



UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

**Biología de la polinización de
Oplonia nannophylla
(Urban) Stearn (Acanthaceae)**

TESIS DE DIPLOMA

Autora: Claudia Reaño Jiménez

Santa Clara, 2017

**UNIVERSIDAD CENTRAL “MARTA ABREU” DE LAS VILLAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**



TESIS DE DIPLOMA

**Biología de la polinización de *Oplonia nannophylla*
(Urban) Stearn (Acanthaceae)**

Autora: Claudia Reaño Jiménez
Tutor: Dr. C. Michel Faife Cabrera*

*Centro de Estudios Jardín Botánico de Villa Clara, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.

Carretera a Camajuaní, 5 1/2 km, Santa Clara, Villa Clara. Código postal 54830.

Email: michei@uclv.edu.cu

Santa Clara, 2017

"I do not think anything in my scientific life has given me so much satisfaction as making out the meaning of the structure of these plants"

Charles Darwin

(Refiriéndose a las plantas heterostilas)

Darwin, C. R. (1958) *The Autobiography of Charles Darwin*

A Moza, que siempre estará conmigo.

A mi papá, por mostrarme el camino.

A mi mamá, por apoyarme.

A Agnese, mi princesita...

Agradezco a...

...mi familia, por educarme y por todo el apoyo durante estos cinco años.

...Rafael Alejandro Pérez Obregón (el Chuli), por acompañarme durante todas esas largas horas en el cuabal, aunque te comieras toda la merienda y por tu culpa me perdiera tantas veces en el campo. Pero también por los consejos y por ser tan criticón con las revisiones, fuiste de gran ayuda.

...mi tutor, por sus consejos, la confianza, y la paciencia. Pero también por los regaños!!! Porque sin su TIC-TAC, TIC-TAC, nunca hubiese podido terminar esta tesis.

...todos mis compañeros de aula, por los momentos que hemos pasado juntos durante estos cinco años.

...Lyselle, por disfrazarse como un campesino canadiense y acompañarme una vez en primer año, para garantizar estar en estos agradecimientos. Pero también por chismear conmigo cuando estaba muy estresada escribiendo esta tesis.

...Cindy, por siempre estar dispuesta a acompañarme al cuabal y defenderme de los toros!!! También por ser mi compañera en todos esos viajes que aparecieron durante la carrera, espero que continúen. A María de los Ángeles (la mamá de Cindy), por la merienda y en especial por sus boniatillos.

...Ignacio, por sus consejos y por darme ánimo, pero en especial por ayudarme con el trabajo de campo. Espero algún día también poder ser de ayuda para él.

...los profesores y trabajadores del Jardín Botánico. En especial a Idelfonso, Noa, Juana, Geidy, Maritza y Lillian. Gracias a todos por contribuir a mi formación profesional, y por enseñarme que los compañeros de trabajo pueden convertirse en una familia.

...todos los profesores del departamento, que me formaron como profesional. En especial a Edgardo, por su ayuda con la matemática y en general con todas mis dudas. A Enma, por sus consejos y aclaraciones que me ayudaron mucho en la realización de este trabajo.

...además, a Annery Serrano por su ayuda con la morfometría geométrica y a los investigadores del Centro de Estudios Informáticos que me ayudaron a desarrollar el índice.

...Rodolfo Arias, por las aclaraciones y los consejos.

...FondoNatura, porque con su financiamiento se realizó parte de esta tesis.

...y a todos los demás que de una forma u otra hicieron posible este trabajo...

MUCHAS GRACIAS

Resumen

Oplonia nannophylla es una especie endémica de Cuba que presenta un sistema reproductivo poco común, pues sus flores son heterostilas y zigomorfas. Se ha planteado que la heterostilia sería de poca utilidad en flores zigomorfas, pues estas ya están adaptadas para la polinización cruzada. Por tanto, es interesante la existencia de estos dos mecanismos tan diferentes para favorecer este fenómeno. Se propuso determinar el posible efecto de la zigomorfía y la heterostilia en el éxito reproductivo de esta especie. Para ello se caracterizó la biología floral, analizó el sistema reproductivo y describió la ecología de la polinización. Para determinar el grado de zigomorfía se utilizaron técnicas de morfometría geométrica. Se plantea un nuevo índice, que permite por primera vez determinar el grado de reciprocidad de pistilos y estambres de cada individuo, con respecto al resto de los individuos del morfo opuesto en la población. No se encontraron diferencias en las variables morfométricas y en la producción de polen entre los morfos, por lo que no existe polimorfismo en los caracteres ancilares. Además, carece de sistema de incompatibilidad heteromórfico, lo que pudiera representar una ventaja adaptativa. La pequeña presentación floral y las bajas producciones de néctar, así como los efectos antrópicos en las localidades estudiadas, pudieran ser la causa de las bajas tasas de visitas. No se encontró relación estadísticamente significativa del grado de reciprocidad y la zigomorfía con el éxito reproductivo, debido a las bajas tasas de visita de los polinizadores en las localidades estudiadas.

Palabras clave: heterostilia, *Oplonia nannophylla*, reciprocidad, zigomorfía.

Abstract

Oplonia nannophylla is a Cuban endemic species that presents an atypical reproductive system, because its flowers are heterostylous and zygomorphic. It has been suggested that heterostyly would be useless in zygomorphic flowers, as they are already adapted for cross-pollination. Therefore, it is interesting the existence of these two mechanisms so different to favor this phenomenon. It was proposed to determine the possible effect of zygomorphy and heterostyly on the reproductive success of this species. For this purpose, the floral biology was characterized, analyzed the reproductive system and described the ecology of the pollination. To determine the degree of zygomorphism, geometric morphometry techniques were used. A new index is proposed, which allows for the first time to determine the reciprocity degree of pistils and stamens of each individual, with respect to the rest of the individuals of the opposite morph in the population. No differences were found in the morphometric variables and in the pollen production among the morphs, so there is no polymorphism in the ancillary characters. In addition, it lacks a system of heteromorphic incompatibility, which could represent an adaptive advantage. The small floral display and the low yields of nectar, as well as the anthropic effects in the studied localities, could be the cause of the low rates of visits. There was no statistically significant relationship of the reciprocity degree and zygomorphy with the reproductive success, due to the low visitation rates of pollinators in the studied localities.

Keywords: heterostyly, *Oplonia nannophylla*, reciprocity, zygomorphy.

Tabla de contenido

1. Introducción.....	1
2. Revisión bibliográfica	3
2.1. Biología floral	3
2.1.1. Heterostilia	4
<i>Definición.....</i>	4
<i>Caracteres ancilares y sistema de incompatibilidad heteromórfico</i>	4
<i>Importancia adaptativa.....</i>	5
<i>Características morfológicas de las flores heterostilas.....</i>	6
<i>Caracterización de la reciprocidad en las poblaciones heterostilas.....</i>	6
2.1.2. La simetría floral: tipos y relación con la polinización	7
<i>Simetría floral: definición, clasificación y origen</i>	7
<i>Zigomorfía y polinización, significación adaptativa</i>	7
<i>Asimetría fluctuante</i>	8
2.2. Sistemas reproductivos	8
2.2.1. Cociente polen-óvulo (P/O)	9
2.2.2. Experimentos de polinización manual	9
2.3. Ecología de la polinización	10
2.4. Morfometría geométrica	11
2.4.1. Definición	11
2.4.2. Puntos morfológicos claves.....	11
3. Materiales y métodos	12
3.1. Generalidades.....	12
3.1.1. Especie estudiada	12
3.1.2. Localidades de estudios.....	12
3.2. Biología floral	13
3.2.1. Producción y tamaño del polen	14
3.2.2. Producción de néctar	14
3.2.3. Efectos de la heterostilia y la zigomorfía en el éxito reproductivo de <i>Oplonia nannophylla</i>	14
<i>Cálculo del grado de reciprocidad de cada individuo</i>	14
<i>Determinación del grado de zigomorfía en cada individuo</i>	14
<i>Determinación del efecto de la zigomorfía y la heterostilia en el éxito reproductivo de O. nannophylla</i>	16

3.3. Sistema reproductivo.....	16
3.3.1. Cociente polen-óvulo (P/O).....	16
3.3.2. Experimentos de polinización manual.....	17
3.4. Ecología de la polinización.....	17
4. Resultados.....	18
4.1. Biología floral.....	18
4.1.1. Efectos de la heterostilia y la zigomorfía en el éxito reproductivo de <i>Oplonia nannophylla</i>	20
4.1.2. Producción y tamaño del polen.....	21
4.1.3. Producción de néctar.....	22
4.2. Sistema reproductivo.....	22
4.3. Ecología de la polinización.....	23
5. Discusión.....	26
6. Conclusiones.....	31
7. Recomendaciones.....	32
Referencias bibliográficas.....	33

1. Introducción

La polinización es el proceso mediante el cual el polen se transfiere desde las anteras de una flor hasta el estigma de esa misma u otra flor (Faegri y van der Pijl, 1966). Por tanto, la biología de la polinización estudia todos aquellos elementos que intervienen en este proceso y que garantizan la atracción de los polinizadores. Su estudio comprende la identificación y comprensión de patrones asociados a la interacción planta-polinizador. Este mutualismo, con millones de años de existencia, ha determinado la evolución conjunta de las especies involucradas. De hecho, la variedad en las características de las flores es el resultado de estas interacciones con diversos polinizadores (Harder y Johnson, 2009), y está asociada con una impresionante variedad de estrategias reproductivas y sistemas sexuales (Barrett, 2002). Dentro de la diversidad floral se registran variaciones en rasgos florales, tanto entre especies como entre individuos de la misma especie (e.g. los polimorfismos florales).

En su libro *The different forms of flowers on plants of the same species*, Darwin fue el primero en abordar la significación adaptativa de algunos polimorfismos, como la heterostilia, y la evolución de la dioecia en las plantas (Darwin, 1877). La heterostilia es un polimorfismo floral en el cual, en una misma población de plantas, podemos encontrar dos (distilia) o tres (tristilia) morfos, caracterizados por diferentes longitudes en pistilos y estambres (Ganders, 1979). En ambos casos, los estigmas se encuentran situados recíprocamente a la altura de las anteras del morfo opuesto (Ferrero, 2009), posicionamiento mediante el cual se promueve la polinización cruzada (Arroyo, 2002). Las flores heterostilas presentan varias características distintivas: son hermafroditas, tienen una estructura relativamente simple y tamaño variable (Ganders, 1979) y generalmente presentan corolas actinomorfas (Darwin, 1877). Sin embargo, en algunas familias (Acanthaceae, Iridaceae y Pontederiaceae) la corola a menudo es zigomorfa (Lloyd y Webb, 1992).

Las flores zigomorfas (monosimétricas o con simetría bilateral) son aquellas que presentan un único plano de simetría (Font-Quer, 1953; Glover, 2007). La interacción polinizador-planta en las flores zigomorfas se favorece con la diferenciación de una “plataforma de aterrizaje”. Esta es usualmente brindada por el perianto, pues las flores zigomorfas típicamente presentan un prominente pétalo inferior de cierta rigidez. Lo anterior posibilita que el polinizador tenga una superficie firme a la que adherirse en el momento de la visita floral (Proctor *et al.*, 1996). Por tanto, se plantea que la zigomorfía favorece la xenogamia en los sistemas reproductivos de las angiospermas, al determinar una deposición y transferencia de polen más precisa (Armbruster *et al.*, 1994; Sargent, 2004).

Entre las plantas con flores zigomorfas, el género *Oplonia* constituye una de las pocas excepciones dentro de la familia Acanthaceae (Lamiales), pues estas son además heterostilas. En particular, *Oplonia nannophylla* (Urb.) Stearn (Acanthaceae) es una especie endémica de cuabales (León y Alain, 1957, Stearn, 1971) que habita en el distrito *Claraense* (Noa y Castañeda, 1998). Según Darwin (1877) la

heterostilia sería de poca utilidad en flores zigomorfas como las encontradas en esta especie, pues ya están bien adaptadas para la polinización cruzada. Por tanto, resulta cuestionable la existencia de estos dos mecanismos tan diferentes para favorecer un mismo fenómeno en *O. nannophylla*.

Hipótesis

La heterostilia (valor de reciprocidad entre alturas de pistilos y estambres) y el grado de zigomorfía, favorecen de forma complementaria la fertilización cruzada en *O. nannophylla*.

Por tanto, se plantea como objetivo general:

Determinar el posible efecto de la zigomorfía y la heterostilia en el éxito reproductivo de *Oplonia nannophylla*.

Por lo que se proponen como objetivos específicos:

- 1- Caracterizar la biología floral, teniendo en cuenta el síndrome heterostilo y la simetría floral.
- 2- Analizar el sistema reproductivo de *O. nannophylla*.
- 3- Describir la ecología de la polinización de esta especie.

2. Revisión bibliográfica

2.1. Biología floral

La biología floral es la parte de la biología que se ocupa de todo cuanto atañe a las funciones florales (Font-Quer, 1953). En sentido estricto se aplica al estudio de las relaciones que se establecen entre flores y polinizadores, así como al de todas las particularidades florales que se relacionan con la polinización.

Las flores polinizadas por animales están bien adaptada para atraer a los polinizadores e inducirlos a establecer contacto mecánico con los órganos sexuales, lo que garantiza la transferencia efectiva de polen (Proctor *et al.*, 1996). Esta atracción puede ser alcanzada por el olfato (debido a la presencia de glándulas de olor), o por la visión (relacionada con la morfología de la flor) (Faegri y van der Pijl, 1979; Marinho *et al.*, 2014). Entre las principales características morfológicas de las flores se encuentran la presentación floral, el tamaño y color de las flores, así como la simetría floral (zigomorfía/actinomorfía).

La presentación floral se define como el número de flores abiertas en un momento dado en una planta, y varía grandemente entre las diferentes especies o entre los diferentes individuos de una misma especie (Ohashi y Yahara, 2001). La variación en el tamaño de la presentación floral produce alteraciones en el comportamiento de los polinizadores. Una presentación floral mayor atrae más polinizadores por unidad de tiempo (Ohashi y Yahara, 2001). Esto promueve la fertilización cruzada, pues aumenta la recepción y remoción de polen (Harder y Barrett, 1996).

Otro de los rasgos morfológicos importantes es el tamaño de la flor. Los polinizadores generalmente prefieren flores más grandes, aunque esto representa un mayor costo para la planta en algunos ambientes (Galen, 2000). El tamaño, la forma y el color de las flores se relacionan con los polinizadores de las mismas. Por ejemplo, cada color atrae a un grupo determinado de polinizadores: el blanco o blancuzco atrae murciélagos, escarabajos, abejas, polillas y mariposas; el amarillo, abejas y aves; el azul y el violeta, abejas, mariposas y aves; el rojo, mariposas y aves; y el verde solo aves (Faegri y van der Pijl, 1966). Debido a esto se habla de patrones de correspondencia morfológica, más o menos específicos, entre las características fisiológicas, morfológicas, anatómicas y fenológicas de las flores y sus polinizadores, que son los llamados síndromes de polinización (Faegri y van der Pijl, 1966). De esta forma, la combinación de determinados atributos florales como la forma y el color, hora de antesis, características y localización del néctar, y las características anatómicas de la flor, garantizan la asociación de un polinizador a un determinado síndrome floral (van der Pijl, 1960).

En la biología floral también influyen determinadas características funcionales como la duración floral y la producción de néctar. Por ejemplo, para asegurar la fecundación en situaciones de limitación de polinizadores puede haber un incremento de la duración floral. Sin embargo, las longevidades altas suponen un costo directo e indirecto de mantenimiento de las flores. El costo directo incluye recursos

invertidos en la producción de néctar y polen, y el mantenimiento de la respiración y la transpiración por las estructuras florales. El costo indirecto resulta del desvío de los recursos de otras funciones reproductivas o vegetativas, lo cual puede reducir la producción de flores y semillas (Schoen y Ashman, 1995).

El néctar es la mayor fuente de energía para los polinizadores, pues les brinda azúcares, aminoácidos y minerales. Además, generalmente constituye la única forma de obtener agua para estos animales (Petanidou, 2007). Las principales características del néctar son el volumen, concentración y contenido de azúcares, olor, color y sabor (Petanidou *et al.*, 2006). Cambios en estas características a lo largo del día aseguran la atracción de diferentes polinizadores, lo que favorece la generalización de los sistemas de polinización (Corbet *et al.*, 1979). Debido a que el néctar es una solución acuosa, su secreción depende mayormente de la disponibilidad de agua. Esto implica que en áreas donde existe déficit hídrico, como los desiertos y otras regiones climáticas áridas, las plantas enfrentan mayores costos al producirlo (Petanidou, 2007).

Las flores hermafroditas pueden presentar diferentes estrategias para evitar la autofertilización, por ejemplo, la hercogamia (separación espacial de los órganos masculinos y femeninos) (Barrett, 2002). El tipo de hercogamia se determina a partir del análisis morfológico de la flor. Según Barrett (2002), podemos encontrar hercogamia de aproximación, hercogamia reversa y hercogamia recíproca o heterostilia. Una flor presenta hercogamia de aproximación cuando los estigmas se sitúan por encima de las anteras, y hercogamia reversa cuando el estigma está situado por debajo de las anteras.

2.1.1. Heterostilia

Definición

La heterostilia es un polimorfismo floral en el que una población de plantas consta de dos (distilia) o tres (tristilia) morfos florales, caracterizados por diferentes longitudes en pistilos y estambres (Ganders, 1979; Ferrero, 2009). En el caso más sencillo, la distilia, existen flores longistilas, que poseen pistilo largo y estambres cortos (morfo L), y flores brevistilas, con estambres largos y pistilo corto (morfo S) (Ganders, 1979; Ferrero, 2009). En ambos casos, los estigmas se encuentran situados recíprocamente a la altura de las anteras del morfo opuesto (Ferrero, 2009), posicionamiento mediante el cual se promueve la polinización cruzada (Arroyo, 2002).

Caracteres ancilares y sistema de incompatibilidad heteromórfico

Existen otros caracteres que difieren repetidamente entre morfos en las especies heterostilas. Estos se denominan caracteres ancilares y los más comúnmente estudiados son: las diferencias en el tamaño de la corola, producción y tamaño de polen, forma y tamaño de las papilas del estigma, entre otros (Ganders, 1979; Ferrero, 2009). Por ejemplo, la mayoría de las especies distilas tienen diferencias morfo-específicas en el tamaño del grano de polen, y en la forma y tamaño de las papilas estigmáticas.

Esto pudiera funcionar como un mecanismo clave que promueve la captura de polen intermórfico y que participa en los mecanismos de incompatibilidad de cada uno de estos polimorfismos (Dulberger, 1992; Lloyd y Webb, 1992). Las diferencias existentes en el tamaño y producción de polen entre morfos son las más comunes, y normalmente implican una mayor producción de polen de menor tamaño por parte del morfo L (Dulberger, 1992; Ferrero, 2009; Faife-Cabrera *et al.*, 2014).

La reciprocidad en los órganos sexuales está usualmente acompañada por un sistema de incompatibilidad heteromórfico que previene la autofecundación y la fecundación dentro de un mismo morfo floral (Barrett, 2002; Brys *et al.*, 2008b). Sin embargo, existen estudios que muestran que la fortaleza de este sistema de incompatibilidad varía considerablemente entre especies y morfos (Barrett y Cruzan, 1994). En el género *Pulmonaria* (Boraginaceae) se conocen especies que carecen de autoincompatibilidad, así como de incompatibilidad heteromórfica (Brys *et al.*, 2008a). Por ejemplo, en *P. officinalis* el apareamiento entre plantas del morfo L es más flexible que entre las del morfo S (Darwin, 1877; Brys *et al.*, 2008a). Resultados similares se encontraron en *P. affinis* (Richards y Mitchell, 1990).

Importancia adaptativa

Como se ha mencionado anteriormente, desde Darwin (1877) se ha considerado que la heterostilia promueve la polinización cruzada. Actualmente se reconocen para este polimorfismo dos funciones distintas relacionadas con el éxito reproductivo masculino y femenino de las plantas (Barrett, 2002). Según esta propuesta, la hercogamia recíproca favorece la función masculina promoviendo la dispersión de polen de una manera eficiente. Además, limita la auto-interferencia entre los órganos sexuales de la propia planta y la consiguiente pérdida de gametos en polinizaciones no viables. Por su parte, el sistema de incompatibilidad mejora el éxito reproductivo femenino. Este impide la autofecundación y reduce la depresión por endogamia y el descuento de óvulos - óvulos fecundados por polen no viable, que ya no estarán disponibles para polinizaciones efectivas (Barrett, 2002).

Entre las características de las plantas heterostilas, la función de la hercogamia recíproca ha suscitado mucho interés (Darwin, 1877; Lloyd y Webb, 1992). Por un lado, la hercogamia entre órganos sexuales de una misma flor se ha considerado un mecanismo que evita la interferencia entre la función masculina y femenina (hipótesis de la interferencia sexual) (Darwin, 1877; Ganders, 1979). La interferencia sexual depende de la longitud y forma de la corola (tubular o no), así como de la morfología e identidad del polinizador. En segundo lugar, la hipótesis del flujo legítimo, propone que la posición recíproca de los órganos sexuales entre los morfos favorece la deposición de polen de cada uno de ellos en partes distintas del polinizador (Lloyd y Webb, 1992; Barrett, 2002; Lau y Bosque, 2003). Esta segregación espacial facilita la transferencia de polen más eficientemente entre plantas, ya que los órganos sexuales recíprocos reciben mayor cantidad de polen legítimo. Además, se pierde menor cantidad de polen en

zonas no útiles en la polinización, por ejemplo en los estilos, o en zonas del cuerpo del polinizador que no contactan el estigma (Armbruster *et al.*, 2006).

Características morfológicas de las flores heterostilas

Las flores heterostilas son hermafroditas, su estructura es relativamente simple y su tamaño varía notablemente dentro de las familias (Lloyd y Webb, 1992). Típicamente los estambres son pocos y definidos (Ganders, 1979), están ubicados en uno o dos verticilos y sobresalen del tubo floral, con el polen periférico y las anteras libres (Lloyd y Webb, 1992). El ovario es súpero y el estigma ocupa una posición central (Lloyd y Webb, 1992).

Darwin (1877) notó que en las grandes familias con flores que presentaban una corola irregular (con flores zigomorfas) la heterostilia faltaba completamente. Por tanto, este polimorfismo sería de poca utilidad para estas plantas, pues ya estaban bien adaptadas para lograr la fertilización cruzada. Sin embargo, podemos encontrar representantes heterostilos en algunas familias (Acanthaceae, Iridaceae y Pontederiaceae) donde la corola a menudo es zigomorfa (Lloyd y Webb, 1992). En *Oplonia*, uno de los pocos géneros heterostilos de la familia *Acanthaceae* (Daniel, 1995), la reducción del número de estambres parece estar relacionada con el desarrollo de la zigomorfía, la cual no es muy pronunciada en el género *Oplonia* (Stearn, 1971).

Caracterización de la reciprocidad en las poblaciones heterostilas

Tradicionalmente, la hercogamia recíproca ha sido considerada como la condición necesaria y suficiente para caracterizar a una planta como heterostila (Ganders, 1979; Lloyd y Webb, 1992; Barrett, 2002). Por tanto, la utilización de un índice de reciprocidad es útil para dilucidar los pasos evolutivos que conllevan a la heterostilia (Sánchez *et al.*, 2008). Además, correlacionarlo con los éxitos reproductivos de las poblaciones, permite probar si las poblaciones más recíprocas son las más exitosas.

Algunos índices han sido propuestos previamente para cuantificar la hercogamia recíproca (Richards y Koptur, 1993; Eckert y Barrett, 1994), y según Sánchez *et al.* (2008) estos presentan algunas limitantes. Por ejemplo, el índice propuesto por Richards y Koptur (1993) está basado en la comparación de las distancias entre los órganos del mismo sexo en los diferentes morfos. Por tanto, este índice mide uniformidad de las distancias entre los órganos y no una verdadera reciprocidad. Por su parte, el índice de Eckert y Barrett (1994) comprende dos términos diferentes, uno relacionado con la reciprocidad y el otro con la precisión (dispersión de los datos). El hecho de que estos términos estén separados constituye una dificultad para establecer comparaciones entre especies o poblaciones.

Un índice propuesto por Sánchez *et al.* (2008) pretende superar este inconveniente al unificar reciprocidad y precisión en el mismo término. De esta forma se facilita realizar comparaciones entre poblaciones, especies e incluso géneros. Sin embargo, estas comparaciones son aplicables solamente a poblaciones distilas. Posteriormente este índice fue modificado al hacer coincidir los mayores valores

con la máxima reciprocidad (lo que facilita su comprensión). Además, el índice fue adaptado para ser utilizado en poblaciones tristilas, lo que permite estudios que comparen entre poblaciones tristilas y distilas (Sánchez *et al.*, 2013). Sin embargo, la creación de un índice que permita realizar comparaciones entre individuos en una misma población y que unifique reciprocidad y precisión en un mismo término, constituye una tarea pendiente en el estudio del síndrome heterostilo.

2.1.2. La simetría floral: tipos y relación con la polinización

Simetría floral: definición, clasificación y origen

Existe simetría en un órgano o parte orgánica, y aún en el vegetal completo, cuando este tiene al menos un plano de simetría que permite dividirlo en dos partes, tales que cualquiera de ellas es capaz de reproducir en un espejo la imagen exacta de la otra (Font-Quer, 1953). La simetría floral es el modelo repetido de las unidades estructurales evaluado en relación al eje principal de la flor (*i.e.* la línea o vector que emana del centro del receptáculo) (Weberling, 1989). Neal *et al.* (1998) precisa que la simetría de la flor sólo se evalúa con una perspectiva bidimensional, la tercera dimensión (profundidad) no es considerada.

Existen tres tipos de simetría floral: regular, irregular y asimetría. Las flores regulares (actinomorfas, polisimétricas, o con simetría radial) son aquellas en que el pistilo, estambres y los segmentos del perianto radian uniformemente hacia afuera desde el eje central. Como resultado, cada uno de estos son iguales en tamaño y forma; y por tanto son dos o más los planos de simetría (Font-Quer, 1953). Las flores irregulares (zigomorfas, monosimétricas o con simetría bilateral) son aquellas que presentan un único plano de simetría (Font-Quer, 1953; Glover, 2007). Esto ocurre porque no todos los órganos de los verticilos florales son idénticos, el cambio puede ocurrir en cualquiera de los cuatro verticilos, siendo más comunes las alteraciones en pétalos o estambres, o en ambos al mismo tiempo (Glover, 2007). Por último, las flores asimétricas son aquellas que no presentan ningún plano de simetría (Font-Quer, 1953).

Zigomorfía y polinización, significación adaptativa

Muchas teorías han sido propuestas para explicar la significación adaptativa de la zigomorfía. Estas pueden ser agrupadas teniendo en cuenta cuatro grandes grupos operacionales: condiciones ambientales, percepción por los polinizadores, información procesada por los polinizadores y los patrones de actividad de los mismos (Neal *et al.*, 1998).

Entre las principales teorías se encuentran la hipótesis de la posición natural y la hipótesis de la deposición de polen. La primera señala que la posición de los polinizadores al volar es de forma vertical, y que por tanto las anteras y el estigma de la flor estarán ubicados de la forma más apropiada, de acuerdo con la posición natural de los polinizadores (Sprengel, 1793). La segunda explica que los polinizadores pueden acercarse a las flores actinomorfas desde cualquier dirección y las mismas no son capaces de restringir el movimiento de los polinizadores dentro de la flor. En cambio, en las flores

zigomorfas, los polinizadores están restringidos con relación a la dirección de acercamiento y al movimiento dentro y entre las flores (Leppik, 1972; Faegri y van der Pijl, 1979; Harper, 1979). Como resultado, existirá una mayor precisión en la deposición de polen en el cuerpo del polinizador, y en el estigma en contacto con este (Macior, 1974; Heinrich, 1979; Laverty, 1980; Armbruster *et al.*, 1994). Por consiguiente, en las flores zigomorfas, la especificidad de la deposición del polen mejora grandemente y con ello la diferenciación reproductiva es posible. Así la zigomorfía favorece la xenogamia en los sistemas reproductivos de las angiospermas (Sargent, 2004).

Por otra parte, la interacción polinizador-planta en las flores zigomorfas se favorece con la diferenciación de una “plataforma de aterrizaje”. Este es un proceso común en muchas flores polinizadas por animales, especialmente en aquellas que presentan melitofilia (Glover, 2007). La plataforma de aterrizaje es usualmente brindada por el perianto, pues las flores zigomorfas típicamente presentan un prominente pétalo inferior de cierta rigidez. Esto posibilita que el polinizador tenga una superficie firme a la que adherirse en el momento de la visita floral (Proctor *et al.*, 1996).

Asimetría fluctuante

Existen numerosos elementos de estrés, inherentes (genéticos) o extrínsecos (ambientales), que pueden influir en los mecanismos responsables de la simetría de las estructuras biológicas (Palmer y Strobeck, 1992). El nivel de desviación de este patrón, o sea, las asimetrías en el fenotipo, pueden ser indicadores sensibles de la calidad genética o del hábitat. En las poblaciones naturales pueden existir tres tipos de asimetrías: antisimetría (AS), asimetría direccional (AD) y asimetría fluctuante (AF). Estos tres términos se refieren a patrones de variación de un rasgo particular que exhiben una muestra de individuos.

Según Van-Valen (1962) la asimetría fluctuante se define como las diferencias no direccionales entre los lados derecho e izquierdo del cuerpo en los rasgos pareados bilaterales. Por lo general estas diferencias son muy pequeñas, por lo que se debe tener cuidado durante la medición y el análisis para aumentar las probabilidades de detectar diferencias entre las muestras (Palmer, 1994).

Para estudiar estas asimetrías, en un principio, se utilizaban medidas lineales y ángulos. Recientemente se utilizan variables de forma, derivadas de la morfometría geométrica. Estos métodos combinan el poder y las herramientas flexibles de los estadísticos multivariados, con las relaciones espaciales entre las partes del cuerpo. De esta forma, es posible investigar variaciones morfológicas con referencia directa en el contexto anatómico de la estructura bajo estudio (Bookstein, 1991; Dryden y Mardia, 1998).

2.2. Sistemas reproductivos

El sistema reproductivo de las plantas comprende las estructuras reproductivas y los procesos que afectan a la fecundidad y a la composición genética de la descendencia de una planta (Barrett y Eckert, 1990). Las plantas pueden reproducirse de forma sexual o asexual, y sólo en el primer caso es posible

incorporar variabilidad genética a la descendencia (Grant, 1989). En este tipo de reproducción se pueden producir semillas por autogamia, a partir de la fertilización de los óvulos con polen de la propia flor; alogamia, a partir de la fertilización de los óvulos con polen de otra flor de la misma planta (geitonogamia), o de una distinta (xenogamia); o bien por una mezcla de autogamia y alogamia (Bacchetta *et al.*, 2008).

Generalmente, la alogamia se ve favorecida por fenómenos como la dioecia (sexos separados en distintos pies de planta), la hercogamia, la dicogamia (separación temporal en la maduración de los órganos masculinos y femeninos), o el sistema de auto-incompatibilidad (Lloyd y Webb, 1986). La ausencia de estos fenómenos facilita la autogamia en las plantas de flores hermafroditas (Runions y Geber, 2000).

Las diferencias en el sistema reproductivo suelen correlacionarse con otras características reproductivas y ecológicas de las plantas (Bacchetta *et al.*, 2008). Por ejemplo, las plantas autógamias tienen flores de menor tamaño y producen menor cantidad de polen que las flores de plantas alógamas con las que están emparentadas (Runions y Geber, 2000; Elle y Carney, 2003). Además, las plantas autógamias suelen ser colonizadoras de hábitats degradados o propias de los primeros estados sucesionales de la vegetación, siendo las plantas alógamas características de estados sucesionales más tardíos (Baker, 1955; Cruden, 1977). Para valorar la principal estrategia reproductiva de una planta se puede recurrir a diferentes técnicas, como el cálculo del cociente polen-óvulo (Cruden, 1977) y los cruzamientos experimentales (Bacchetta *et al.*, 2008).

2.2.1. Cociente polen-óvulo (P/O)

Según Cruden (1977), el cociente polen-óvulo refleja la probabilidad de que suficientes granos de polen alcancen el estigma, y como consecuencia se garantiza la producción de un número máximo de semillas. Mientras más eficiente sea la transferencia de polen, menor debe ser este cociente. Por tanto, las flores cleistógamas tendrán los valores más bajos ($4,7 \pm 7$), y las autógamias ($27,7 \pm 3,1$) menores valores que las flores xenógamas ($796,6 \pm 87,7$). De igual forma, las flores autógamias facultativas tendrán valores más bajos ($168,5 \pm 22,1$) que las xenógamas facultativas ($796,6 \pm 87,7$). El cociente polen-óvulo refleja la contradicción entre ser energéticamente conservador al minimizar la producción de polen, y a la vez proveer el exceso de polen necesario para garantizar la máxima fecundidad. Sin embargo, existen casos en los que el tipo de sistema reproductivo estimado con el P/O no se corresponde con el real de la planta, por lo que es conveniente estudiar en profundidad el sistema reproductivo de cada especie (Jürgens *et al.*, 2002).

2.2.2. Experimentos de polinización manual

Bacchetta *et al.* (2008) propone seis tipos de cruzamientos experimentales: (1) agamospermia, para evaluar la capacidad de reproducción asexual; (2) auto-polinización autónoma, para evaluar la

capacidad de producción de frutos y semillas sin que medien agentes externos y (3) auto-polinización (las flores se embolsan y polinizan con su propio polen), para la determinación de auto-incompatibilidad. Además, (4) geitono-polinización (las flores se emasculan, embolsan y polinizan con polen procedente de otra flor de la misma planta), para la determinación de auto-incompatibilidad y (5) polinización manual (las flores se emasculan, embolsan y polinizan manualmente con polen procedente de otra planta), para evaluar la capacidad de producción de frutos y semillas cuando median agentes externos. Por último, (6) control (las flores se marcan y dejan libres para la polinización natural) para evaluar la capacidad de producción de frutos y semillas bajo condiciones naturales. Sin embargo, en las especies distilas, debido a la presencia de dos morfos, es necesario realizar polinización manual entre plantas de igual y de diferente morfo floral.

El sistema reproductivo de la planta se evalúa en relación con el éxito reproductivo obtenido en cada ensayo de polinización, en función de la cantidad y calidad de los frutos y semillas producidos (Bacchetta *et al.*, 2008). El tipo de sistema reproductivo puede describirse a través del cálculo del índice de auto-polinización automática (IAS) y del índice de auto-incompatibilidad (ISI). Los valores del IAS y del ISI por encima de 0,2 indican capacidad de auto-polinización autónoma y auto-compatibilidad, respectivamente (Ruíz-Zapata y Arroyo, 1978; Jaimes y Ramírez, 1999).

2.3. Ecología de la polinización

La polinización es el transporte de polen desde las anteras hasta el estigma de la misma o de otra flor, y puede ser llevada a cabo por vectores abióticos o bióticos (Font-Quer, 1953). Los vectores abióticos son el agua y el viento. Los vectores bióticos consisten en un grupo de animales (insectos, aves, murciélagos y otros vertebrados), que son los encargados de la polinización en la mayoría de las angiospermas (Glover, 2007).

Los animales no polinizan deliberadamente, sino que ven a las flores como fuente de alimento (Glover, 2007). Estos establecen con la planta una relación mutualista beneficiosa para ambos y son atraídos generalmente por el color o la esencia de las flores (Proctor *et al.*, 1996). La recompensa obtenida usualmente es una mezcla de néctar y polen (Glover, 2007), mientras que las plantas obtienen el servicio de los polinizadores que transportan el polen de una flor a otra (Proctor *et al.*, 1996).

Para tomar esta recompensa, los polinizadores hacen contacto con las estructuras reproductivas de la flor, lo que causa la transferencia de polen desde los estambres a su cuerpo, y de ahí a la superficie estigmática. Muchas flores muestran características estructurales que incrementan el contacto entre el cuerpo del polinizador y los órganos reproductivos (Glover, 2007). Muchas de estas características permiten predecir qué grupos de animales serán los posibles polinizadores de una planta dada, lo cual se conoce como síndrome de polinización (Faegri y van der Pijl, 1979). Según Glover (2007), esto implica un proceso de coevolución entre plantas y polinizadores, en el que la planta adquiere rasgos que

aumentan sus posibilidades de atraer y ser polinizadas por un polinizador específico. Por tanto, características como el color, la forma, y el olor son específicos para flores polinizadas por tipos específicos de animales.

2.4. Morfometría geométrica

2.4.1. Definición

La morfometría es el estudio cuantitativo de la forma de los organismos, así como la variación de la forma en dependencia de factores bióticos o abióticos (Webster y Sheets, 2010). La morfometría tradicional implica medidas de largo, radios, ángulos, entre otras. A mediados de los años '80 del siglo XX aparece la morfometría geométrica. Esta puede definirse como el sistema de métodos y procedimientos, con base geométrica, para el análisis de los patrones de las formas. En la misma, las mediciones usualmente derivan de contornos o de puntos morfológicos claves (*landmarks*) (Adams *et al.*, 2004).

Aplicaciones de la morfometría geométrica benefician múltiples campos de la biología como la sistemática, evolución y la biología del desarrollo (Webster y Sheets, 2010). Sin embargo, aunque los métodos morfométricos son ampliamente utilizados en la zoología, la investigaciones botánicas que utilizan esta herramienta continúan siendo muy escasas (Gómez y Perfectti, 2010; Klingenberg *et al.*, 2012; Savriama *et al.*, 2012; Zelditch *et al.*, 2012; Gómez *et al.*, 2016; Gardner *et al.*, 2016) .

2.4.2. Puntos morfológicos claves

La morfometría geométrica utiliza las coordenadas de ciertos puntos llamados puntos morfológicos claves. Estos son puntos específicos, localizados sobre una estructura biológica o una imagen de ella (Bookstein, 1991). En condiciones ideales, se tienen en cuenta criterios de importancia biológica, adaptativa, taxonómica y filogenética. Sin embargo, es muy poco frecuente la posibilidad de definir puntos con tales criterios. Se recurre, entonces, a reglas prácticas: puntos de fácil ubicación, situados en intersecciones de dos o más tejidos y presentes en todas las estructuras analizadas.

Según Bookstein (1991) se pueden definir tres tipos de puntos morfológicos claves en función del criterio geométrico o biológico utilizado para su ubicación. Los puntos de tipo 1 son aquellos que se encuentran en una zona de yuxtaposición de diversos tejidos o huesos. Los puntos de tipo 2 son aquellos que su homología entre casos viene dada sólo por evidencias geométricas y no histológicas. Mientras que los puntos de tipo 3 son aquellos que tienen al menos una coordenada deficiente, como por ejemplo, cualquiera de los extremos de la parte más baja de una concavidad.

3. Materiales y métodos

3.1. Generalidades

3.1.1. Especie estudiada

Oplonia nannophylla (Urb.) Stearn (Acanthaceae) es una especie endémica de los cuabales de Las Villas, La Habana y Pinar del Río (León y Alain, 1957). Según la Lista roja de la flora de Cuba (2016), también es posible encontrarla en varias áreas protegidas en el Oriente, Centro y Occidente de nuestro país, y está categorizada como de preocupación menor (LC) (González-Torres *et al.*, 2016).

Es un arbustillo de 6 - 15 cm; perenne, las ramas con espinas supra-axilares opuestas, delgadas, rectas, de 1,5 - 5 mm. Las hojas son subsentadas, obovadas, elípticas y obovado-elípticas, de 1 - 2 mm, redondeadas a obtusas en el ápice y algo estrechas en la base. El fruto es una cápsula oblonga, estipitada, de 4 mm, con cuatro semillas (o menos), suborbiculares y tuberculadas (León y Alain, 1957).

León y Alain (1957), señalan que las flores de esta especie son desconocidas. No obstante, estos autores mencionan que en el género las flores son solitarias y axilares, con brácteas pequeñas y bractéolas ausentes; el cáliz es pequeño, 5-lobulado, lóbulos subiguales. El tubo de la corola es cilíndrico, con cinco lóbulos, algo desiguales. Presentan dos estambres, anteriores, nacidos en la garganta, con filamentos muy cortos. Las anteras son oblongas, 2-loculares, con tecas paralelas y míticas; dos estaminodios posteriores; el estilo es filiforme, obtuso en el ápice, apenas 2-lobulado; contienen dos óvulos por celda.

3.1.2. Localidades de estudios

Localidad I-Área al suroeste de la ciudad de Santa Clara

Esta área de estudio se localiza en las serpentinitas del suroeste de la ciudad de Santa Clara, en la provincia Villa Clara, entre los 22° 24' N y los 79° 59' O. Forma parte de las Alturas de Cubanacán y es atravesada por uno de los afluentes del río Yabú. Está insertada prácticamente dentro del área urbana, limitando al norte con el Reparto "José Martí", al sur con la carretera que conduce al motel "Los Caneyes" y el motel propiamente, y al este con la "Escuela de Instructores de Arte". El área de trabajo tiene una extensión de unas 27 ha, donde se conservan los parches de vegetación de matorral xeromorfo espinoso sobre serpentina (Méndez-Orozco *et al.*, 2015).

Localidad II-Cerro de Pelo Malo

Situado a pocos kilómetros de la ciudad de Santa Clara. Se encuentra enclavado en una región de colinas suaves, redondeadas y serpentinosas. Presenta una elevación máxima de 220 m, abrupta y de difícil acceso. En el lugar existe una vegetación variada, tanto herbácea como arbustiva. Aparecen especies xerófitas, pero también higrófitas y mesófitas, debido a que las condiciones ambientales pueden ser muy diversas aún en los más pequeños espacios de terreno (Díaz y Alfonso, 1975).

3.2. Biología floral

Para caracterizar la morfología floral se tomaron 30 flores (una por individuo) en la localidad al suroeste de la ciudad de Santa Clara y 48 en el Cerro de Pelo Malo, las que se conservaron en alcohol al 70%. Los distintos tamaños de muestra se deben a que existían diferencias en la disponibilidad de flores en cada localidad. Cada flor fue diseccionada y fotografiada, y utilizando el software ImageJ (Rasband, 1997-2012) se midió: (1) diámetro de la corola, (2 y 3) apertura de la corola (horizontal y vertical, respectivamente), (4) longitud del tubo floral, (5) largo del pétalo diferenciado, (6) ancho del pétalo diferenciado, (7) longitud del pistilo, (8) altura de las anteras, (9) longitud de las anteras y (10) ancho de las anteras (Fig. 1).

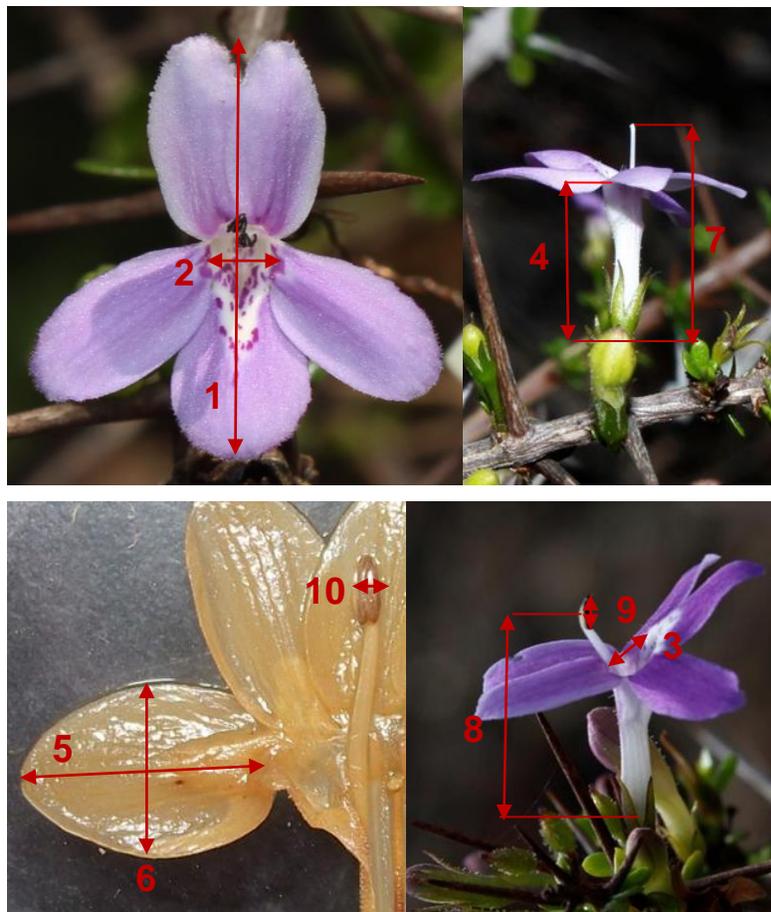


Figura 1. Variables morfométricas medidas en flores de *Oplonia nannophylla*: 1) diámetro de la corola, 2 y 3) apertura de la corola (horizontal y vertical, respectivamente), 4) longitud del tubo floral, 5) largo del pétalo diferenciado, 6) ancho del pétalo diferenciado, 7) longitud del pistilo, 8) altura de las anteras, 9) longitud de las anteras, y 10) ancho de las anteras.

3.2.1. Producción y tamaño del polen

Para evaluar la producción de polen, se seleccionaron 20 botones de cada morfo (uno por individuo) en la localidad al suroeste de la ciudad de Santa Clara en el 2016. En cada botón se seleccionó y diseccionó una antera, siguiendo el método propuesto por Bacchetta *et al.*, 2008. Los granos de polen fueron extraídos y se colocaron en una gota de glicerina. Posteriormente se realizó el conteo mediante observación en el microscopio óptico, con un aumento de 400X. La producción total de granos de polen se obtuvo al multiplicar el valor obtenido en cada caso por el número de anteras (*i.e.* dos) en cada flor. Además, se midió el diámetro de 20 granos de polen en cada uno de los 20 botones de cada morfo floral, con el objetivo de determinar las diferencias en el tamaño del polen entre los morfos.

3.2.2. Producción de néctar

Se embolsaron 20 botones (que estuvieran a punto de abrir) de cada morfo en la localidad al suroeste de la ciudad de Santa Clara. Dos horas después de la antesis (entre las 0800 h y las 0900 h del día), a cinco flores de cada morfo se les midió el volumen y concentración de néctar, utilizando capilares de cinco μ l y un refractómetro. Estas mediciones fueron realizadas nuevamente en cinco flores de cada morfo a intervalos de dos horas (1000-1100 h, 1200-1300 h, 1400-1500 h de día), respectivamente.

3.2.3. Efectos de la heterostilia y la zigomorfía en el éxito reproductivo de *Oplonia nannophylla*

Cálculo del grado de reciprocidad de cada individuo

Se colectaron cinco flores por cada uno de los 20 individuos (10 de cada morfo) en la localidad al suroeste de la ciudad de Santa Clara, y 30 individuos (15 de cada morfo) en el Cerro de Pelo Malo. Las flores se conservaron en etanol al 70%. Posteriormente fueron diseccionadas y fotografiadas, y utilizando el software ImageJ (Rasband, 1997-2012) se midió la longitud del pistilo y de los estambres (utilizando como referencia el punto medio de las anteras).

Los valores de las longitudes del pistilo se promediaron para obtener un único valor por planta. De igual forma, se promediaron los valores de las longitudes de los estambres para obtener un único valor para cada planta. Con estos valores fue posible calcular el grado de reciprocidad de cada individuo. Debido a que los índices planteados anteriormente permiten realizar comparaciones entre diferentes poblaciones (Richards y Koptur, 1993; Eckert y Barrett, 1994; Sánchez *et al.*, 2008), pero no entre plantas de una misma población, fue necesario crear un nuevo índice de reciprocidad.

Determinación del grado de zigomorfía en cada individuo

Para determinar el grado de zigomorfía se etiquetaron y fotografiaron cinco flores en cada uno de los 20 individuos seleccionados en la localidad al suroeste de la ciudad de Santa Clara y los 30 individuos en el Cerro de Pelo Malo. Para procesar las fotos se utilizó el programa TPS (Rohlf, 2006). Para facilitar la ubicación de los puntos en los lados derecho e izquierdo de la flor, se diferenciaron tres pétalos (pétalo

1, pétalo 2 y el pétalo 3 o pétalo diferenciado), y la estructura diferenciada por el cambio de coloración (Fig. 2).

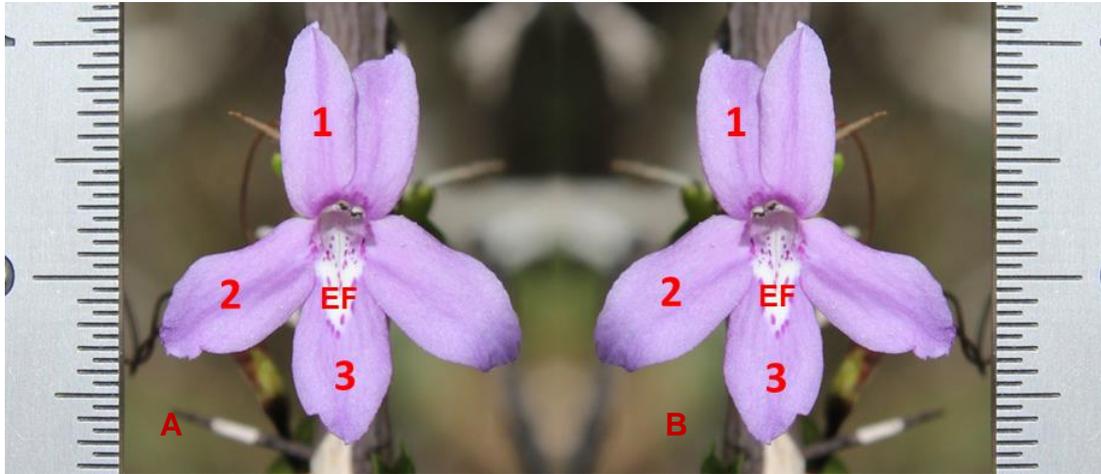


Figura 2. Diferenciación de los tres pétalos (destacados en números arábigos) y de la estructura especializada (EF), con el objetivo de facilitar la ubicación de los puntos morfológicos claves. A) lado izquierdo y B) lado derecho.

En cada foto, se ubicaron 17 puntos claves (*landmarks*) en los lados derecho e izquierdo de la flor. Los puntos 2, 5, 8 y 11 son puntos de tipo I, mientras que los restantes son puntos de tipo II (Fig. 3). Los puntos 2 y 8 se ubicaron en el extremo distal de los pétalos 1 y 2 respectivamente. El punto 5 se situó en el punto de unión entre los pétalos 1 y 2; y el punto 11 en la unión del pétalo 2 y el pétalo diferenciado.

Los puntos restantes se ubicaron en el contorno de los pétalos, teniendo en cuenta la longitud de los mismos, desde el extremo distal hasta la base. Los puntos 1 y 3 se ubicaron a un tercio de la longitud del pétalo 1; los puntos 7 y 9 a un tercio del pétalo 2; y el punto 13 a un tercio de la longitud del pétalo diferenciado. El punto 4 se situó a dos tercios de la longitud del pétalo 1; los puntos 6 y 10 a dos tercios del pétalo 2; y el 12 a dos tercios de la longitud del pétalo diferenciado. Los puntos 16 y 15 se ubicaron a uno y dos tercios, respectivamente, de la longitud de la estructura diferenciada. Además, se trazó una horizontal al extremo distal del pétalo 3, y se ubicó el punto 14 en el último punto de contacto entre estos. El punto 17 se ubicó siguiendo esta metodología en la estructura diferenciada.

Se realizó un análisis de superposición Procrustes para obtener los valores de las coordenadas Procrustes para todos los *landmarks* en los lados derecho e izquierdo. Se calculó el grado de asimetría fluctuante propuesto por Zelditch *et al.* (2012), que representa la distancia Procrustes convencional entre la distancia lado derecho-izquierdo de cada individuo y la media de la forma entre estos.

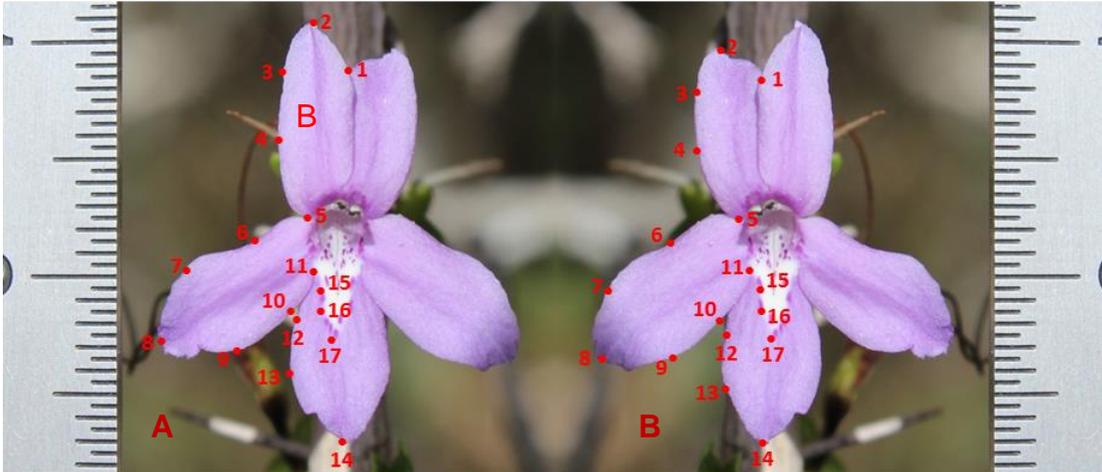


Figura 3. Ubicación de los puntos morfológicos claves (números arábigos) en *Oplonia nannophylla*. A) lado izquierdo y B) lado derecho.

Se obtuvo así un valor de asimetría fluctuante para cada flor, donde un mayor valor se corresponde con flores menos zigomorfas. Los valores obtenidos en cada una de las cinco flores fueron promediados para obtener un único valor por individuo.

Determinación del efecto de la zigomorfía y la heterostilia en el éxito reproductivo de O. nannophylla

Un mes después de realizadas las fotografías, se colectaron los frutos formados por cada una de las cinco flores etiquetadas en cada individuo. El éxito reproductivo se estimó mediante la razón número de semillas/número de óvulos. Estos valores fueron promediados para obtener un único valor por individuo. Para determinar el posible efecto de la zigomorfía y la heterostilia en el éxito reproductivo de *O. nannophylla* se realizaron correlaciones de Spearman entre los valores del índice de reciprocidad y el grado de zigomorfía de cada planta con respecto a su éxito reproductivo. Además, se realizaron correlaciones de Spearman entre los valores del índice de reciprocidad y el grado de zigomorfía de cada individuo.

3.3. Sistema reproductivo

3.3.1. Cociente polen-óvulo (P/O)

Con el objetivo de calcular el cociente polen-óvulo, se utilizaron los valores de producción de polen obtenidos para los 20 botones de cada morfo en la localidad al suroeste de la ciudad de Santa Clara en el 2016. Para obtener el número de óvulos se diseccionaron los ovarios de 15 botones de cada morfo bajo el microscopio estereoscópico y se contaron todos los óvulos.

El P/O de cada flor se calculó dividiendo el valor de la producción de polen por el número de óvulos, y finalmente se obtuvo un valor medio para cada morfo floral. El tipo de sistema reproductivo se estimó según los criterios de Cruden (1977).

3.3.2. Experimentos de polinización manual

En el año 2015 se seleccionaron 10 individuos en la localidad al suroeste de la ciudad de Santa Clara, a los cuales se le realizaron los siguientes cruzamientos: (1) xenogamia entre morfos diferentes (polinización con mezcla de polen de diferentes plantas del morfo opuesto); (2) xenogamia con plantas de igual morfo floral (polinización con mezcla de polen de plantas del mismo morfo); (3) autopolinización manual; y (4) autopolinización autónoma (sin polinización asistida).

Para los tratamientos (1), (2), (3) y (4) se realizó el embolsado de los botones, y en el caso de (1) y (2) fue necesario además emasculiar antes de la apertura de las anteras para evitar la contaminación de polen en el estigma (Dafni, 1992). Las polinizaciones se realizaron con polen viable y en el momento en que el estigma era receptivo. Además, todos los tratamientos se hicieron sobre la misma planta para minimizar los efectos de la variabilidad intraespecífica (Dafni, 1992). El sistema reproductivo se evaluó en función del éxito reproductivo, calculado mediante la razón número de semillas/número de óvulos contenidos en las flores tratadas.

El tipo de sistema reproductivo se determinó a través del cálculo del índice de autopolinización automática (IAS) y el índice de autoincompatibilidad (ISI) (Bacchetta *et al.*, 2008). El IAS se obtuvo dividiendo el porcentaje de fructificación de la auto-polinización autónoma por el porcentaje de fructificación xenógama. Mientras que el ISI se calculó dividiendo el porcentaje de fructificación de la auto-polinización por el porcentaje de fructificación xenógama.

3.4. Ecología de la polinización

En el año 2016, durante el pico de floración de la especie, se realizó el estudio de la ecología de la polinización. En cada una de las poblaciones se realizaron 10 horas de observaciones, abarcando entre las 0800 y 1600 horas del día. Para identificar los visitantes florales se realizaron colectas y fotografías. Se tomaron los siguientes datos: especie del visitante floral, número de flores visitadas, si el visitante hacía contacto o no con las estructuras reproductoras y morfo de la flor que visitó. Se calculó el índice de tasa de visita de Talavera *et al.* (1999).

El procesamiento estadístico se realizó con los programas PAST y STATGRAPHICS Centurion XV versión 15.2.14. En todos los casos, para determinar si existían diferencias significativas entre los dos morfos, se realizaron pruebas U de Mann Whitney debido a que los datos no seguían una distribución normal.

4. Resultados

4.1. Biología floral

Oplonia nannophylla es una especie distila. Este fenómeno se evidencia claramente en la figura 4, en la que se muestra la relación existente entre las alturas de pistilos y estambres en *O. nannophylla*. En ambas localidades es posible distinguir dos morfos florales, caracterizados por diferentes longitudes de pistilos y estambres (Fig. 5).

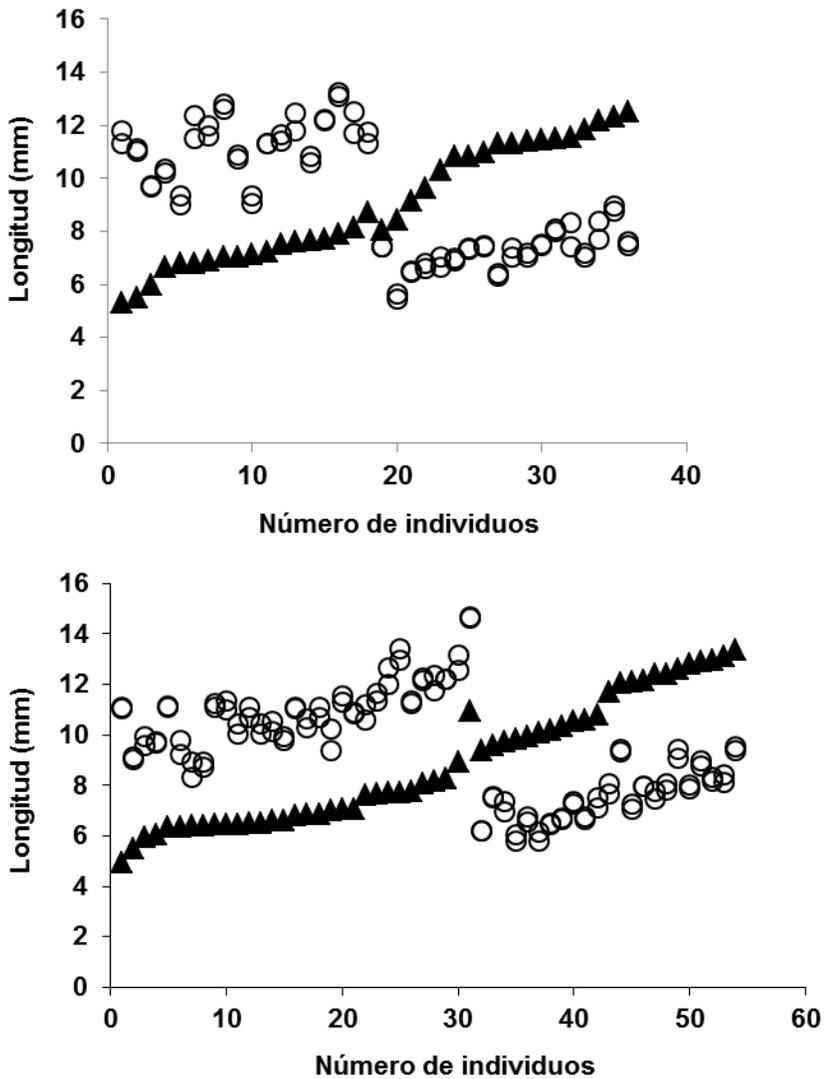


Figura 4. Relación entre las longitudes de pistilos y estambres de *O. nannophylla* en la localidad al suroeste de la ciudad de Santa Clara (arriba), y en el Cerro de Pelo Malo (abajo) (○ estambres, ▲ pistilos).

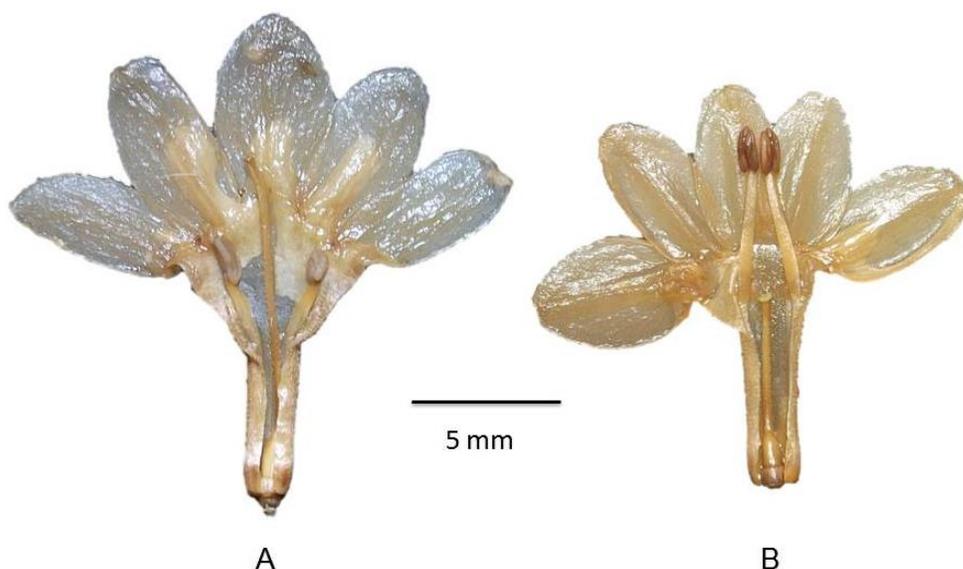


Figura 5. Corte longitudinal de dos flores de *O. nannophylla*. A) flor longistila (morfo L) y B) flor brevistila (morfo S).

En ambas localidades se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las longitudes de pistilos y estambres entre los dos morfos. En la tabla I se resumen los valores de longitudes de pistilos y estambres en ambas localidades.

Tabla I. Longitudes (mm) de pistilos y estambres de flores de ambos morfos de *O. nannophylla* (Acanthaceae) en la localidad al suroeste de la ciudad de Santa Clara, y en el Cerro de Pelo Malo. Valores dados en media aritmética (desviación estándar), (*) $P < 0,05$

	Suroeste de la ciudad de Santa Clara		Cerro de Pelo Malo	
	Pistilo	Estambres	Pistilo	Estambres
Morfo S	7,09 (0,87)	11,27 (1,13)	7,09 (1,20)	11,02 (1,41)
Morfo L	10,87 (1,28)	7,24 (0,74)	11,45 (1,3)	7,56 (1,06)
	U = 3*	U = 0,0*	U = 10*	U = 11*

En la localidad al suroeste de la ciudad de Santa Clara no se encontraron diferencias significativas entre los dos morfos florales en ninguna de las demás variables medidas. En el Cerro de Pelo Malo sólo se encontraron diferencias entre los morfos en el ancho del pétalo diferenciado (U = 190, P = 0,04) (tabla II).

Tabla II. Mediciones morfométricas (en mm) de flores de ambos morfos de *O. nannophylla* en la localidad al suroeste de la ciudad de Santa Clara, y en el Cerro de Pelo Malo. Valores dados en media aritmética (desviación estándar). Se resaltan en negrita las diferencias significativas para $\alpha = 0,05$.

Variables morfométricas	Suroeste de la ciudad de Santa Clara			Cerro de Pelo Malo		
	Morfo S	Morfo L	P	Morfo S	Morfo L	P
Diámetro de la corola	12,2 (2,6)	12,3 (2,3)	0,84	14,1 (1,8)	13,1 (2,3)	0,06
Apertura horizontal de la corola	2,2 (0,4)	2,2 (0,1)	0,92	2,2 (0,4)	2,0 (0,3)	0,29
Apertura vertical de la corola	2,3 (0,5)	2,3 (0,4)	0,7	2,3 (0,4)	2,2 (0,4)	0,97
Longitud del tubo floral	8,7 (0,9)	8,3 (1,2)	0,08	9,0 (0,8)	8,8 (1,0)	0,76
Largo del pétalo diferenciado	5,9 (0,9)	5,7 (0,7)	0,64	6,1 (1,1)	5,9 (1,1)	0,41
Ancho del pétalo diferenciado	3,7 (1,2)	3,4 (0,5)	0,64	3,7 (0,7)	3,4 (0,5)	0,04
Longitud de las anteras	1,6 (0,1)	1,6 (0,2)	0,48	1,5 (0,2)	1,5 (0,2)	0,91
Ancho de las anteras	0,7 (0,1)	0,7 (0,1)	0,16	0,6 (0,1)	0,6 (0,1)	0,86

4.1.1. Efectos de la heterostilia y la zigomorfía en el éxito reproductivo de *Oplonia nannophylla*

Para obtener un valor del grado de reciprocidad de cada individuo, con respecto al resto de los individuos del morfo opuesto en la población, se planteó un nuevo índice:

$$R_i = \bar{X}_1 |\bar{P}_i - \bar{E}_j| + \bar{X}_2 |\bar{E}_i - \bar{P}_j|$$

Donde:

R_i representa el grado de reciprocidad de las alturas de pistilo y estambres del individuo i con respecto a los individuos del morfo opuesto de la población,

\bar{P}_i representa el promedio de las longitudes del pistilo en el i -ésimo individuo de un morfo dado,

\bar{E}_i representa el promedio de las longitudes de los estambres en el i -ésimo individuo de un morfo dado,

\bar{P}_j representa el promedio de las longitudes del pistilo en cada uno de los j -ésimos individuos del morfo opuesto al del i -ésimo individuo,

\bar{E}_j representa el promedio de las longitudes de los estambres en cada uno de los j -ésimos individuos del morfo opuesto al del i -ésimo individuo,

Por lo tanto,

$\bar{X}_1 |\bar{P}_i - \bar{E}_j|$ representa la diferencia entre el promedio de las longitudes del pistilo en el i -ésimo individuo, y el promedio de las longitudes de los estambres en cada uno de los individuos del morfo opuesto.

Mientras que $\bar{X}_2 |\bar{E}_i - \bar{P}_j|$ representa la diferencia entre el promedio de las longitudes de los estambres

en el *i*-ésimo individuo, y el promedio de las longitudes del pistilo en cada uno de los individuos del morfo opuesto.

Al aplicar este índice los valores teóricos podrían variar desde cero hasta infinito ($0 \rightarrow \infty$), donde los mayores valores se corresponden con una mayor reciprocidad. Cero representa la mínima reciprocidad, pero este valor sólo podría obtenerse en caso de que no existan diferencias entre las longitudes de pistilos y estambres (*i. e.* en el caso de una población homostila).

En ninguna de las localidades se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los valores de reciprocidad, éxito reproductivo y grado de asimetría entre los individuos de ambos morfos (tabla III). Por último, tampoco existe una relación estadísticamente significativa entre el grado de reciprocidad y la zigomorfía en *Oplonia nannophylla* ($R = 0,29$, $P = 0,1$ y $R = 0,03$, $P = 0,8$ para las localidades I y II, respectivamente).

Tabla III. Valores de reciprocidad, éxito reproductivo y asimetría de individuos de ambos morfos de *O. nannophylla* en una localidad al suroeste de la ciudad de Santa Clara (localidad I) y en el Cerro de Pelo Malo (localidad II). Valores dados en media aritmética (desviación estándar).

	Reciprocidad		Éxito reproductivo		Asimetría	
	Localidad I	Localidad II	Localidad I	Localidad II	Localidad I	Localidad II
Morfo S	1,6 (0,6)	1,4 (0,7)	0,2 (0,2)	0,3 (0,2)	0,1 (0,02)	0,12 (0,03)
Morfo L	1,5 (1,1)	1,4 (1,2)	0,2 (0,2)	0,4 (0,2)	0,11 (0,02)	0,12 (0,03)
	$P = 0,25$	$P = 0,63$	$P = 0,64$	$P = 0,46$	$P = 0,49$	$P = 0,9$

4.1.2. Producción y tamaño del polen

La producción de granos de polen supera los 3000 granos por flor y el tamaño no supera los 0,5 μm . No se encontraron diferencias significativas ni en el número ni en el tamaño de los granos de polen al comparar los morfos florales (tabla IV).

Tabla IV. Número y tamaño de los granos de polen en flores de cada morfo de *O. nannophylla*. Valores dados en media aritmética (desviación estándar).

	Número de granos de polen	Tamaño de los granos de polen (μm)
Morfo S	3324 (830,18)	0,45 (0,027)
Morfo L	3635 (852,60)	0,44 (0,020)
	$P = 0,13$	$P = 0,32$

4.1.3. Producción de néctar

Se encontró que la producción de néctar es muy baja en ambos morfos florales (tabla V). El volumen y la concentración del néctar producido no difieren significativamente entre los morfos. Además, una vez extraído el néctar las flores no lo resintetizan. Al analizar la producción de néctar entre los distintos horarios del día, no se encontraron diferencias en cuanto al volumen ($U = 130$, $P = 0,87$), pero sí en la concentración ($U = 73,5$, $P = 0,02$) (Fig. 6).

Tabla V. Volumen y concentración de néctar en flores de cada morfo de *O. nannophylla* en la localidad al suroeste de la ciudad de Santa Clara. Valores dados en media aritmética (desviación estándar).

	Volumen de néctar (μl)	Concentración de néctar (%)
Morfo S	0,64 (0,5)	26,2 (20,4)
Morfo L	0,56 (0,89)	17,1 (20,6)
	$P = 0,08$	$P = 0,48$

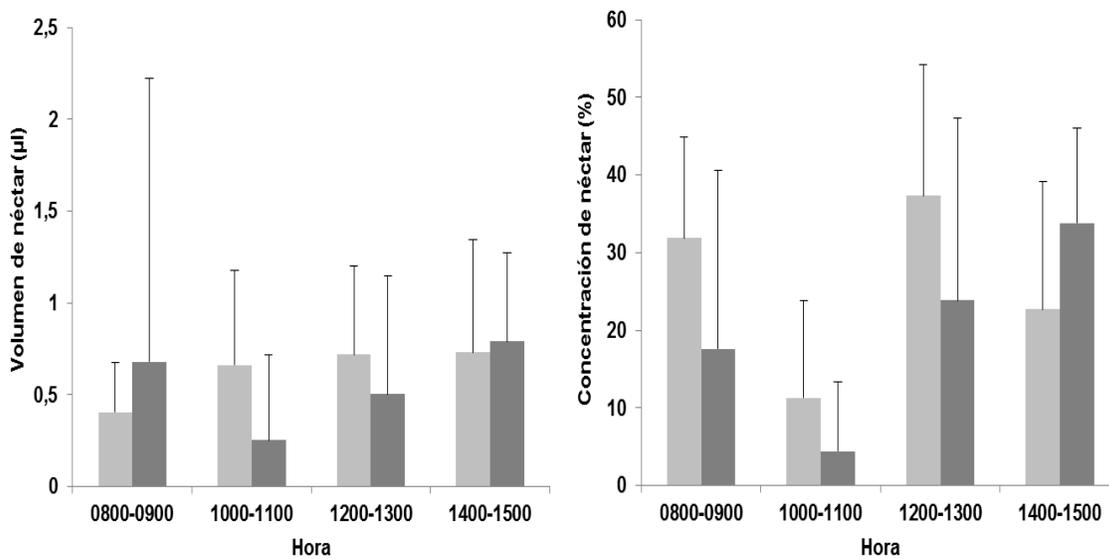


Figura 6. Producción de néctar en individuos de *O. nannophylla* en la localidad al suroeste de la ciudad de Santa Clara: A) volumen (μl) y B) concentración (%) (● morfo S, ● morfo L).

4.2. Sistema reproductivo

El cociente polen-óvulo (P/O) fue de $831,1 \pm 207,5$ para el morfo S y de $908,8 \pm 213,1$ para el morfo L. En la figura 7 se muestra el resultado de las 40 flores tratadas en *O. nannophylla*. De estas, 23 produjeron frutos: siete a partir del cruzamiento intermorfo, ocho como resultado del cruzamiento intramorfo y ocho como consecuencia de la autopolinización manual. El índice de auto-polinización

automática (IAS) resultó ser cero. Mientras que el índice de auto-incompatibilidad (ISI) fue de 0,875 para la xenogamia entre morfos diferentes, y de uno para la xenogamia con plantas de igual morfo floral.

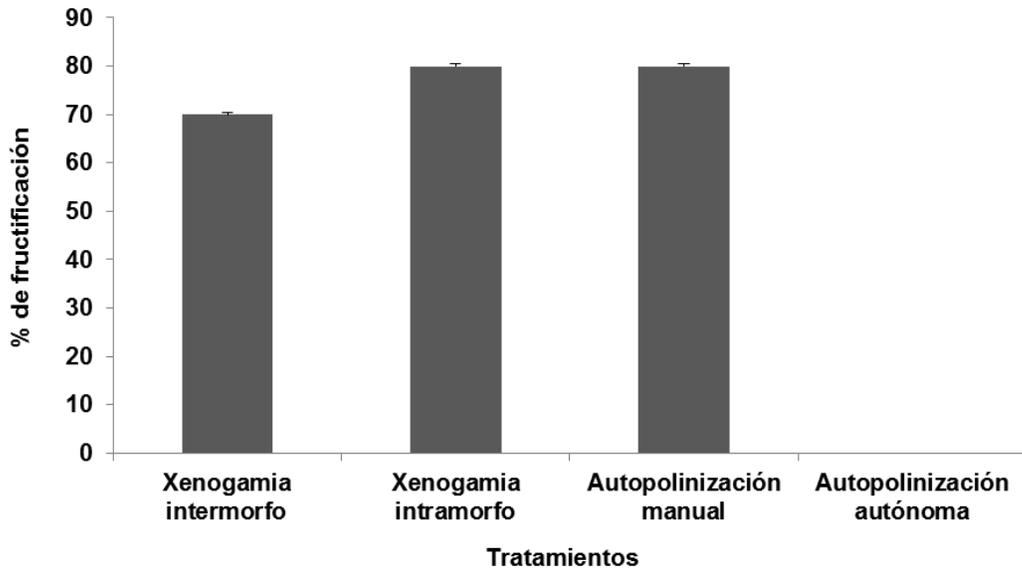


Figura 7. Porcentaje de fructificación de los experimentos de polinización manual en *O. nannophylla*, en la localidad al suroeste de la ciudad de Santa Clara, Villa Clara.

4.3. Ecología de la polinización

En la figura 8 se representan las tasas de visitas de polinizadores de *Oplonia nannophylla* en ambas localidades. El pico de visita fue de las 1000 h a las 1300 h del día.

Entre los visitantes observados se encuentran *Lassioglossum* sp. (Halictidae, Hymenoptera), *Centris* sp., *Chlorostilbon ricordii*, *Cybaeus tripunctus* (Hesperiidae, Lepidoptera) y *Tabanus* sp. (Fig. 9). La tasa de visita de los visitantes florales varió entre los diferentes horarios de observación (tabla VI). Los individuos de *Chlorostilbon ricordii* y *Lassioglossum* sp. sólo visitaron las flores de *O. nannophylla* durante la mañana. Los visitantes de *Cybaeus tripunctus* sólo realizaron visitas entre las 1200 h y las 1300 h del día, y los de *Tabanus* sp. visitaron tanto en la mañana como en la tarde. Sin embargo, las flores son visitadas durante casi todo el día por individuos de *Centris* sp. (desde las 0900 h a las 1400 h del día).

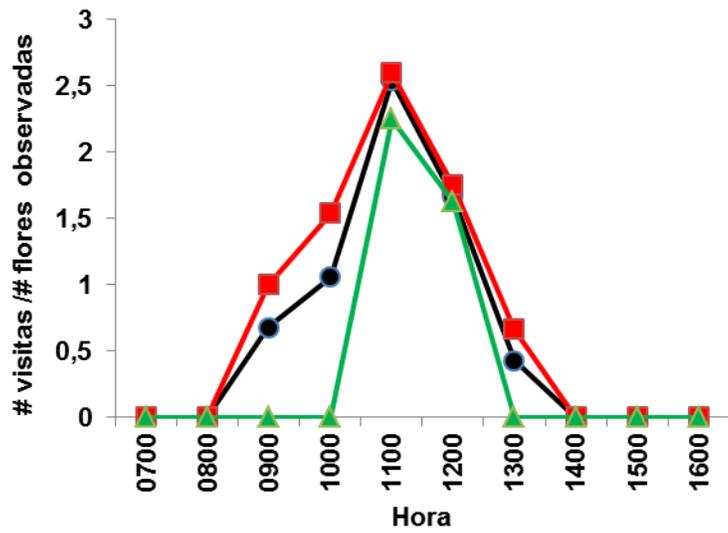
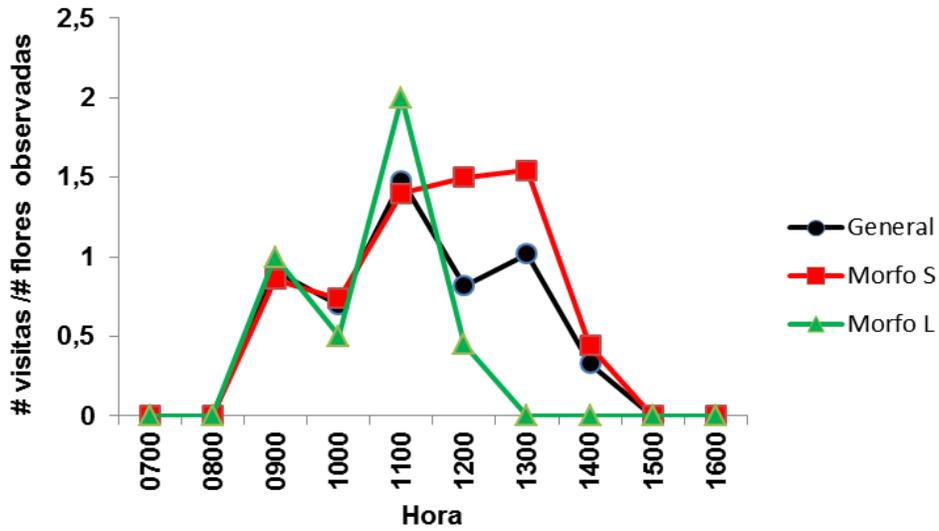


Figura 8. Tasas de visitas de los visitantes florales de *O. nannophylla* en la localidad al suroeste de la ciudad de Santa Clara (arriba), y en el Cerro de Pelo Malo (abajo).



Figura 9. Algunas especies de visitantes florales observadas en *O. nannophylla*: A) *Tabanus* sp. y B) *Lassioglossum* sp.

Tabla VI. Tasas de visita por especie a flores de *O. nannophylla*, en los diferentes horarios.

Especie	Hora										General	
	0700	0800	0900	1000	1100	1200	1300	1400	1500	1600		
<i>Chlorostilbon ricordii</i>	-	-	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-	0,008
<i>Lassioglossum</i> sp.	-	-	0,41	0,15	0,2	-	-	-	-	-	-	0,025
<i>Cymaenes tripunctus</i>	-	-	-	-	-	0,17	0,03	-	-	-	-	0,008
<i>Tabanus</i> sp.	-	-	-	0,1	0,08	-	0,03	0,03	-	-	-	0,006
<i>Centris</i> sp.	-	-	0,37	0,08	0,42	0,2	0,3	0,31	-	-	-	0,029

5. Discusión

Biología floral

La heterostilia en *Oplonia nannophylla* ha sido descrita con anterioridad para este género por Stearn (1971), así como para otros géneros de la familia Acanthaceae (Daniel, 1995). Sin embargo, ninguno de estos autores analiza la existencia o no de polimorfismos en caracteres florales. En el caso de la especie de estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la mayoría de las variables morfométricas entre los dos morfos, excepto en el ancho del pétalo diferenciado y en las longitudes de pistilos y estambres. Esto sugiere que en *Oplonia nannophylla* no existe polimorfismo en los caracteres secundarios que tipifican el síndrome heterostilo. Resultados similares han sido reportados por Ramírez y Navarro (2010), y por Faife-Cabrera *et al.* (2014) en especies del género *Melochia* en Venezuela y Cuba, respectivamente. Sin embargo, ninguno de estos ofrece una posible explicación sobre la ausencia del mismo.

No obstante, Sánchez-Pérez (2013) plantea que la falta de diferencias entre los morfos florales pudiera estar compensada con una mayor producción de flores por parte de uno de ellos. En el caso de *O. nannophylla*, las observaciones en el campo sugieren que había mayor cantidad de flores del morfo L. Sin embargo, para comprobar esta idea sería necesario estudiar la presentación floral de la especie.

El pétalo diferenciado más ancho en los individuos del morfo S, sólo en el Cerro de Pelo Malo, podría ser un mecanismo para atraer más polinizadores. De esta forma se contrarrestaría el flujo asimétrico de polen que generalmente ocurre en poblaciones de especies distilas. Según Proctor *et al.* (1996), este brinda una superficie firme a la que los visitantes pueden adherirse en el momento de la visita floral. La existencia de este pétalo inferior de cierta rigidez es una característica que mejora la interacción polinizador-planta en las flores zigomorfas, especialmente en aquellas que presentan melitofilia. Sin embargo, es necesario realizar un estudio de eficiencia de los polinizadores en esta especie para determinar si existe o no un flujo asimétrico de polen entre los dos morfos. En el caso de la otra localidad estudiada, la ausencia de diferencias significativas en el ancho del pétalo diferenciado pudiera deberse al pequeño tamaño de la muestra.

La existencia de este pétalo diferenciado en *O. nannophylla* pudiera representar una ventaja con respecto a otras especies heterostilas actinomorfas que habitan en los cuabales. El costo energético para producir un pétalo diferenciado más ancho es menor que producir flores completas de mayores dimensiones en uno de los morfos florales. Por ejemplo, en *Guettarda clarensis*, los individuos del morfo S necesitan producir flores más grandes para atraer más polinizadores, y de esta forma, compensar el flujo asimétrico de polen (Martínez-Pérez, 2013). Sin embargo, en *O. nannophylla*, para garantizar la mayor atracción por parte de los individuos del morfo S, sólo sería necesario producir un pétalo diferenciado más ancho.

El hecho de que no existan diferencias estadísticamente significativas en la producción y el tamaño del polen entre los morfos, corrobora la idea de que en *Oplonia nannophylla* no existe polimorfismo en los caracteres secundarios de la heterostilia. En el caso del género *Oplonia*, los estudios sobre la producción y el tamaño del polen son muy escasos. No obstante, según Stearn (1971) los granos de polen de *Oplonia microphylla* y *Oplonia armata* var. *pallidior* tienen entre 30 μm y 50 μm de diámetro. Los valores encontrados en *O. nannophylla* se encuentran dentro de este rango.

Con posterioridad, Ornduff (1979) precisa que en *O. microphylla* el diámetro de los granos de polen fue de 39,8 μm y de 45,8 μm para los morfos L y S, respectivamente, lo que resulta similar a lo encontrado en esta investigación. En el caso de *O. armata* var. *pallidior* las flores del morfo L producen granos de polen de mayor diámetro que las del morfo S (59,8 μm y 46,2 μm , respectivamente). Sin embargo, este autor no tuvo en cuenta la producción de polen y tampoco realizó pruebas estadísticas para determinar si existían diferencias significativas entre los morfos. Por tanto, no es posible saber si en estas especies existe polimorfismo en los caracteres secundarios. Además, esto impide realizar comparaciones efectivas entre dichas especies y *O. nannophylla*.

Se ha planteado que el polimorfismo en la producción y el tamaño del polen pudiera funcionar como un mecanismo que promueve la captura de polen intermórfico, y que participa en los mecanismos de incompatibilidad de la heterostilia (Dulberger, 1992; Lloyd y Webb, 1992). Por tanto, la ausencia de este polimorfismo pudiera explicar la carencia del sistema de incompatibilidad heteromórfico en *O. nannophylla*. Estudios posteriores sobre la morfología del polen y de las papilas estigmáticas podrían ayudar a esclarecer esta idea.

Por otra parte, las bajas producciones de néctar encontradas pudieran explicarse por la escasez de agua, unida a las altas temperaturas presentes en los cuabales. Además, estos factores también pudieran ser la causa de que la especie no resintetice néctar, lo que resultaría fisiológicamente muy costoso en este ambiente, tal y como plantea Petanidou (2007). Resultados similares fueron encontrados en *Guettarda clarensis* por Martínez-Pérez (2013). Otro factor que pudiera explicar las bajas producciones de néctar pudiera ser el pequeño tamaño de las flores. Existe una fuerte correlación entre el volumen de néctar y la biomasa floral, pues la producción de néctar aumenta con el tamaño del nectario (Opler, 1983, Szabo, 1984, Galetto y Bernardello, 2004).

La producción de néctar constante a lo largo del día en *O. nannophylla* es un elemento que indica ausencia de especialización hacia un grupo de polinizadores específicos. Esto coincide con los resultados de las observaciones de campo, que indican que esta especie presenta un sistema de polinización de tipo generalista. Por último, la mayor concentración del néctar en los horarios de la tarde pudiera deberse a que las altas temperaturas ocasionan una mayor evaporación del agua.

Efectos de la heterostilia y la zigomorfía en el éxito reproductivo de *Oplonia nannophylla*

La ausencia de una relación estadísticamente significativa entre el grado de reciprocidad, la zigomorfía y el éxito reproductivo, pudiera deberse a las bajas tasas de visita de los visitantes florales. La especie estudiada, aunque es autocompatible, es incapaz de autopolinizarse de forma autónoma y por tanto el éxito reproductivo depende estrictamente de la actividad de los polinizadores. Es por ello que, de presentarse tasas de visita más elevadas podría registrarse un efecto directo de la heterostilia y/o la zigomorfía, como rasgos florales que determinen el éxito reproductivo de la especie.

Tanto la heterostilia como la zigomorfía favorecen la polinización cruzada (Arroyo, 2002; Sargent, 2004), por lo cual estas pueden favorecer la xenogamia, como mecanismo clave que disminuya los efectos negativos de la depresión por endogamia. Esto pudiera ser relevante en *O. nannophylla*, especie autocompatible y capaz de reproducirse de forma asexual. Por ende, ambos mecanismos podrían aumentar las posibilidades de que ocurra polinización cruzada incrementando la variabilidad genética. De esta forma, aumentan las probabilidades de supervivencia de los individuos en las condiciones estresantes en que habitan, y la especie estará mejor preparada para adaptarse a un nuevo cambio ambiental.

La zigomorfía es una característica presente en todas las especies de la familia Acanthaceae y del orden Lamiales. Por tanto, es posible inferir que la zigomorfía es una característica ancestral que puede garantizar la fecundación cruzada en este grupo. Sin embargo, sólo los géneros *Chileranthemum*, *Odontonema*, *Pseuderanthemum* y *Oplonia* son heterostilos (Daniel, 1995). Según McDade *et al.* (2000), estos géneros pertenecen a la tribu Justiciaeae, linaje *Pseuderanthemum*, y son monofiléticos. En estos casos la heterostilia pudo haberse originado debido a que la zigomorfía no fue un mecanismo lo suficiente eficiente como para garantizar la polinización cruzada. Esto podría explicar la existencia de estos dos mecanismos para favorecer un mismo propósito en *O. nannophylla*.

En el caso de la heterostilia, su origen podría explicarse atendiendo al modelo de Lloyd y Webb (1992). En la condición ancestral (hercogamia de aproximación) pudo haber ocurrido una mutación simple para la longitud del estilo favoreciendo el establecimiento del dimorfismo estilar. Posteriormente, una segunda mutación para la altura de las anteras, evitaría la gran pérdida de polen debido a la escasa reciprocidad entre los morfos. El sistema de incompatibilidad heteromórfico y los caracteres secundarios serían procesos independientes de las modificaciones morfológicas anteriores y pueden expresarse, o no, *a posteriori* (Lloyd y Webb, 1992). Esto explica la existencia de hercogamia recíproca, así como la ausencia del sistema de incompatibilidad heteromórfico y caracteres ancilares en *O. nannophylla*.

Es necesario aclarar que el cálculo del grado de reciprocidad a nivel de individuos es un aporte novedoso de esta investigación y que debe probarse en otras especies. Esto contribuiría a evaluar la efectividad del mismo en el análisis de la reciprocidad intrapoblacional. Por el momento, no resulta posible calificar en alta o baja la reciprocidad de los individuos. Estudios posteriores que apliquen este

índice en otras poblaciones de *O. nannophylla*, y otras especies de este género, podrían ayudar a esclarecer esta problemática. Por último, este índice comprende la reciprocidad pistilo-estambres, pero no tiene en cuenta la dispersión de los datos, lo que según Sánchez *et al.* (2008), constituye una limitante que dificulta establecer comparaciones entre especies o poblaciones. Aspecto que debe tenerse en cuenta para la mejora del índice utilizado.

Así mismo, el cálculo del grado de la zigomorfía pudo haber estado afectado por pequeñas diferencias en el ángulo al tomar las fotografías. Además, es necesario señalar el posible error humano en la colocación de los puntos claves de tipo II. Estos constituyen factores que se deben tener en cuenta, pues pueden sesgar los estudios que involucren morfometría geométrica. Aspectos que pueden ser relevantes también para evaluar el efecto de la zigomorfía en el éxito reproductivo de las plantas.

Sistema reproductivo

El cociente polen-óvulo (P/O) fue de $831,1 \pm 207,5$ para el morfo S y de $908,8 \pm 213,1$ para el morfo L, lo que según Cruden (1977), indica xenogamia facultativa. Los valores del índice de auto-incompatibilidad (ISI) y del índice de auto-polinización automática (IAS), indican auto-compatibilidad e incapacidad de auto-polinización autónoma, respectivamente. Por tanto, *Oplonia nannophylla* carece del sistema de incompatibilidad heteromórfico que ha menudo acompaña a las especies distilas. Resultados similares han sido planteados por Ornduff (1979) en otras especies heterostilas de este género, y por Brys *et al.* (2008a), en especies del género *Pulmonaria* (Boraginaceae).

La carencia del sistema de incompatibilidad heteromórfico pudiera explicarse porque esta especie presenta polinización de tipo generalista. Según Brys *et al.* (2004), la ausencia de polinizadores especialistas, que garanticen el flujo de polen equilibrado entre los morfos, puede ser una presión selectiva hacia la ruptura de los sistemas de autoincompatibilidad. Además, la carencia de polimorfismo en la producción y tamaño del polen pudiera explicar la ausencia de este sistema, como se explicó anteriormente.

La presencia de autocompatibilidad en *O. nannophylla* pudiera representar una ventaja adaptativa que permite que ocurra reproducción sexual, ya que es posible la fertilización inter e intramorfo. Esto podría ser relevante en especies heterostilas con baja sincronía de los morfos florales. Observaciones en el campo sugieren que no existe una alta sincronía entre los morfos, pues los individuos del morfo L comienzan la floración antes que los del morfo S. Sin embargo, para comprobar lo anterior sería necesario estudiar la fenología reproductiva de la especie. Aunque el sistema de incompatibilidad heteromórfico garantiza el entrecruzamiento este restringe las oportunidades de apareamiento (Barrett, 2002). Es por ello que la ruptura del sistema de incompatibilidad heteromórfico permite la reproducción sexual si sólo un morfo está disponible (Faria *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2013). Además, también permite

garantizar un mayor porcentaje de fructificación, dado las bajas frecuencias de visitas florales que presenta esta especie.

Ecología de la polinización

Los visitantes florales de *Oplonia nannophylla* pertenecen a más de un grupo taxonómico (himenópteros, dípteros, lepidópteros y aves), por lo que presenta polinización de tipo generalista, tal y como plantean Ramírez y Navarro (2010). Esto coincide con lo planteado por Ganders (1979), que señala que en las flores heterostilas la polinización es llevada a cabo por insectos y en menor medida por colibríes.

Las bajas tasas de visita pudieran explicarse porque la época de floración de *O. nannophylla* coincide con la floración de otras especies del cuabal. El hecho de que la presentación floral y la producción de néctar sean mayores en algunas de estas especies (Martínez-Pérez, 2017), podría provocar que exista una gran competencia por la atracción de los polinizadores, lo que explica este fenómeno. Además, según Cruden (1977), en los hábitats perturbados los ensambles de polinizadores son impredecibles. Por tanto, los efectos antrópicos en las localidades de estudio pudieran explicar las bajas tasas de visita. Por otra parte, los cambios en la concentración del néctar durante el día pudieran explicar los distintos horarios de visita de los diferentes visitantes florales. Esto coincide con lo planteado por Corbet *et al.* (1979) para los sistemas de polinización de tipo generalista. Por ejemplo, para satisfacer sus requerimientos de agua, los colibríes prefieren el néctar diluído, especialmente en ambientes de altas temperaturas (Baker, 1975; Calder, 1979). Esto explica por qué *Chlorostilbon ricordii* sólo visitó *O. nannophylla* en el horario de la mañana, durante el cual el néctar estaba menos concentrado. Además, May (1985) señala que para los lepidópteros la concentración óptima del néctar es entre el 30 y el 40%. En las flores de *O. nannophylla*, el néctar presentaba estas concentraciones a partir de las 1200 h del día, lo que se corresponde con los horarios de visita de *Cybaeus tripunctus*.

6. Conclusiones

1. En *Oplonia nannophylla* no existe polimorfismo en los caracteres secundarios que tipifican la heterostilia. Sin embargo, los individuos del morfo S podrían estar formando flores con el pétalo diferenciado más ancho, para contrarrestar el flujo asimétrico de polen al atraer más polinizadores.
2. *Oplonia nannophylla* es autocompatible y carece del sistema de incompatibilidad heteromórfico. Esto pudiera representar una ventaja adaptativa debido a las bajas tasas de visita de los polinizadores, la baja sincronía entre los morfos y las condiciones de estrés en que habita la misma.
3. La especie presenta polinización de tipo generalista. La baja producción de néctar y la pequeña presentación floral en comparación con otras especies del cuabal, así como los efectos antrópicos en las localidades estudiadas, pudieran ser la causa de las bajas tasas de visita de los polinizadores.
4. La influencia no significativa de la zigomorfía y la heterostilia en el éxito reproductivo de la especie, es resultado de las bajas tasas de visita de los polinizadores.

7. Recomendaciones

- Realizar un estudio de eficiencia de los polinizadores en *Oplonia nannophylla*.
- Aplicar el índice propuesto en otras poblaciones de *O. nannophylla*, así como en otras especies de este género.
- Estudiar la morfología del polen y de las papilas estigmáticas.
- Estudiar la fenología reproductiva de la especie.

Referencias bibliográficas

- Adams, D. C., Rohlf, F. J. y Slice, D. E. (2004) Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*. 71: 5-16.
- Armbruster, W. S., Edwards, M. E. y Debevec, E. M. (1994) Floral character displacement generates assemblage structure of Western *Australian triggerplants* (*Stylidium*). *Ecology*. 75: 315–329.
- Armbruster, W. S., Pérez-Barrales, R., Arroyo, J., Edwards, M. E. y Vargas, P. (2006) Three-dimensional reciprocity of floral morphs in wild flax (*Linum suffruticosum*): a new twist on heterostyly. *New Phytologist*. 1-10.
- Arroyo, J. (2002) *Narcissus* (Amaryllidaceae), la evolución de los polimorfismos florales y la conservación más allá de las "listas rojas". *Revista Chilena de Historia Natural*. 75: 39-55.
- Bacchetta, G., Bueno-Sánchez, A., Fenu, G., Jiménez-Alfaro, B., Mattana, E., Piotto, B. y Virevaire, M. (2008) *Conservación ex situ de plantas silvestres*. Principado de Asturias / La Caixa, España, pp.
- Baker, H. G. (1955) Self-compatibility and establishment after "long-distance" dispersal. *Evolution* 9: 347-348.
- Baker, H. G. (1975) Sugar concentrations in nectars from hummingbird flowers. *Biotropica*. 7: 37–41.
- Barrett, S. C. H. y Eckert, C. G. (1990) Variation and evolution of mating systems in seed plants. En: Kawano, S. (ed.). *Biological approaches and evolutionary trends in plants*. pp. 229-254. London: Academic Press.
- Barrett, S. C. H. y Cruzan, B. (1994) Incompatibility in heterostylous plants. En: Williams, E. G. et al. (eds.). *Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants*. pp. 189-219. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Barrett, S. C. H. (2002) The Evolution of Plant Sexual Diversity. *Nature Reviews Genetics*. 3: 274-284.
- Bookstein, F. L. (1991) *Morphometric Tools for Landmark Data. Geometry and Biology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Brys, R., Jacquemyn, H., Endels, P., Rossum, F. V., Hermy, M., Triest, L., Bruyn, L. D. y Blust, G. D. E. (2004) Reduced reproductive success in small populations of the self-incompatible *Primula vulgaris*. *Journal of Ecology*. 92: 5-14.

- Brys, R., Jacquemyn, H. y Beeckman, T. (2008a) Morph-ratio variation, population size and female reproductive success in distylous *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *Journal of Evolutionary Biology*. 21: 1281–1289.
- Brys, R., Jacquemyn, H., Hermy, M. y Beeckman, T. (2008b) Pollen deposition rates and the functioning of distyly in the perennial *Pulmonaria officinalis* (Boraginaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 273: 1-12.
- Calder, W. A. (1979) On the temperature-dependency of optimal nectar concentrations for birds. *Journal of Theoretical Biology*. 78: 185–196.
- Castro, S., Ferrero, V., Costa, J., Sousa, A., Castro, M., Navarro, L. y Loureiro, J. (2013) Reproductive strategy of the invasive *Oxalis pes-caprae*: distribution patterns of floral morphs, ploidy levels and sexual reproduction. *Biological Invasions*. 15: 1863–1875.
- Corbet, S. A., Unwin, D. M. y Prys-Jones, O. E. (1979) Humidity, nectar and insect visits to flowers, with special reference to *Crataegus*, *Tilia* and *Echium*. *Ecological Entomology*. 4: 9-22.
- Cruden, R. W. (1977) Pollen-ovule ratios: conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.
- Díaz, R. A. y Alfonso, O. A. (1975) Especies botánicas endémicas en el Cerro de Pelo Malo. Santa Clara. Las Villas. *Centro Agrícola*. 1-11.
- Dafni, A. (1992) *Pollination Ecology: A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press.
- Daniel, T. F. (1995) Revision of *Odontonema* (Acanthaceae) in Mexico. *Contributions from the University of Michigan Herbarium*. 20: 147-171.
- Darwin, C. R. (1877) *The Different Forms of Flowers and Plants of the Same Species*. London: John Murray.
- Dryden, I. L. y Mardia, K. V. (1998) *Statistical shape analysis*. Wiley, Nueva York.
- Dulberger, R. (1992) Floral Polymorphisms and Their Functional Significance in the Heterostylous Syndrome. En: Barrett, S. C. H. (ed.). *Evolution and Function of Heterostyly*. pp. 41-84. Berlin: Springer-Verlag.
- Eckert, C. G. y Barrett, S. C. H. (1994) Tristyly, self-compatibility and floral variation in *Decodon verticillatus* (Lithraceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 53: 1-30.
- Elle, E. y Carney, R. (2003) Reproductive assurance varies with flower size in *Collinsia parviflora* Scrophulariaceae. *American Journal of Botany*. 90: 888-896.
- Faegri, K. y van der Pijl, L. (1966) *The principles of pollination ecology*. Headington Hill Hall, Oxford, Gran Bretaña: Pergamon Press Ltd.
- Faegri, K. y van der Pijl, L. (1979) *The Principles of Pollination Ecology*. Oxford: Pergamon.

- Faife-Cabrera, M., Ferrero, V. y Navarro, L. (2014) Unravelling the stylar polymorphism in *Melochia* (Malvaceae): reciprocity and ancillary characters. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 176: 147-158.
- Faria, R. R., Ferrero, V., Navarro, L. y Araújo, A. C. (2012) Flexible mating system in distylous populations of *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae) in Brazilian Cerrado. *Plant Systematics and Evolution*. 298: 619–627.
- Ferrero, V. (2009) La ecología y evolución del polimorfismo floral en *Lithodora* (Boraginaceae). *Ecosistemas*. 18: 30-34.
- Font-Quer, P. (1953) Diccionario de Botánica. Barcelona: Editorial Labor, S. A., pp. 944.
- Gómez, J. M. y Perfectti, F. (2010) Evolution of complex traits: the case of *Erysimum* corolla shape. *International Journal of Plant Sciences*. 171: 987-998.
- Gómez, J. M., Torices, R., Lorite, J., Klingenberg, C. P. y Perfectti, F. (2016) The role of pollinators in the evolution of corolla shape variation, disparity and integration in a highly diversified plant family with a conserved floral bauplan. *Annals of Botany*. 117: 889-904.
- Galen, C. (2000) High and dry: drought stress, sex-allocation trade-offs, and selection on flower size in the alpine wildflower *Polemonium viscosum*. *American Naturalist*. 156: 72-83.
- Galetto, L. y Bernardello, G. (2004) Floral nectaries, nectar production dynamics and chemical composition in six *Ipomoea* species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. *Annals of Botany*. 94: 269–280.
- Ganders, F. R. (1979) The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany*. 17: 607-635.
- Gardner, A. G., Gerald, J. N. F., Menz, J., Shepherd, K. A., Howarth, D. G. y Jabaily, R. S. (2016) Characterizing floral symmetry in the Core Goodeniaceae with geometric morphometrics. *PLoS One*. 11: e0154736.
- Glover, B. (2007) *Understanding Flower & Flowering*. Oxford: Oxford University Press, 140 pp.
- González-Torres, L. R., Palmarola, A., González-Oliva, L., Bécquer, E. R., Testé, E. y Barrios, D. (2016) Lista roja de la flora de Cuba. *Bissea*. 10: 1-352.
- Grant, V. (1989) *Especiación vegetal*. México DF, México: Limusa ed.
- Harder, L. D. y Barrett, S. C. H. (1996) Ecology of geitonogamous pollination. En: Lloyd, D. G. y Barrett, S. C. H. (eds.). *Floral Biology*. pp. 140–190. New York: Chapman & Hall.
- Harder, L. D. y Johnson, S. (2009) Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. *New Phytol*. 183: 530–545.
- Harper, K. T. (1979) Some reproductive and life history characteristics of rare plants and implications of management. *Great Basin Naturalist Mem*. 3: 129-137.
- Heinrich, B. (1979) *Bumblebee Economics*. Cambridge: Harvard Univ. Press.

- Jürgens, A., Witt, T. y Gottsberger, G. (2002) Pollen grains numbers, ovule numbers and pollen-ovule ratios in Caryophylloideae: correlation with breeding system, pollination, life form, style number and sexual system. *Sexual Plant Reproduction*. 14: 279-289.
- Jaimes, I. y Ramírez, N. (1999) Breeding systems in a secondary deciduous forest in Venezuela: The importance of life form, habitat, and pollination specificity. *Plant Systematics and Evolution*. 215: 23-36.
- Klingenberg, C. P., Duttke, S., Whelan, S. y Kim, M. (2012) Developmental plasticity, morphological variation and evolvability: A multilevel analysis of morphometric integration in the shape of compound leaves. *Journal of Evolutionary Biology*. 25: 115-129.
- Lau, P. y Bosque, C. (2003) Pollen flow in the distylous *Palicourea fendleri* (Rubiaceae) an experimental test of the Disassortative Pollen Flow Hypothesis. *Oecologia*. 135: 593-600.
- Laverty, T. M. (1980) The flower-visiting behaviour of bumble bees: floral complexity and learning. *Canadian Journal of Zoology*. 58: 1324–1335.
- León, H. y Alain, H. (1957) *Flora de Cuba*. La Habana: Contribuciones ocasionales del Museo de Historia Natural del Colegio "La Salle" No 16.
- Leppik, E. E. (1972) Origin and evolution of bilateral symmetry in flowers. *Evolutionary Biology*. 5: 49-85.
- Lloyd, D. G. y Webb, C. K. (1986) The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. *New Zealand Journal of Botany*. 24: 135-162.
- Lloyd, D. G. y Webb, C. J. (1992) The Selection of Heterostyly En: Barrett, S. C. H. (ed.). *Evolution and Function of Heterostyly*. pp. 151-178. Berlin: Springer-Verlag.
- Méndez-Orozco, O., Faife-Cabrera, M. y Castañeda-Noa, I. (2015) Flora y vegetación de las serpentinitas ubicadas al suroeste de Santa Clara, Villa Clara, Cuba. *Revista del Jardín Botánico Nacional*. 36: 55-64.
- Macior, L. W. (1974) Behavioral aspects of coadaptations between flowers and insect pollinators. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 61: 760-769.
- Marinho, C. R., Souza, C. D., Barros, T. C. y Teixeira, S. P. (2014) Scent glands in legume flowers. *Plant Biology*. 16: 215-226.
- Martínez-Pérez, L. (2013) Fenología reproductiva y efecto del robo de néctar en el éxito reproductivo de *Guettarda clarensis*, en Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Santa Clara, Cuba: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- Martínez-Pérez, L. (2017) Relación del vecindario floral con la frecuencia de robo de néctar en *Guettarda clarensis* (Rubiaceae). Santa Clara: Centro de Estudios Jardín Botánico de Villa Clara, pp. 55.

- May, P. G. (1985) Nectar uptake rates and optimal nectar concentrations of two butterfly species. *Oecologia*. 66: 381–386.
- McDade, L. A., Daniel, T. F., Masta, S. E. y Riley, K. M. (2000) Phylogenetic Relationships within the Tribe Justiceae (Acanthaceae): Evidence from Molecular Sequences, Morphology, and Cytology. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 87: 435-458.
- Neal, P. R., Dafni, A. y Giurfa, M. (1998) Floral Symmetry and its Role in Plant-Pollinator Systems: Terminology, Distribution, and Hypotheses. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 29: 345-373.
- Noa, A. y Castañeda, I. (1998) Flora de las serpentinitas de Santa Clara. *Revista del Jardín Botánico Nacional*. 19: 67-87.
- Ohashi, K. y Yahara, T. (2001) Behavioral responses of pollinators to variation in floral display size and their influences on the evolution of floral traits. En: Chittka, L. y Thomson, J. D. (eds.). *Cognitive Ecology of Pollination, Animal Behavior and Floral Evolution*. pp. 274-296. Londres: Cambridge University Press.
- Opler, P. A. (1983) Nectar production in a tropical ecosystem. En: Bentley, B. y Elias, T. (eds.). *The biology of nectaries*. pp. 30–79. New York: Columbia University Press.
- Ornduff, R. (1979) Heterostyly in *Oplonia* (Acanthaceae). *Journal of the Arnold Arboretum*. 60: 382-385.
- Palmer, A. R. y Strobeck, C. (1992) Fluctuating asymmetry as a measure of developmental stability: Implications of non-normal distributions and power of statistical tests. *Acta Zoologica Fennica*. 191: 57-72.
- Palmer, A. R. (1994) Fluctuating asymmetric analysis: A primer. En: Markow, T. A. (ed.). *Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications*. pp. 335–364. Kluwer, Dordrecht, Netherlands.
- Petanidou, T., Laere, A. J. V., Ellis, W. N. y Smets, E. (2006) What shapes amino acid and sugar composition in Mediterranean floral nectars? *Oikos*. 115: 155-169.
- Petanidou, T. (2007) Ecological and evolutionary aspects of floral nectars in Mediterranean habitats. En: Nicolson, S. W. et al. (eds.). *Nectaries and Nectar* pp. 343-375. Dordrecht: Springer.
- Proctor, M., Yeo, P. y Lack, A. (1996) *The Natural History of Pollination*. Rotherwick: British Wildlife Publishing.
- Ramírez, N. y Navarro, L. (2010) Trends in the reproductive biology of Venezuelan *Melochia* (Malvaceae) species. *Plant Syst Evol*. 289: 147–163.
- Rasband, W. S. (1997-2012) ImageJ. Bethesda, Maryland: U. S. National Institutes of Health.

- Richards, A. J. y Mitchell, J. (1990) The control of incompatibility in distylous *Pulmonaria affinis* Jordan (Boraginaceae). *Botanica Journal of the Linnean Society*. 104: 369–380.
- Richards, J. H. y Koptur, S. (1993) Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* (Rubiaceae). *American Journal of Botany*. 80: 31-40.
- Rohlf, F. J. (2006) TPS Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Ruíz-Zapata, T. R. y Arroyo, M. T. K. (1978) Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica*. 10: 221-230.
- Runions, C. J. y Geber, M. A. (2000) Evolution of the self-pollinating flower in *Clarkia xantiana* Onagraceae, I. Size and development of floral organs. *American Journal of Botany*. 87: 1439-1451.
- Sánchez-Pérez, D. (2013) Eficiencia de polinizadores y reciprocidad intermorfo en especies del género *Melochia* (Malvaceae) en Cuba. Santa Clara, Cuba: Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
- Sánchez, J. M., Ferrero, V. y Navarro, L. (2008) A New Approach to the Quantification of Degree of Reciprocity in Distylous (*sensu lato*) Plant Populations. *Annals of Botany*. 102: 463–472.
- Sánchez, J. M., Ferrero, V. y Navarro, L. (2013) Quantifying reciprocity in distylous and tristylous plant populations. *Plant Biology*. 15: 616-620.
- Sargent, R. D. (2004) Floral symmetry affects speciation rates in angiosperms. *Proceedings of the Royal Society of London B*. 271: 603-608.
- Savriama, Y., Gómez, J. M., Perfectti, F. y Klingenberg, C. P. (2012) Geometric morphometrics of corolla shape: dissecting components of symmetric and asymmetric variation in *Erysimum mediohispanicum* (Brassicaceae). *New Phytologist*. 196: 945-954.
- Schoen, D. J. y Ashman, T. L. (1995) The evolution of floral longevity: resource allocation to maintenance versus construction of repeated parts in modular organisms. *Evolution*. 49: 131–139.
- Sprengel, C. K. (1793) Discovery of the secret of Nature in the structure and fertilization of flowers. En: Lloyd, D. G. (ed.). *Floral Biology*. pp. 3-43.
- Stearn, W. T. (1971) A Survey of the Tropical Genera *Oplonia* and *Psilanthele* (Acanthaceae). *Bulletin of The British Museum (Natural History) Botany*. 4: 259-323.
- Szabo, T. I. (1984) Nectar secretion in dandelion. *Journal of Apicultural Research*. 23: 204–208.
- Talavera, S., Bastida, F., Ortiz, P. L. y Arista, M. (1999). Pollinator attendance and reproductive success in *Cistus libanotis* L. (Cistaceae). *International Journal of Plant Sciences*. 162: 343-352.

- van der Pijl, K. (1960) Ecological aspects of flower evolution I: phyletic evolution. *Evolution*. 14: 403-416.
- Van-Valen, L. (1962) A study of fluctuating asymmetry. *Evolution*. 16: 125-142.
- Weberling, F. (1989) *Morphology of Flowers and Inflorescences*. Cambridge: Cambridge Univ. Press.
- Webster, M. y Sheets, H. D. (2010) A practical introduction to landmark-based geometric morfometrics. *The Paleontological Society Papers*. 16: 163-188.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L. y Sheets, H. D. (2012) *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Amsterdam: Academic Press.