisten dentro de la misma población (Barrett 1992, 2002a). En el caso de la diestilia, las poblaciones están compuestas por individuos que exhiben flores con pistilos largos y estambres cortos llamadas longiestiladas o “pin” e individuos con flores que presentan estos órganos reproductivos en un patrón invertido; estas últimas son llamadas breviestiladas o “thrum” (Barrett 1992, 2002a, Dulberger 1992). Además del posicionamiento recíproco de anteras y estigmas (hercogamia recíproca), los morfos pueden ser autoincompatibles y exhibir otros polimorfismos adicionales que involucran el tamaño de anteras y estigmas, así como también el tamaño y cantidad de granos de polen por flor (Ganders 1979, Barrett 1990, 1992, 2002a; Barrett & Richards 1990, Barrett *et al.* 2000, Dulberger 1992, Webb & Lloyd 1986, 1992, Richards & Barrett 1992).

La hercogamia recíproca se ha interpretado hipotéticamente como un mecanismo que promueve la polinización cruzada (entre morfos florales) por medio de animales (Darwin 1877). Acorde a esta idea, el polen contenido en anteras dispuestas a diferentes niveles podría adherirse en distintas partes del cuerpo del polinizador, las cuales a su vez, corresponderían al punto donde los estigmas del morfo compatible contacten al animal (Barrett & Glover 1985, Lloyd & Webb 1992, Barrett 2002a, de Jong & Klinkhamer 2005). De esta manera, el polimorfismo podría limitar los niveles de desperdicio de gametos masculinos (polen) y a su vez, podría promover una mayor precisión en su transferencia, en comparación a lo que podría ocurrir en poblaciones donde las flores exhiben los órganos sexuales en un arreglo uniforme (Barrett 2002a, de Jong & Klinkhamer 2005).

La efectividad de la hercogamia recíproca en función de la polinización cruzada, se ha evaluado principalmente a través del examen de cargas de polen estigmáticas en flores de ambos morfos bajo condiciones naturales (Olesen 1979a, Ganders 1979, Barrett & Glover 1985; Stone 1995, Ornelas *et al.* 2004a, Hernández & Ornelas 2007a, García-Robledo 2008) o experimentales (Lau & Bosque 2003). Ganders (1979) y Olesen (1979a) entre otros, han resaltado la importancia de la emasculación floral (remoción de anteras) para evaluar si el dimorfismo estilar promueve la polinización cruzada, pues esta práctica elimina el componente ilegítimo de la carga de polen estigmática proveniente de la misma flor. No obstante, algunos investigadores no han encontrado diferencias significativas en la cargas de polen estigmáticas de flores emasculadas y sin emascular (Nishihiro & Washitani 1998, Cesaro *et al.* 2004) y otros han asumido que la carga de polen estigmática es principalmente el resultado de la actividad de los polinizadores (Cariveau *et al.* 2004). Por otra parte, emascular algunas flores puede ser una tarea poco práctica, especialmente en especies donde las anteras se encuentran fusionadas al tubo de la corola (ver Hernández & Ornelas 2007a, obs. pers. en este trabajo) y, de realizarse, podría alterar los patrones naturales de deposición de polen (Stone 1995), pues tal manipulación, seguramente reduce el atractivo de las flores a sus polinizadores (ver Cruden & Lyon 1989, Kearns & Inouye 1993, Strauss 1997).

En este trabajo partimos de la premisa que si el posicionamiento recíproco de las anteras y de los estigmas entre los morfos promueve una óptima polinización cruzada, comparado a lo que podría ocurrir en poblaciones donde las flores presentan una uniformidad en el arreglo de los órganos sexuales, entonces, deberíamos esperar que *i*) en la población de *P. demissa* en La Mucuy, donde hemos evidenciado una estrecha reciprocidad entre las anteras de las flores longiestiladas y los estigma de aquellas breviestiladas (Capítulo 1), el flujo de polen legítimo (del

morfo opuesto) sea predominantemente a favor del morfo breviestilado y por lo tanto, las plantas de este morfo, *ii*) deberían exhibir una mayor proporción de frutos y semillas en condiciones naturales. Para evaluar estas hipótesis, registramos patrones naturales de deposición de polen sobre estigmas y cuantificamos la producción de frutos y semillas en ambos morfos florales.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio: El trabajo de campo se realizó en la selva nublada La Mucuy, Parque Nacional Sierra Nevada, estado Mérida, Venezuela. Una descripción detallada de este sitio puede verse en el Capítulo 1.

2.2. Especie estudiada: *Palicourea demissa* Standl. (Rubiaceae), es un arbusto de 3-8 metros de altura que forma parte de la vegetación de sotobosque en selvas nubladas de Los Andes venezolanos. Las flores breviestiladas de esta especie, exhiben corolas, lóbulos estigmáticos, anteras y granos de polen de mayor tamaño que las flores longiestiladas (Figura 2.1); por otro lado, la hercogamia recíproca es más estrecha entre las anteras del morfo longistilado y los estigmas del morfo breviestilado que en el patrón invertido (Capítulo 1). En La Mucuy estos morfos presentan una relación 1:1 (Valois-Cuesta & Novoa-Sheppard 2006), sus flores no difieren en producción de polen y solamente producen frutos y semillas cuando se llevan a cabo cruces entre plantas de diferentes morfos (Capítulo 1). Los frutos de ambos morfos tardan en madurar cerca de 32 semanas desde el momento en que la flor es polinizada ($n = 11$ frutos/5 plantas breviestiladas y 12/6 plantas longiestiladas) (Valois-Cuesta & Soriano, datos sin publicar)

y son consumidos por las aves *Penelope montagnii*, *Aulacorhynchus pracinus* y *Chlorospingus ophthalmicus* (obs. pers.); sin embargo, su rol como dispersoras es desconocido.

2.3. Disposición espacial de los morfos en la población: Hasta el momento sabemos que los morfos florales de *P. demissa* en la selva nublada La Mucuy presentan una relación proporcional 1:1 (Valois-Cuesta & Novoa-Sheppard 2006) y que la producción de semillas en esta especie depende de la disponibilidad de ambos morfos dentro de la población (Capítulo 1). Sin embargo, no contamos con evidencia que nos permita explicar si esta especie también se reproduce por vía asexual (clones). La manera como se disponen las plantas de ambos morfos dentro de la población, podría darnos luces en este sentido. Para explorar esta posibilidad, durante el pico de floración (mayo-junio 2008) escogimos al azar varias plantas focales de cada morfo a través de toda la población y medimos la distancia (m) entre éstas y su vecina morfo-específica más cercana. A partir de estos datos también calculamos el coeficiente de segregación (S) siguiendo los lineamientos de Pielou (1961) como sigue:

$$S = 1 - \frac{\text{Frecuencia observada LB y BL}}{\text{Frecuencia esperada LB y BL}}$$

Donde LB y BL son combinaciones de vecindad entre plantas longiestiladas-breviestiladas y plantas breviestiladas-longiestiladas respectivamente. Si $S = 0$ no hay segregación, $S = 1$ completa segregación y $S = -1$ afinidad espacial entre los morfos.

2.4. Auto-deposición espontánea de polen: Dado que eventualmente las anteras pueden depositar polen sobre los estigmas espontáneamente, especialmente en flores breviestiladas, podría ser engañoso asumir que la carga de polen estigmática es únicamente el resultado de la

actividad de forrajeo de los polinizadores (Cariveau *et al.* 2004). Para explorar si en *P. demissa* la autodeposición explica en parte los patrones naturales de deposición de polen en cada morfo, examinamos cargas de polen estigmáticas de flores que fueron expuestas a polinizadores ($n = 30/\text{morfo}$) y de aquellas que fueron excluidas de los mismos desde su preantesis ($n = 30/\text{morfo}$). Para excluir las flores utilizamos bolsas de tul (tela sintética con orificios $< 1,0$ mm) y, en ambos casos, recolectamos los estigmas a las 1800 h. Las muestras fueron tomadas a partir de 30 plantas de cada morfo (una flor por planta).

2.5. Patrones naturales de deposición de polen: Asumiendo que la calidad de la carga de polen estigmática (cantidad de polen compatible) es un reflejo del comportamiento de forrajeo de los polinizadores y de las características de las flores (Kearns & Inouye 1993, Murcia & Feinsinger 1996, Cariveau *et al.* 2004, Engel & Irwin 2003), recolectamos flores intactas de ambos morfos (cada dos horas entre las 0600 y 1800 h) que habían estado expuestas a polinizaciones naturales; a estas flores les removimos el estigma, los cuales fijamos inmediatamente en porta-objetos con gel de fushina básica (Kearns & Inouye 1993). Posteriormente, estas muestras fueron analizadas bajo un microscopio Leitz Dialux 20 EB y asumiendo que los granos de polen de *P. demissa* ≥ 105 μm provenían del morfo breviestilado y aquellos < 100 μm pertenecían del morfo longistilado, contabilizamos la polinización legítima (del morfo opuesto) e ilegítimo (del mismo morfo) sobre cada estigma (Figura 2.1). Para comparar la capacidad de cada morfo como donante (función masculina) y receptor (función femenina) de polen legítimo, usamos el análisis de probabilidades propuesto por Lloyd & Webb (1992):

$$T_{ij} = \frac{(\bar{x} \text{ polen sobre estigma})_{ij} \times (\text{N}^\circ \text{ flores})_j}{(\text{N}^\circ \text{ polen/flor})_i \times (\text{N}^\circ \text{ flores})_i}$$

Donde: $(\bar{x} \text{ polen sobre estigma})_{ij}$ es el promedio de granos de polen i sobre cada estigma j ; en esta ecuación i, j representa cualquiera de los dos morfos florales.

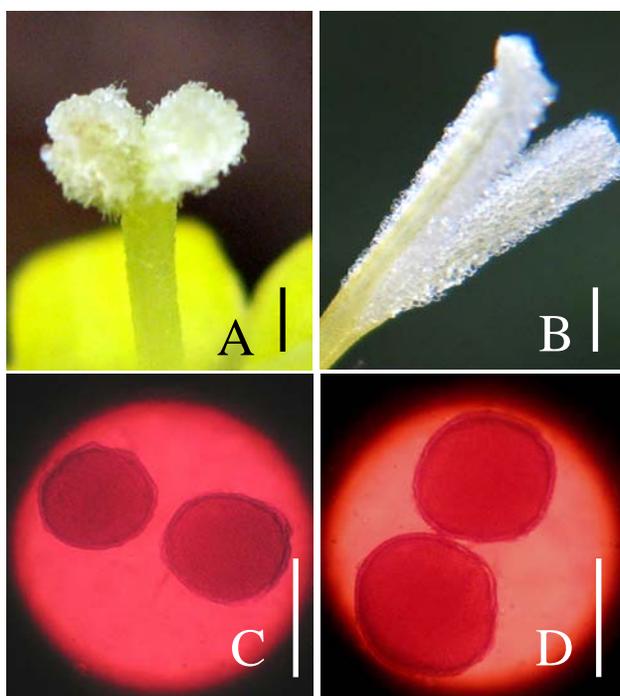


Figura 2.1. Características del estigma y de los granos de polen en flores breviestiladas y longiestiladas de *Palicourea demissa* (Rubiaceae). Barra = 1 mm en A y B; 100 μm en C y D.

2.6. Producción de frutos y semillas bajo condiciones naturales: Para explorar posibles asimetrías en el éxito reproductivo femenino (cantidad de frutos por inflorescencia) entre los morfos, escogimos varias plantas al azar ($n = 24$ breviestiladas y 26 longiestiladas) al inicio del periodo de fructificación (septiembre 2007); en cada una de ellas, seleccionamos infrutescencias inmaduras de diferentes ramas y entonces cuantificamos el número de frutos presentes (González *et al.* 2005). Dado que los pedicelos florales persisten en los racimos, también cuantificamos el número de pedicelos, como una medida del número de flores producidas por el racimo durante el

periodo de floración (Ree 1997); es importante resaltar que no observamos evidencia de depredación de botones flores, flores abiertas y/o frutos que comenzaban su desarrollo (Figura 2.2 A-B). Además de lo anterior, exploramos posibles asimetrías entre los morfos en la cantidad de semillas viables e inviables-abortadas. Para ello, seleccionamos varias plantas al azar ($n = 30$ /morfo) de las cuales recolectamos frutos completamente maduros ($n = 115$ en plantas brevistiladas y 114 en longiestiladas) de diferentes infrutescencias. La evaluación de la viabilidad de las semillas fue indirecta, asumiendo que aquellas semillas con apariencia regular (tamaño y forma consistente al promedio) eran potencialmente viables mientras que aquellas con apariencia irregular (reducidas, amorfas y sin endosperma) fueron consideradas como inviables (ver Arista *et al.* 1992, Kearns & Inouye 1993, Ayala-Cordero *et al.* 2004) (ver Figura 2.2 C a y b).

2.7. Expresión de la función sexual entre los morfos florales: Con el fin de evaluar la función sexual de las plantas de *P. demissa*, cuantificamos el número de óvulos por flor ($n = 100$ flores/morfo, en 30 plantas/morfo) en cada morfo y luego usando los datos sobre producción de polen por flor (Capítulo 1), estimamos la función de género potencial (masculina y femenina) de cada morfo siguiendo a García-Robledo (2008) como sigue:

$$G_{pot_i} = \frac{\overline{OV}_i}{\overline{OV}_i + (\overline{PO}_i \times E_{pot_i})}$$

$$A_{pot_i} = \frac{\overline{PO}_i \times E_{pot_i}}{\overline{OV}_i + (\overline{PO}_i \times E_{pot_i})}$$

Donde G_{pot} y A_{pot} representan la proporción de genes que potencialmente podrían ser transferidos a la siguiente generación a través de la función femenina (óvulos) y masculina

(polen) respectivamente; i representa cualquiera de los morfos. E_{pot} es un factor para ajustar a G_{pot} y A_{pot} considerando la relación entre el número de granos de polen producidos por el morfo i (\overline{PO}_i) en función de la cantidad óvulos potencialmente disponibles para polinizaciones legítimas (\overline{OV}_j) así:

$$E_{pot} = \frac{\overline{OV}_j}{\overline{PO}_i}$$

Además de la función de género potencial, también estimamos la función de género real (observada) en cada morfos (García-Robledo 2008). Para ello, usamos como predictores el número promedio de semillas aparentemente viables Sv_i (ver sección 2,6) y el número promedio de granos de polen legítimo por estigma en cada morfo \overline{PO}_{ij} (ver sección 2,5) así:

$$G_{real_i} = \frac{Sv_i}{Sv_i + (\overline{PO}_{ij} \times E_{real_i})}$$

$$A_{real_i} = \frac{\overline{PO}_{ij} \times E_{real_i}}{Sv_i + (\overline{PO}_{ij} \times E_{real_i})}$$

G_{real} y A_{real} son estimadores de la contribución genética de cada morfo a la siguiente generación a través de su función reproductiva femenina (semillas viables) y masculina (donación de polen) respectivamente. E_{real} es un factor para ajustar a G_{real} y A_{real} , el cual considera la relación entre el número promedio de semillas aparentemente viables por fruto producidas por el morfo opuesto (Sv_j), en función del número promedio de granos de polen donados hacia los estigmas de ese morfo (\overline{PO}_{ij}) como sigue:

$$E_{real} = \frac{Sv_j}{\overline{PO}_{ij}}$$

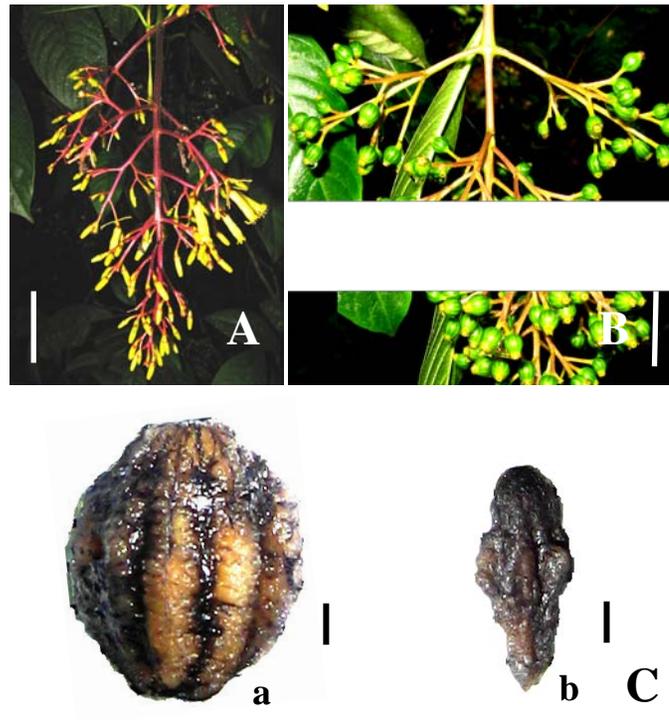


Figura 2.2. *Palicourea demissa* (Rubiaceae): A - inflorescencia, B - infrutescencia con frutos en desarrollo; C, a - semilla aparentemente viables y b - semilla aparentemente inviable. Escala: 3 cm en A, 2,5 cm en B y 1 mm en C.

Finalmente, con el fin de explorar si posibles asimetrías en el flujo de polen legítimo entre los morfos, modifican su función sexual (masculina y femenina) potencial, calculamos la desviación entre la función de sexual potencial y la función sexual real femenina (ΔG) y masculina (ΔA) en ambos morfos florales con la siguiente ecuación (García-Robledo 2008):

$$\Delta G = G_{\text{real}_i} - G_{\text{pot}_i}$$

$$\Delta A = A_{\text{real}_i} - A_{\text{pot}_i}$$

Como vimos anteriormente, G_{real} y A_{real} son estimadores de la contribución proporcional real de genes transferidos por cada morfo a la siguiente generación a través de su función reproductiva femenina (semillas) y masculina (polen) respectivamente y, G_{pot} y A_{pot} , estiman la proporción potencial de genes que podían ser transferidos a la siguiente generación a través de la función femenina (óvulos) y masculina (polen) respectivamente.

Dado que los morfos de *P. demissa* presentan una proporción de 1:1 dentro de la población objeto de estudio (Valois-Cuesta & Novoa-Sheppard 2006) y, además, no difieren en el número de inflorescencias e infrutescencia por planta (Valois-Cuesta & soriano, datos sin publicar), pero quizás sí, en el número flores y frutos por inflorescencia e infrutescencias respectivamente, los parámetros de las anteriores ecuaciones fueron estimados a partir de datos extrapolados a nivel de inflorescencia e infrutescencia para ambos morfos así:

$$\overline{OV}_i = \text{número de óvulos} \cdot \text{flor } i^{-1} \times \text{número de flores} \cdot \text{inflorescencia } i^{-1}.$$

$$\overline{PO}_i = \text{número de granos de polen} \cdot \text{flor } i^{-1} \times \text{número de flores} \cdot \text{inflorescencia } i^{-1}.$$

$$Sv_i = \text{número de semillas viables} \cdot \text{fruto } i^{-1} \times \text{número de frutos} \cdot \text{infrutescencia } i^{-1}.$$

$$\overline{PO}_{ij} = \text{número de granos de polen } i \text{ sobre estigma } j \times \text{número de flores} \cdot \text{inflorescencia } j^{-1}$$

2.8. Análisis de datos: Las diferencias entre los morfos en su capacidad de auto deposición de polen, recepción del mismo y producción de frutos y semillas fueron analizadas con estadística paramétrica, para ello los datos fueron transformados al \log_{10} o a su raíz cuadrada con el fin de corregir su normalidad y homoscedasticidad. En el texto, tablas y figuras se muestran los datos (media \pm 1 error estándar) sin transformar. Las pruebas estadísticas usadas, incluyendo algunas no paramétricas para otros casos, se indican sobre el texto. Todos los análisis fueron realizados en el programa SPSS 12.0.

3. RESULTADOS

3.1. Disposición espacial de los morfos en la población: La distancia que guardaron las plantas focales de cada morfo con su vecino morfo-específico más cercano fue similar en todas las combinaciones posibles entre los morfos (planta focal → vecino más cercano: brevistilada → brevistilada = $2,25 \pm 0,43$ metros, $n = 15$; brevistilada → longistilada = $2,20 \pm 0,33$, $n = 19$; longistilada → longiestiladas = $2,57 \pm 0,36$, $n = 14$; longistilada → brevistilada = $1,97 \pm 0,32$; $n = 18$; Kruscal-Wallis, $X^2 = 1,82$, $g.l = 3$, $P = 0,60$). Además, no observamos un patrón de segregación morfo-específico entre ellos ($S = -0,12$).

3.2. Auto-deposición espontánea de polen: En ambos morfos, las flores excluidas de visitantes florales experimentaron muy poca autodeposición de polen al compararlas con aquellas flores expuestas a éstos (breviestiladas; excluidas = $6,8 \pm 2,18$ granos de polen · estigma⁻¹, $n = 30$ flores; no excluidas = $225 \pm 21,7$, $n = 30$; ANOVA, $F = 99,607$, $P < 0,0001$; longiestiladas: excluidas = $0,83 \pm 0,4$, $n = 30$; no excluidas = $79 \pm 7,5$, $n = 30$; $F = 108,145$, $P < 0,0001$). A pesar de ello, las flores breviestiladas se autodepositaron más polen que las flores longiestiladas (Prueba $t = -2,704$, $P = 0,009$).

3.3. Patrones naturales de deposición de polen y producción de frutos: Bajo condiciones naturales los estigmas de las flores breviestiladas reciben más polen coespecífico que los estigmas de las flores longiestiladas (breviestiladas = $132,9 \pm 7,2$ granos de polen · estigma⁻¹, $n = 210$ estigmas; longiestiladas = $52,8 \pm 3,1$, $n = 210$; $t = 10,179$, $P < 0,0001$). Al clasificar los granos de polen por diferencias de tamaño, pudimos evidenciar que los estigmas de las flores

breviestiladas reciben mayor cantidad de polen legítimo ($78,6 \pm 4,5$ granos de polen \cdot estigma⁻¹, $n = 210$) e ilegítimo ($54,4 \pm 4,4$, $n = 210$) que los estigmas de las flores longiestiladas (legítimo = $13,1 \pm 1,1$ granos de polen \cdot estigma⁻¹, $n = 210$ flores; ilegítimo = $39,7 \pm 2,6$, $n = 210$). Sin embargo, las flores breviestiladas experimentan proporcionalmente mayores montos de polinización legítima ($t = 17,007$, $P < 0,0001$; Figura 2,3). Dentro de las muestras estigmáticas examinadas, encontramos en promedio 7,3% de granos polen de otras especies, este polen no fue clasificado y se excluyó de los análisis.

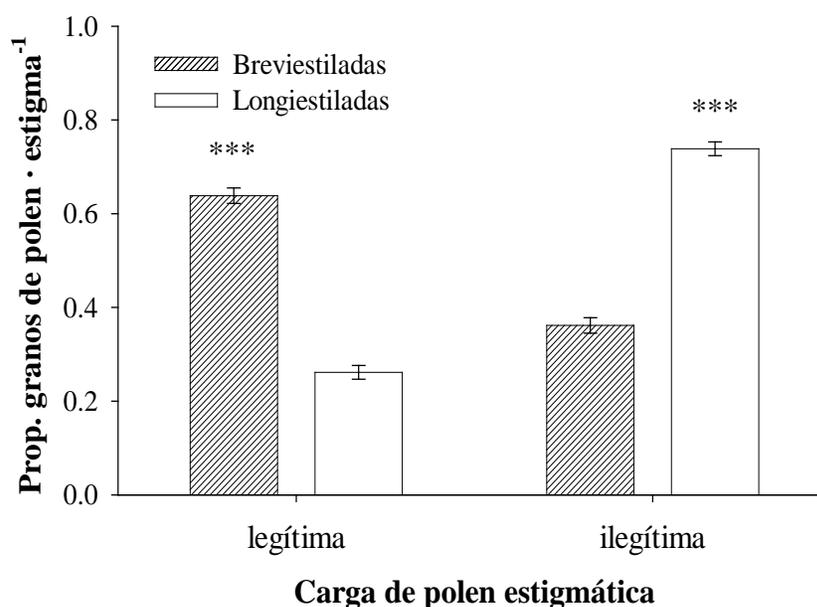


Figura 2.3. Proporción de polen legítimo (compatible) e ilegítimo (incompatible) clasificado por diferencia de tamaños sobre los estigmas de las flores breviestiladas y longiestiladas de *Palicourea demissa* (Rubiaceae). Diferencia entre morfos *** $P < 0,0001$

En general las flores de ambos morfos florales tienden a acumular granos de polen coespecífico (legítimo e ilegítimo) conforme avanza el día (ANOVA; efecto de la hora del día; breviestiladas, $F = 20,34$, $P < 0,0001$; longiestiladas, $F = 14,72$, $P < 0,0001$). Sin embargo, los

estigmas de las flores breviestiladas experimentan montos significativamente superiores a los de las flores longiestiladas (Figura 2.4A); a pesar de ello, los estigmas de las flores breviestiladas reciben durante todo el día una mayor proporción de polen legítimo (Figura 2.4B).

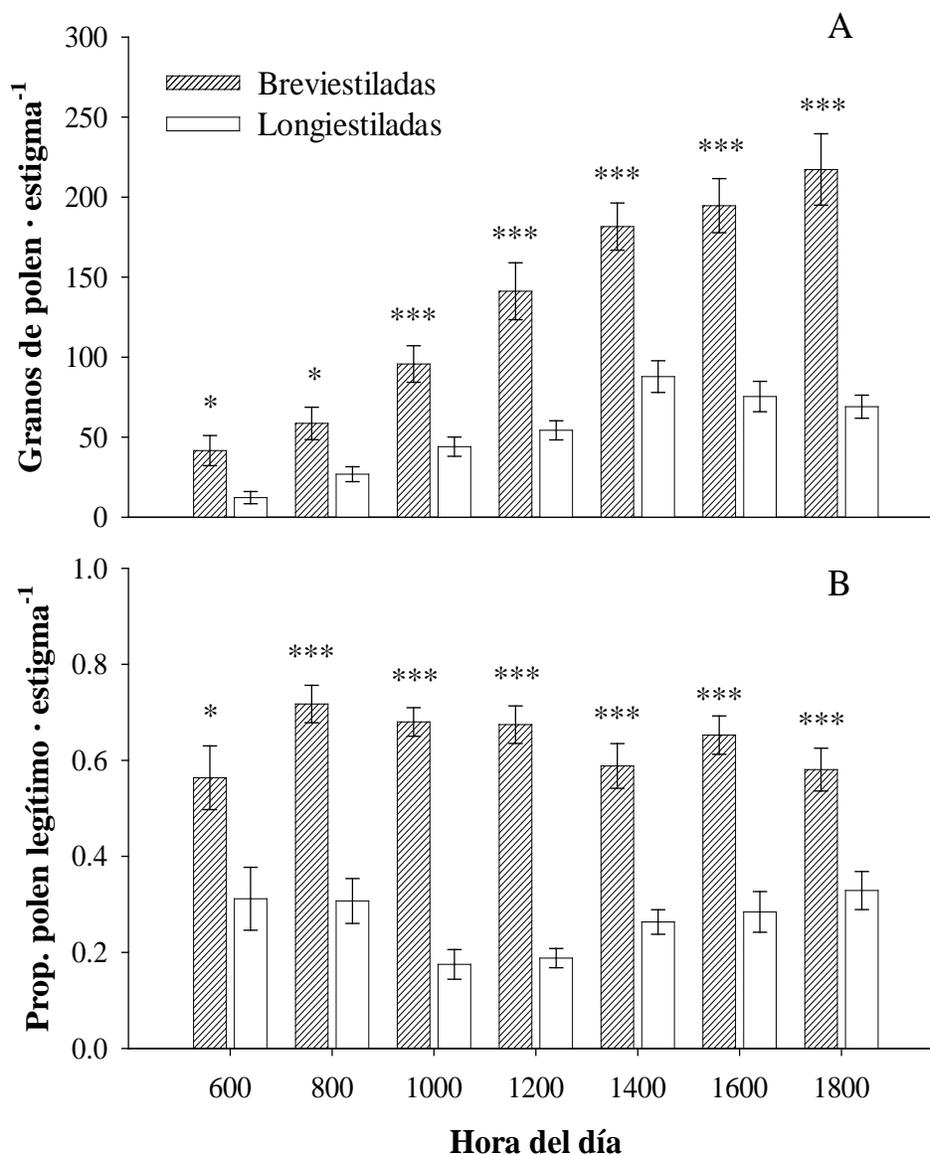


Figura 2.4. Tasas de deposición de polen coespecífico sobre estigmas de flores breviestiladas y longiestiladas de *P. demissa*. A - Número de granos de polen coespecífico por estigma y B - su proporción de polen legítimo. Diferencia entre morfos * $P < 0,05$, *** $P < 0,0001$.

El análisis de probabilidades en la transferencia de polen entre los morfos indicó que desde el punto de vista de la función femenina, una flor breviestilada tiene 1,4 veces más probabilidad de recibir un grano de polen legítimo que uno ilegítimo, mientras que una flor longiestilada tiene menos probabilidad (0,33) de recibir un grano de polen proveniente del morfo opuesto. Ahora bien, al analizar los morfos desde su función masculina, encontramos que un grano de polen de una flor longiestilada tiene 2,0 veces más probabilidad de ser depositado sobre un estigma legítimo que sobre uno ilegítimo; mientras que un grano de polen de una flor breviestilada tiene menos (0,24) probabilidad de llegar hasta un estigma legítimo (Tabla 2.1). Con relación a ello, fue interesante encontrar que aunque los morfos no difieren en la cantidad de flores por inflorescencia (breviestiladas = $122,4 \pm 7,3$ flores \cdot inflorescencia⁻¹, $n = 48$ inflorescencias; longiestiladas = $109,5 \pm 5,9$, $n = 55$; ANOVA, $F = 1,92$, $P = 0,169$), las infrutescencias de éstos, si difieren significativamente en la cantidad de frutos en desarrollo, siendo más productivas las plantas breviestiladas (breviestiladas = $68,4 \pm 4,9$ frutos \cdot infrutescencia⁻¹, $n = 48$ infrutescencias; longiestiladas = $52,5 \pm 3,2$, $n = 55$; $F = 7,68$, $P = 0,007$, Figura 2.5A).

En ambos morfos la cantidad de semillas aparentemente viables fue significativamente superior al número de semillas abortadas (breviestiladas: potencialmente viables = 215, abortadas = 15 semillas, $n = 230$ semillas; Chi-cuadrado, $X^2 = 173,91$, $gl = 1$, $P < 0,0001$; longiestiladas: potencialmente viables = 194, abortadas = 34, $n = 228$; $X^2 = 112,28$, $gl = 1$, $P < 0,0001$). Sin embargo, las plantas breviestiladas producen en promedio más semillas aparentemente viables por fruto que las plantas longiestiladas (breviestiladas = $1,9 \pm 0,03$ semillas aparentemente viables \cdot fruto⁻¹, $n = 115$ frutos; longiestiladas = $1,7 \pm 0,04$, $n = 114$; $t = 3,14$, $P = 0,002$; Figura 2.5B). La relación entre semillas potencialmente viables y abortadas, fue superior en plantas

breviestiladas (viables/abortadas = 14,3, $n = 230$ semillas) que en plantas longiestiladas (5,7, $n = 228$), ya que esta últimas presentaron más semillas abortadas por fruto (breviestiladas = $0,1 \pm 0,03$ semillas abortadas \cdot fruto⁻¹, $n = 115$ frutos; longiestiladas = $0,3 \pm 0,04$, $n = 114$; $t = -3.15$, $P = 0.002$; Figura 2.5B).

Tabla 2.1. Probabilidades que tiene un determinado grano de polen de ser transferido a los estigmas de cada morfos. ** Polinización legítima, * polinización ilegítima.

Donador (polen)	Receptor (estigma)	
	Longiestilado	Breviestilado
Longiestilado	$0,92 \times 10^{-3}$ *	$1,83 \times 10^{-3}$ **
Breviestilado	$0,31 \times 10^{-3}$ **	$1,27 \times 10^{-3}$ *

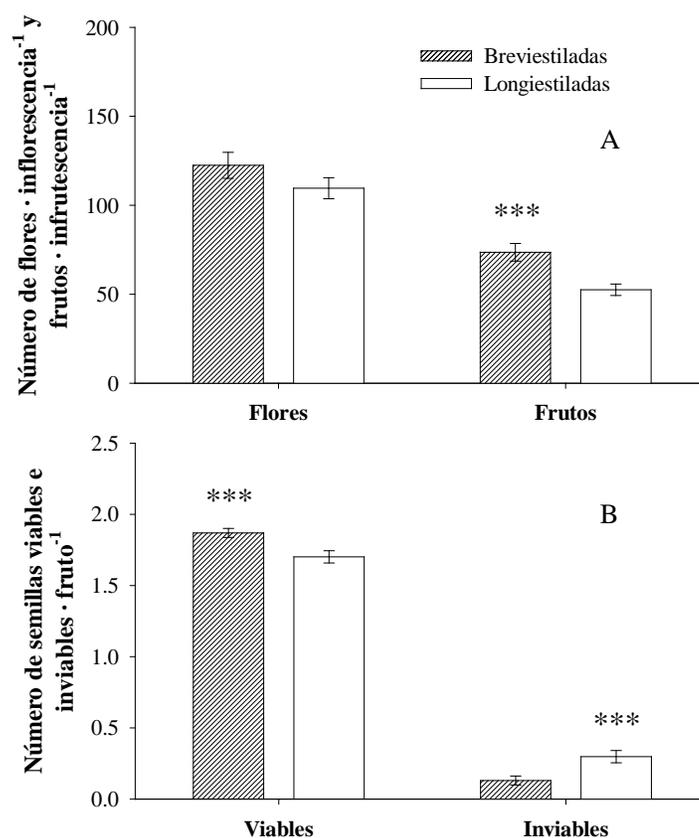


Figura 2.5. (A) Producción de flores, frutos y (B) número de semillas aparentemente viables y abortadas (inviabiles) en plantas breviestiladas y longiestiladas de *P. demissa* (Rubiaceae). Diferencia entre morfos *** $P < 0,01$.

3.4. Expresión de la función sexual de los morfos: Nuestro análisis sobre la función sexual de los morfos florales de *P. demissa*, señaló que las plantas breviestiladas ($244,9 \pm 14,6$ óvulos \cdot inflorescencia⁻¹, $n = 48$ inflorescencias; $230956,4 \pm 13802,1$ granos de polen \cdot inflorescencia⁻¹, $n = 48$) no difieren de las plantas longiestiladas ($219,2 \pm 11,8$ óvulos \cdot inflorescencia⁻¹, $n = 48$; $207767,1 \pm 11169,4$ granos de polen \cdot inflorescencia⁻¹, $n = 48$) en sus funciones sexuales potenciales (A_{pot} [breviestiladas = $0,4741 \pm 0,02$, $n = 48$; longiestiladas = $0,5259 \pm 0,02$, $n = 48$; $F = 3,71$, $P = 0,06$]; G_{pot} [breviestiladas = $0,5259 \pm 0,02$, $n = 48$; longiestiladas = $0,4741 \pm 0,02$, $n = 48$; $F = 3,51$, $P = 0,06$]; Figura 2.6A). Sin embargo, al analizar la función sexual real de los morfos basándonos en estimados sobre donación de polen legítimo (función masculina) y producción de semillas aparentemente viables (función femenina), encontramos que los morfos presentaron importantes diferencias (donación de polen hacia el morfo opuesto [breviestiladas = $1435,5 \pm 77,2$ granos de polen \cdot inflorescencia⁻¹, $n = 55$ inflorescencias; longiestiladas = $9625,2 \pm 575,2$, $n = 48$]; producción de semillas aparentemente viables [breviestiladas = $139,7 \pm 9,4$ semillas \cdot infrutescencia⁻¹, $n = 48$ infrutescencias; longiestiladas = $89,3 \pm 5,5$, $n = 55$]; en este sentido, las plantas breviestiladas mostraron mayor éxito reproductivo femenino (G_{real} : breviestiladas = $0,6055 \pm 0,02$, $n = 48$ inflorescencias; longiestiladas = $0,3945 \pm 0,02$, $n = 48$; $F = 37,77$, $P < 0,0001$), mientras que las plantas longiestiladas fueron más exitosas a través de su función masculina (A_{real} : breviestiladas = $0,3945 \pm 0,02$, $n = 48$; longiestiladas = $0,6055 \pm 0,02$, $n = 48$; $F = 37,77$, $P < 0,0001$; Figura 2.5B); esto determinó que la función sexual real (observada) en ambos morfos, se encontrara desviada significativamente de su función sexual esperada o potencial (efecto del morfo floral; desviación desde G_{pot} ; $F = 45,80$, $P < 0,0001$; desviación desde A_{pot} ; $F = 47,29$, $P < 0,0001$; Figura 2.5C).

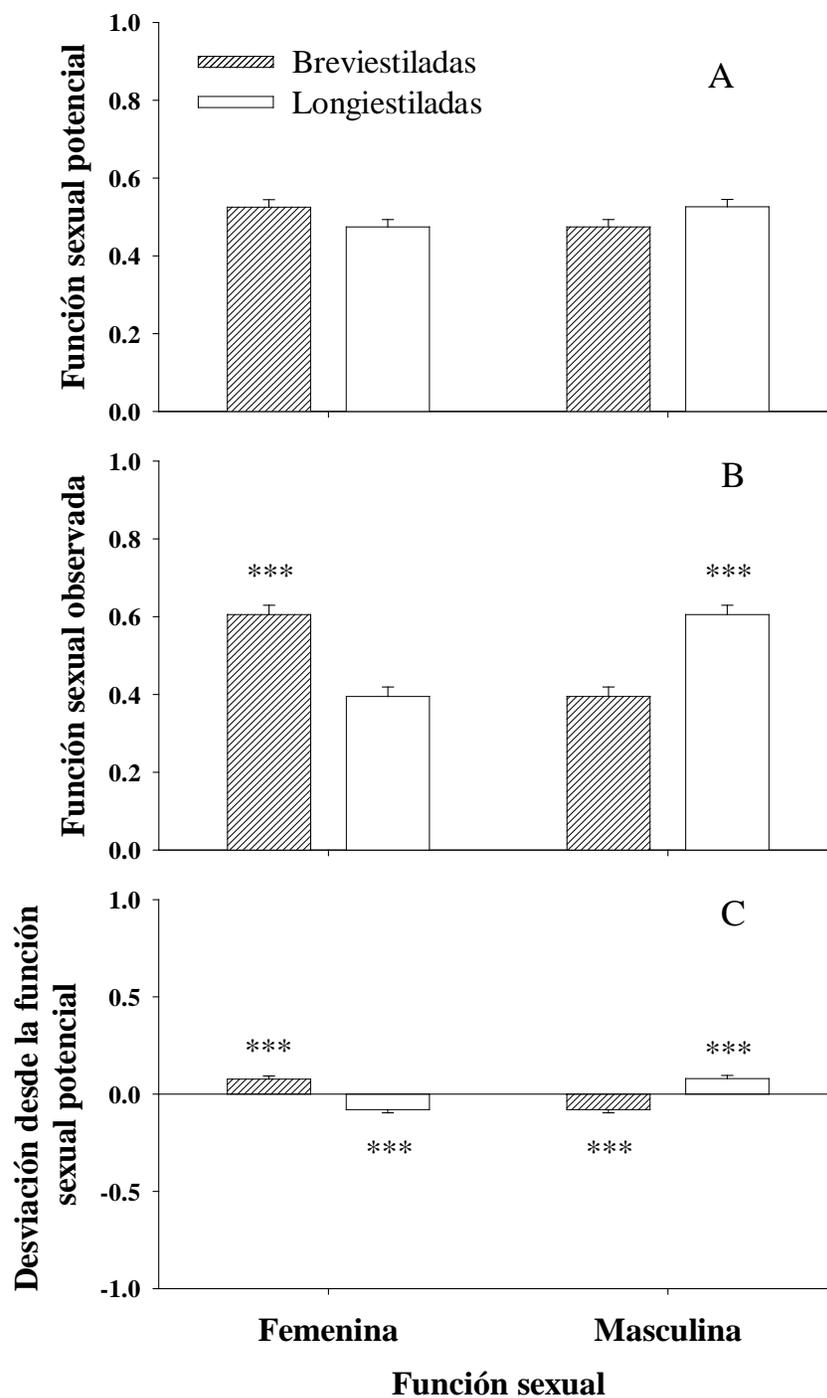


Figura 2.6. Contribución de las funciones reproductivas masculina y femenina a la función sexual potencial (A) y a la función sexual real (B) de los morfos florales de *Palicourea demissa*

(Rubiaceae). (C) Desviación de la función sexual real (observada) a partir de la función potencial. Diferencias entre los morfos *** $P < 0,0001$.

4. DISCUSIÓN

4.1. Disposición espacial de los morfos en la población: Uno de los factores que indica la presencia de reproducción clonal en plantas diestílicas es la formación de parches conformados por individuos de un mismo morfo floral. En nuestro caso, no observamos un patrón de segregación morfo-específico (conformación de parches del mismo morfo) entre las plantas de *P. demissa*; ello indica que las plantas de cada morfo se establecen de manera aleatoria dentro de la población (ver también Ree 1997 y Ornelas *et al.* 2004b) y además, sugiere que la adecuación de los morfos depende en gran medida de su éxito reproductivo por la vía sexual. En este sentido, es posible que este patrón de disposición aleatoria encontrado entre los morfos de *P. demissa*, favorezca su éxito de polinización, pues el hecho que las plantas de ambos morfos se encuentren próximas unas de las otras en el espacio, aumenta la probabilidad que los polinizadores generen un flujo de polen recíproco entre ellas. Este planteamiento puede apoyarse en cierta evidencia donde se señala que los colibríes (que en nuestro caso son visitantes frecuentes de *P. demissa*) preferiblemente vuelan distancias cortas y visitan las plantas más cercanas a menos que el recurso que ofrezcan sea de muy baja calidad (Wolf & Hainsworth 1990).

4.2. Auto-deposición espontánea de polen: En *P. demissa* las flores excluidas de visitantes florales experimentan una insignificante auto-deposición espontánea de polen al compararlas con aquellas flores control (ver también Hernández & Ornelas 2007a). Además de ello, mediante algunas observaciones de campo hemos registrado varias especies de colibríes visitando las flores de *P. demissa* a una tasa relativamente constante durante todo el día (Capítulo

3). A partir de esto, podríamos inferir que las variaciones que encontramos bajo condiciones naturales en las cargas de polen estigmáticas de ambos morfos de *P. demissa*, son principalmente el resultado de la actividad de forrajeo de sus visitantes naturales (ver Cariveau *et al.* 2004 y Capítulo 3). Varios trabajos apoyan esta apreciación; p. e. Young & Stanton (1990) encontraron que en la especie *Raphanus sativus* (Brassicaceae) tanto la remoción de polen desde las anteras como la deposición de éste sobre estigmas, se correlaciona positivamente con el número de visitas florales que experimentan las plantas (ver también Rush *et al.* 1995); igualmente, Rademaker *et al.* (1997) estimaron que durante una singular visita (a flores recién abiertas) el abejorro *Bombus terrestris* colecta un monto de polen del cual aproximadamente el 60% es depositado en la siguiente flor visitada. Por su parte, Hernández & Ornelas (2007a) sugirieron que los patrones de deposición de polen de la especie *Palicourea padifolia*, donde flores breviestiladas reciben más polen legítimo que las flores longiestiladas, pueden ser atribuidos a la dinámica de forrajeo de sus visitantes florales, los cuales son principalmente colibríes.

4.3. Expresión sexual de los morfos florales de *P. demissa*: En un gran número de especies heteroestílicas los estigmas de las flores longiestiladas reciben más granos de polen que los estigmas de las flores breviestiladas (Levin 1968, Ornduff 1970, 1971, Ganders 1979, Olesen 1979b, Swamy & Habadur 1984), fenómeno atribuido a que las anteras en las flores breviestiladas y los estigmas en las longiestiladas son más accesibles a los visitantes florales (Swamy & Habadur 1984). Sin embargo, es posible que esta tendencia también esté asociada a que en estas especies, las flores longiestiladas presentan estigmas y/o papilas estigmáticas de mayor tamaño que en las breviestiladas, lo cual seguramente aumenta su probabilidad de captura de polen (ver Ganders 1979). Opuesto a lo anterior, en *P. demissa* los estigmas de las flores

breviestiladas recibieron significativamente más granos de polen compatible que los estigmas de las flores longiestiladas, patrón que se ha documentado en un gran número de Rubiáceas, en las cuales, al igual que en *P. demissa* (Figura 1AB), el estigma del morfo breviestilado supera en tamaño al del morfo longiestilado (Sobrevilla *et al.* 1983, Feinsinger & Busby 1987, Stone 1995, Lau & Bosque 2003, Ornelas *et al.* 2004 a y b, García-Robledo 2008, Hernández & Ornelas 2007a).

Las plantas breviestiladas de *P. demissa* produjeron más frutos y semillas aparentemente viables por inflorescencia que las plantas longiestiladas (Figura 2.5). Estas diferencias en el éxito reproductivo femenino de los morfos, pueden estar explicada por el flujo asimétrico de polen legítimo que favorece a las flores breviestiladas (ver también Ornelas *et al.* 2004 a. Hernández & Ornelas 2007, García-Robledo 2008). Por otra parte, aunque en *P. demissa* solamente hemos observado desarrollo de frutos en cruces intermorfos (Capítulo 1), no descartamos la posibilidad que la mayor cantidad de semillas abortadas por fruto observadas en las plantas longiestiladas, se deba a que este morfo experimenta mayores niveles de polinización intramórfica. En muchas especies heteroestíficas se ha encontrado que las flores longiestiladas tienen una respuesta de autoincompatibilidad más débil que las flores breviestiladas (ver Dulberger 1992); p. e., Bawa & Beach (1983) encontraron que en varias especies de Rubiaceae, el punto máximo de penetración de tubos polínicos “ilegítimos” en flores breviestiladas se dio a nivel del estigma, mientras que en flores longiestiladas, los tubos “ilegítimos” podían penetrar hasta la base del estilo (ver también Feinsinger & Busby 1987). Entonces, considerando tales evidencias, es probable que en *P. demissa* granos de polen ilegítimos sobre flores longiestiladas desarrollen tubos polínicos que quizás penetren hasta los ovarios y fecunden óvulos. Sin embargo, es posible que debido a mecanismos genéticos de evasión a los efectos de la endogamia y selección de progenie con

mayor vigor, tales fecundaciones ilegítimas terminen en embriones abortados selectivamente (de Jong & Klinkhamer 2005).

En especies heteroestílicas, el dimorfismo en el tamaño del estigma se ha interpretado como un mecanismo que permite aumentar el área de recepción de polen favoreciendo el flujo hacia estigmas menos accesibles (Dulberger 1992); bajo esta idea, es probable que el mayor tamaño del estigma encontrado en las flores breviestiladas de *P. demissa*, represente una adaptación que permite a este morfo, aumentar su probabilidad de recibir granos de polen legítimo (ver Ree 1999). En especies con hercogamia recíproca imperfecta, es probable que el tamaño del estigma sea un atributo más importante que la posición del mismo en explicar las diferencias en recepción de polen entre los morfos (Hernández & Ornelas 2007a). Sin embargo, nosotros sugerimos que en la población de *P. demissa* objeto de estudio, tanto el tamaño y la posición del estigma, así como también, la posición de las anteras y el tamaño de la corola seguramente juegan un rol fundamental en la facilitación de la polinización cruzada entre los morfos, especialmente hacia el morfo breviestilado; p. e., observamos que los estigmas de flores breviestiladas tienen mayor superficie de recepción de polen que los estigmas de flores longiestiladas, además, éstos se encuentran simétricamente alineados con respecto a la posición de las anteras de flores longiestiladas, lo cual no ocurre en el patrón invertido (ver Capítulo 1, Figura 1.4). Así, basándonos en los planteamientos de la hipótesis Darwiniana (Darwin 1877, Lloyd & Webb 1992, Barrett 2002a), se debería esperar que los estigmas de las flores breviestiladas de *P. demissa* experimentaran mucha más polinización legítima que las flores longiestiladas, tal como efectivamente ocurrió (ver también Stone & Tompson 1994, Lau & Bosque 2003, Ornelas *et al.* 2004a, Hernández & Ornelas 2007a).

Aunque el tamaño del estigma y su posición relativa con relación a las anteras del morfo opuesto (hercogamia recíproca) puede explicar en parte las diferencias entre los morfos en recepción de polen (Barrett 2002a, Ornelas *et al.* 2004a, Hernández y Ornelas 2007a, este estudio), es importante resaltar que otros atributos florales tales como la producción de néctar floral y sus patrones de disponibilidad espacio-temporal, también pueden jugar un rol fundamental indirecto en la mediación de la polinización cruzada entre los morfos de *P. demissa*, ya que variaciones en la producción y oferta de néctar entre los morfos, probablemente contribuyen a recompensar diferencialmente a polinizadores efectivos y, en consecuencia, éstos podrían generar que los morfos experimenten diferencias en su éxito reproductivo (Stone & Thompson 1994, Murcia & Feinsinger 1996, Manetas & Petropoulou 2000, Ornelas *et al.* 2004a y b). Esta posibilidad se exploró en el capítulo 3.

Nuestro análisis sobre la expresión sexual de los morfos de *P. demissa*, sugiere que en la población estudiada, las plantas brevistiladas podrían estar transfiriendo a la progenie una proporción de genes mucho mayor a través de su función femenina (óvulos) que a través de su función masculina (polen), mientras que plantas longiestiladas podrían estarlo haciendo de manera inversa (Figura 26A-B) (ver también García-Robledo 2008). Al respecto, Casper (1992) y Baker (1958) sugieren que los morfos florales en plantas heteroestílicas pueden presentar una ganancia diferencial de éxitos reproductivos a través de su función masculina o femenina; tal apreciación, ha sido considerada como una de las principales evidencias que sugieren a la condición diestílica como una de las rutas hacia la evolución de la dioecia (plantas especializada en una determinada función sexual) en plantas con flores (Bawa 1980, Beach & Bawa 1980). Al respecto, Bawa (1980) sugiere que en los casos donde especies dioicas han evolucionado desde ancestros diestílicos, los individuos masculinos han surgido desde plantas brevistiladas, mientras

que los individuos femeninos lo han hecho a partir de plantas longiestiladas. Este razonamiento es muy consistente, si consideramos los caracteres fenotípicos de las flores diestílicas como la principal evidencia. Sin embargo, al evaluar el funcionamiento de muchos sistemas diestílicos, especialmente en especies de *Palicourea* entre otras Rubiaceas, la apreciación sobre el origen de plantas masculinas y femeninas desde ancestros breviestilados y longiestilados respectivamente, no es muy consistente; p. e., en *P. demissa* las plantas breviestiladas experimentaron más polinización legítima y produjeron significativamente más frutos y semillas aparentemente viables por inflorescencias que las plantas longiestiladas, las cuales a su vez, fueron mucho más eficientes que las plantas breviestiladas en la donación de polen hacia estigmas compatibles (Tabla 2.1 y Figura 2.5, ver también Figura 2.6). Tendencias similares a ésta han sido documentadas en otras especies diestílicas de la familia Rubiaceae tales como *Palicourea fendleri* (Lau & Bosque 2003), *Palicourea padifolia* (Ornelas *et al.* 2004a, Hernández & Ornelas 2007a) y *Arcytophyllum lavarum* (García-Robledo 2008), pero ver Ree (1997) para un caso opuesto.

Aun falta mucho por conocer sobre las bases genéticas y/o los mecanismos selectivos que gobiernan la transición evolutiva desde la diestilia hacia la dioecia (Barrett 2002a). Sin embargo, es probable que los polinizadores jueguen un papel importante como mediadores de un flujo de polen asimétrico que conlleve a que los morfos se especialicen gradualmente hacia una determinada función sexual (Beach & Bawa 1980, García-Robledo 2008). Un aspecto interesante de la expresión sexual funcional de los morfos de especies diestílicas es que ésta puede eventualmente variar con el tiempo; al respecto, en un estudio que duró cinco años, González *et al.* (2005) encontraron que en 1998 y 1999 las plantas breviestiladas de *P. padifolia* presentaron más éxito reproductivo femenino que las plantas longiestiladas, mientras que en el

2002 ocurrió el patrón opuesto. Al respecto es probable que tales variaciones en la expresión sexual de especies con polimorfismo floral se deba a cambios en la frecuencia, abundancia y composición del ensamblaje de polinizadores dentro y entre estaciones de floración (González *et al.* 2005).

Las características genéticas de la heteroestilia (un factor dialélico *Ss* en diestilia y dos factores dialélicos en triestilia *Ss* y *Mm*; Lewis & Lones 1992) son semejantes en muchas especies de diferentes grupos de plantas no emparentados filogenéticamente y, por otro lado, estudios moleculares de la determinación sexual de especies con especialización de género (dioicas, androdioicas y ginodioicas), han revelado importantes variaciones genéticas entre taxa, sugiriendo que la dioecia se ha originado a través de diferentes rutas evolutivas (Barrett 2002a).

Por otro lado, es importante resaltar la expresión sexual de muchas especies con especialización de género, puede estar regulada por los niveles de algunas fitohormonas en las plantas (Chailakhyan 1979, Dellaporta & Calderon-Urrea 1993, Irish & Nelson 1989, Yin & Quinn 1995); p. e., Tanimoto (2007) encontró que al aumentar la concentración de Acido Gliberílico, plantas masculinas de *Sagittaria latifolia* tienden a producir flores femeninas, mientras que al aumentar las concentraciones de Paclobutrazol, plantas femeninas y trimonoicas tienen a producir flores masculinas y hermafroditas.

En términos generales nuestros resultados sugieren que en *P. demissa* pudiese existir un cierto grado de especialización en la función sexual de los morfos (ver Casper 1992, Lloyd 1979). Sin embargo, dado que posibles variaciones en la frecuencia, abundancia y composición del ensamblaje de polinizadores puede influenciar el éxito reproductivo de estas plantas (González *et al.* 2005), consideramos que para dilucidar esta posibilidad, se deberá profundizar aún más en el conocimiento de la biología reproductiva de esta especie, a través de enfoques que nos permitan

entender el rol que juegan los visitantes florales dentro del proceso de polinización intermórfica y conocer los mecanismos bioquímicos y genéticos que regulan la expresión sexual en esta especie.

**PRODUCCIÓN DE NÉCTAR EN FLORES BREVIESTILADAS Y LONGIESTILADAS
DE *Palicourea demissa* (RUBIACEAE): IMPLICACIONES SOBRE LA TASA DE VISITA
Y POLINIZACIÓN.**

RESUMEN

Las poblaciones de plantas diestílicas se caracterizan por la coexistencia de dos tipos de individuos que difieren en algunos atributos morfológicos de las flores. Debido a que estos morfos florales generalmente son autoincompatibles, el éxito reproductivo de cada uno de ellos, depende en gran medida de la actividad sus visitantes florales, la cual puede estar mediada por la producción de néctar en estas plantas. En este trabajo exploramos el papel de la oferta de néctar dentro del sistema de polinización de especies diestílicas, para ello, usamos como modelo de estudio a la especie *Palicourea demissa* (Rubiaceae), un arbusto polinizado por colibríes en las selvas nubladas de Los Andes venezolanos. Los morfos florales de *P. demissa* no difieren en la calidad de la recompensa (volumen y concentración del néctar) que ofrecen a sus visitantes florales y ninguno de ellos, se ve estimulado a producir volúmenes extras de néctar como resultado de su interacción con polinizadores; en consecuencia, las plantas de ambos morfos experimentan tasas de visita similares en el tiempo. Algunas de nuestras observaciones previas muestran que las plantas de ambos morfos se encuentran dispuestas aleatoriamente en esta población; entonces, es probable que la homogeneidad en oferta de néctar observada aquí entre ellas, favorezca su éxito reproductivo.

Palabras clave: diestilia, recompensa floral, colibríes, exogamia, *Palicourea*.

1. INTRODUCCIÓN

En los bosques húmedos neotropicales la mayoría de las plantas son polinizadas a través de su interacción con animales (Bawa 1990); en la gran mayoría de estas plantas, el néctar cumple un rol importante como recompensa para los polinizadores (Simpson & Neff 1983, Langenberger & Davis 2002, Murcia 2002). El balance energético entre los costos que supone la producción de néctar para las plantas y las demandas energéticas de los polinizadores, junto al costo de extracción del recurso desde las flores, incide directamente sobre las estrategias reproductivas de las plantas y sobre la dinámica de forrajeo de sus polinizadores (Murcia 2002).

En varios trabajos se han documentado relaciones positivas entre la disponibilidad de néctar y la cantidad de visitas que experimentan las plantas (Martínez del Rio & Eguiarte 1987, Zimmerman 1983, Devlin & Stephenson 1985, Ree 1997, Contreras & Ornelas 1999, Cresswell 1999, Pappers *et al.* 1999, Lasso & Naranjo 2003, Ornelas *et al.* 2004 a y b); p. e. en algunas plantas dicógamas se conocen casos donde los polinizadores tienden a visitar con mayor frecuencia las flores durante la fase sexual que secreta mayor cantidad de néctar (Carlson & Harás 2006). Kearns & Inouye (1993) sugieren que el número de flores visitadas por planta, la duración de la visita en cada flor y los movimientos de los polinizadores dentro y entre inflorescencias, pueden ser influenciados por la calidad de néctar y sus patrones de disponibilidad espacio-temporal. Según lo anterior y considerando que los patrones de búsqueda de alimento de los polinizadores, pueden generar diferentes patrones de deposición de polen (Murcia 2002, Engel & Irwin 2003, Adler & Irwin 2006), es razonable pensar que variaciones en la producción de néctar dentro de una población, generen diferencias en el éxito reproductivo de las plantas (ver Manetas & Petropoulou 2002). En especies diestílicas autoincompatibles donde el éxito

reproductivo de la planta de un determinado morfo floral depende de la transferencia de polen desde plantas del morfo opuesto (Barrett 1992, 2002a, Dulberger 1992, Capítulo 1, Tabla 1,1), una asimetría en la producción y oferta de néctar a polinizadores podría generar patrones diferenciales de visitas y probablemente una ocurrencia desproporcionada de éxitos reproductivos entre los morfos (ver Ornelas *et al.* 2004a y b).

En este trabajo partimos de la premisa que si la oferta de néctar influencia la dinámica de los visitantes florales; entonces en poblaciones diestílicas *i*) las plantas de ambos morfos deberían ofrecer recompensas similares a lo largo del día y en consecuencia, *ii*) los visitantes florales más frecuentes deberán visitar las plantas independientemente de su morfo floral y ello, debería repercutir positivamente sobre la deposición de polen legítimo entre los morfos. Para probar estas hipótesis, tomamos como modelo de estudio a la especie diestílica *Palicourea demissa* Standl. (Rubiaceae), un arbusto polinizado por colibríes en selvas nubladas de Los Andes venezolanos. En este sentido, documentamos los patrones morfo-específicos de producción de néctar, visitas florales y deposición de polen entre los morfos y evaluamos experimentalmente el efecto de las visitas florales sobre la producción néctar en esta especie.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Área de estudio: Este trabajo se llevó a cabo en la selva nublada que circunda la Estación Ornitológica La Mucuy (8° 38' N y 76° 02'; 2300-2400 m.s.n.m) en el Parque Nacional Sierra Nevada, Mérida, Venezuela. En esta zona se han registrado 14 especies de colibríes (Rengifo *et al.* 2005). Una descripción detallada de esta selva puede verse en el capítulo 1,

2.2. Especie estudiada: *P. demissa* (Rubiaceae), está representada por arbustos que miden entre 3 y 8 metros de alto. En La Mucuy, los individuos de esta especie son diestílicos (dos morfos florales dentro de la población, pero todas las flores de un determinado individuo son de un solo morfo) y autoincompatible (solo producen frutos en cruces intermorfo) (Capítulo 1); los mismos presentan una relación entre morfos cercana a 1:1 (Valois-Cuesta & Novoa-Sheppard 2006, Capítulos 1 y 2) y se encuentran dispuestos de manera aleatoria dentro la población (Capítulo 2). Independientemente del morfo floral, durante el pico de floración (mayo-junio) cada planta puede exhibir $23,4 \pm 5,92$ inflorescencias ($n = 22$ plantas) y eventualmente cada inflorescencia puede ofrecer $2,4 \pm 0,1$ flores por día ($n = 200$ observaciones) (Valois-Cuesta & Soriano, datos sin publicar). En una inflorescencia, el tiempo transcurrido entre la apertura de las primeras flores hasta cuando se agota la oferta floral es de $47,6 \pm 3,0$ días (Valois-Cuesta & Soriano, datos sin publicar). La flores de esta especie son pediceladas, gamopétalas y amarillas; las mismas están dispuesta en inflorescencias de raquis rojizo, inician su antesis entre las 0530 y las 0730 h, tienen una longevidad aproximada de 14 horas (Valois-Cuesta & Novoa-Sheppard 2006, Valois-Cuesta & Soriano, datos sin publicar), producen néctar como recompensa y son visitadas principalmente por colibríes (Valois-Cuesta & Novoa-Sheppard 2006).

2.3. Patrones naturales de producción de néctar: Seleccionamos al azar varios botones florales en preantesis ($n = 30$ plantas/morfo) y los excluimos de visitantes florales con bolsas de tul (tela sintética con orificios $< 1,0$ mm de diámetro); al día siguiente, cada dos horas (desde 0800 hasta 1800 h), recolectábamos flores al azar de diferentes plantas y mediamos la cantidad (μL) de néctar que contenían y la concentración del mismo (% Brix); para ello, utilizamos tubos capilares de $20\mu\text{L}$ y un refractómetro manual Bellingham + Stanley 45 – 81 (Kearns & Inouye 1993).

2.4. Efecto de los visitantes florales sobre la producción de néctar: Dado que la verdadera cantidad de néctar secretada por las flores, puede no ser revelada claramente por los patrones naturales de producción de néctar (acumulación de néctar en flores imperturbadas) en casos donde las plantas responden positivamente a la remoción del mismo; realizamos medidas de volumen de néctar a lo largo de la vida de algunas flores (cinco remociones, una cada dos horas; desde 0800 hasta 1800 h). Para evaluar si las remociones repetidas de néctar estimulaban positivamente a las flores a producir más néctar, en cada una de las plantas donde hicimos las medidas repetidas, excluimos algunas flores en preantesis y las dejamos acumular néctar hasta el final de su antesis (1800 h) y posteriormente comparamos los volúmenes de néctar de flores sometidas a remociones repetidas y aquellas que acumularon néctar durante su vida ($n = 30$ plantas de cada morfo, una flor por planta para cada caso).

2.5. Patrones naturales de disponibilidad néctar: En este caso medimos el volumen (μL) y la concentración (%) del néctar en flores de ambos morfos que estaban expuestas a su visitantes florales naturales ($n = 30$ plantas/morfo). Estas mediciones fueron realizadas cada dos horas a lo largo del día (0600-1800 h). Además, a partir de estos parámetros, estimamos la cantidad de azúcares (mg) que contenía en néctar (Bolten *et al.* 1979, Kearns & Inouye 1993).

2.6. Polinización cruzada legítima, producción de néctar y polinizadores: Para analizar la magnitud de la polinización legítima entre los morfos, recolectamos al azar cada dos horas (desde las 0800 hasta las 1800 h) flores intactas de ambos morfos expuestas a sus polinizadores ($n = 30$ flores, una por planta en cada morfo). A cada una de ellas le removimos el estigma y lo fijamos en un porta-objetos con gel de fushina básica (Kearns & Inouye 1993). Posteriormente

las muestras fueron analizadas bajo un microscopio Leitz Dialux 20 EB basándonos en el mismo criterio expuesto en la sección 2.5 del capítulo 2. Con el fin de analizar si la polinización legítima en ambos morfos podía ser explicada por la producción de néctar en cada uno de ellos, evaluamos mediante regresiones lineales los valores promedio de deposición de polen legítimo sobre estigmas como una función de la producción de néctar en cada morfo. Adicionalmente, el promedio de visitas experimentado por las plantas cada dos horas también fue analizado como una función de la producción de néctar. Todos estos usos fueron tomados en las mismas plantas.

2.7. Comportamiento de visitantes florales: A lo largo del periodo de mayor floración (mayo-junio) realizamos observaciones sobre 22 plantas ($n = 10$ breviestiladas y 12 longiestiladas) escogidas al azar dentro de la población. Las observaciones fueron realizadas de 0600 a 1800 h; durante este periodo en cada planta identificamos los visitantes florales y registramos para cada uno de ellos: *i*) el número de visitas por hora, *ii*) número de visitas por día y *iii*) número de flores visitadas por planta por visita (Kearns & Inouye 1993).

2.8. Análisis de datos: Las comparaciones entre los morfos en características del néctar, polinización legítima y tasa de visitas, fueron realizadas usando estadística paramétrica, para ello, los datos fueron transformados al $\log(x + 1)$ para aumentar su normalidad y homoscedasticidad. Sin embargo, en el texto, tablas y figuras se muestran los datos (media \pm 1 error estándar) sin transformar. Las pruebas estadísticas usadas, incluyendo algunas no paramétricas casos, también se indican en el texto. Todos los análisis fueron realizados en el programa SPSS 12.0.

3. RESULTADOS

3.1. Efecto de los visitantes florales sobre la producción de néctar: Las flores de ambos morfos no presentaron diferencias en la cantidad de néctar que producen durante su vida o en la tasa a la cual este fluido es secretado por las flores a lo largo del día (Tabla 3.1). La tasa de producción de néctar no solamente fue independiente del morfo floral, sino también de la hora del día en cada uno de ellos (ANOVA; efecto de la hora del día en flores medidas repetidas veces; breviestiladas, $F = 0,70$, $P = 0,58$; longiestiladas, $F = 1,36$, $P = 0,24$; flores distintas medidas una sola vez, breviestiladas, $F = 1,25$, $P = 0,28$; longiestiladas $F = 0,15$, $P = 0,97$; Figura 3.1 A-B). Finalmente, no encontramos diferencias significativas en la cantidad de néctar secretado por flores que fueron sometidas a varias remociones a lo largo del día (simulando las visitas de los polinizadores) y aquellas que acumularon néctar durante su vida (una única remoción al final del día) (ANOVA, efecto del tratamiento, breviestiladas, $F = 1,11$, $P = 0,29$; longiestiladas, $F = 0,09$, $P = 0,92$; Figuras 3.1 A y B).

3.2. Patrones naturales de disponibilidad de néctar: En flores expuestas a visitantes florales tanto el volumen del néctar, su concentración y la cantidad de azúcares contenidas en el mismo, fue similar entre los morfos (Tabla 3.1). Esta similitud entre los morfos en los anteriores parámetros del néctar disponible a polinizadores, se mantuvo a lo largo del día, pero con fluctuaciones significativas entre horas (ANOVA, efecto de la hora del día; volumen: breviestiladas, $F = 45,14$, $P < 0,0001$; longiestiladas, $F = 19,51$, $P < 0,0001$; concentración de azúcares: breviestiladas, $F = 4,65$, $P < 0,0001$; longiestiladas, $F = 6,47$, $P < 0,0001$; masa de azúcares: breviestiladas, $F = 26,67$, $P < 0,0001$; longiestiladas, $F = 10,15$, $P < 0,0001$; Figura

3.2). Una prueba posterior (HSD de Tukey) señaló que estas fluctuaciones fueron altamente significativas ($P < 0,05$), para el caso del volumen y la cantidad de azúcares del néctar, entre las primeras horas de la mañana y el resto del día (Figura 3.2).

Tabla 3.1. Valores promedio (± 1 error estándar) de producción y disponibilidad de néctar en flores breviestiladas y longiestiladas de *P. demissa* (Rubiaceae): flores A (flores que acumularon néctar durante toda la antesis), flores B (las mismas flores fueron sometidas a cinco remociones repetidas), flores C (flores diferentes acumularon néctar hasta una hora determinada, luego fueron colectadas y medidas). Entre paréntesis el número de muestras. NS = No significativo ($P > 0.05$).

Producción de néctar ($\mu\text{L} \cdot \text{flor}^{-1}$)	Morfo floral		Prueba <i>t</i>
	Breviestadas	Longiestilada	
Producción diaria			
Flores A	27,0 \pm 2,3 (40)	24,7 \pm 2,7 (44)	1.58 NS
Flores B	28,8 \pm 2,2 (29)	24,6 \pm 3,2 (30)	1.05 NS
Producción por hora			
Flores C	1,13 \pm 0,39 (240)	0,80 \pm 0,52 (240)	0.50 NS
Flores B	1,48 \pm 0,11 (145)	1,24 \pm 0,10 (140)	1,50 NS
Nectar disponible ($\mu\text{L} \cdot \text{flor}^{-1}$)			
Volumen (μL)	2,3 \pm 0,2 (362)	2,1 \pm 0,2 (362)	1,07 NS
Concentración de azúcares (%)	18,6 \pm 0,2 (352)	18,1 \pm 0,2 (358)	1,08 NS
Cantidad de azúcares (mg)	0,47 \pm 0,04 (324)	0,40 \pm 0,04 (328)	1.63 NS

3.3. Comportamiento de visitas florales: Registramos 1205 visitas florales ejecutadas por nueve especies entre colibríes e insectos los cuales representaron significativamente el gremio de visitantes florales de *P. demissa* (Media \pm D. E; especies observadas = 9,0 \pm 0,0; estimadas, Chao 1 = 9,0 \pm 0,0, ICE = 9,0 \pm 0,0, $n = 264$ horas; Figura 3.3). Durante este periodo, no encontramos diferencias significativas entre los morfos en el número de visitas que experimentaban las plantas individualmente durante todo el día (breviestiladas = 55,6 \pm 9,3 visitas \cdot planta⁻¹ \cdot día⁻¹, $n = 10$ plantas; longiestiladas = 53,9 \pm 5,5 visitas \cdot planta⁻¹ \cdot día⁻¹, $n = 12$; Mann-Whitney, $U = 56,00$, P

= 0,82) o en una hora en particular (breviestiladas = $4,6 \pm 0,3$ visitas \cdot planta⁻¹ \cdot h⁻¹, $n = 120$ horas de observación; longiestiladas = $4,5 \pm 0,2$ visitas \cdot planta⁻¹ \cdot h⁻¹, $n = 144$; $t = 0,69$, $P = 0,48$). El número de flores probadas por visita, varió entre 2 y 94 flores; no obstante, en la mayoría de los casos (86%) los visitantes probaron en promedio < 20 flores \cdot planta⁻¹ \cdot visita⁻¹. Curiosamente, algunos de los visitantes florales menos frecuentes (*Bombus* sp., *Aglaicercus kingui* y *Ocreatus underwoody*) probaban en promedio > 20 flores \cdot planta⁻¹ durante una visita (Tabla 3.2). A pesar de ello, los morfos florales no presentaron diferencias en la cantidad de flores probadas por visita (breviestiladas = $17,7 \pm 0,7$ flores \cdot planta⁻¹ \cdot visita⁻¹, $n = 347$ visitas; longiestiladas = $18,0 \pm 0,6$ flores probadas \cdot planta⁻¹ \cdot visita⁻¹, $n = 518$; $t = -0,35$, $P = 0,72$).

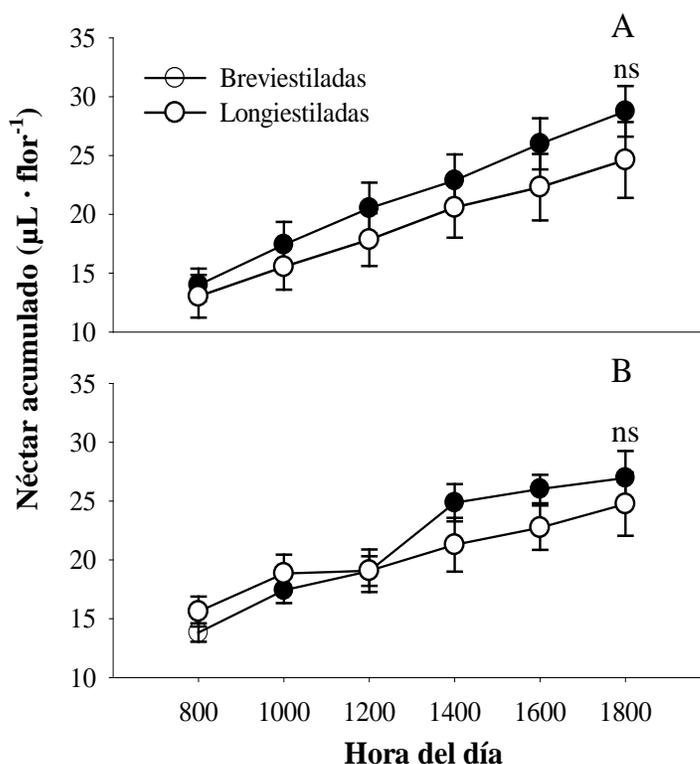


Figura 3.1. Producción de néctar en flores breviestiladas y longiestiladas de *Palicourea demissa* (Rubiaceae): (A) Las mismas flores fueron medidas a lo largo del día. (B) Flores diferentes acumularon néctar y en intervalos de tiempo distintos y luego fueron medidas. La comparación entre los morfos y entre tratamientos \times morfo muestra valores no significativos (ns = $P > 0.05$).

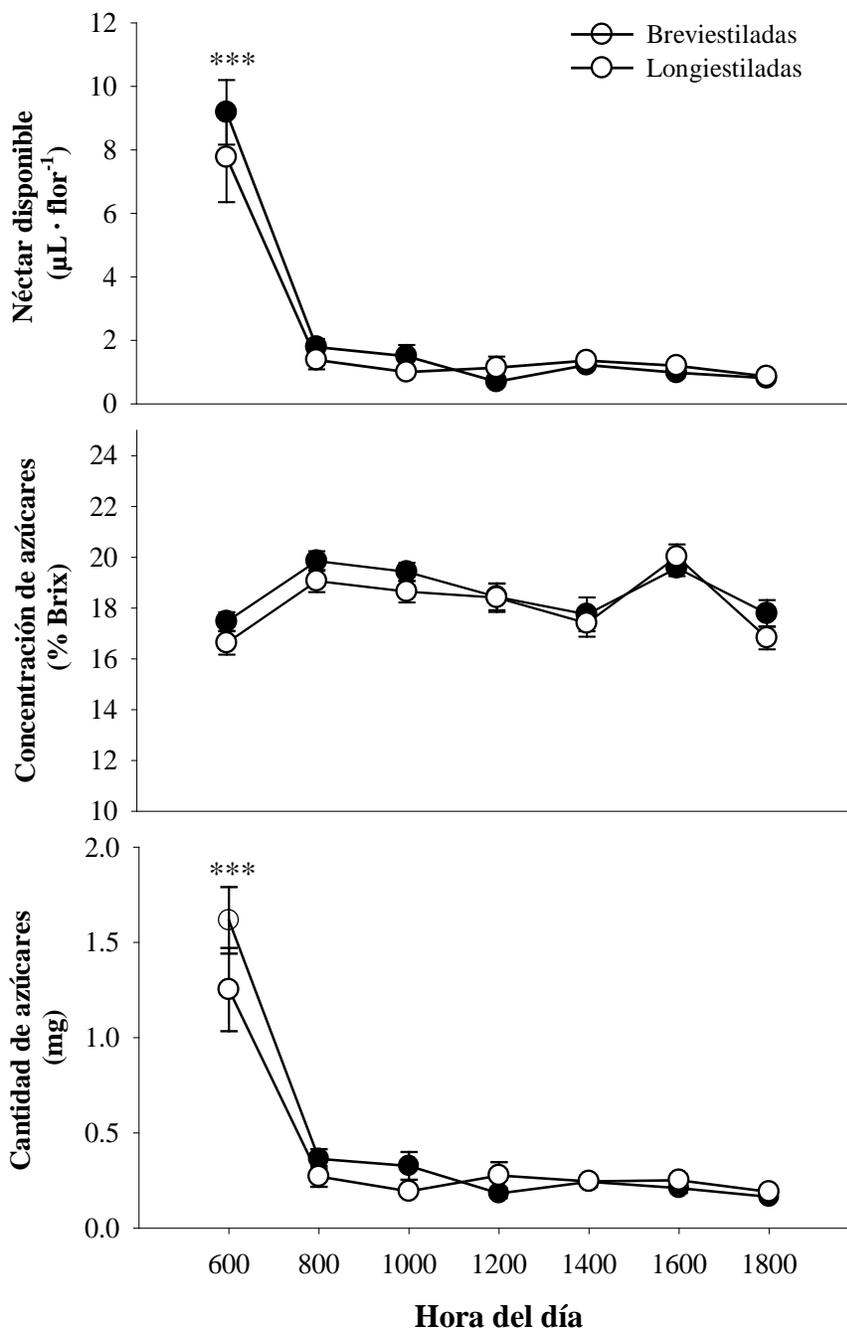


Figura 3.2. Patrones de disponibilidad de néctar “standing crop” en las flores breviesticiladas y longiesticiladas de *Palicourea demissa* (Rubiaceae) en la selva nublada La Mucuy, Mérida, Venezuela. Efecto de la hora del día $***P < 0,0001$; Diferencias entre morfos no fueron significativas a través del día ($P > 0,05$).

Dentro del gremio de visitantes florales de *P. demissa*, los colibríes en conjunto fueron más representativos que los insectos (plantas brevistiladas: colibríes = $4,58 \pm 0,3$ visitas \cdot planta⁻¹ \cdot h⁻¹, $n = 120$ horas; insectos = $0,06 \pm 0,02$ visitas \cdot planta⁻¹ \cdot h⁻¹, $n = 120$; $t = 30,40$, $P < 0,0001$; plantas longiestiladas: colibríes = $4,11 \pm 0,21$ visitas \cdot planta⁻¹ \cdot h⁻¹, $n = 144$ horas; insectos = $0,38 \pm 0,12$ visitas \cdot planta⁻¹ \cdot h⁻¹, $n = 144$ horas; $t = 21,89$, $P < 0,0001$; Figura 3.4) y su tasa de visita fue independiente del morfo floral (morfo floral \times visitas de colibríes; $t = 1,43$, $P = 0,15$). Los insectos por su parte, mostraron una tendencia a visitar con mayor frecuencia las plantas longiestiladas (morfo floral \times visitas de insectos; $t = -2,60$, $P = 0,01$; Figura 3.5).

Dentro del ensamble de colibríes registrados como visitantes de *P. demissa*, el colibrí *Coeligena torquata* fue el visitante más frecuente (Tabla 3.2, Figura 3.5). Estos colibríes difieren en la longitud de sus picos. Sin embargo, todos probaban las flores de esta especie legítimamente (Figura 3.6), de hecho, durante nuestras observaciones no encontramos evidencia de robo de néctar en las flores de *P. demissa*. Aunque en conjunto los colibríes fueron los visitantes más frecuentes (94,7% de las visitas), entre ellos observamos diferencias en cuanto a la frecuencia en que visitaron las plantas de ambos morfos (ANOVA; $F = 32,60$, $P < 0,0001$). Una prueba posterior (HSD de Tukey) señaló ($P < 0,05$) que *Coeligena torquata* ($1,6 \pm 0,1$ visitas \cdot planta⁻¹ \cdot h⁻¹, $n = 264$ horas) y *Heliangelus spencei* ($1,2 \pm 0,1$, $n = 264$; $P = 0,28$) visitaban más plantas por hora que *Adelomyia melanogenys* ($0,9 \pm 0,1$, $n = 264$). Sin embargo, estos tres colibríes en conjunto, fueron significativamente más constantes que *Agelaiocercus kingui* ($0,33 \pm 0,05$ visitas \cdot planta⁻¹ \cdot h⁻¹, $n = 264$), *Ocreatus underwoody* ($0,3 \pm 0,04$, visitas \cdot planta⁻¹ \cdot h⁻¹, $n = 264$) y *Colibri thalassinus* ($0,25 \pm 0,04$, visitas \cdot planta⁻¹ \cdot h⁻¹, $n = 264$; $P = 0,98$; Figura 3.5).

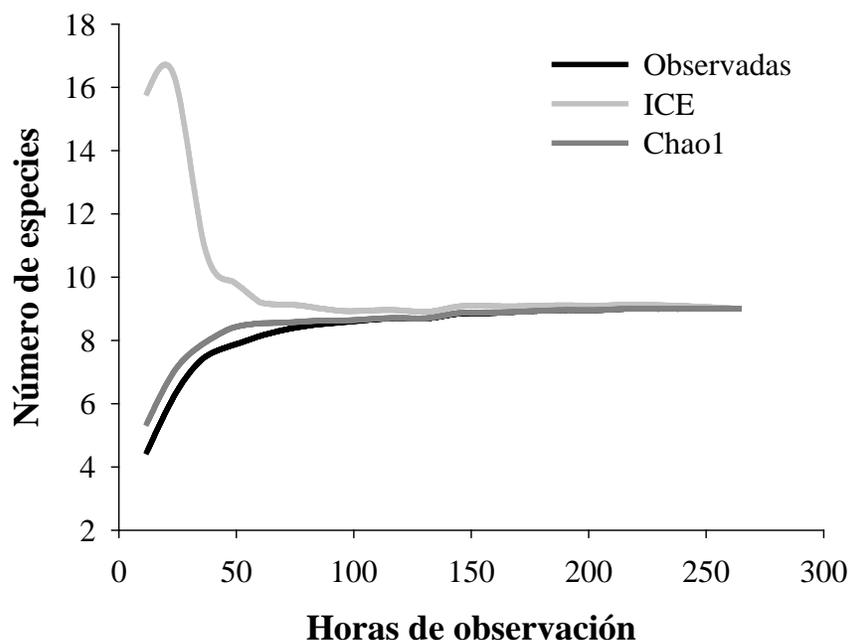


Figura 3.3. Especies observadas y esperadas (Chao1, ICE) dentro de gremio de visitantes florales de *Palicourea demissa* (Rubiaceae) en La Mucuy, Mérida, Venezuela. Los estimadores se obtuvieron a partir de la abundancia de visitas por especie. (EstmateS 6,0b1, Colwell 2000).

Tabla 3.2. Gremio de visitantes florales registrados durante el pico de floración de *Palicourea demissa* en la selva nublada La Mucuy, Mérida, Venezuela.

Espece	Número total de visitas (%)		Nº flores · planta ⁻¹ · visita ⁻¹ (media ± 1 E.E)
Colibríes			
<i>Adelomyia melanogenys</i>	231	(19,2)	17,1 ± 1,0
<i>Agelaiocercus kingui</i>	87	(7,2)	23,0 ± 1,8
<i>Coeligena torquata</i>	413	(34,3)	18,4 ± 0,8
<i>Colibri thalassinus</i>	67	(5,6)	12,2 ± 1,0
<i>Heliangelus spencei</i>	265	(22,0)	17,8 ± 0,8
<i>Ocreatus underwoodii</i>	78	(6,5)	23,7 ± 2,3
Insectos			
<i>Bombus</i> sp.	5	(0,4)	25,3 ± 9,4
<i>Heliconius clisonimus</i>	29	(2,4)	6,1 ± 1,2
Lepidoptera sp.	30	(2,5)	12,8 ± 2,5

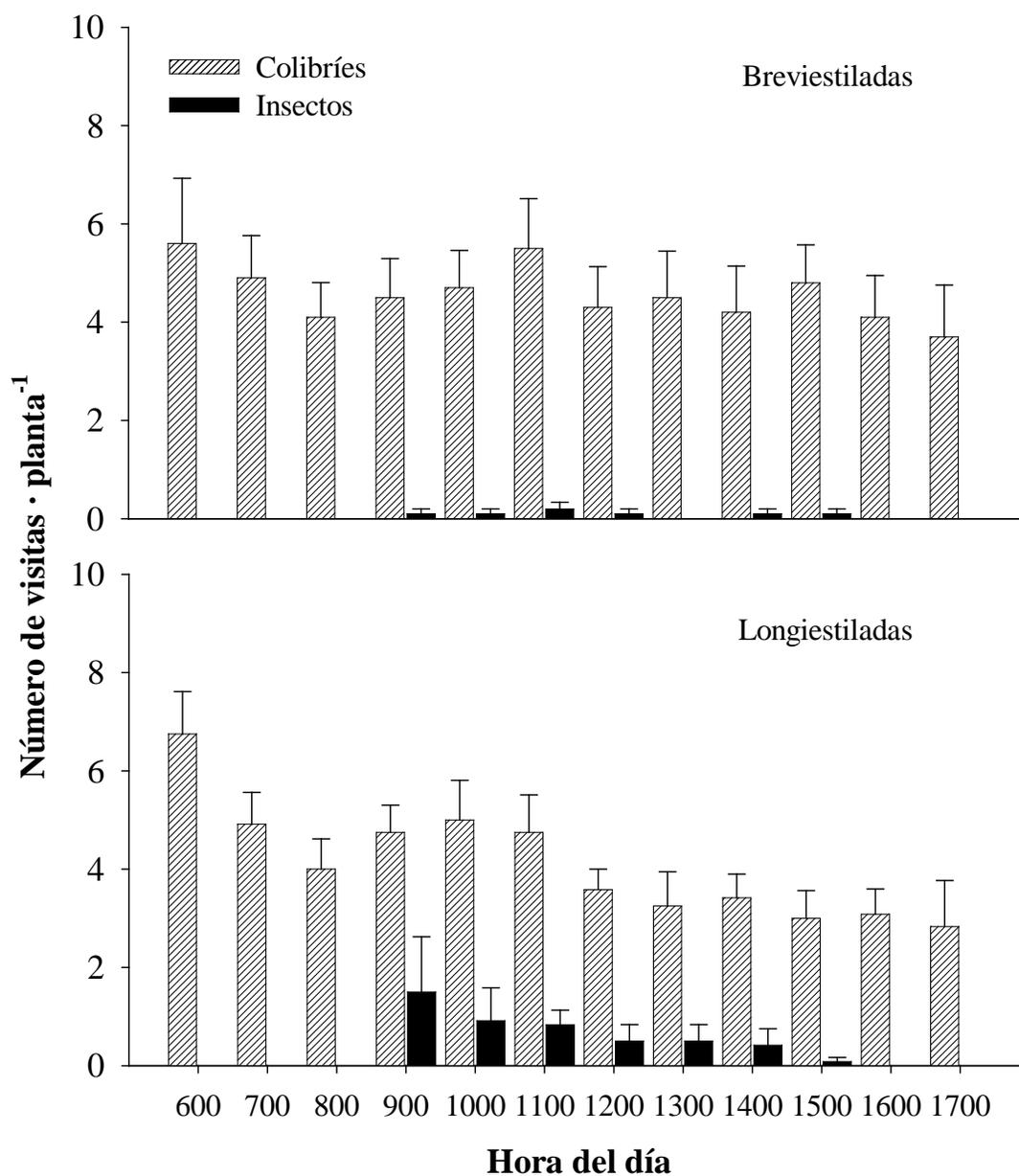


Figura 3.4. Frecuencia de visita de colibríes e insectos en plantas breviestiladas y longiestiladas de *Palicourea demissa* (Rubiaceae) en la selva nublada La Mucuy, Mérida, Venezuela. Diferencia entre colibríes e insectos fueron significativas a través del día ($P < 0,0001$).

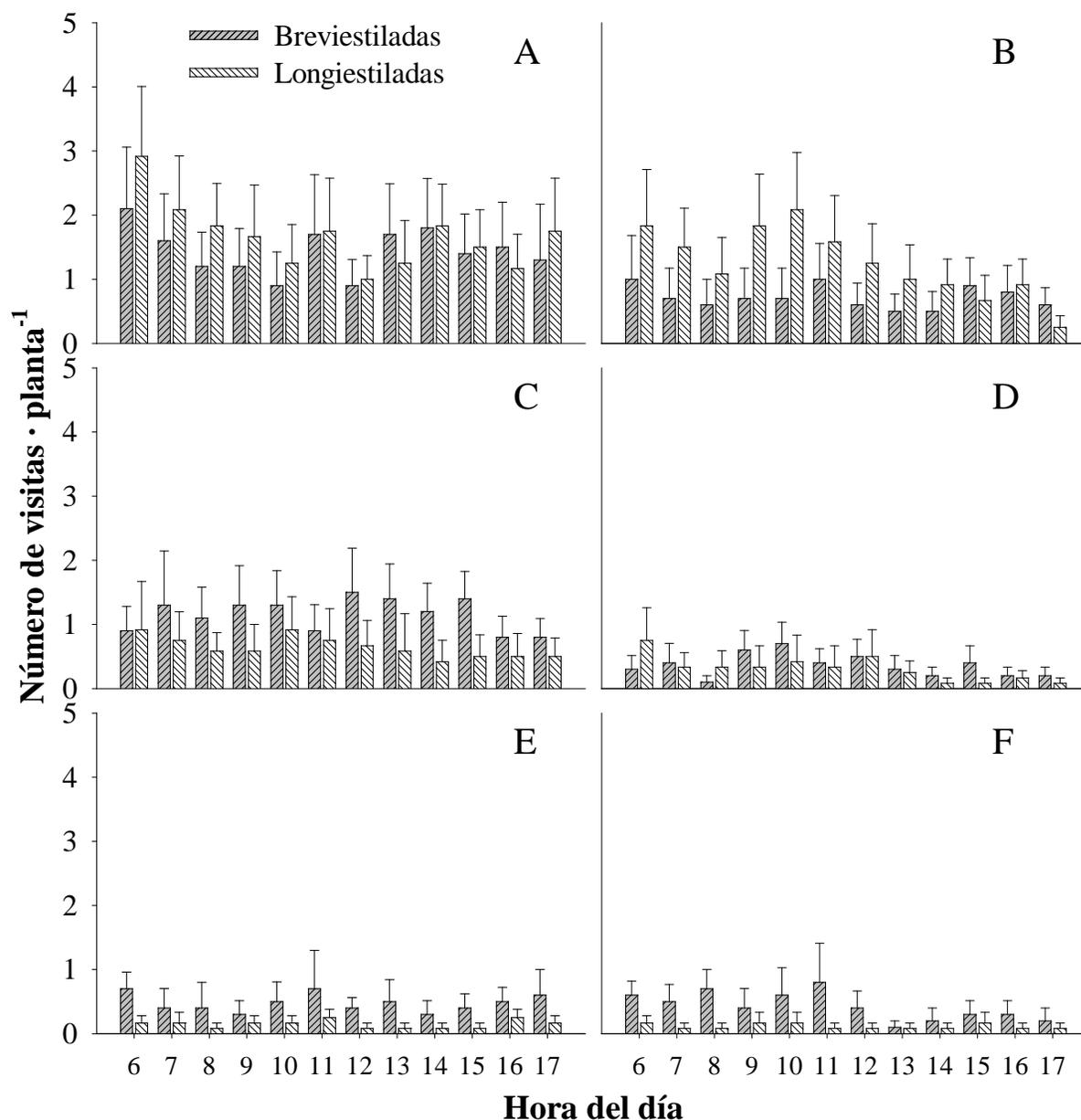


Figura 3.5. Tasa de visitas de los visitantes florales más frecuentes de floración de *Palicourea demissa* (Rubiaceae) en la selva nublada La Mucuy, Mérida, Venezuela. A - *Coeligena torquata*, B - *Heliangelus spencei*, C - *Adelomyia melanogenys*, D - *Agelaiocercus kingui*, E - *Ocreatus underwoody*, F - *Colibri thalassinus*. Las diferencia entre morfos florales en cada caso no fueron significativas ($P > 0,05$).

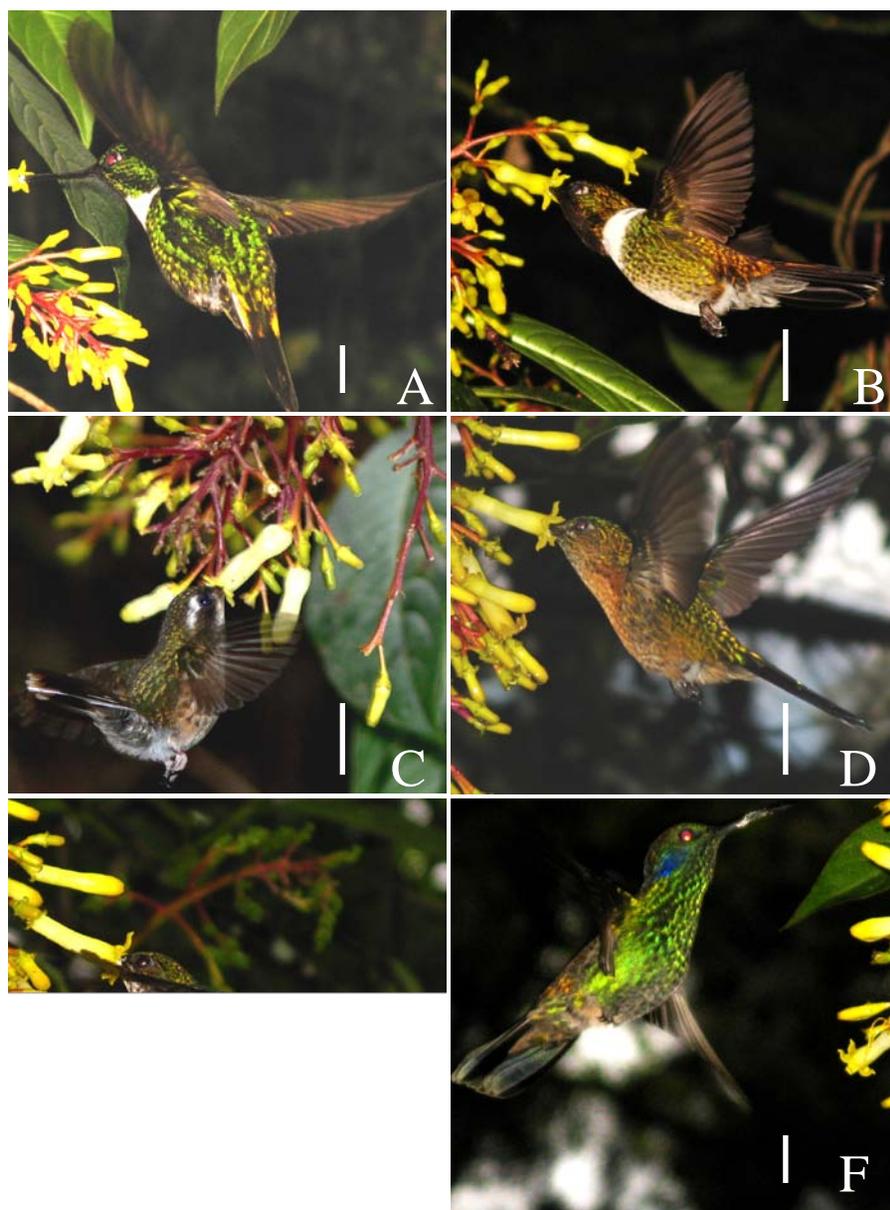


Figura 3.6. Visitantes florales más comunes de *Palicourea demissa* (Rubiaceae) en la selva nublada La Mucuy, Mérida, Venezuela. A - *Coeligena torquata*, B - *Heliangelus spencei*, C - *Adelomyia melanogenys*, D - *Aglaiocercus kingui* ♀, E - *Ocreatus underwoody* ♀, F - *Colibri thalassinus*. Escala = 1cm.

Además de las diferencias comentadas en su frecuencia, pudimos observar que estos colibríes también difieren en su comportamiento de forrajeo; p. e. *C. torquata*, *A. melanogenys* y *O. underwoody* no fueron observados estableciendo territorios de alimentación restringidos a pocas plantas, mientras que *H. spencei* y *C. thalassinus* fueron muy territoriales y agresivos con otros visitantes que irrumpían dentro de su territorio; por su parte, *A. kingui* no mostró comportamientos agresivos. Sin embargo, de manera facultativa, establecía territorios de alimentación cuando la oferta floral de una planta era abundante. Este colibrí, luego de visitar una planta, generalmente se perchaba en plantas aledañas (del dosel) hasta por intervalos de tiempo > 15-20 minutos antes de regresar nuevamente a visitar la planta. Además de lo anterior, también observamos con relativa frecuencia que *H. spencei*, *A. kingui* y con menor constancia *A. melanogenys* (todos ellos colibríes de pico corto) se limpiaban el pico en la misma planta después de probar pocas flores.

3.4. Polinización cruzada legítima - el papel del néctar y los colibríes: Los estigmas de las flores breviestiladas recibieron más granos de polen legítimo ($88,0 \pm 4,8$ granos de polen \cdot estigma⁻¹, $n = 180$ flores) e ilegítimo ($60,2 \pm 5,0$ granos de polen \cdot estigma⁻¹, $n = 180$) que los estigmas de las flores longiestiladas (legítimo = $14,9 \pm 1,2$, $n = 180$; ilegítimo = $44,7 \pm 2,8$, $n = 180$) (morfo floral \times tipo de polinización: legítima, prueba $t = 14,75$, $P < 0,0001$; ilegítima, $t = 2,72$, $P = 0,007$). No obstante, los estigmas de las flores breviestiladas experimentaron proporcionalmente mayores niveles de polinización legítima ($t = 17,5$, $P < 0,0001$) (ver también capítulo 2). La tasa a la cual los granos de polen legítimo se acumulaban a través del día sobre los estigmas de ambos morfos, presentó significativas diferencias entre ellos (breviestiladas = $8,09 \pm 2,8$ granos de polen legítimo \cdot estigma⁻¹ \cdot h⁻¹, $n = 180$ estigmas; longiestiladas = $1,42 \pm$

0,76, $n = 180$; $t = 2,37$, $P = 0,018$), siendo constante sobre estigmas de las flores breviestiladas y ligeramente fluctuante en longiestiladas (ANOVA, efecto de la hora del día; breviestiladas, $F = 1,79$, $P = 0,11$; longiestiladas, $F = 3,13$, $P = 0,01$). Finalmente, pudimos apreciar que tanto la cantidad de visita que experimentaban las plantas por parte de los colibríes, así como también, la cantidad de granos de polen legítimos que eran depositados por estos animales sobre los estigmas de cada morfo, fueron explicados fuertemente por los volúmenes de néctar secretado en las flores de cada morfo. En el caso de la concentración de néctar y la cantidad de azúcares que contenía el mismo estas relaciones no fueron evidentes pues los valores de las pendientes fueron no significativos (Tabla 3.3, Figura 3.7A-C).

4. DISCUSIÓN

4.1. Producción de néctar, forrajeo de polinizadores y deposición de polen: Tanto en las plantas breviestiladas como en las longiestiladas, el volumen de néctar secretado por flores que fueron sometidas a remociones periódicas (simulando la visita de polinizadores), no fue diferente de aquellos montos obtenidos en flores que acumularon néctar hasta el final del día (Figura 3.1). Aunque nosotros no evaluamos el efecto de diferentes intensidades de remoción (dos, cuatro, ocho, diez etc.) sobre la producción de néctar, nuestros resultados sugieren que en *P. demissa* las visitas de los polinizadores no alteran el ritmo natural de secreción de néctar (secreción en flores imperturbadas) en las flores de ninguno de los morfos (ver también Pleasants 1983, Musicante & Galetto 2008). A pesar de ello, el número total de visitas que experimentaban las plantas de cada morfos durante el día, se relacionó positivamente con la cantidad de néctar que secretaron las flores durante su anthesis (Figura 3.7); esta relación puede ser explicada dado que en *P. demissa*,

el volumen total de néctar producido por las flores de ambos morfos ($\sim 25 \mu\text{L} \cdot \text{flor}^{-1}$) es secretado a una tasa ($\sim 1,3 \mu\text{L} \cdot \text{flor}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) que permite una oferta de pocos microlitros por flor a través del tiempo, ello podría permitir que los polinizadores sean recompensados durante todo el día (especialmente a primera hora en la mañana cuando las flores tienen aproximadamente seis horas de acumulación equivalente a $\sim 8 \mu\text{L} \cdot \text{flor}^{-1}$; Figura 3.1) y, en consecuencia, las plantas de cada morfo experimenten una tasa de visitas relativamente constantemente a lo largo del día, tal como fue apreciado en este trabajo (Figura 3.4 y 3.5).

Tabla 3.3. Valores de regresión lineal para la polinización legítima y visitas florales en función de la producción de néctar en flores brevistiladas (Bda) y longiestiladas (Lda) de *Palicourea demissa* (Rubiaceae). Para el análisis los datos fueron transformados al log (x+1). NS = No significativo ($P > 0,05$), * $P = 0,02$, *** $P < 0,0001$.

Variables de contraste	Regresión lineal		Intersección	Prueba <i>t</i>
	r^2	Pendiente		
Volumen (μL) de néctar por flor \times visita por planta				
Bda	0,98	1,97***	-1,10	19,8
Lda	0,96	1,82***	-0,83	0,74
Volumen (μL) de néctar por flor \times granos de polen legítimo por estigma				
Bda	0,97	1,72 ***	-0,39	12,61
Lda	0,74	1,64 *	-0,96	3,44
Concentración de azúcares (%) por flor \times visita por planta				
Bda	0,54	0,59 NS	-0,032	2,20
Lda	0,54	3,14 NS	-3,19	0,09
Concentración de azúcares (%) por flor \times granos de polen legítimo por estigma				
Bda	0,46	4,56 NS	-4,47	1,88
Lda	0,27	10,76 NS	-12,62	1,22
Cantidad de azúcares (mg) por flor \times visita por planta				
Bda	0,29	0,52 NS	0,66	1,29
Lda	0,08	-0,46 NS	0,70	-0,18
Cantidad de azúcares (mg) por flor \times granos de polen legítimo por estigma				
Bda	0,21	3,67 NS	0,85	1,03
Lda	0,15	9,61 NS	-0,29	0,86

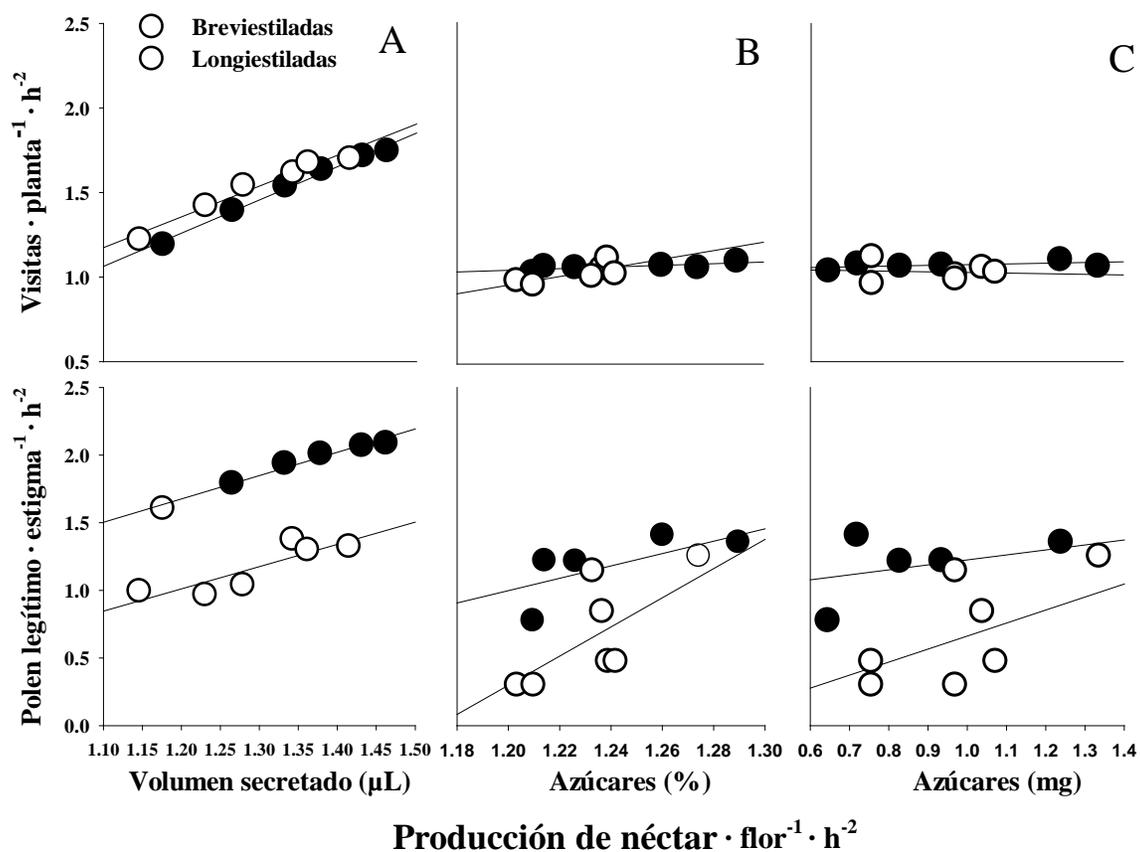


Figura 3.7. Visitas florales de colibríes y polinización legítima en función del (A) volumen, (B) concentración y (C) masa de azúcares del néctar floral en plantas longiestiladas y breviestiladas de *Palicourea demissa* (Rubiaceae). Para el análisis usamos los promedio (transformados $\log [x+1]$) obtenidos cada dos horas a lo largo del día (0800–1800 h) en las cinco variables. Los tres tipos de datos fueron medidos en las mismas plantas durante el pico de floración.

Además de ello, una oferta de néctar de pocos microlitros por flor, indirectamente podría incrementar la probabilidad de transferencia de polen entre los morfos (Figura 3.7), ya que los polinizadores a fin de satisfacer sus requerimientos energéticos, seguramente se ven forzados a

visitar muchas más plantas de las que visitarían si las flores ofrecieran mayores montos de néctar individualmente. Con relación a ello, se ha demostrado que incrementos en la disponibilidad de néctar por flor generan un aumento en la duración de la visita en flores individuales y, en consecuencia, una reducción en la transferencia de polen entre ellas (Stone & Thompson 1994, Cresswell 1999). Según de Jong & Klinkhamer (2005) aumentos en la disponibilidad de néctar incrementan la remoción de polen, pero a la vez, reducen la eficiencia a la cual el polen es exportado; ello se debe a que la frecuencia de visitas por planta y el número de flores probadas por visita, tienen un efecto directo sobre la transferencia de polen entre plantas (Engel & Irwin 2003, de Jong & Klinkhamer 2005).

Un aspecto interesante de la relación entre la producción de néctar, dinámica de polinizadores y deposición de polen en *P. demissa*, fue el no haber encontrado relaciones estadísticamente significativas entre los atributos energéticos del néctar y la cantidad de visitas y polinización legítima que experimentaban los morfos (Figura 3.7). Ello sugiere que en *P. demissa*, tanto la constancia de los polinizadores al igual que la magnitud de polinización legítima que experimentan los morfos, quizás depende más de la cantidad de néctar que puedan producir las flores a lo largo de su anthesis que del contenido energético del mismo. Sin embargo, esta es una apreciación que deberá ser evaluada experimentalmente en el futuro. Una posible explicación para la falta de relación entre el contenido energético del néctar y los patrones de deposición de polen y visitas florales que registramos en *P. demissa*, puede estar dada en que las diferencias estadísticas que nosotros detectamos entre horas en el porcentaje y en la cantidad de azúcares en el néctar a lo largo del día, no tengan significado biológico (impacto abrupto) desde el punto de vista de la perfección de la polinizadores. Otra explicación a este hecho, podría apoyarse en que los morfos de *P. demissa* producen el mismo número de inflorescencias por

plantas, presentan una relación proporcional cercana al 1:1 y se encuentran dispuestos de manera aleatoria dentro de la población a distancias relativamente cortas (~ 3 metros); bajo estas condiciones, es posible que plantas productoras de néctar con bajo contenido energético, se encuentren circundadas por plantas coespecíficas de alta recompensa; ello podría facilitar que los polinizadores no discriminen entre plantas que ofrecen néctar con “bajo” o “alto” contenido energético. Así, los estigmas de aquellas flores que ofrecen néctar con un contenido energético por debajo del promedio, quizás podrían experimentar tasas de visitas y de deposición de polen legítimo dentro del promedio de todas las plantas. Klinkhamer *et al.* (2001) demostraron experimentalmente que los polinizadores pueden discriminar entre plantas de alta y baja recompensa, si éstas, se encuentran distantes unas de las otras; sin embargo, cuando estos autores entremezclaron las plantas de alta y baja recompensa, los polinizadores visitaron ambos tipos de plantas independientemente de la calidad de la recompensa que ofrecían (ver también Wolf & Hainsworth 1990).

En *P. demissa* el patrón temporal de oferta de néctar (volumen, concentración y masa de azúcares) no presentaron diferencias entre los morfos (Figura 3.2), sugiriendo que los polinizadores se ven recompensados de la misma manera al visitar plantas brevistiladas o longistiladas; ello explica el hecho de haber observado que los visitantes florales más frecuentes de *P. demissa* (colibríes) visitaran las plantas durante todo el día independiente de su morfo floral (Figura 3.4 y 3.5).

Casos de especialización sexual basada en la producción y oferta de néctar se han documentado en un número importante de especies dicógamas especialmente protándricas (Carlson & Harms 2006). Sin embargo, no se conoce o no se ha explorado en detalle en la gran mayoría de especies heteroestílicas. A pesar de ello, en especies diestílicas para las cuales existen

datos sobre patrones de producción de néctar, los morfos florales al parecer no difieren en la calidad de la recompensa (volumen y concentración de néctar) que ofrecen a sus polinizadores (*Palicourea petiolaris* y *P. fendleri*, Sobrevila *et al.* 1983; *Fernandusa speciosa* Castro & Oliveira 2001; *Psychotria poepigiana*, Coelho & Barbosa 2004; *P. barbiflora*, Teixeira & Machado 2004a y b; este estudio), aunque existen excepciones al respecto (ver *Palicourea padifolia*, Ornelas *et al.* 2004b, *Fagopirum esculentum*, Cavoy *et al.* 2008).

Una oferta de néctar diferencial entre los morfos florales quizás podría generar tasas diferenciales de visita y de deposición de polen (Ornelas *et al.* 2004a y b) y eventualmente, ello podría acarrear consecuencias negativas sobre el éxito reproductivo de las plantas (Manetas & Petropoulou 2000). Esta apreciación ha sido evaluada en muchos trabajos, los cuales, generalmente sugieren que la producción de néctar y sus patrones de disponibilidad tienen un efecto sobre la actividad de forrajeo de los polinizadores y/o el éxito reproductivo de las plantas (Martínez del Río & Eguiarte 1983, Zimmerman 1983, Zimmerman & Cook 1985, Devlin & Stephenson 1985, Real & Rathcke 1991, Stone & Thompson 1994, Shykoff & Bucheli 1995, Stone 1995, Ree 1997, Cresswell 1999, Lasso & Naranjo 2003, Ornelas *et al.* 2004 a y b).

Bajo los anteriores planteamientos, la similitud que encontramos entre los morfos florales de *P. demissa* en sus patrones de producción y oferta de néctar, podría favorecer el éxito de polinización de los morfos y, por tanto, la adecuación de la especie. En este sentido, una tasa de producción de néctar similar entre los morfos aumenta la probabilidad de que los mismos sean visitados simultáneamente por sus polinizadores y, de esta manera, ambos podrían funcionar como eficientes donadores (función masculina) y receptores (función femenina) de polen legítimo, aumentando así su probabilidad de transferir genes a la siguiente generación a través de ambas funciones sexuales (ver capítulo 2).

4.2. El papel de los colibríes como mediadores de polinización legítima: Nuestros resultados sobre incompatibilidad reproductiva (Capítulo 1), auto-deposición espontánea de polen (Capítulo 2) y dinámica de visitas florales (este capítulo), sugieren que los colibríes a diferencia de los insectos, juegan un rol fundamental como vectores de polen y polinizadores de *P. demissa*. Sin embargo, dado que las flores de esta especie son dimórficas (las flores breviestiladas exhiben corolas más largas que las flores longiestiladas y los órganos sexuales entre los morfos se posicionan recíprocamente) y que los colibríes que las forrajean presentan diferencias en la talla de sus picos (*Coeligena torquata*, 33 mm, *Colibri thalassinus*, 20 mm, *Heliangelus spencei*, 18 mm, *Adelomyia melanogenys*, 13 mm, *Ocreatus underwoodii*, 13 mm, *Agelaiocercus kingui*, 13 mm; Hilty 2003), es probable que la eficiencia de polinización de cada uno de ellos, dependa del ajuste morfológico entre sus picos y las flores de esta especie (ver Murcia & Feinsinger 1996).

Varios trabajos han evaluado el efecto de la morfología floral sobre la eficiencia de los polinizadores en función de la polinización cruzada en plantas diestílicas; p. e., Stone & Tompson (1994) observaron que anteras y estigmas de nivel alto y de nivel bajo tienden a contactar diferentes zonas del cuerpo del polinizador (ver también Lloyd & Webb 1992); Lau & Bosque (2003) por su parte, registraron que el colibrí *Amazilia tobaci* fue más eficiente depositando polen legítimo sobre los estigmas de las flores breviestiladas de *Palicourea fendleri* y sugirieron que la probabilidad que tiene el polinizador de remover y transferir polen entre los morfos florales de esta especie, depende de la posición relativa de anteras y estigmas (ver también Stone 1995, Ornelas *et al.* 2004a).

A partir de lo anterior, si consideramos la longitud del pico de los colibríes como un factor determinante de la dirección del flujo de polen entre los morfos florales, podríamos inferir que los colibríes de pico largo seguramente tienen mayor probabilidad de transferir polen entre los

órganos reproductivos de niveles bajos (desde las anteras de las flores longiestiladas hacia los estigmas de las flores breviestiladas); mientras que aquellos colibríes con pico muy corto, dada la facilidad de establecer contacto con las estructuras sexuales más expuestas en las flores (Figuras 3.6A versus B-E), podrían ser más eficientes en el transporte de granos de polen entre los órganos reproductivos posicionados a un nivel más alto (desde las anteras de las flores breviestiladas hacia los estigmas de las flores longiestiladas). Esta hipótesis fue evaluada experimentalmente por Ornelas *et al.* (2004a) quienes encontraron que el colibrí de pico más largo dentro del ensamble de polinizadores de *P. padifolia*, transfirió significativamente más polen desde flores longiestiladas hacia flores breviestiladas. Bajo estos planteamiento y evidencias, es razonable pensar que dentro del ensamble de colibríes registrados como visitantes de *P. demissa*, el colibrí *C. torquata* al tener el pico más largo (33 mm) dentro de todos los colibríes, podría eventualmente ser más eficiente en la transferencia de polen legítimo desde flores longiestiladas hacia flores breviestiladas, mientras que un colibrí como *A. kingui*, el cual exhibe un pico muy corto (13 mm), podría eventualmente ser más eficiente en el transporte de polen desde las flores breviestiladas hacia las flores longiestiladas.

Si la anterior predicción se cumple y además, consideramos que los morfos de *P. demissa* presentan una relación cercana al 1:1 (Valois-Cuesta & Novoa-Sheppard 2006) y que las plantas de ambos morfo ofrecen recompensas florales similares (néctar) y se encuentran dispuestas de manera aleatoria dentro de la población (Capítulo 2), deberíamos esperar que los morfos experimentaran similares niveles de polinización legítima; pero entonces ¿Cómo explicamos el flujo asimétrico de polen legítimo a favor del morfo breviestilado observado en *P. demissa*? (ver también Capítulo 2). La respuesta a este interrogante pone de manifiesto un segundo factor que podría jugar un rol fundamental a favor de la polinización cruzada entre los morfos de esta

especie, “la frecuencia de visitas y el comportamiento de forrajeo del polinizador” (ver Feinsinger & Busby 1987, Engel & Irwin 2003, Lasso & Naranjo 2003, Ornelas *et al.* 2004a); p. e., *C. torquata* fue un visitante floral no territorial y significativamente más frecuente en ambos morfos florales que *A. kingui* (territorial cuando las plantas tienen abundantes flores) (Tabla 3.1, Figura 3.5); por lo tanto, si la hipótesis sobre el efecto del tamaño del pico se cumple en *P. demissa*, es probable que la mayor frecuencia de visitas de *C. torquata* en las flores de ambos morfos, facilite que los estigmas de las flores breviestiladas reciban en el tiempo y en el espacio más granos de polen provenientes desde las flores longiestiladas, las cuales a su vez, tendrían menos probabilidad de recibir granos de polen legítimo desde plantas breviestiladas dada la baja frecuencia de visitas y territorialidad de *A. kingui*.

Aunque la frecuencia de visitas puede explicar en gran medida los patrones de recepción de polen sobre estigmas (Engel & Irwin 2003), es probable que otros atributos del comportamiento de forrajeo de los polinizadores jueguen un rol importante en el éxito de polinización de este tipo de especies, p. e., nosotros observamos que *H. spencei*, *A. kingui* y con menor constancia *A. melanogenys* (colibríes de pico corto que eventualmente podrían ser eficientes polinizadores de flores longiestiladas), se limpiaban el pico después de probar varias flores dentro de la misma planta. Este tipo de comportamiento, podría eventualmente limitar la probabilidad de geitonogamia entre las inflorescencias de una misma planta. Sin embargo, ello también podría reducir la disponibilidad de polen por flor y en consecuencia, limitar la probabilidad que visitantes no territoriales (como es el caso de *C. torquata*) transfieran eficientemente polen hacia otras plantas, eventualmente del morfo opuesto.

Aunque en *P. demissa* el flujo de polen entre los morfos es mediado principalmente por colibríes, no se descarta la posibilidad de que los insectos, pese su baja frecuencia de visitas (<

6%, ver Tabla 3.1), también jueguen un rol importante como polinizadores en esta especie, pues dada su facilidad para establecer contacto corporal con anteras de flores breviestiladas y los estigmas de flores longiestiladas, ellos quizás podrían mediar eficazmente la polinización legítima de flores longiestiladas. Sin embargo, la baja frecuencia con que estos animales visitaron las plantas breviestiladas (que en este caso serían las donadoras de polen) (ver Figura 3.4), podría eventualmente limitar su papel como eficientes polinizadores en esa dirección del flujo de polen en *P. demissa*. En todo caso, dilucidar el papel que juega el gremio de insectos como eficientes polinizadores de las plantas de *P. demissa*, requerirá en el futuro una evaluación detallada mediante un enfoque experimental.

En términos generales nuestros resultados sugieren que los polinizadores de *P. demissa* se ven recompensados de manera similar al visitar plantas breviestiladas o longiestiladas, lo cual tiene un efecto positivo sobre su éxito de polinización de estas plantas y la adecuación de la especie. No obstante, dado que el ajuste morfológico entre flores y polinizadores, al igual que el comportamiento de forrajeo de los mismos, quizás afecta la transferencia de polen entre los morfos, se hace necesario profundizar a futuro en el entendimiento del rol que juegan cada uno de los visitantes florales de *P. demissa* (colibríes e insectos) como mediadores eficientes de polen legítima entre los morfos florales de esta especie diestílica de las selvas nubladas de los Andes venezolanos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al apoyo logístico de la Estación Ornitológica La Mucuy, Parque Nacional Sierra Nevada y del laboratorio de Ecología Animal “A” de la Universidad de

Los Andes, Mérida – Venezuela. La Red Latinoamericana de Botánica (Becas: RLB06-M03 y RLB08-SP-1) y el Concejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico de la Universidad de los Andes, Mérida-Venezuela (Proyecto: C-1557-08-01EM) proporcionaron el apoyo financiero. Agradecemos a Zamira Betancourt, Carlos Rengifo, Jhon H. Castaño y Jhony Murillo su apoyo en el trabajo de campo y a Javier Estada, Carlos García, Nelson Ramírez y Maria E. Naranjo sus oportunos comentarios para perfeccionar este trabajo.

LITERATURA CITADA

- Adler, L. S. & R. E. Irwin. 2006. Comparison of pollen transfer dynamics by multiple floral visitors: experiments with pollen and fluorescent dye. *Annals of Botany* 97: 141-150.
- Anderson, W. R. 1973. A morphological hypothesis for the origin of heterostyly in the Rubiaceae. *Taxon* 22: 537 - 542.
- Aráoz, S., Del Longo, O. & O. Carlin. 2004. Germinación de semillas de *Zizyphus mistol* Grisebach III. Correlaciones paramétricas del tamaño y peso de drupas, endocarpos y semillas con la germinación y el vigor. *Multequina* 13: 51 - 56.
- Arista, M., Talavera, S. & J. Herrera. 1992. Viabilidad y germinación de las semillas de *Abies pinsapo* Boiss. *Acta Botanica Malacitana* 17: 223 - 228.
- Ataroff, M. & F. Rada. 2000. Deforestation impact on water dynamic in a Venezuelan Andean cloud forest. *Ambio* 29: 440 - 444.
- Ataroff, M. & L. Sarmiento. 2004. Las unidades ecológicas de los Andes de Venezuela, Pp 10-26. *En*: La Marca, E. & P. J. Soriano (eds), Reptiles de los Andes de Venezuela. Fundación Polar, Conservación Internacional, CODEPRE-ULA, Fundación Mérida, BIOGEOS, Mérida – Venezuela.
- Ayala-Cordero, G., Terrazas, T., López-Mata, Lauro & C. Trejo. 2004. Variación en el tamaño y peso de la semilla y su relación con a germinación en una población de *Stenocereus beneckei*. *Interciencia* 29: 692 - 697.

- Bailey, M. F. & D. E. McCauley. 2006. The effects of inbreeding, outbreeding and long-distance gene flow on survivorship in North American populations of *Silene vulgaris*. *Journal of Ecology* 94: 98-104.
- Baker, H. G. 1958. Studies in the reproductive biology of west African Rubiaceae. *Journal of Western Africa Science Association* 4: 9-24.
- Baker, H. G. 1956. Pollen dimorphism in the Rubiaceae. *Evolution* 10: 23-31.
- Barrett, S. C. H. 1990. The evolution and adaptive significance of heterostyly. *Tree* 5: 144-148.
- Barrett, S. C. H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis 1-29 pp. *En: S. C. H. Barrett (ed). Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag. New York.
- Barrett, S. C. H. 2002a. The evolution of plants sexual diversity. *Nature Reviews* 3: 274-284.
- Barrett, S. C. H. 2002b. Sexual interference of the kind. *Heredity* 88: 154-159.
- Barrett, S. C. H. & D. Glover. 1985. On the Darwinian hypothesis of the adaptive significance of tristily. *Evolution* 39:766-774.
- Barrett, S. C. H. & J. H. Richards. 1990. Heterostyly in tropical plants. *Memoirs of New York Botanical Garden* 55: 35-65.
- Barrett, S. C. H., Jesson, L. K. & A. M. Baker. 2000. The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. *Annals of Botany* 85 (suppl A): 253-265.
- Barrett, S. C. H. and J. S. Shore. 2008. New insights on heterostyly: comparative biology, ecology and genetics. Pp 3 - 32 *en: Franklin-Tong, V. E. (ed). Self-incompatibility in flowering plants - evolution, diversity, and mechanisms*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Bawa, K. S. 1980. Evolution of dioecy in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 11: 15-39.
- Bawa, K. S. 1990. Plant-pollinator interactions in tropical rain forest. *Annual Review of Ecology and Systematic* 21: 399-422.
- Bawa, K. S. & Beach, J. H. 1983. Self-incompatibility systems in the Rubiaceae of a tropical lowland wet forest. *American Journal of Botany* 70: 1281-1288.
- Bawa, K. S., Perry, D. R. & J. H. Beach. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees I. Sexual system and incompatibility mechanisms. *American Journal of Botany* 72: 331-345.

- Beach, J. H. & K. S. Bawa. 1980. Role of pollinators in the evolution of dioecy from distyly. *Evolution* 34: 1138-1142.
- Bolten, A. B., Feinsinger, P., Baker, H. G. & I. Baker. 1979. On the calculation of sugar concentration in flower nectar. *Oecologia* 41: 301-304.
- Broyles, S. B. & R. Wyatt. 1993. The consequences of self pollination in *Asclepias exaltata*, a self-incompatible milkweed. *American Journal of Botany* 80: 41- 44.
- Cariveau, D., Irwin, R. E., Brody, A. K., Garcia-Mayeya, L. S. & A. von der Ohe. 2004. Direct and indirect effects of pollinators and seed predators to selection on plant and floral traits. *Oikos* 104: 15-26.
- Carlson, J. E. & K. E. Harms. 2006. The evolution of gender-biased nectar production in hermaphroditic plants. *The Botanical Review* 72: 179-205.
- Casper, B. B. 1992. The application of sex allocation theory to heterostylous plants. 207-223 pp. *En: S. C. H. Barrett (ed). Evolution and function of heterostyly. Springer-Verlag. New York.*
- Castro, C. C. & P. E. A. Oliveira. 2001. Reproductive biology of the protandrous *Ferdinandusa speciosa* Pohl (Rubiaceae) in southeastern Brazil. *Revista Brasil. Bot.* 24: 167 - 172.
- Cawoy, V., Kinet, J. M. & A. L. Jacquemart. 2008. Morphology of nectaries and biology of nectar production in the distylous species *Fagopyrum esculentum*. *Annals of botany* 102: 675-684.
- Cesaro, A. C., Barrett, S. C. H., Maurice, S., Vaissiere, B. E. & J. D. Thompson. 2004. An experimental evaluation of self-interference in *Narcissus assoanus*: functional and evolutionary implications. *J. Evol. Biol.* 17: 1367-1376.
- Chailakhyan, M. K. 1979. Genetic and hormonal regulation of growth, flowering, and sex expression in plants. *American Journal of Botany* 66: 717-736.
- Charlesworth, D. 1988. Evidence for pollen competition in plants and its relationship to progeny fitness: a comment. *The American Naturalist* 132: 298-302.
- Charlesworth, D. & B. Charlesworth. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 237-268.
- Coelho, C. P. & A. A. Barbosa. 2003. Biologia reproductiva de *Palicourea macrobotrys* Ruiz & Pavon (Rubiaceae): um possível caso de homostilia no gênero *Palicourea* Aubl. *Revista Brasil Bot.* 26: 403-413.

- Coelho, C. P. & A. A. Barbosa. 2004. Biología reproductiva de *Psychotria poeppigiana* (Mull) Arg. (Rubiaceae) em mata de galeria. *Acta Bot. Bras.* 18: 481 - 489.
- Consolaro, H., Da Silva, E. B. & P. E. De Oliveira. 2005. Variação floral e biologia reproductiva de *Manettia cordifolia* Mart. (Rubiaceae). *Revista Brasil Bot.* 28: 85-94.
- Colwell, R. K. 2000. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples, Version 6.01b, User's guide and application: <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates>.
- Contreras, P. S. & J. F. Ornelas. 1999. Reproductive conflicts of *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a distylous shrub of a tropical cloud forest in Mexico. *Plant Systematic and Evolution* 219: 225 - 241.
- Cordero-Ayala, G., Terrazas, T., López-Mata, T. & C. Trejo. 2004. Variación en el tamaño y peso de la semilla y su relación con la germinación en una población de *Stenocereus beneckeii*. *Interciencia* 29: 692-697.
- Cresswell, J. E. 1999. The influence of nectar and pollen availability on pollen transfer by individual flowers of oil-seed rape (*Brassica napus*) when pollinated by bumblebees (*Bombus lapidarius*). *Journal of Ecology* 87: 670-677.
- Cruden, R. W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32 - 46.
- Cruden, R. W. & D. L. Lyon. 1989. Facultative xenogamy: examination of a mixed mating system. Pp 171-207. *En: J. H. Book & Y. B. Linhart (eds.), The evolutionary ecology of plants.* Westview Press, Boulder, Colorado, USA.
- Dalling, J. W. & S. P. Hubbell. 2002. Seed size, growth rates and gap microsite conditions as determinants of recruitment success for pioneer species. *Journal of Ecology* 90: 557-568.
- Darwin, C. 1877. The different forms of flowers on plants of the same species. Murray, London, UK.
- De Jong, T. J. & P. Klinkhamer. 2005. Evolutionary ecology of plant reproductive strategies. Cambridge University Press. New York. 333 p.
- Delph, L. F. & C. M. Lively. 1992. Pollinator visitation, floral display, and nectar production of the sexual morphs of a gynodioecious shrub. *Oikos* 63: 161-170.
- Dellaporta, S. L. & A. Calderon-Urrea. 1993. Sex determination in flowering plants. *The Plant Cell* 5: 1241-1251.

- Devlin, B. & A. G. Stephenson. 1985. Sex differential floral longevity, nectar secretion, and pollinator foraging in a protandrous species. *American Journal of Botany* 72: 303-310.
- Dinnétz, P. 1997. Male sterility, protogyny, and pollen-pistil interference in *Plantago maritime* (Plantaginaceae), a wind pollinated, self-incompatible perennial. *American Journal of Botany* 84: 1588 - 1594.
- Dulberger, R. 1992. Floral polymorphisms and their functional significance in the heterostylous syndrome. 41-84 pp. *En: S. C. H. Barrett (ed). Evolution and function of heterostyly.* Springer-Verlag. New York.
- Engel, E. C. & R. E. Irwin 2003. Linking pollinator visitation rate and pollen receipt. *American Journal of Botany* 90: 1612-1618.
- Faivre, A. E & L. A. McDade. 2001. Population-level variation in the expression of heterostyly in three species of Rubiaceae: does reciprocal placement of anthers and stigmas characterize heterostyly?. *American Journal of Botany* 88: 841 - 853.
- Fetscher, A. E. 2001. Resolution of male – female conflicts in a hermaphroditic flower. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268: 525-529.
- Feinsinger, P. & W. H. Busby. 1987. Pollen carryover: experimental comparisons between morphs of *Palicourea lasiorrachis* (Rubiaceae), a distylous, bird-pollinated, tropical treelet. *Oecologia* 73: 231 - 235.
- Gathua, M. 2000. The effects of primates and squirrels on seed survival of a canopy tree, *Azelia quanzensis*, in Arabuko-Sokoke Forest, Kenya. *Biotropica* 32: 127-132.
- Ganders, F. R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany* 17: 607-635.
- Galen, C., Gregory, T. & L. F. Galloway. 1989. Costs of selfpollination in a self-incompatible plant, *Polemonium viscosum*. *American Journal of Botany* 76: 1675-1680.
- García-Robledo, C. 2008. Asymmetry in pollen flow promotes gender specialization in morphs of the distylous neotropical herb *Arcytophyllum lamarum* (Rubiaceae). *Evolutionary Ecology* 22: 743 - 755.
- González, C., Ornelas, J. F. & L. Jiménez. 2005. Between-year changes in functional gender expression of *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a distylous, hummingbird-pollinated shrub. *Annals of Botany* 95: 371 - 378.
- Hernández, A. & J. F. Ornelas. 2003. Correlación morfo-específica en flores de *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *Bol. Soc. Bot. Mex.* 73: 35 - 41.

- Hernández, A. & J. F. Ornelas. 2007a. Disassortative pollen transfer in distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a hummingbirds-pollinated shrub, *Écoscience* 14: 8-16.
- Hernández, A. & J. F. Ornelas. 2007b. Development of distylous flowers and investment of biomass in male and female function in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *Plant Biol.* 9: 694 - 704.
- Hilty, S. L. 2003. Birds of Venezuela. Princeton University Press 875 p.
- Irish, E. E. & T. Nelson. 1989. Sex determination in monoecious and dioecious plants. *The Plant Cell* 8: 737-744.
- Jakobson, A. & O. Erikson. 2000. A comparative study of seed number, seed size, seedling size and recruitment in grassland species. *Oikos* 88: 494 – 502.
- Kearns, C. A. & D. W. Inouye. 1993. Techniques for pollination biologists. University Press of Colorado, Nwot, Colorado. 583 p.
- Klinkhamer, P. G. L., de Jonh, T. J. & L. A. Linnebank. 2001. Small-scale spatial patterns determine ecological relationships: an experimental example using nectar production rates. *Ecology Letter* 4: 559-567.
- Kohn, J. R. & S. C. H. Barrett. 1992. Experimental studies of the functional significance of heterostyly. *Evolution* 46: 43-55.
- Langenberger, M. W. & A. R. Deivis. 2002. Temporal changes in temporal nectar production, reabsorption, and composition associated with dichogamy in annual caraway (*Carum carvi*; Apicaceae). *American Journal of Botany* 89: 1588-1598.
- Lau, P. & C. Bosque. 2003. Pollen flow in the distylous *Palicourea fendleri* (Rubiaceae): an experimental test of the disassortative pollen flow hypothesis. *Oecologia* 135: 593 - 600.
- Lasso, E. & M. E. Naranjo. 2003. Effect of pollinators and nectar robbers on nectar production and pollen deposition in *Hamelia patens* (Rubiaceae). *Biotropica* 35: 57-66.
- Lebel-Hardenack, S. & S. R. Grant. 1997. Genetics of sex determination in flowering plants. *Trends Plant Sci.* 2: 130-139.
- Levin, D. A. 1968. The breeding system of *Lithospermum caroliniensis*: Adaption and counter adaption. *American Naturalist* 102: 427-441.
- Lewis, D. & D. A. Jones. 1992. The genetics of heterostyly. 129-150 pp. *En:* S. C. H. Barrett (eds.). Evolution and function of heterostyly. Springer-Verlag. New York.

- Lloyd, D. G. 1979. Evolution towards dioecy in heterostylous populations. *Plant Systematic and Evolution* 131: 71-80.
- Lloyd, D. G. & C. J. Webb. 1992. The selection of heterostyly. Pp. 179-207 *En*: S. C. H. Barrett (eds.) *Evolution and function of heterostyly*. Springer -Verlag. New York.
- Lloyd, D. G. & 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: 135-162.
- Lopes, L. E & S. Buzato. 2005. Biología reproductiva de *Psychotria suterella* Muell. Arg. (Rubiaceae) e a abordagem de escalas ecológicas para a fenologia de floração e frutificação. *Revista Brasil. Bot.* 28:785 - 795.
- Manetas, Y. & Y. Petropoulou. 2002. Nectar amount, pollinator visit duration and polination success in the mediterranean shrub *Cistus creticus*. *Annals of Botany* 86: 815-820.
- Martinez del Rio, C. & L. E. Eguiarte. 1987. The effect of nectar availability on the foraging behavior of the stingless bee *Trigona testacea*. *The Southwestern Naturalist* 32: 313-319.
- Murcia, C. 2002. Ecología de la polinización, Pp. 493-530. *en*: Guanguata, M. & G. Kattan (eds). *Ecología y conservación de bosques neotropicales*. Ediciones LUR. Costa Rica.
- Murcia, C. & P. Feinsinger. 1996. Interspecific pollen loss by hummingbirds visiting flower mixtures: effects of floral architecture. *Ecology* 77: 550-560.
- Musicante, M. L. & L. Galetto. 2008. Características del néctar de *Cologania broussonetii* (Balb.) DC. (Fabaceae) y su relación con los visitantes florales. *Ecología Austral* 18: 195-204.
- Nishihiro, J. & I. Washitani. 1998. Patterns and consequences of self-pollen deposition on stigmas in heterostylous *Persicaria japonica* (Polygonaceae). *American Journal of Botany* 85: 352-359.
- Olesen, J. M. 1979a. Differential anther eating by snails in the heterostylous plant species, *Primula elatior* (L.) Hill. *Acta Botanica Neerlandica* 28: 519-521.
- Olesen, J. M. 1979b. Floral morphology and pollen flow in the heterostylous species *Pulmonaria obscura* Dumort. (Boraginaceae). *New Phytologist* 82: 757-767.
- Ornduff, R. 1970. Incompatibility and the pollen economy of *Jepsonia aparryi*. *American Journal of Botany* 57: 1036-1041.
- Ornduff, R. 1971. The reproductive system of *Jepsonia heteranda*. *Evolution*, 25: 300-311.

- Ornduff, R. 1980. Heterostyly, population composition and pollen flow in *Hedyotis caerulea*. *American Journal of Botany* 67: 95 - 103.
- Ornelas, J. F., González, C., Jiménez, L., Lara, C. & A. J. Martínez. 2004a. Reproductive ecology of distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) in a tropical montane cloud forest. I. Hummingbirds' effectiveness as pollen vectors. *American Journal of Botany* 91: 1052 - 1060.
- Ornelas, J. F., González, C., Jiménez, L., Lara, C. & A. J. Martínez. 2004b. Reproductive ecology of distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae) in a tropical montane cloud forest. II. Attracting and rewarding mutualistic and antagonistic visitors. *American Journal of Botany* 91: 1061 - 1069.
- Pailler, T & J. D. Thomsom. 1997. Distyly and variation in heteromorphic incompatibility in *Gaertnera vaginata* (Rubiaceae) endemic to La Reunion Island. *American Journal of Botany* 84: 315 - 327.
- Pappers, S. M., de Jong, T. J., Klinkhamer, P. & E. Meelis. 1999. Effect of nectar content on number of bumblebee approaches and the length of visitation frequencies in *Echium vulgare* (Boraginaceae). *Oikos* 87: 580-586.
- Pielou, E. C. 1961. Segregation and symmetry in two-species populations as studied by nearest-neighbour relationships. *Journal of Ecology* 49: 255-269.
- Pleasants, J. M. 1983. Nectar production patterns in *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae). *American Journal of Botany* 70: 1468-1475.
- Rademaker, M. C. J., de Jong, T. J. & P. G. L. Klinkhamer. 1997. Pollen dynamics of bumblebee visitation on *Echium vulgare*. *Functional Ecology* 11: 554-563.
- Real, L. A. & B. J. Rathcke. 1991. Individual variation in nectar production and its effect on fitness in *Kalmia latifolia*. *Ecology* 72: 149-155.
- Ree, R. H. 1997. Pollen flow, fecundity, and the adaptive significance of heterostyly in *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *Biotropica* 29: 298 - 308.
- Rengifo, C., Nava, A. & M. Zambrano. 2005. Lista de Aves de La Mucuy y Mucubaji, Parque Nacional Sierra Nevada, Mérida-Venezuela. Serie Aves de Mérida. 79 p.
- Richards, J. H. & S. C. H. Barrett. 1992. The development of heterostyly. Pp 85-227. En: S. C. H. Barrett (ed.). *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag. New York.

- Richards, J. H. & S. Koptur. 1993. Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 80: 31 - 40.
- Rossi, A. A., Oliveira, L. O. & M. F. Vieira. 2005. Distyly and variation in floral traits in natural populations of *Psychotria ipecacuanha* (Brot.) Stokes (Rubiaceae). *Revista Brasil. Bot.* 28: 285 - 294.
- Rush, S., Corner, J. K. & P. Jenetten. 1995. The effects of natural variation in pollinator visitation on rates of pollen removal in Wild Radish, *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 82: 1522-1526.
- Strauss, S. Y. 1997. Floral characters link herbivores, pollinators and plant fitness. *Ecology* 78: 1640-1645.
- Sage, T. L., Strumas, F., Cole, W. W. & S. C. H. Barrett. 1999. Differential ovule development following self- and crosspollination: the basis of self-sterility in *Narcissus triandrus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* 86: 855 - 870.
- Shycoff, J. A. & E. Bucheli. 1995. Pollinator visitation patterns, floral rewards and the probability of transmission of *Microbotryum violaceum*, a venereal disease of plants. *Journal of Ecology* 83: 189-198.
- Simpson, B. B. & J. L. Neff. 1983. Evolution and diversity of floral rewards. Pp 142–159. *En: C. E. Jones & R. J. Little (eds.). Handbook of experimental pollination biology. Scientific and Academic Editions, Van Nostrand Reinhold Company, New York, NY.*
- Smith, C. C. & Fretwell, S. D. 1974. The optimal balance between size and number of offspring. *American Naturalist*. 108: 499 - 506.
- Sobrevila, C., Ramirez, N. & N. X. de Enrech. 1983. Reproductive biology of *Palicourea flendleri* and *Palicourea petiolaris* (Rubiaceae), heterostylous shrubs of a tropical cloud forest in Venezuela. *Biotropica* 15: 161 - 169.
- Stone, J. L. 1995. Pollen donation patterns in a tropical distylous shrub (*Psychotria suerrensii*, Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82: 1390 - 1398.
- Stone, J. L. & J. D. Thompson. 1994. The evolution of distyly: pollen transfer in artificial flowers. *Evolution* 48: 1595 - 1606.
- Swamy, N. R. & B. Habadur 1984. Pollen flow in dimorphic *Turnera subulata* (Turneraceae). *New Phytology* 98: 205 - 209.

- Tanimoto, T. 2007. Modification of sex expression in *Sagittaria latifolia* by the application of Gibberellic Acid and Paclobutrazol. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 76: 47-53.
- Taylor, C. M. 1989. Revision of *Palicourea* (Rubiaceae) in Mexico and America Central. *Sistematic Botany Monographs*. 26: 102pp.
- Taylor, C. M. 2000. New species and a new name in *Palicourea* (Rubiaceae: Psychotrieae) from Northwestern South America. *Novon* 10: 78-87.
- Teixeira, L. A. & I. C. Machado. 2004a. Biología da polinização e sistema reproductivo de *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). *Acta Bot. Bras.* 18: 853-862.
- Teixeira, L. A. & I. C. Machado. 2004b. *Sabicea cinerea* Aubl. (Rubiaceae): diestilia e polinização em um fragmento de floresta Atlântica em Pernambuco, Nordeste do Brasil. *Revista Brasil. Bot.* 27: 193-204.
- Thompson. J. D. & B. Domme. 2000. Morph-specific patterns of variation in stigma height in natural populations of distylous *Jasminum fruticans*. *New Phytologist* 148: 303 - 314.
- Valois-Cuesta, H. & S. Novoa-Sheppard. 2006. Ecología reproductiva de *Palicourea demissa* (Rubiaceae): Néctar y colibríes en una selva nublada de Los Andes venezolanos. *Revista institucional. U.T.CH.* 25: 40 - 46.
- Waser, N. M. & M. V. Price. 1991. Reproductive costs of selfpollination in *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae): are ovules usurped?. *American Journal of Botany* 78: 1036-1043.
- Webb, C. J. & 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: 163-178.
- Wheelwright, N. T. 1993. Fruit size in a tropical tree species: variation, preference by birds, and heritability, Pp. 163-174. *En*: Fleming, T. H. & A. Estrada (eds.). *Frugivory and seed dispersal: Ecological and evolutionary aspects*. Kluwer Academic Publisher. Berlin
- Willson, M. F. & J. Ågren. 1989. Differential floral rewards and pollination by deceit in unisexual flowers. *Oikos* 55: 23-29.
- Wolf, L. L. & F. R. Hainsworth. 1990. Non-random foraging by hummingbirds: patterns of movement between *Ipomopsis aggregata* (Pursch) V. Grant inflorescences. *Functional Ecology* 4: 149-157.

- Wolfe, D. E., Satkoski, J. A., White, K. & L. H. Rieseberg. 2001. Sex determination in the androdioecious plant *Datisca glomerata*, and its dioecious sister species, *D. cannabina*. *Genetics* 159: 1243-1257.
- Yin T. & J. A. Quinn 1995. Tests of a mechanistic model of one hormone regulating both sexes in *Cucumis sativus* (Cucurbitaceae). *American Journal of Botany* 82: 1537-1546.
- Young, H. J. & M. L. Stanton. 1990. Influences of floral variation on pollen removal and seed production in wild radish. *Ecology* 71: 536-547.
- Zimmerman, M. 1983. Plant reproduction and optimal foraging: experimental nectar manipulation in *Delphinium nelsonii*. *Oikos* 41: 57-63.
- Zimmerman, M. & S. Cook. 1985. Pollinator foraging, experimental nectar-robbing and plant fitness in *Impatiens capensis*. *American Midland Naturalist* 113: 84-91.