



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Licenciatura en Biología

**“ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE LA PLANTA ACUÁTICA DISTÍLICA
Nymphoides fallax ORNDUFF (MENYANTHACEAE)”**

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Biología

Presenta:

LUIS ENRIQUE OLGUÍN CHÁVEZ

Dirigido por:

DRA. TATIANA LOBATO DE MAGALHÃES

Querétaro, Qro, marzo 2022



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

Licenciatura en Biología

“ASPECTOS REPRODUCTIVOS DE LA PLANTA ACUÁTICA DISTÍLICA

***Nymphoides fallax* ORNDUFF (MENYANTHACEAE)”**

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciado en Biología

Presenta:

LUIS ENRIQUE OLGUÍN CHÁVEZ

Dirigido por:

DRA. TATIANA LOBATO DE MAGALHÃES

Dra. Tatiana Lobato de Magalhães

Presidenta

Dra. Mahinda Martínez y Díaz de Salas

Secretaria

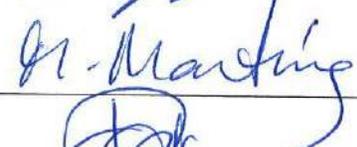
Dra. Olga Lidia Gómez Nucamendi

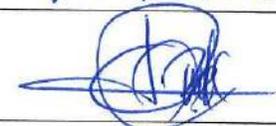
Vocal

Dr. Nicholas Tippery

Vocal









Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Marzo, 2022

México

RESUMEN

Nymphoides fallax Ornduff (Menyanthaceae) es una planta acuática distílica endémica de las tierras altas de México y Guatemala. Aunque la reproducción vegetativa es frecuentemente reportada en el género *Nymphoides* Ség., existe evidencia que sugiere alta prevalencia de la reproducción sexual en *N. fallax*. Los objetivos de esta tesis abordan aspectos reproductivos de esta especie, buscando particularmente: (i) probar si existe autoincompatibilidad heteromórfica y determinar su sistema de apareamiento, (ii) calcular la proporción de los morfos en algunas poblaciones y (iii) identificar el ensamblaje de visitantes florales y estimar su tasa de visitación. Las poblaciones estudiadas están ubicadas en el sur del estado de Querétaro, México. Se realizó un experimento de polinización controlada con plantas cultivadas (ocho tratamientos, $n = 80$) y se estimó la relación polen/óvulo para evaluar la existencia de autoincompatibilidad heteromórfica y establecer el sistema de apareamiento. Se hizo conteo de los morfos florales en seis poblaciones naturales y se calculó su proporción. Se realizaron observaciones de los visitantes florales en tres poblaciones naturales, incluyendo su identidad taxonómica y tasa de visitación (891 flores; 600 minutos). También se hicieron observaciones sobre la fenología a nivel floral, la viabilidad del polen y registro de carga polínica en algunos visitantes florales frecuentes, usando microscopía electrónica de barrido. Se encontró que *N. fallax* tiene flores diurnas con duración de un día, alta receptividad del estigma y alta viabilidad de los granos de polen (promedio: 96.54%); expresa autoincompatibilidad heteromórfica (producción de frutos en cruza intermorfo: 80-90%; 3-24 semillas por fruto, mientras que en las cruza intramorfo y autopolinización: 0-20%; 1-3 semillas). La relación polen/óvulo (5089.91) apoya la hipótesis de la xenogamia. Cuatro poblaciones naturales presentan ambos morfos (~ 1:1), dos poblaciones un solo morfo (de estilo largo). Fue observado un ensamblaje de 28 taxa de visitantes florales (944 visitas en total). Los visitantes más frecuentes fueron *Apis mellifera* (43.46%) y dípteros (familia Ephydridae: 33.26%; familias Stratiomyidae y Syrphidae: 7.2%). Se observaron granos de polen adheridos al cuerpo de los visitantes más frecuentes, lo cual sugiere que potencialmente son polinizadores efectivos. Esta investigación amplía el conocimiento del síndrome heterostílico y de la reproducción sexual en *N. fallax*.

Palabras clave: autoincompatibilidad heteromórfica, morfos florales, polinización controlada, visitantes florales, xenogamia

ABSTRACT

Nymphoides fallax Ornduff (Menyanthaceae) is an aquatic distylous plant endemic to Mexican and Guatemalan highlands. Although vegetative reproduction is frequently reported for *Nymphoides* species, there is evidence suggesting high prevalence of sexual reproduction in *N. fallax*. The objectives of this thesis address the following: (i) to test the heteromorphic self-incompatibility and determine species mating system, (ii) to estimate morph proportions on natural populations, and (iii) to identify floral visitor assemblage and quantify their visitation rate. Studied populations were located in Southern Querétaro State, Mexico. To evaluate the heteromorphic self-incompatibility a controlled pollination experiment was performed with eight treatments (n = 80). Also, pollen/ovule ratio was estimated to establish the mating system; the proportion of floral morphs were measured in six natural populations. Floral visitor observations were made in three natural populations, including their taxonomic identity and visitation rate (891 flowers; 600 minutes). Floral phenology aspects, pollen viability and pollen load presence in some frequent floral visitors were observed, the latter using scanning electron microscopy. *Nymphoides fallax* has diurnal flowers with one day length, high stigma receptivity, and high pollen viability (average: 96.54%). Heteromorphic self-incompatibility was determined to be significant (fruit production of intermorph crosses: 80-90%; 3 to 24 seeds per fruit, while in intramorph crosses and self-pollination: 0-20%; 1 to 3 seeds). The pollen/ovule ratio (5089.91) is consistent with xenogamy. Four natural populations were found to have both morphs in approximately equal proportions, and two populations possessed only one morph (long style). An assemblage of 28 floral visitor taxa was observed (944 visits in total). The most frequent visitors were exotic bees (*Apis mellifera*: 43.46%) and dipterans (Ephydriidae family: 33.26%; Stratiomyidae and Syrphidae: 7.2%). Pollen grains were observed attached to the body of the most frequent visitors, suggesting that they are potentially effective pollinators. This research expands the knowledge of the heterostylous syndrome and sexual reproduction in *N. fallax*.

Keywords: controlled pollination, floral morphs, floral visitors, heteromorphic self-incompatibility, xenogamy

“In their manner of fertilization a more remarkable case than can, perhaps, be found in any other plant or animal. Nature has ordained a most complex marriage arrangement”

Charles Darwin

“Without stories of progress, the world has become a terrifying place. The ruin glares at us with the horror of its abandonment. It’s not easy to know how to make a life, much less avert planetary destruction. Luckily there is still company, human and not human. We can still explore the overgrown verges of our blasted landscapes - the edges of capitalist discipline, scalability, and abandoned resource plantations. We can still catch the scent of the latent commons - and the elusive autumn aroma”

Anna Tsing

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro por mi formación académica. A la Society of Wetland Scientists (SWS) por el apoyo económico brindado a través del Student Research Grant 2021 (Apéndice A). A la Dra. Tatiana Lobato por apoyar la realización de esta tesis de todas las maneras posibles, por sus comentarios, recomendaciones, ideas y enseñanzas que van más allá de lo académico. A las Doctoras Mahinda Martínez y Olga Gómez y el Dr. Nicholas Tippery por formar parte de mi comité, por sus recomendaciones, comentarios, por facilitar y proporcionar algunos materiales y equipos.

A mi familia por acompañarme y por su apoyo durante mi trayecto en la Universidad, millones de gracias: Cristina, José Luis y Gabriela. A mis amigos de la Facultad, en especial a Rods y Ricardo (Fucho), gracias por ayudarme a obtener algunos de los frutos del experimento de polinización y por ayudarme a mantener las plantas en cultivo con agua. A Alan, Gabo y Mane por acompañarme a campo. Muchas gracias Mane por ayudarme también con el mapa.

A la M. Maricela Gómez, Dr. Luis Hernández, Dra. Mahinda Martínez y Dra. Patricia Herrera por mostrarme lo extraordinarias que son las plantas, a la Dra. Mónica Queijeiro por ser las increíbles clases de ecología y a la M. en C. Oliva, gracias por introducirme al fascinante mundo de la reproducción sexual de las plantas y la polinización.

A la M. en C. Ana Lucía Tovar, por su ayuda en la obtención de imágenes en el microscopio electrónico de barrido. A la Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera y la M. en C. Q. B. Elizabeth Martínez Rojo del Posgrado en Ciencias Químico-Biológicas de la Facultad de Química de la UAQ, por permitirme usar el cell counter para el conteo de polen y por su ayuda técnica. Al M. en C. Santiago Jaume Schinkel quien amablemente me confirmó las familias de algunos dípteros.

A Gatina, por ser mi amiga y acompañante-no-humana.

ÍNDICE

RESUMEN	iii
ABSTRACT.....	iv
DEDICATORIAS	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE CUADROS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 La reproducción sexual en las angiospermas	3
2.2 La flor.....	4
2.3 Polinización	5
2.4 Sistemas de apareamiento.....	7
2.5 Heterostilia	10
2.6 Autoincompatibilidad heteromórfica.....	12
2.7 Reproducción asexual.....	13
2.8 Plantas acuáticas.....	14
2.9 La familia Menyanthaceae.....	16
2.10 Especie focal: <i>Nymphoides fallax</i>	17
3. HIPÓTESIS.....	20
4. OBJETIVOS	21

4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos particulares	21
5. MATERIAL Y MÉTODOS	22
5.1 Área de estudio y colecta de plantas para cultivo	22
5.2 Fenología floral, relación polen/óvulo y viabilidad del polen	26
5.3 Experimento de polinización controlada	27
5.4 Proporción de morfos en poblaciones naturales	28
5.5 Observación de visitantes florales	28
5.6 Observación de polen en el cuerpo de visitantes florales selectos ...	29
6. RESULTADOS	30
6.1 Fenología floral, relación polen/óvulo y viabilidad del polen	30
6.2 Experimento de polinización controlada	34
6.3 Proporción de morfos en poblaciones naturales	37
6.4 Observación de visitantes florales	38
6.5 Observación de polen en el cuerpo de visitantes florales selectos ...	42
7. DISCUSIÓN	45
8. CONCLUSIONES	50
LITERATURA CITADA	51
APÉNDICES	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Relación polen óvulo (P/O) promedio \pm error estándar, conforme a los sistemas de apareamiento. En los sistemas facultativos puede ocurrir autofecundación o fecundación cruzada, pero un modo es predominante.	10
2	Sitios de estudio. C= colecta de plantas para el experimento de polinización controlada, M= conteo de morfos, O= observación de visitantes florales.	22
3	Tratamientos y grupos control del experimento de polinización manual, se indica el morfo donador y receptor de polen.	28
4	Número de granos de polen, óvulos y relación polen/óvulo (P/O) de los morfos S, L y en conjunto.	34
5	Porcentaje de viabilidad de los granos de polen divididos por morfo y en conjunto.	34
6	Porcentaje de frutos desarrollados, número de semillas por tratamiento y por fruto y número de días para la formación de semillas. S \times L= cruza intermorfo (polen de morfo S sobre estigma de morfo L), L \times S= cruza intermorfo (polen de morfo L sobre estigma de morfo S), S \times S= cruza intramorfo S, L \times L= cruza intramorfo L, A-S= autopolinización morfo S, A-L= autopolinización morfo L, C-S= control morfo S, C-L= control morfo L.	35
7	Porcentaje de individuos de cada morfo floral en poblaciones naturales de <i>Nymphoides fallax</i> .	37
8	Número de morfoespecies de visitantes florales de <i>Nymphoides fallax</i> por orden, número de visitas y porcentaje que representan.	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación del proceso de doble fecundación en <i>Arabidopsis</i> . Se muestran tres fases: 1) fase de descarga del tupo polínico, donde se descargan las células espermáticas hacia el gametofito femenino. 2) Fase de inmovilidad, las células espermáticas se mantienen en el límite entre la ovocélula y la célula central. 3) Fase de doble fecundación, las células espermáticas se fusionan con la ovocélula y la célula central.	4
2	Flor de <i>Oenothera tetraptera</i> Cav. Acercamiento y vista desde abajo. Se señala sépalo, pétalo, antera, filamento, estigma, estilo y ovario.	5
3	Una abeja del género <i>Peponapis</i> en la flor de una calabaza (<i>Cucurbita</i> sp.), son visibles algunos granos de polen en la parte dorsal del tórax de la abeja.	6
4	Representación del transporte de granos de polen entre dos individuos, ilustrando los tres sistemas de apareamiento: xenogamia, autogamia y geitonogamia.	8
5	Flores heterostílicas: (a) morfo L, (b) morfo S de <i>Fagopyrum esculentum</i> (Polygonaceae) y (c) morfos L, M y S de <i>Lythrum salicaria</i> (Lythraceae).	11
6	Diagrama ilustrando el acomodo espacial de androceo y gineceo en flores distílicas (de izquierda a derecha: morfo L y morfo S). Las flechas indican la dirección de recepción y deposición de polen entre los morfos, mediada por el visitante floral y los rectángulos naranjas representan los diferentes sitios de deposición de polen de cada morfo en su cuerpo.	12
7	Diagrama de las formas de vida generales de plantas acuáticas.	14
8	Varios individuos de <i>Nymphoides fallax</i> en floración.	18
9	Flores de los morfos S (a) y L (b) de <i>Nymphoides fallax</i> .	19
10	Granos de polen del morfo S (a), del morfo L (b) y papilas del estigma del morfo S (c) y del morfo L (d) de <i>Nymphoides fallax</i> .	19
11	Sitios de estudio en los municipios de Pedro Escobedo, Amealco de Bonfil, Huimilpan y San Juan del Río, en el sur del estado de Querétaro. C= colecta de plantas para el experimento de polinización controlada, M= conteo de morfos, O= observación de visitantes florales.	23
12	Fotografías de algunos sitios de estudio: sitios 1, 3 y 5 (cuerpos de agua temporal), sitio 2 (cuerpo de agua permanente).	25

13	Aislamiento de flores para el experimento de polinización, para cada una se usó una bolsa de pergamino sostenida por una pinza a una estaca delgada de madera, enterrada en el sustrato de la tina.	27
14	Antesis de las flores de <i>Nymphoides fallax</i> . El cambio más notorio es el desdoblamiento de los pétalos. Todas las fotografías corresponden a una flor del morfo L, a excepción de la flor abierta.	31
15	Acumulación de flores en antesis en un periodo de dos horas (8:40-10:40 hrs).	31
16	Burbujeo en el estigma de una flor de morfo L al contacto con peróxido de hidrógeno, sugiriendo que se encuentra receptivo.	32
17	Granos de polen (señalados con flechas negras) observados con el contador de células.	32
18	Granos de polen viables teñidos con el reactivo de Alexander, observados en el microscopio óptico.	33
19	Granos de polen en el estigma de <i>Nymphoides fallax</i> observados en microscopio electrónico de barrido.	33
20	Producción de semillas por tratamiento. Las barras representan los rangos de datos. El tratamiento S × L tiene una media de 10.6 y mediana de 12.5 (línea). El tratamiento L × S tiene una media de 7.9 y mediana de 5 (línea). * = diferencias significativas ($p= 1.83 \times 10^{-12}$).	36
21	Semillas flotando en la superficie del agua en el sitio 1.	39
22	<i>Apis mellifera</i> visitando una flor de <i>Nymphoides fallax</i> en el sitio 3.	39
23	Díptero de la familia Ephydriidae (agrupado en el segundo visitante más frecuente) visitando una flor de <i>Nymphoides fallax</i> en el sitio 2.	40
24	Díptero de la familia Stratiomyidae (agrupado en el tercer visitante más frecuente) visitando una flor de <i>Nymphoides fallax</i> en el sitio 3.	40
25	<i>Leptophobia aripa</i> visitando una flor de <i>Nymphoides fallax</i> en el sitio 2.	41
26	<i>Catantix nimbice</i> visitando una flor de <i>Nymphoides fallax</i> en el sitio 2.	41
27	Carga polínica de <i>Nymphoides fallax</i> en la probóscide (a), tórax (b y c) y acercamiento a la corbícula (d) de una abeja melífera (<i>Apis mellifera</i>).	42
28	Carga polínica de <i>Nymphoides fallax</i> en la parte dorsal de tórax de un díptero (familia Ephydriidae).	43
29	Carga polínica de <i>Nymphoides fallax</i> en la parte dorsal de tórax (a y b) y abdomen (c y d) de un díptero (familia Stratiomyidae). Se muestra un acercamiento a cuatro granos de polen (d).	44

1. INTRODUCCIÓN

La heterostilia es un polimorfismo floral, consiste en poblaciones con dos o tres tipos de morfos florales que difieren de manera recíproca en las alturas a las que se encuentran anteras y estigmas en flores de individuos diferentes; este acomodo espacial también es conocido como hercogamia recíproca (Barrett, 2002a; Fernandes-Cardoso *et al.*, 2018; Barrett, 2019). Comúnmente, las plantas heterostílicas también cuentan con un sistema de autoincompatibilidad heteromórfica, que asegura la fecundación entre morfos diferentes y una serie de polimorfismos morfológicos secundarios, particularmente en los estigmas y granos de polen (Barrett y Cruzan, 1994). La importancia adaptativa de la heterostilia incluye la promoción de la polinización cruzada, por lo tanto, evita el desperdicio de los granos de polen; simultáneamente previene la interferencia entre las funciones femenina y masculina, reduciendo la probabilidad de pérdida de gametos masculinos y femeninos disponibles para fecundación cruzada (Darwin, 1877; Lloyd y Webb, 1992a; Barrett, 2002b; Barrett y Shore, 2008; Keller *et al.*, 2014)

La heterostilia no está asociada específicamente a ninguna región geográfica, hábitat ni forma de vida de las plantas (Ganders, 1979; Barrett y Richards, 1990). Sin embargo, resulta particularmente interesante su presencia en algunos linajes de plantas acuáticas, debido a que comúnmente cuentan con amplia capacidad de reproducción asexual (Barrett *et al.*, 1993; Philbrick y Les, 1996), incluyendo el grupo al que pertenece *N. fallax* (Ornduff, 1966; Ornduff, 1970; Barrett, 1980; Kadereit, 2007; Haddadchi *et al.*, 2014).

Nymphoides fallax Ornduff (Menyanthaceae Dumort.) es una planta acuática distílica, tetraploide y endémica de los humedales de las tierras altas de México y Guatemala (Ornduff, 1969; Lobato-de Magalhães y Martínez, 2018; Lobato-de Magalhães *et al.*, 2019). Existe evidencia que sugiere alta prevalencia de la reproducción sexual en esta especie, incluyendo: alta diversidad genética, la presencia de dimorfismo en el tamaño de los granos de polen, del estigma y de sus papilas, presencia de visitantes florales (insectos de los ordenes Diptera, Hymenoptera, Lepidoptera y Odonata), abundante producción de semillas y establecimiento de plántulas en el campo (Zepeda *et al.*, 2014; Lobato-de Magalhães *et al.*, 2019; Lobato-de Magalhães y Martínez, 2020; Lobato-de Magalhães *et al.*, 2020). No obstante, se conoce muy

poco de la historia de vida de esta especie y su sistema reproductivo, notablemente se desconoce la función de la heterostilia en su reproducción sexual (Lobato-de Magalhães y Martínez, 2020), esta tesis tiene como objetivo principal aportar en la generación de este conocimiento en *N. fallax*.

2. ANTECEDENTES

2.1. La reproducción sexual en las angiospermas

Las angiospermas son un grupo monofilético de plantas, su nombre viene de las palabras griegas *angeion* (contenedor o vaso) y *sperma* (semilla) haciendo referencia a la formación de los óvulos dentro de un órgano de la flor, denominado carpelo. En la actualidad, las angiospermas son el grupo más diverso de plantas, con estimaciones entre las 300,000 y 350,000 especies a nivel global (Christenhusz y Byng, 2016; Scutt, 2021). En México se han registrado 21,841 especies de angiospermas (Villaseñor y Ortiz, 2014) y se estiman hasta 29,000 especies (Villaseñor, 2003); destacan también, por contar con gran diversidad de formas, estrategias y estructuras asociadas a la reproducción sexual (Fernandes-Cardoso *et al.*, 2018).

El ciclo de vida de todas las plantas se caracteriza por la alternancia de dos fases multicelulares: el gametofito haploide y el esporofito diploide (Kenrick y Crane, 1997). En las angiospermas, los gametofitos masculinos son los granos de polen, cada uno está constituido de tres células: dos células espermáticas y una vegetativa; mientras que el gametofito femenino es el saco embrionario, en la mayoría de angiospermas consiste en siete células dentro de los óvulos: tres antípodas, dos sinérgidas, una célula central con dos núcleos y la ovocélula (Figura 1) (Schmidt *et al.*, 2015; González-Gutiérrez *et al.*, 2014). La reproducción sexual involucra un proceso de doble fecundación, para la formación del embrión: primero ocurre la atracción del tubo polínico hacia el saco embrionario, se liberan las dos células espermáticas en una de las sinérgidas y migran hacia la célula central y la ovocélula, ocurre reconocimiento celular y fusión: con la célula central se formará el endospermo (triploide) y la fusión con la ovocélula dará lugar al embrión (diploide) y el ciclo se reinicia (Figura 1) (Berger *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2015). Posterior a la fecundación, los tejidos que conforman al ovario (una parte del carpelo) se desarrollan en un fruto, que protege a las semillas en desarrollo (u óvulos fecundados) y finalmente participa en la dispersión de las semillas (Scutt, 2021).

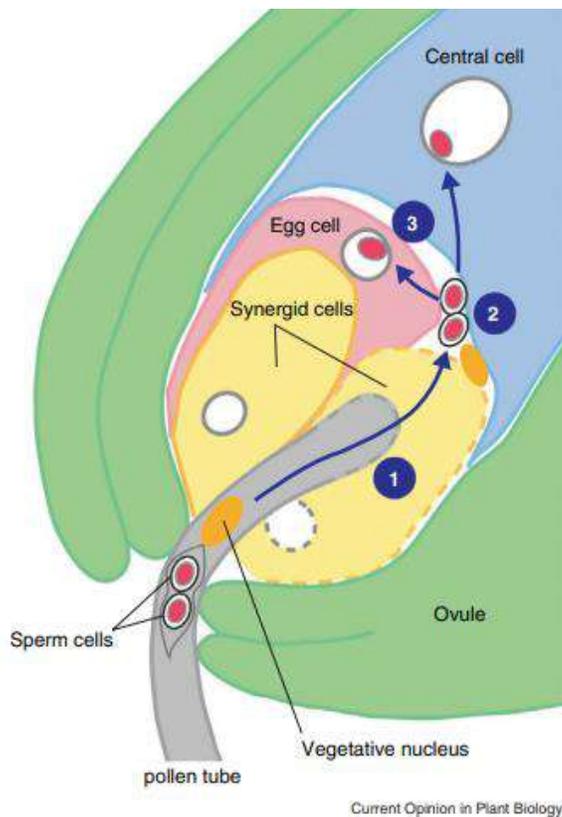


Figura 1. Representación del proceso de doble fecundación en *Arabidopsis*. Se muestran tres fases: 1) fase de descarga del tupo polínico, donde se descargan las células espermáticas hacia el gametofito femenino. 2) Fase de inmovilidad, las células espermáticas se mantienen en el límite entre la ovocélula y la célula central. 3) Fase de doble fecundación, las células espermáticas se fusionan con la ovocélula y la célula central. Fuente: Hamamura *et al.*, (2012).

2.2 La flor

La flor puede ser definida como un eje reproductivo y determinado, comúnmente hermafrodita, aunque existen también flores unisexuales. Las flores hermafroditas están compuestas regularmente por perianto, androceo y gineceo. El perianto es una zona estéril, formada de sépalos y pétalos, en conjunto constituyen el cáliz y la corola, respectivamente. Los sépalos usualmente son verticilos verdes que encierran a los botones florales en desarrollo, mientras que los pétalos son más diversos en tamaño, forma y color; cuando no existe diferenciación en el perianto u ocurre de manera gradual, los verticilos se denominan tépalos (Figura 2) (Bateman *et al.*, 2006; Specht y Bartlett, 2009; Simpson, 2019a).



Figura 2. Flor de *Oenothera tetraptera* Cav. Acercamiento y vista desde abajo. Se señala sépalo, pétalo, antera, filamento, estigma, estilo y ovario. Fuente: Modificado de Pedro Tenorio Lezama (sitio de Malezas de México).

Los estambres en conjunto componen al androceo, a su vez, cada estambre se constituye de una parte basal y estéril denominada filamento, y de una antera compuesta típicamente de dos compartimentos llamados tecas, cada una con dos microesporangios, en donde se producen los granos de polen (Simpson, 2019a). Por último, el gineceo consiste en uno o más carpelos (fusionados o separados) que protegen a los óvulos (Pfannebecker *et al.*, 2017; Scutt, 2021). Cada estructura del gineceo por separado, se denomina pistilo y puede componerse de uno o varios carpelos; la porción basal que contiene a los óvulos es el ovario, mientras que el estigma es la superficie receptiva a la que llegan los granos de polen y donde comienza su germinación; el estilo es la porción que une al estigma y al ovario, a través de la cual los tubos polínicos crecen (Pfannebecker *et al.*, 2017).

2.3 Polinización

Para la reproducción sexual es necesaria la polinización (Figura 3), es decir, el transporte de los granos de polen desde las anteras y su deposición en el estigma de la flor, donde pueden germinar, crecer a través del estilo y fecundar a los óvulos para producir semillas (Inouye, 2013). La polinización en la mayoría de las angiospermas es llevada a cabo por animales, se estima que en aproximadamente el 87.5% de las especies actuales (Ollerton *et*

al., 2011; Ollerton, 2017). Es una interacción muy importante, los efectos ecológicos que tiene abarcan distintos niveles incluyendo: otras interacciones, poblaciones, comunidades y ecosistemas (Kearns *et al.*, 1998; Ollerton *et al.*, 2011).



Figura 3. Una abeja del género *Peponapis* en la flor de una calabaza (*Cucurbita* sp.), son visibles algunos granos de polen en la parte dorsal del tórax de la abeja. Fuente: Modificado de Wilson y Messinger-Carril (2016).

Un concepto ampliamente utilizado en el estudio de esta interacción son los síndromes de polinización, estos se definen como una serie de características fenotípicas florales, incluyendo color, morfología, olor, recompensa, fenología, entre otras, asociadas la atracción y utilización de uno o más grupos funcionales de visitantes florales que ejercen presiones selectivas similares, presumiblemente reflejando adaptación convergente a los visitantes más eficientes en linajes convergentes de angiospermas, es decir con varios orígenes evolutivos (Fenster *et al.*, 2004; Ollerton *et al.*, 2015; Dellinger, 2020). Entre los síndromes de polinización bióticos propuestos están: quiropterofilia (muerciélagos), melitofilia (abejas), cantarofilia (escarabajos), ornitofilia (aves), psicofilia (mariposas y polillas diurnas), saprofilia (moscas califóridas), rinomiofilia (moscas de probóscide larga), miofilia (moscas, exceptuando los dos grupos ya mencionados), falenofilia (polillas), terofilia (mamíferos no voladores) y esfecofilia (avispas) (Rosas-Guerrero *et al.*, 2014).

Además de polinizadores, hay vectores abióticos de polen: viento y agua. La anemofilia o polinización por viento, es una condición derivada de la polinización biótica que ha evolucionado al menos 65 veces en las angiospermas, y está presente en cerca del 10% de las especies, típicamente con flores unisexuales, pequeñas, poco vistosas y con polen abundante (Ackerman, 2000; Friedman y Barrett, 2009). También existen dos tipos de hidrofilia o polinización acuática: epihidrofilia e hipohidrofilia, en el primero, la polinización ocurre en la superficie del agua, mientras que en la hipohidrofilia sucede en la columna de agua, en flores totalmente sumergidas. La hidrofilia está presente en unas 130 especies de 26 géneros de angiospermas estrictamente acuáticas, todas monocotiledóneas a excepción de *Callitriche* y *Ceratophyllum*; la hidrofilia tuvo al menos ocho orígenes evolutivos, en algunos casos probablemente a partir de la anemofilia (Cox, 1988; Philbrick y Les, 1996; Du y Wang, 2014).

2.4 Sistemas de apareamiento

Un aspecto determinante de la biología reproductiva de las plantas, son los sistemas de apareamiento, estos se refieren al parentesco genético entre gametos y a sus patrones de emparejamiento (Ward *et al.*, 2005). La transmisión genética en las angiospermas depende de varios factores, incluyendo el movimiento de los vectores de polen (abióticos o bióticos), la presencia de algún sistema de incompatibilidad y las formas de expresión sexual (Fernandes-Cardoso *et al.*, 2018). La diversidad en estrategias de apareamiento entre las angiospermas se relaciona con varias de sus características, como: la falta de desplazamiento, el crecimiento modular, la condición comúnmente hermafrodita, la variación en las estructuras reproductivas y la diversidad de sus historias de vida (incluyendo forma de vida, longevidad y tamaño), resultando en muchas combinaciones estructurales y temporales posibles de los gametos masculinos y femeninos a diferentes grados, desde una flor individual hasta nivel poblacional (Barrett, 2002a; Barrett, 2003; Barrett, 2010). Se reconocen tres sistemas de apareamiento: autogamia (*selfing*), geitonogamia y xenogamia (*outcrossing*), su diferencia fundamental es el origen de los granos de polen que fecundarán a los óvulos: pueden ser del mismo individuo o de otro genéticamente diferente (Figura 4) (Barrett, 2002a; Fernandes-Cardoso *et al.*, 2018).

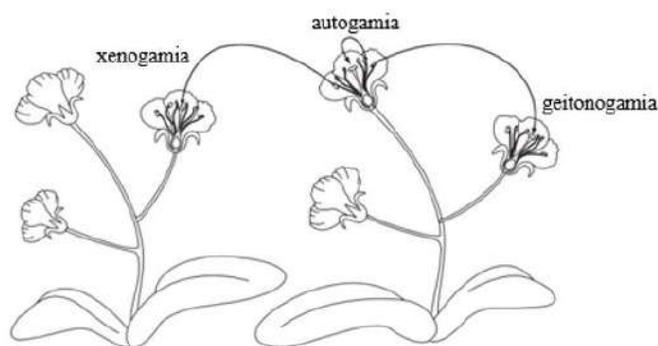


Figura 4. Representación del transporte de granos de polen entre dos individuos, ilustrando los tres sistemas de apareamiento: xenogamia, autogamia y geitonogamia. Fuente: Figura modificada de Osborne y Free (2003).

La xenogamia es el tipo de fecundación producto de polinización cruzada entre flores de individuos genéticamente diferentes (Fernandes-Cardoso *et al.*, 2018; Simpson, 2019b). Este sistema de apareamiento promueve el aumento de diversidad genética, debido a la recombinación, permitiendo mayor probabilidad de persistencia de las poblaciones en situaciones ambientales diversas y aumentando la probabilidad de cambios evolutivos (Simpson, 2019b). La xenogamia puede ser más favorable bajo condiciones de variación temporal en el suministro de recursos, sin embargo, puede ser limitante en algunas situaciones como en caso de escasez de polinizadores o cuando los individuos están muy distantes entre sí (Barrett, 2002a; Silvertown, 2008; Whitehead *et al.*, 2018).

La autogamia consiste en autofecundación después de autopolinización: los gametos masculinos y femeninos tienen su origen en la misma flor, puede ser resultado de mecanismos florales que lo favorezcan como la ausencia de hercogamia (Fernandes-Cardoso *et al.*, 2018), o bien, como resultado del comportamiento de algún visitante floral (autogamia facilitada) (Lloyd, 1992). La autogamia ha sido interpretada como un mecanismo de aseguramiento reproductivo, bajo condiciones limitadas de transferencia de polen, además puede ser conveniente en poblaciones con baja presión endogámica (Lloyd, 1992; Busch y Delph, 2012; Whitehead *et al.*, 2018). Cerca del 20% de las angiospermas, ha evolucionado un sistema de apareamiento predominantemente orientado a la autogamia (Barrett, 2002a).

La geitonogamia es la fecundación entre gametos de diferentes flores del mismo individuo, puede ocurrir en plantas con flores hermafroditas o en planta monoicas (con flores unisexuales en el mismo individuo), no representa un mecanismo de aseguramiento reproductivo, porque necesariamente está implicado un vector de polen (Eckert, 2000; Vallejo-Marín *et al.*, 2010; Fernandes-Cardoso *et al.*, 2018). En especies capaces de reproducción vegetativa, la geitonogamia también puede ocurrir entre individuos distintos, pero genéticamente idénticos; así la arquitectura clonal de las plantas afecta la probabilidad de geitonogamia a través del acomodo espacial de las flores dentro de los clones (Vallejo-Marín *et al.*, 2010). La geitonogamia ecológicamente tiene las mismas consecuencias que la xenogamia, pero genéticamente es muy similar a la autogamia; aunque mediante la acumulación de mutaciones en distintos meristemas, y debido al crecimiento y cuerpo metamérico y modular de las plantas, potencialmente puede implicar variabilidad genética. (Lloyd y Schoen, 1992; Barrett y Harder, 2017).

Es común que la proporción de las formas de apareamiento dentro de una población no ocurra de manera discreta, sino continua; resultando en sistemas de apareamiento mixtos, sobre todo en especies polinizadas por animales (Vogler y Kalisz, 2001; Barrett, 2002a). Es prevalente también, la variación de la tasa de entrecruzamiento entre poblaciones diferentes de la misma especie, resultado de factores ecológicos, genéticos y su sinergia (Devaux *et al.*, 2014; Whitehead *et al.*, 2018).

La relación polen-óvulo (P/O) es una proporción que puede estar relacionada con los sistemas de apareamiento de las plantas; después de recopilar información de numerosas poblaciones y especies Cruden (1977) propuso que esta relación es mayor en especies xenógamas obligadas y decrece hasta alcanzar los valores más bajos en especies cleistógamas (un caso particular de autogamia que ocurre en flores que no se abren) (Erbar y Langlotz, 2005) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Relación polen óvulo (P/O) promedio \pm error estándar, conforme a los sistemas de apareamiento. En los sistemas facultativos puede ocurrir autofecundación o fecundación cruzada, pero un modo es predominante.

Relación P/O promedio \pm error estándar	Sistema de apareamiento
4.7 \pm 0.7	Cleistogamia
27.7 \pm 3.1	Autogamia obligada
168.5 \pm 22.1	Autogamia facultativa
796.6 \pm 87.7	Xenogamia facultativa
5859.2 \pm 936.5	Xenogamia

Fuente: Modificado de Erbar y Langlotz (2005).

2.5 Heterostilia

Los polimorfismos florales son distintos tipos heredables de flores presentes en una misma población; comúnmente la variación se expresa en características fenotípicas como color, color, forma y olor (de-Jager y Ellis, 2014; Gibbs, 2017). Específicamente, existen polimorfismos relacionados con la altura u orientación del estilo y estigma en flores hermafroditas, incluyendo la heterostilia, el dimorfismo de altura del estigma y la enantioestilia (Barrett *et al.*, 2000).

La heterostilia es un polimorfismo floral consistente en poblaciones con dos o tres morfos con hercogamia recíproca, es decir, difieren de manera mutua en la altura a la que están anteras y estigmas en flores de individuos diferentes; la heterostilia ha tenido múltiples orígenes evolutivos y está presente en al menos 28 familias de angiospermas (Barrett y Shore, 2008; Barrett, 2019; Fernandes-Cardoso *et al.*, 2018; Lloyd y Webb, 1992b). Es más frecuente la evolución de la heterostilia en linajes con flores actinomorfas (simetría radial) de corola abierta y un tubo floral con néctar en la base (Lloyd y Webb, 1992b; Barrett y Shore, 2008). Hay dos formas de heterostilia: distilia y tristilia (Figura 5). Por convención, se nombran L, M y S a los morfos de estilo largo, mediano y bajo, respectivamente (Barrett, 1992;

Barrett, 2002a; Barrett y Shore, 2008). Existe una serie de características asociadas a estas plantas, que en conjunto constituyen el "síndrome heterostéfico", típicamente incluye un sistema de autoincompatibilidad, y una serie de polimorfismos morfológicos secundarios, en algunas especies incluyen más de 20 caracteres florales (Lloyd y Webb, 1992a; Barrett y Cruzan, 1994). En específico, los polimorfismos en los granos de polen y el estigma destacan porque pueden estar implicados en promover la captura de polen compatible (del morfo opuesto), a través de la adhesión preferencial de polen del morfo opuesto, debido a complementariedad topográfica (Dulberger, 1975; Costa *et al.*, 2017; Barrett, 2019).



Figura 5. Flores heterostéficas: (a) morfo L, (b) morfo S de *Fagopyrum esculentum* (Polygonaceae) y (c) morfos L, M y S de *Lythrum salicaria* (Lythraceae). Fuente: Modificado de Barrett (2019) y Ronald Toth (sitio de Plant Teaching Collection, University of Wisconsin).

La significancia adaptativa de la heterostilia es un tópico desarrollado desde los estudios de Darwin (1877) con la hipótesis de la promoción cruzada (*cross-promotion hypothesis*), donde propuso que la posición relativa de las anteras y los estigmas en plantas heterostéficas, representa una adaptación para la polinización cruzada, asegurando el transporte de polen de un morfo a otro. Así, la heterostilia sería una forma de reducir el conflicto de evitar interferencia entre el androceo y el gineceo de la misma flor, pero logrando precisión en el transporte y deposición del polen, debido al contacto con los visitantes florales con solamente un sexo de la flor o bien, tocando ambos pero con diferentes partes de su cuerpo, promoviendo emparejamiento selectivo negativo (*disassortative mating*), es decir, entre individuos con fenotipos diferentes, en este caso morfos opuestos (Figura 6) (Barrett, 2002a; Barrett, 2019; Cesaro y Thompson, 2004).

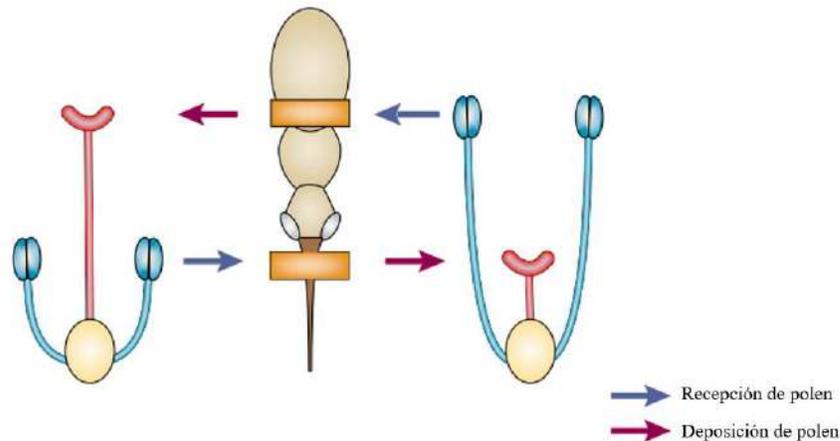


Figura 6. Diagrama ilustrando el acomodo espacial de androceo y gineceo en flores distílicas (de izquierda a derecha: morfo L y morfo S). Las flechas indican la dirección de recepción y deposición de polen entre los morfos, mediada por el visitante floral y los rectángulos naranjas representan los diferentes sitios de deposición de polen de cada morfo en su cuerpo. Fuente: Figura modificada de Barrett (2002a).

Un aspecto ecológico importante en poblaciones heterostílicas es la proporción de morfos; se predice que, en condiciones de equilibrio, las poblaciones sean isopléticas, es decir en una proporción equitativa, como consecuencia del emparejamiento selectivo negativo (Barrett, 2019). Aunque distintos procesos pueden causar desviaciones de la proporción esperada, existiendo poblaciones anisopléticas estables (con mayor proporción de algún morfo), esto puede estar relacionado con una ruptura parcial o total del sistema de autoincompatibilidad o un flujo asimétrico de polen, derivando en una adecuación desigual de los morfos (Heuch, 1979; Casper y Charnov, 1982; Casper, 1992).

2.6 Autoincompatibilidad heteromórfica

Los sistemas de incompatibilidad en las plantas se refieren a la incapacidad controlada genéticamente de producir semillas (Allen y Hiscock, 2008; Fernandes-Cardoso *et al.*, 2018). Se pueden clasificar en dos categorías relacionadas a la morfología, la más común es la autoincompatibilidad homomórfica, en plantas que carecen de diferencias morfológicas entre los individuos compatibles. En cambio, la autoincompatibilidad heteromórfica está presente en plantas con heterostilia, en este caso hay una correspondencia entre los individuos com-

patibles y los morfos florales, incluso puede haber diferencias en el grado de autoincompatibilidad y mecanismo de respuesta entre los morfos (Barrett y Cruzan, 1994; Allen y Hiscock, 2008; Iqbal *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 2009; Fernandes-Cardoso *et al.*, 2018). Es importante destacar que existen plantas heterostílicas autocompatibles (i.e., Barrett, 1988; Schoen *et al.*, 1997), aunque es probable que esto se deba a la pérdida del sistema de autoincompatibilidad heteromórfica y a una tendencia a la ruptura de la heterostilia, en general (Barrett, 2013).

Se denominan cruzas legítimas a aquellas que ocurren entre morfos opuestos, por lo general son las únicas que producen semillas (o un mayor número de ellas), el resto de las cruzas se conocen como ilegítimas: entre la misma flor, con otra flor del individuo o con otro individuo del morfo igual (Barrett y Cruzan, 1994). Se han registrado varias respuestas fisiológicas después de la deposición de polen ilegítimo que explican la falla en la fecundación, incluyendo, falta de adhesión, hidratación y germinación de los granos de polen, inhabilidad de los tubos polínicos de penetrar la zona estigmática o interrupción del crecimiento del tubo polínico en el estilo u ovario, en muchas especies se presenta más de una de estas respuestas, formando una secuencia de barreras que de manera individual no son completamente efectivas (Dulberger, 1992; Barrett y Cruzan, 1994).

2.7 Reproducción asexual

Además de reproducirse de forma sexual, las angiospermas se destacan por tener gran capacidad de reproducción asexual, esto se refiere al desarrollo de un nuevo individuo sin la formación de un embrión, de dos formas principales: reproducción vegetativa y apomixis (Schmidt *et al.*, 2015). En la reproducción vegetativa se producen nuevos individuos a través de tejidos de las raíces, tallos y menos comúnmente a partir de hojas o inflorescencias; mientras que en el proceso de apomixis se producen semillas sin fecundación, es decir son clones de la planta madre (Silvertown, 2008). La reproducción asexual es más común en especies acuáticas, apomícticas, raras y amenazadas; las poblaciones de plantas invasoras también tienen mayores tasas de clonalidad y es más frecuente que este tipo de reproducción ocurra en los bordes de los rangos de distribución de las especies (Grace, 1993; Philbrick y Les, 1996; Cronk y Fennessy, 2009). Sin embargo, según Silvertown (2008) es más probable que esta serie de condiciones no son las que explican la persistencia de la reproducción asexual,

sino representan las situaciones donde la reproducción sexual falla. Aun cuando la reproducción asexual está tan asociada a las plantas acuáticas, solo hay pocos casos registrados de especies sin la capacidad de producir semillas viables, como *Utricularia australis* R. Br. y algunas poblaciones de especies de *Armoracia* G. Gaertn., B. Mey. y Scherb. y *Neobeckia* Greene (Taylor, 1989; Les, 1994).

2.8 Plantas acuáticas

Las macrófitas acuáticas son un grupo de organismos acuáticos fotosintéticos macroscópicos, tienen sus órganos vegetativos creciendo de manera permanente o periódica, sumergidos, flotando o emergiendo de la superficie del agua, en cuerpos de agua dulce o salobre al interior de los continentes, incluyendo cuerpos y cursos de agua permanentes, temporales y efímeros; taxonómicamente incluyen macroalgas y plantas, particularmente, se han registrado 3496 especies de plantas acuáticas vasculares a nivel global (Chambers *et al.*, 2008; Murphy *et al.*, 2019). Existen varios sistemas de clasificación propuestos para las formas de vida de plantas acuáticas, en general se reconocen cuatro tipos: emergentes, sumergidas, libres flotadoras y enraizadas de hojas flotantes (Sculthorpe, 1985) (Figura 7).

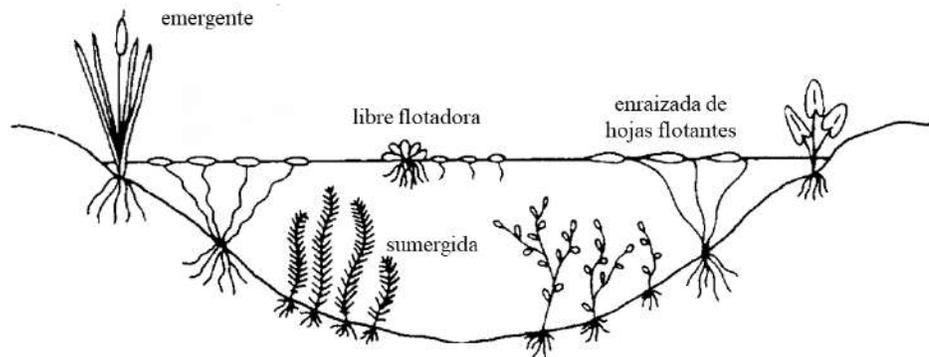


Figura 7. Diagrama de las formas de vida generales de plantas acuáticas. Fuente: Figura modificada de Riemer (1984).

Las plantas acuáticas tuvieron su origen en al menos 50 eventos evolutivos independientes ocurridos a distintos tiempos; algunos linajes son ancestralmente acuáticos a nivel de

orden o familia, mientras que otras son especies acuáticas únicas en géneros terrestres (Cook, 1990; Les *et al.*, 1997; Cook, 1999). Debido a este origen polifilético, las plantas acuáticas son muy diversas en su morfología y ecología, aunque también son comunes las convergencias evolutivas (Du y Wang, 2014).

Los sistemas reproductivos de las plantas acuáticas son complejos y difíciles de generalizar, por la contribución variable que tienen de reproducción sexual y asexual (Philbrick y Les, 1996; Cronk y Fennessy, 2009). Particularmente, la mayor parte de las angiospermas acuáticas retuvieron la floración y, por lo tanto, el sistema de polinización de sus ancestros terrestres, la otra alternativa; la evolución de la hidrofilia es la divergencia más notable dentro de la evolución de los sistemas de polinización de las angiospermas, y está presente solo en 26 géneros y unas 130 especies (Cox, 1988, Philbrick y Les, 1996; Du y Wang, 2014). El hábito acuático de una planta y su polinización terrestre presenta algunos posibles inconvenientes, como una posible disrupción en la transferencia del polen o su inviabilidad por el contacto con el agua (Corbet, 1990). Durante su evolución, algunas especies han desarrollado características para evitar el contacto con el agua, por ejemplo, hojas modificadas, tallos y pedúnculos que sostienen a flores emergentes del agua (Sculthorpe, 1985; Philbrick y Les, 1996). Además, con la conservación de un sistema reproductivo terrestre, se podría esperar que plantas acuáticas y terrestres compartan algunos de sus polinizadores; aunque con flores de plantas acuáticas la interacción no se relaciona solamente con recompensas florales, como es común de la polinización en el medio terrestre; las visitas a las flores de plantas acuáticas también pueden deberse a su uso como lugares para apareamiento, refugio o protección y para captura de presas (Philbrick y Les, 1996).

La forma de reproducción vegetativa puede ser determinante en varios procesos poblacionales de plantas acuáticas, como su establecimiento, crecimiento y persistencia, tal es el caso de la exitosa proliferación de varias especies de plantas acuáticas fuera de sus rangos de distribución nativa (Philbrick y Les, 1996). Entre los factores que probablemente han favorecido la reproducción asexual en plantas acuáticas están la reducción de tejidos de soporte mecánico y de conducción, así puede ocurrir fragmentación y establecimiento de estos fragmentos, sin consecuencias negativas por daño en el tejido de conducción y la inmediatez del

medio acuático para el establecimiento de propágulos. Asimismo, en algunas especies se ha observado una relación inversamente proporcional entre producción de flores y semillas en relación con biomasa vegetativa, probablemente resultado de una disyuntiva en la asignación de recursos, en algunas plantas incluso, se desarrollan turiones en los tallos florales (Philbrick y Les, 1996; Adamec, 2018). El desempeño de la reproducción asexual a través de órganos especializadas está relacionado con otras funciones que llevan a cabo simultáneamente, incluyendo la dispersión, adquisición de recursos, almacenamiento, protección, anclaje y perennación (Grace, 1993, Cronk y Fennessy, 2009).

2.9 La familia Menyanthaceae

Menyanthaceae Humor. es una familia cosmopolita con seis géneros: *Liparophyllum* Hook. f., *Menyanthes* L., *Nephrrophyllidium* Gilg, *Nymphoides* Ség., *Ornduffia* Tippery & Les y *Villarsia* Vent (Tippery y Les, 2009). Con un total de entre 60 y 70 especies de plantas herbáceas que habitan ambientes acuáticos o húmedos. Sus flores son llamativas, de corolas blancas, rosadas o amarillas, y producen néctar por cinco glándulas o un disco en la base del ovario (Kadereit, 2007). La heterostilia es una condición ancestral para la familia y ha sido perdida evolutivamente varias veces de manera independiente (Tippery *et al.*, 2008). Algunas especies son hermafroditas homostílicas (con solo un morfo floral), además de cuatro especies dioicas (con individuos exclusivamente femeninos o masculinos) y una especie ginodioica (con individuos hermafroditas y otros solamente femeninos) dentro del género *Nymphoides* (Kadereit, 2007). La reproducción asexual comúnmente es por división de las plantas, resultando en rametos individuales, además puede haber regeneración vegetativa a partir de porciones de rizoma desprendidas de plantas ya establecidas, y algunas especies producen estolones que comienzan a enraizar y posteriormente se separan de la planta madre (Kadereit, 2007). Los frutos de la mayoría de las especies de esta familia son cápsulas que pueden ser dehiscentes o indehiscentes, en *Nymphoides* las infrutescencias están sumergidas y los frutos se abren después de la descomposición de los pedúnculos que los sostienen (Kadereit, 2007). La dispersión de las semillas generalmente es a través del agua, promovida por su flotabilidad, debido a la presencia de pelos o células llenas de aire y a su superficie hidrofóbica (Chuang y Ornduff, 1992; Kadereit, 2007). Los pelos de algunas especies pueden

servir para epizoocoría: dispersión por superficies externas de animales, como el caso de *N. peltata* y su dispersión por aves acuáticas (Cook, 1990).

Nymphoides es un género con alrededor de 56 especies de plantas herbáceas acuáticas tropicales y subtropicales, casi siempre perennes, con rizomas que producen raíces adventicias, estolones y hojas, sus flores crecen en cimas o conjuntos parecidos a umbelas, casi siempre son pentámeras (algunas tetrámeras; *N. indica* comúnmente tiene seis o siete pétalos) (Tippery y Les, 2011; Tippery com. pers., POWO, 2022). En Norteamérica hay cuatro especies nativas de *Nymphoides*, en Estados Unidos: *N. aquatica* y *N. cordata*, ambas dioicas y en México: *N. fallax* y *N. humboldtiana* (Tippery y Les, 2011; Lot, 2017).

2.10 Especie focal: *Nymphoides fallax*

Nymphoides fallax Ornduff es una planta herbácea acuática, tetraploide ($2n = 36$ cromosomas), enraizada de hojas flotantes, comúnmente perenne; tiene inflorescencias en fascículos, con 2 a 20 flores sumergidas antes y después de la antesis, la corola es amarilla y está compuesta de lóbulos oblongos con pubescencia densa, alas fimbriadas en sus márgenes y una serie de pelos cerca de la base, sus frutos son cápsulas de ovoides a globosas, contienen de 10 hasta 29 semillas con tubérculos solitarios o en grupos de 2 a 6, en densidad variable o bien pueden ser lisas (Ornduff, 1969; Lot, 2017; Calderón-de Rzedowski y Marroquín, 2010; Lobato-de Magalhães y Martínez, 2020). Es una especie recurrente en humedales del centro de México, típicamente en densidades altas (Figura 8) (Lobato-de Magalhães y Martínez, 2018; Lobato-de Magalhães *et al.*, 2019).

Su anatomía es típica de una planta acuática: tiene abundante aerénquima en todos los órganos a excepción de las raíces, las terminaciones de las venas de las hojas terminan en hidatodos o estomas poco diferenciados sin mecanismo de apertura y cierre, e hidropoten o grupos de células pequeñas y abultadas en el envés de las hojas (Martínez y Gómez-Sánchez, 2006). Se han encontrado 75 especies de zooplancton (de una comunidad de 92 especies en total) asociadas a *N. fallax* en un cuerpo de agua del Estado de México (Espinosa-Rodríguez *et al.*, 2021). Asimismo, se ha cuantificado la variación de biomasa en estratificación vertical durante un ciclo anual, en una laguna del estado de Hidalgo. La producción anual neta fue de

3070.1 g PS m² (gramos de peso seco por metro cuadrado), alcanzando su máximo en junio, los órganos tienen una contribución variable a la biomasa: 10% de las hojas, 40% de los peciolos y tallos, las raíces y demás órganos subterráneos un 50% (Quiroz-Flores *et al.*, 2014).

Nymphoides fallax es una especie distílica (Figura 9) que además de tener hercogamia, presenta diferencias en el tamaño de varias características florales, destacan diferencias en el tamaño del estigma, de las papilas estigmáticas y de los granos de polen (Figuras 10 y 11). Sin embargo, tiene un número similar de óvulos y una producción de semillas equitativa en una población estudiada de un humedal temporal del centro de México (Lobato-de Magalhães y Martínez, 2020). Es notable, la falta de información respecto a la reproducción y al síndrome heterostílico, destacando la existencia y efectividad de incompatibilidad en la mayoría de las especies (Tippery y Les, 2011).



Figura 8. Varios individuos de *Nymphoides fallax* en floración. Fuente: Fotografía de Tatiana Lobato de Magalhães.

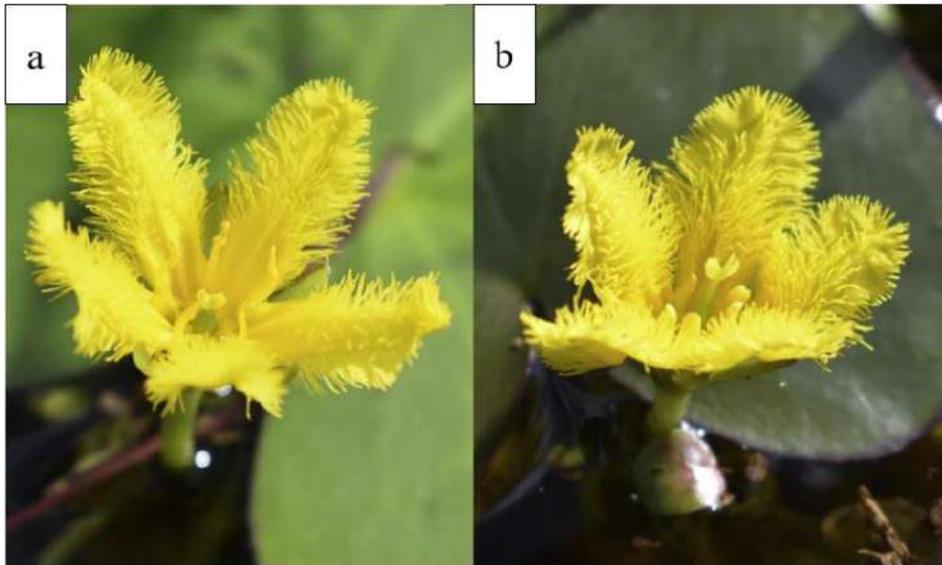


Figura 9. Flores de los morfos S (a) y L (b) de *Nymphoides fallax*. Fuente: Adaptado de Lobato-de Magalhães y Martínez (2020).

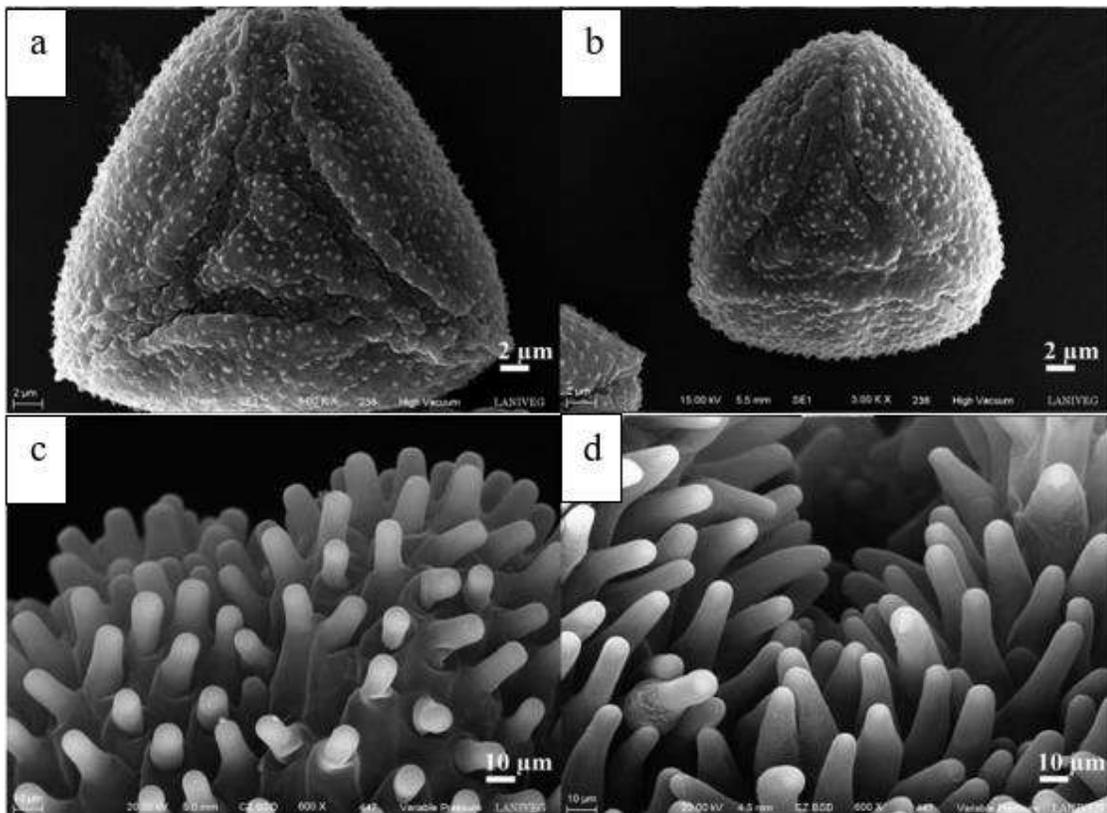


Figura 10. Granos de polen del morfo S (a), del morfo L (b), y papilas del estigma del morfo S (c) y del morfo L (d) de *Nymphoides fallax*. Fuente: Adaptado de Lobato-de Magalhães y Martínez (2020).

3. HIPÓTESIS

H1: El sistema de apareamiento de *Nymphoides fallax* será la xenogamia y expresará auto-incompatibilidad heteromórfica, es decir, las cruzas intermorfo serán las únicas que produzcan semillas o en mayor cantidad.

H2: Las poblaciones dimórficas serán isopléticas, esto se refiere a una proporción equitativa de los morfos.

H3: El sistema de polinización de *Nymphoides fallax* será generalista, con visitantes florales de varios ordenes de insectos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Describir aspectos de la biología reproductiva de *Nymphoides fallax*.

4.2 Objetivos particulares

- i. Determinar el sistema de apareamiento y probar si existe autoincompatibilidad heteromórfica en *N. fallax*;
- ii. Describir aspectos la fenología floral, estimar la relación polen/óvulo y la viabilidad de los granos de polen de *N. fallax*;
- iii. Estimar la proporción de morfos florales en poblaciones de *N. fallax* en estado natural;
- iv. Identificar el ensamblaje de visitantes florales en poblaciones de *N. fallax* en estado natural, y estimar su tasa de visitas a las flores.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Área de estudio y colecta de plantas para cultivo

El área de estudio está ubicada en los municipios de Pedro Escobedo, Amealco de Bonfil, Huimilpan y San Juan del Río del estado de Querétaro, México. El clima de la región es templado subhúmedo con lluvias en verano (tipo C(w₂)) (UNAM, 2012). La región forma parte de la provincia fisiográfica de la Faja Volcánica Transmexicana y la vegetación circundante se compone de bosque de encino y pastizales, aunque existe degradación por la presencia de actividades agrícolas (Martínez y García-Mendoza, 2001; CONABIO, 2022). Las poblaciones se localizan en siete cuerpos de agua naturales y alterados, en estos cuerpos de agua se colectaron plantas para cultivo para observaciones sobre la fenología de la flor y para el experimento de polinización controlada. Las poblaciones, adicionalmente fueron utilizadas para el conteo de morfos, para la observación y colecta de visitantes florales (Cuadro 2) (Figura 11).

Cuadro 2. Sitios de estudio. C= colecta de plantas para el experimento de polinización controlada, M= conteo de morfos, O= observación de visitantes florales.

Sitio	Municipio	Coordenadas geográficas (Lat, Long)	Altitud (m.s.n.m.)	Actividades realizadas
1	Pedro Escobedo	20°24'38.2''N, 100°15'58.6''O	2302	CMO
2	Pedro Escobedo	20°24'57.6''N, 100°15'53.9''O	2257	MO
3	Amealco de Bonfil	20°17'25.6''N, 100°11'05.4''O	2312	MO
4	Amealco de Bonfil	20°18'10.4''N, 100°12'52.7''O	2381	M
5	Pedro Escobedo	20°23'55.3''N, 100°16'03.6''O	2316	CMO
6	Huimilpan	20°21'20.0''N, 100°16'28.0''O	2339	CM
7	San Juan del Río	20°19'43.1''N, 100°07'56.0''O	2227	C

Fuente: Elaboración propia.

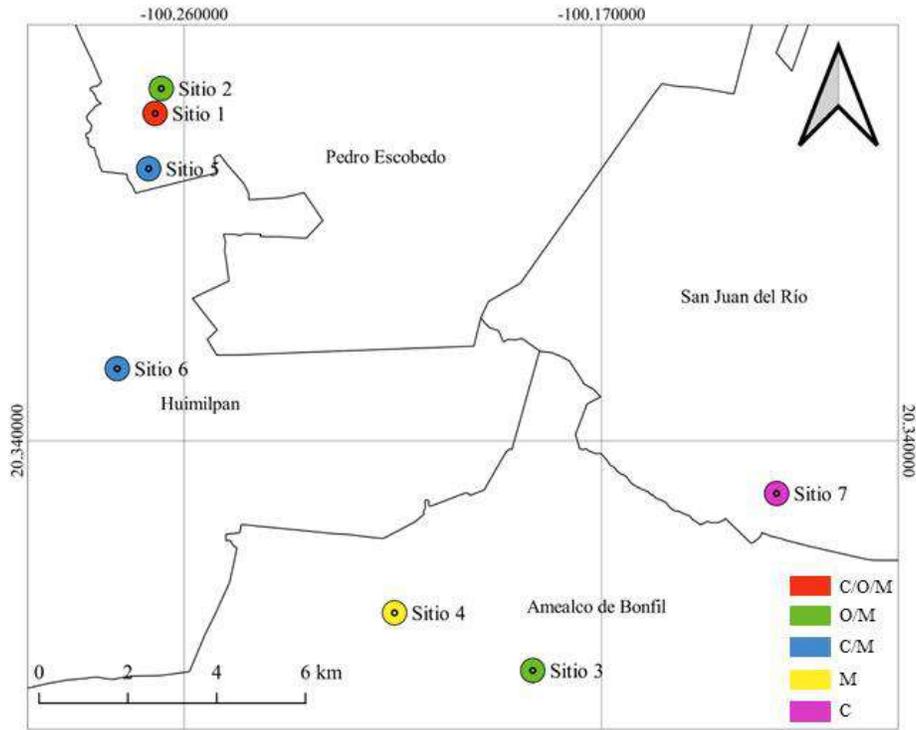


Figura 11. Sitios de estudio en los municipios de Pedro Escobedo, Amealco de Bonfil, Huimilpan y San Juan del Río, en el sur del estado de Querétaro. C= colecta de plantas para el experimento de polinización controlada, M= conteo de morfos, O= observación de visitantes florales. Fuente: Elaboración propia.

Los humedales temporales de esta región se mantienen con agua durante seis a nueve meses, su formación generalmente ocurre entre mayo y junio, en lugares de relieve plano y drenaje deficiente, su desecación ocurre entre diciembre y febrero, aunque hay años que no se forman (Figura 12) (Martínez y García-Mendoza, 2001; Zamudio *et al.*, 1992). Los humedales temporales de la zona albergan gran diversidad de plantas acuáticas, aunque presentan alta presión por degradación antrópica debido a su cercanía a poblaciones humanas. Estos sitios son vulnerables a procesos de excavación, conversión a presas, drenaje, contaminación y conversión de uso del suelo (Lobato-de Magalhães y Martínez, 2018). En la región, además, son comunes los bordos, estos son presas pequeñas construidas o muchas veces promovidas en sitios que fueron humedales naturales y llegan a funcionar como hábitat crucial para las especies de plantas y animales acuáticas (Martínez y García-Mendoza, 2001; Lobato-de Magalhães y Martínez, 2020).

Entre marzo y mayo de 2021 se colectaron al menos 10 plantas por población en cuatro poblaciones de *Nymphoides fallax* (Figura 12) para cultivo en el Jardín Botánico de la Universidad Autónoma de Querétaro. Las plantas colectadas fueron cultivadas en tinas de 210 L con sustrato compuesto de tierra negra, arena, tepojal y fertilizante osmocote (en proporciones 3:1:1:1), la mayoría de las plantas fueron colocadas en macetas sobre el sustrato de la tina. Estas plantas fueron utilizadas para observación de la fenología floral, para el conteo de polen y óvulos, y el experimento de polinización controlada.



Figura 12. Fotografías de algunos sitios de estudio: sitios 1, 3 y 5 (cuerpos de agua temporal), sitio 2 (cuerpo de agua permanente). Fuente: Tatiana Lobato-de Magalhães.

5.2 Fenología floral, relación polen/óvulo y viabilidad del polen

Las observaciones de la fenología floral se llevaron a cabo en mayo de 2021. Se hizo el seguimiento de 45 botones florales de varios individuos para describir: horario de antesis, duración de las flores y dehiscencia de las anteras (Dafni, 1992). A partir de la antesis de la flor, las observaciones se realizaron a intervalos de 10 minutos. Para probar la receptividad del estigma se utilizaron 21 flores colectadas en tres horarios: 12 alrededor de las 9:45 am (cerca de la hora de antesis), 9 a las 12:45 pm (3 horas posterior a la antesis) y 6 a las 15:45 pm (6 horas posterior a la antesis). Se realizó la prueba de presencia de peroxidasa, aplicando una gota de peróxido de hidrógeno con una pipeta de Pasteur a los estigmas y en caso de registrar burbujeo (un indicativo de actividad enzimática) se consideró receptivo el estigma (Kearns e Inouye, 1993).

La relación polen/óvulo (P/O) se obtuvo con seis flores de cada morfo, aisladas previamente a su antesis para evitar pérdida de polen con el método propuesto por Cruden (1977). Se separó una antera de cada flor en un tubo de microcentrífuga con 600 μ L de hidróxido de potasio (KOH) al 10%, se calentaron los tubos a baño maría por 15 minutos para romper los tejidos de la antera y obtener el mayor número de granos de polen posible, posteriormente se usó una centrífuga a 2000 rpm por 2 minutos para homogeneizar las muestras. El número de granos de polen en cada tubo se estimó con 10 μ L de la muestra un contador celular (Corning Cell Counter) y se hizo la conversión para el volumen de la muestra. Los ovarios de las flores se diseccionaron bajo microscopio estereoscópico para contar el número de óvulos (Márquez *et al.*, 2016).

Para evaluar la viabilidad del polen, se usaron siete flores del morfo L y cuatro del morfo S. Se colocaron todas las anteras de cada flor en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se añadieron 200 μ L de reactivo de Alexander, después se homogeneizaron con un mezclador de vórtice. De cada tubo se tomaron 15 μ L, se colocaron en un portaobjetos para su observación en el microscopio óptico con el objetivo de 10x; en 10 campos se contó el número de granos de polen viables y no viables, este último paso se repitió tres veces para tener un total de 30 campos por flor. El reactivo de Alexander tiñe los granos de polen viables de tonalidad morada y la cubierta celular verde (Márquez *et al.*, 2016).

5.3 Experimento de polinización controlada

Una vez que las plantas se establecieron y comenzaron su floración, se hicieron seis tratamientos de polinización controlada y dos controles (uno para cada morfo) siguiendo la metodología modificada de Haddadchi (2013) y Massinga *et al.*, (2005): dos cruza entre morfos opuestos ($S \times L$; $L \times S$), dos entre el mismo morfo, pero en diferentes individuos ($S \times S$; $L \times L$), dos de autopolinización y dos grupos control, es decir, flores sin manipulación (Cuadro 3). Por cada tratamiento y control, se realizaron 10 repeticiones ($N=80$), usando flores sucesivas de las mismas plantas. Cada flor fue aislada antes de la antesis con una bolsa de pergamino sostenida por una estaca de madera enterrada en el sustrato de la tina, para evitar fuentes externas de granos de polen (Figura 14). Una vez ocurrida la antesis se transfirió polen deseado al estigma de la flor, usando un triángulo pequeño y desechable de papel filtro, posteriormente se volvieron a aislar las flores (Dafni, 1992). Se registró el estado de los restos de la flor a las dos y cuatro semanas después de haberse efectuado la cruza. El primer registro funcionó como un indicador preliminar para determinar si se estaba desarrollando un fruto, y el segundo corresponde a la fecha aproximada para la colecta de los frutos. Se registró el tiempo de formación de los frutos y el número de semillas contenidas.



Figura 13. Aislamiento de flores para el experimento de polinización, para cada una se usó una bolsa de pergamino sostenida por una pinza a una estaca delgada de madera, enterrada en el sustrato de la tina. Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 3. Tratamientos y grupos control del experimento de polinización manual, se indica el morfo donador y receptor de polen.

Tratamiento	Donador de polen	Receptor de polen
SxL	S	L
LxS	L	S
SxS	S	S (diferente individuo)
LxL	L	L (diferente individuo)
Autopolinización S	S	S
Autopolinización L	L	L
Control S	-	-
Control L	-	-

Fuente: Elaboración propia.

5.4 Proporción de morfos en poblaciones naturales

Los humedales se recorrieron en transectos paralelos a los márgenes del humedal para registrar el número de individuos de cada morfo y obtener su proporción, considerando una distancia mínima de 3 metros entre individuos, en caso de encontrar una densidad alta de individuos se contaron mínimo 100 individuos, para poblaciones pequeñas se consideró toda la población (Haddadchi, 2013; Lobato-de Magalhães y Martínez, 2020) (Apéndice B).

5.5 Observación de visitantes florales

Para estimar la tasa de visitas a las flores, en cada visita a los sitios se realizaron ocho observaciones de 15 minutos. Se contó el número de flores observadas y el número de visitas a las flores, el criterio fue que hubiera contacto con el estigma, las anteras o con la parte interna de la flor. En campo, se identificó visualmente a los visitantes al menor nivel taxonómico posible, y al menos a nivel de orden (i.e., Lepidoptera, Hymenoptera, Diptera, Coleoptera). La finalidad del muestreo no destructivo es evitar afectar la abundancia y comportamiento de los visitantes durante el resto de las observaciones (Stewart y Waitayachart, 2020).

Las unidades de muestreo se establecieron en parches de entre 8-34 flores dependiendo de la disponibilidad y al menos una distancia entre sí de 5 metros, siguiendo la metodología modificada de Dietzsch *et al.*, (2011) (Apéndice B). Se intentaron repartir equitativamente las unidades de muestreo dentro del cuerpo de agua, de ser posible se dividió en cuatro cuadrantes (dos unidades de muestreo en cada cuadrante), pero esto dependió de la distribución de *Nymphoides fallax* (a veces irregular) dentro del cuerpo de agua.

5.6 Observación de polen en el cuerpo de visitantes florales selectos

Se colectaron algunos insectos con red entomológica y frascos a manera de cámara letal, para su observación en el microscopio electrónico de barrido EVO-50 Carl Zeiss (Carl Zeiss MicroImaging, Jena, Alemania) utilizando el software SmartSEM® v05.06, para examinar si transportaban granos de polen de *Nymphoides fallax* y la parte del cuerpo de adhesión. Los insectos fueron seleccionados después de las primeras observaciones de visitantes florales, los criterios de selección fueron la frecuencia y duración de sus visitas a las flores, además de su comportamiento en ellas. Se observaron individuos de los tres visitantes más frecuentes: una abeja melífera (*Apis mellifera*), tres dípteros de la familia Ephydriidae (agrupados en el segundo visitante más frecuente), un díptero de la familia Syrphidae y un díptero de la familia Stratiomyidae (ambos agrupados en el tercer visitante más frecuente).

6. RESULTADOS

6.1 Fenología floral, relación polen/óvulo y viabilidad del polen

Las flores de *Nymphoides fallax* son diurnas y tienen una duración de un día, la antesis puede comenzar desde las 8:40 h, pero la mayoría se concentra desde las 08:50 h hasta las 09:20 h en plantas en cultivo. En el campo se observó el mismo horario de antesis de las flores (Figura 14, 15). Desde su apertura, las anteras están dehiscentes y con polen disponible. *Apis mellifera* comienza a visitar las flores, incluso cuando los pétalos aún no se extienden por completo. A las 15:40 h la mayoría de las flores se observaron marchitas, a las 17:40 h algunas comienzan a hundirse, mientras los botones florales que abrirán el siguiente día comienzan a emerger del agua. Al día siguiente, el cáliz sigue persistente, hay restos de la corola, muchas mantienen el estilo y algunas incluso el estigma. Todas las flores en las que se evaluó la receptividad del estigma presentaron burbujeo al contacto con peróxido de hidrógeno, en los tres tiempos analizados (09:45, 12:45 y 15:45 h), sugiriendo que el estigma es receptivo durante la mayor parte de la vida de la flor (Figura 16).

Una vez que las plantas se establecieron y comenzó su floración, se realizó el conteo del número promedio de granos. Este fue inferior en el morfo S (morfo S: 65000 ± 13247 granos de polen/flor, 16.5 ± 7.69 óvulos/flor, 44423.69 ± 1288.88 granos de polen/óvulo; morfo L: 80750 ± 27654.57 granos de polen/flor, 14.5 ± 3.73 óvulos/flor, 5756.14 ± 1788.64 granos de polen/óvulo) (Cuadro 4; Figura 17). No se encontraron diferencias significativas entre los morfos para el número de granos de polen ($F= 1.58$, $gl= 1$, $p= 0.23$), óvulos ($F= 0.32$, $gl= 1$, $p= 0.57$) y relación polen/óvulo ($F= 2.19$, $gl= 1$, $p= 0.16$). Se encontró alta viabilidad de los granos de polen, con valores del 80 a 100 %; promedio 96.54% (Cuadro 5; Figuras 18, 19).



Figura 14. Antesis de las flores de *Nymphoides fallax*. El cambio más notorio es el desdoblamiento de los pétalos. Todas las fotografías corresponden a una flor del morfo L, a excepción de la flor abierta. Fuente: Fotografías de Manuel Navarrete y Tatiana Lobato de Magalhães.

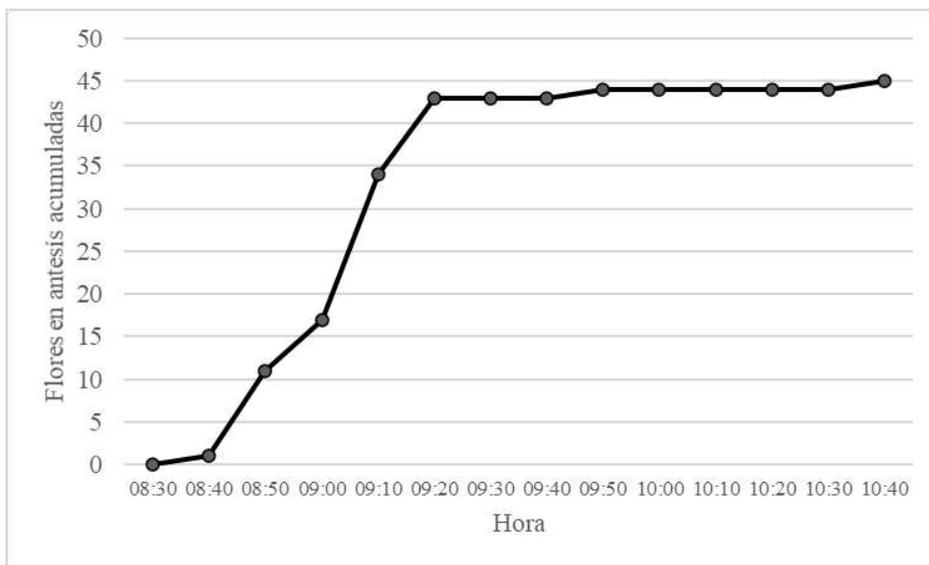


Figura 15. Acumulación de flores en antesis en un periodo de dos horas (8:40-10:40 hrs). Fuente: Elaboración propia.



Figura 16. Burbujeo en el estigma de una flor de morfo L al contacto con peróxido de hidrógeno, sugiriendo que se encuentra receptivo. Fuente: Elaboración propia.

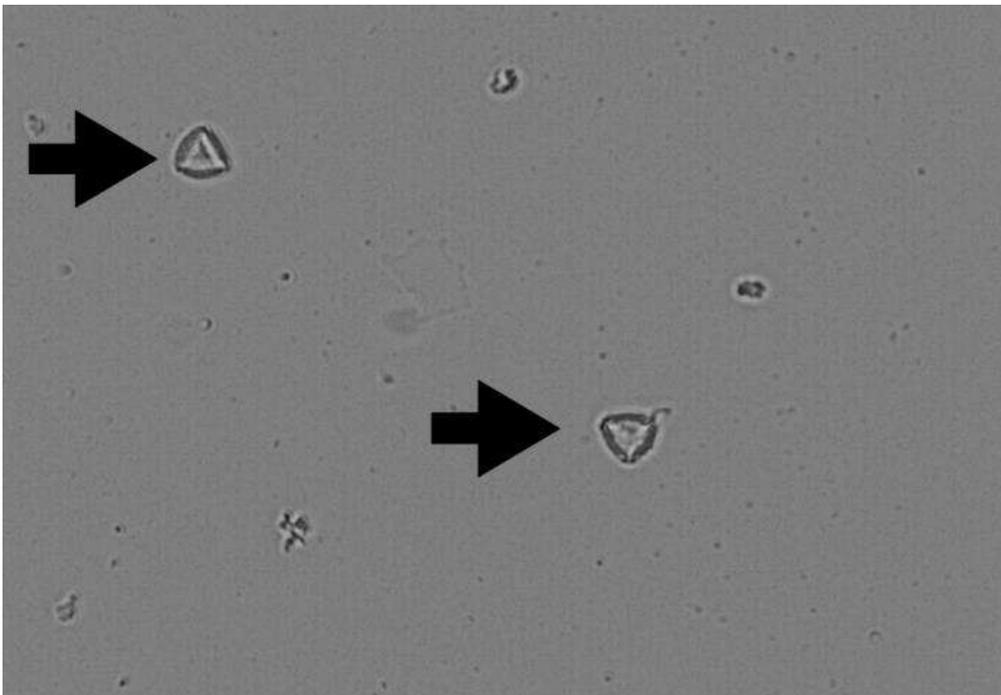


Figura 17. Granos de polen (señalados con flechas negras) observados con el contador de células. Fuente: Elaboración propia.

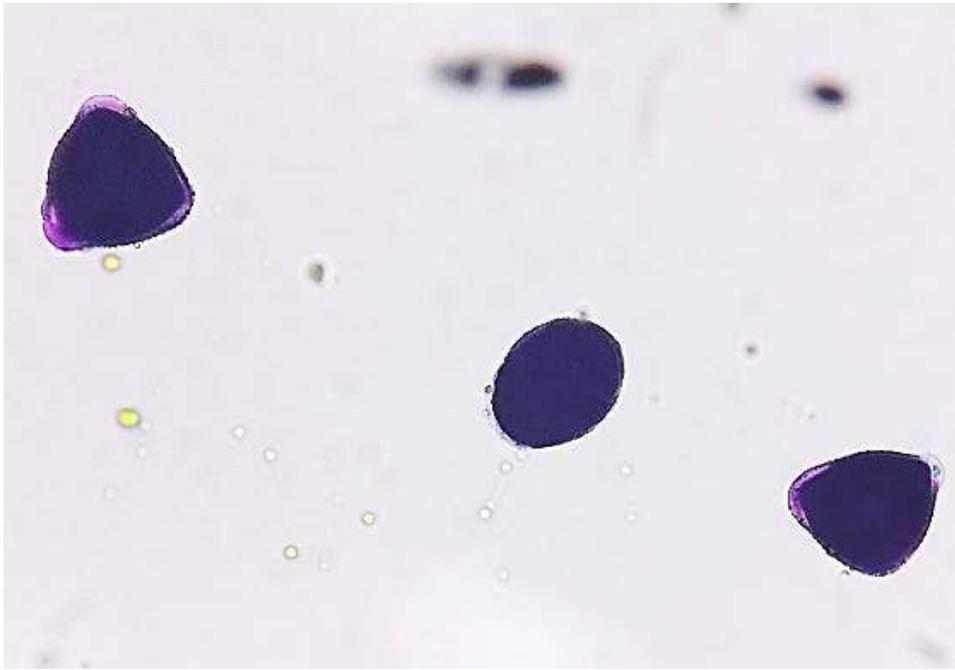


Figura 18. Granos de polen viables teñidos con el reactivo de Alexander, observados en el microscopio óptico. Fuente: Elaboración propia.

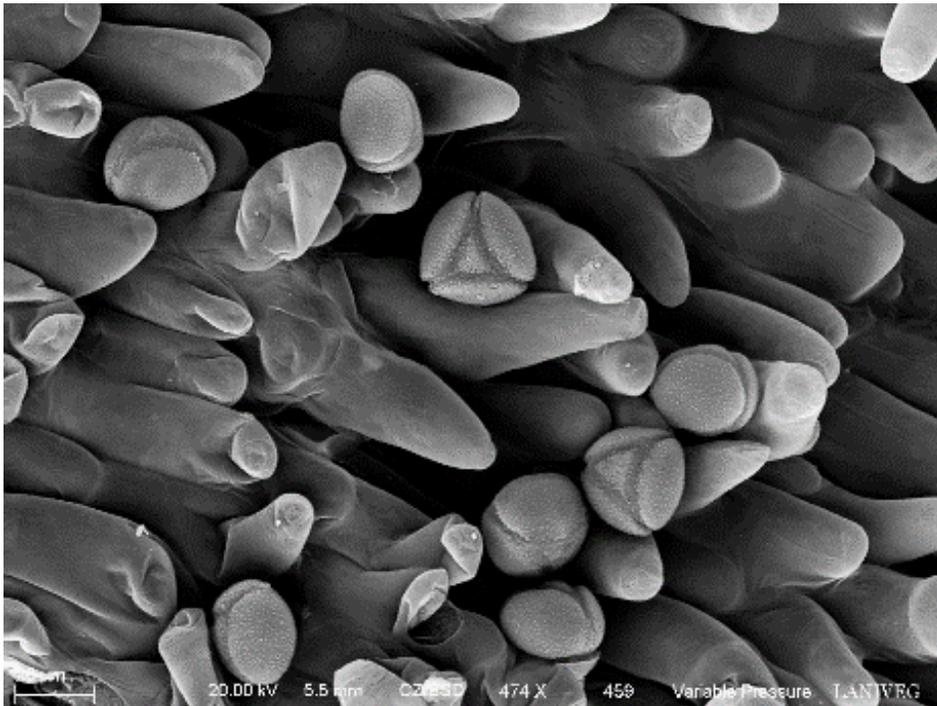


Figura 19. Granos de polen en el estigma de *Nymphoides fallax* observados en microscopio electrónico de barrido. Fuente: Fotografía de Ana Lucía Tovar.

Cuadro 4. Número de granos de polen, óvulos y relación polen/óvulo (P/O) de los morfos S, L y en conjunto.

Característica	Morfo S	Morfo L	Ambos morfos
Granos de polen/flor (media ± desviación estándar)	65000 ± 13247.64	80750 ± 27654.57	72875 ± 22249.74
Óvulos/flor (media ± desviación estándar)	16.5 ± 7.69	14.5 ± 3.73	15.5 ± 5.85
Relación polen/óvulo (media ± desviación estándar)	4423.69 ± 1288.88	5756.14 ± 1788.64	5089.91 ± 1641.19

Fuente: Elaboración propia.

Cuadro 5. Porcentaje de viabilidad de los granos de polen divididos por morfo y en conjunto.

	Morfo S	Morfo L	Ambos morfos
Rango	98.82 – 100%	80 – 98.14%	80-100%
Promedio	99.24%	94.99%	96.54%

Fuente: Elaboración propia.

6.2 Experimento de polinización controlada

Los tratamientos intermorfo fueron los más exitosos en la producción de frutos: S × L (90%) y L × S (80%). Los tratamientos de autopolinización e intramorfo en general no produjeron frutos, con excepción de dos cruza de autopolinización L (20%), una cruza intramorfo S (10%) y una cruza intramorfo L (10%). El tratamiento de autopolinización S y los grupos control no produjeron frutos. El tiempo de formación de frutos varió entre 27 y 44 días, en promedio 34.84 días (Cuadro 6). Los tratamientos que produjeron más semillas de forma significativa ($F= 15.94$, $gl= 7$, $p= 1.83 \times 10^{-12}$) fueron las cruza intermorfo (S × L; L × S) (Figura 20). En promedio, S × L produjo 10.6 semillas, L × S 7.9 semillas, el tratamiento

de autopolinización L produjo 0.6 semillas y, por último, ambas cruza intramorfo, 0.1 semillas. Respecto al número de semillas promedio por fruto, se mantiene el mismo orden: $S \times L$ (11.78 semillas), $L \times S$ (9.88 semillas), autopolinización L (3 semillas) y ambas cruza intramorfo (1 semilla) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentaje de frutos desarrollados, número de semillas por tratamiento, por fruto y número de días para la formación de semillas. $S \times L$ = cruza intermorfo (polen de morfo S sobre estigma de morfo L), $L \times S$ = cruza intermorfo (polen de morfo L sobre estigma de morfo S), $S \times S$ = cruza intramorfo S, $L \times L$ = cruza intramorfo L, A-S= autopolinización morfo S, A-L= autopolinización morfo L, C-S= control morfo S, C-L= control morfo L.

Observación/Tratamiento	$S \times L$	$L \times S$	$S \times S$	$L \times L$	A-S	A-L	C-S	C-L
Porcentaje de frutos desarrollados	90%	80%	10%	10%	0%	20%	0%	0%
Número de semillas (por tratamiento) mínimo (promedio) máximo \pm desviación estándar	0 (10.6) 16 \pm 5.5	0 (7.9) 24 \pm 7.7	0 (0.1) 1 \pm 0.3	0 (0.1) 1 \pm 0.3	-	0 (0.6) 3 \pm 1.3	-	-
Número de semillas (por fruto) mínimo (promedio) máximo \pm desviación estándar	4 (11.8) 16 \pm 4.4	3 (9.9) 24 \pm 7.3	1 (1) 1	1 (1) 1	-	3 (3) 3 \pm 0	-	-
Número de días promedio para formación de semillas	34.5	36.6	27	33	-	35	-	-

Fuente: Elaboración propia.

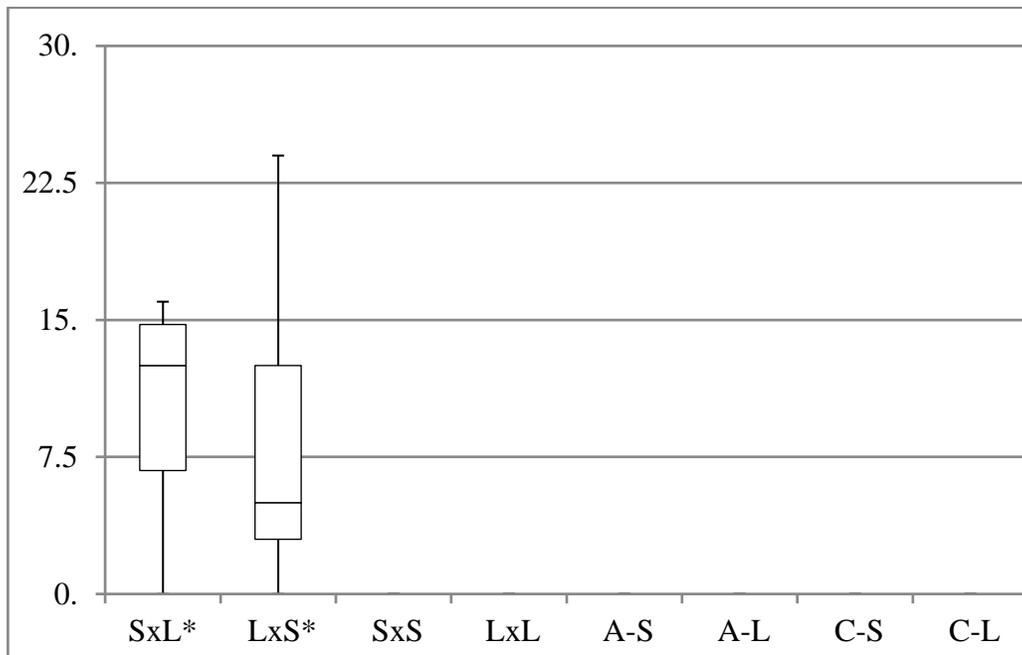


Figura 20. Producción de semillas por tratamiento. Las barras representan los rangos de datos. El tratamiento $S \times L$ tiene una media de 10.6 y mediana de 12.5 (línea). El tratamiento $L \times S$ tiene una media de 7.9 y mediana de 5 (línea). * = diferencias significativas ($p= 1.83 \times 10^{-12}$). Fuente: Elaboración propia.

Dos semanas después de haberse realizado la cruce, era evidente si el ovario se estaba desarrollando en fruto, debido a su color verde y ensanchamiento. Sin embargo, en los frutos producidos por los tratamientos intramorfo y de autopolinización no fue así, el ovario se encontraba parecido a su tamaño inicial y se parecía más a aquellos casos donde no hubo fecundación exitosa. En algunos casos, una porción de la planta incluyendo los sus frutos en desarrollo y su hoja asociada se separaron del resto del individuo, los frutos continuaron su desarrollo mientras crecían raíces. La flor receptiva de polen de una repetición del tratamiento $L \times S$, tenía seis verticilos florales (no cinco como casi todas), produjo tres semillas.

6.3 Proporción de morfos en poblaciones naturales

La mayoría de las poblaciones estudiadas tiene una proporción cercana a 1:1 (sitios 1, 3, 4 y 5), y en dos poblaciones solo se encontró el morfo L (de estilo largo) (sitios 2 y 6) (Cuadro 7). Es destacable mencionar que en los sitios con presencia de ambos morfos se observó una gran cantidad de semillas flotando en la superficie del agua (Figura 21), lo que no fue observado en los dos sitios con morfo de estilo largo.

Cuadro 7. Porcentaje de individuos de cada morfo floral en poblaciones naturales de *Nymphoides fallax*.

Sitio	Porcentaje de morfos %	
	S	L
1	49	51
2	0	100
3	57	43
4	62	38
5	51	49
6	0	100

Fuente: Elaboración propia.



Figura 21. Semillas flotando en la superficie del agua en el sitio 1. Fuente: Fotografía de Manuel Navarrete.

6.4 Observación de visitantes florales

Se registraron 944 visitas de 28 morfoespecies a 891 flores de *Nymphoides fallax* en un periodo de 600 minutos de observación. Los visitantes florales pertenecen a seis ordenes de insectos: Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Lepidoptera, Odonata y Hemiptera y uno de arácnidos: Araneae (Cuadro 8). Los visitantes más frecuentes fueron: la abeja melífera (*Apis mellifera*) (Figura 22) con 43.64% del total de visitas, seguida de dípteros pequeños (tamaño 4-5 mm; Figura 23) con el 33.26% y un grupo de dípteros más grandes (tamaño 7.5-9 mm; Figura 24) realizó el 7.2% de las visitas. En ambos grupos de dípteros, no se hizo distinción entre morfoespecies durante las observaciones. Otros visitantes menos frecuentes fueron los lepidópteros *Leptophobia aripa*, *Catantix nimbice* (Figuras 25 y 26) y una mariposa perteneciente a la familia Hesperidae. La tasa de visitas a las flores de *Nymphoides fallax* en las unidades de muestreo varió entre 0 y 4.87 visitas por minuto, el promedio fue de 1.57 visitas por minuto. El promedio de tasa de visitas en el sitio 1 fue de 1.23 visitas por minuto, en el sitio 2 de 1.83 y en el sitio 3 de 1.74.

Cuadro 8. Número de morfoespecies de visitantes florales de *Nymphoides fallax* por orden, número de visitas y porcentaje que representan.

Orden	Número de morfoespecies	Número de visitas a las flores (porcentaje que representan del total)
Diptera	13	487 (51.59%)
Hymenoptera	3	436 (46.19%)
Lepidoptera	3	5 (0.52%)
Coleoptera	3	5 (0.52%)
Odonata	2	3 (0.32%)
Hemiptera	2	7 (0.74%)
Araneae	1	1 (0.11%)

Fuente: Elaboración propia.



Figura 22. *Apis mellifera* visitando una flor de *Nymphoides fallax* en el sitio 3. Fuente: Fotografía de Tatiana Lobato de Magalhães.



Figura 23. Díptero de la familia Ephydriidae (agrupado en el segundo visitante más frecuente) visitando una flor de *Nymphoides fallax* en el sitio 2. Fuente: Fotografía de Tatiana Lobato de Magalhães.



Figura 24. Díptero de la familia Stratiomyidae (agrupado en el tercer visitante más frecuente) visitando una flor de *Nymphoides fallax* en el sitio 3. Fuente: Fotografía de Tatiana Lobato de Magalhães.



Figura 25. *Leptophobia aripa* visitando una flor de *Nymphoides fallax* en el sitio 2. Fuente: Fotografía de Tatiana Lobato de Magalhães.

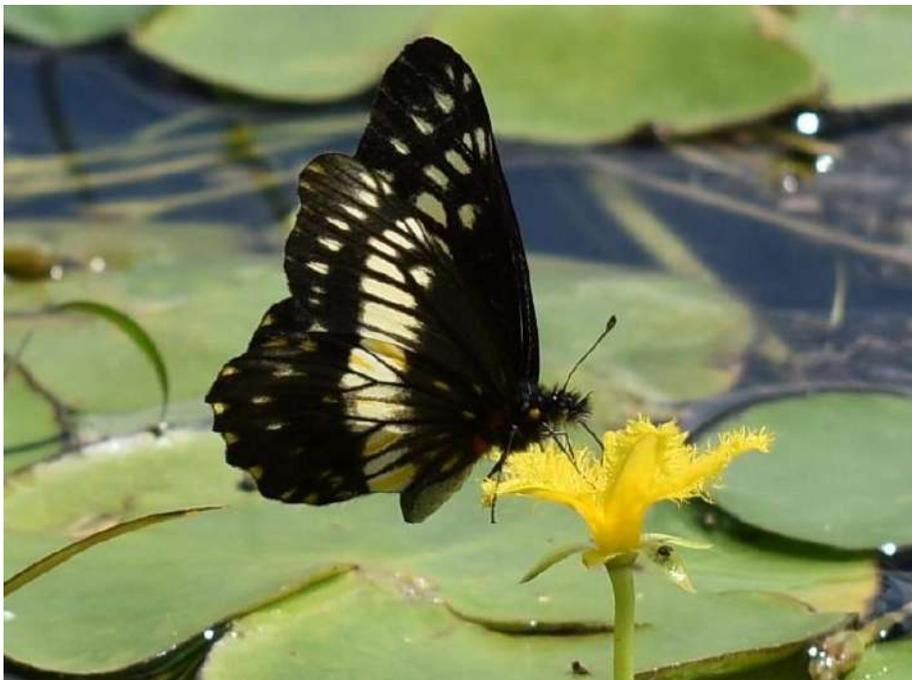


Figura 26. *Catasticta nimbice* visitando una flor de *Nymphoides fallax* en el sitio 2. Fuente: Fotografía de Tatiana Lobato de Magalhães.

6.5 Observación de polen en el cuerpo de visitantes florales selectos

Se encontró presencia de carga polínica de *Nymphoides fallax* en tres visitantes: en la abeja *Apis mellifera* se observó en la parte ventral del tórax, las corbículas y la probóscide (Figura 26), en uno de los dípteros de la familia Ephydridae el sitio de adhesión fue la parte dorsal del tórax (Figura 27), mientras que en el díptero de la familia Stratiomyidae la carga polínica se observó en el lado ventral del tórax y abdomen (Figura 28).

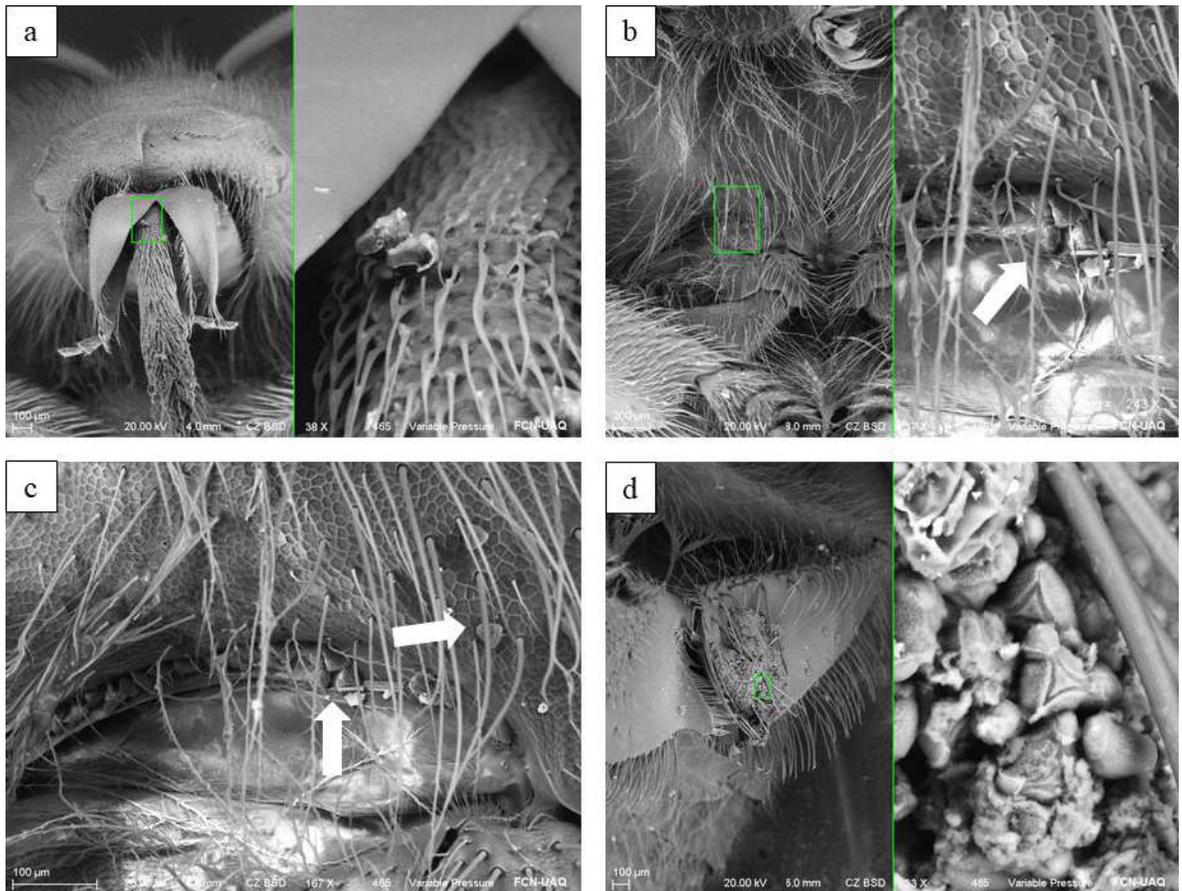


Figura 27. Carga polínica de *Nymphoides fallax* en la probóscide (a), tórax (b y c) y acercamiento a la corbícula (d) de una abeja melífera (*Apis mellifera*). Fuente: Fotografía de Ana Lucía Tovar.

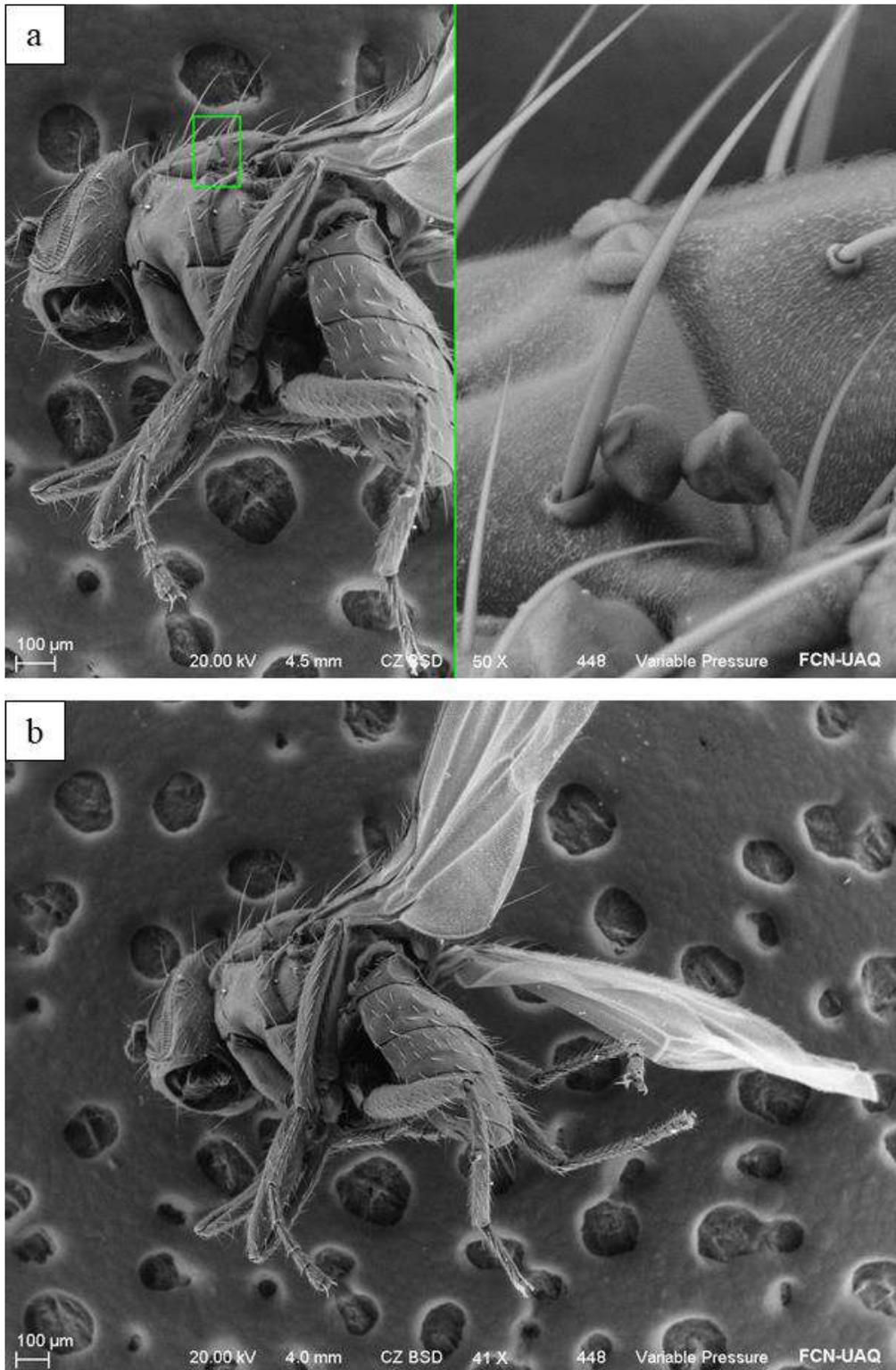


Figura 28. Carga polínica de *Nymphoides fallax* en la parte dorsal de tórax de un díptero (familia Ephydriidae). Fuente: Fotografía de Ana Lucía Tovar

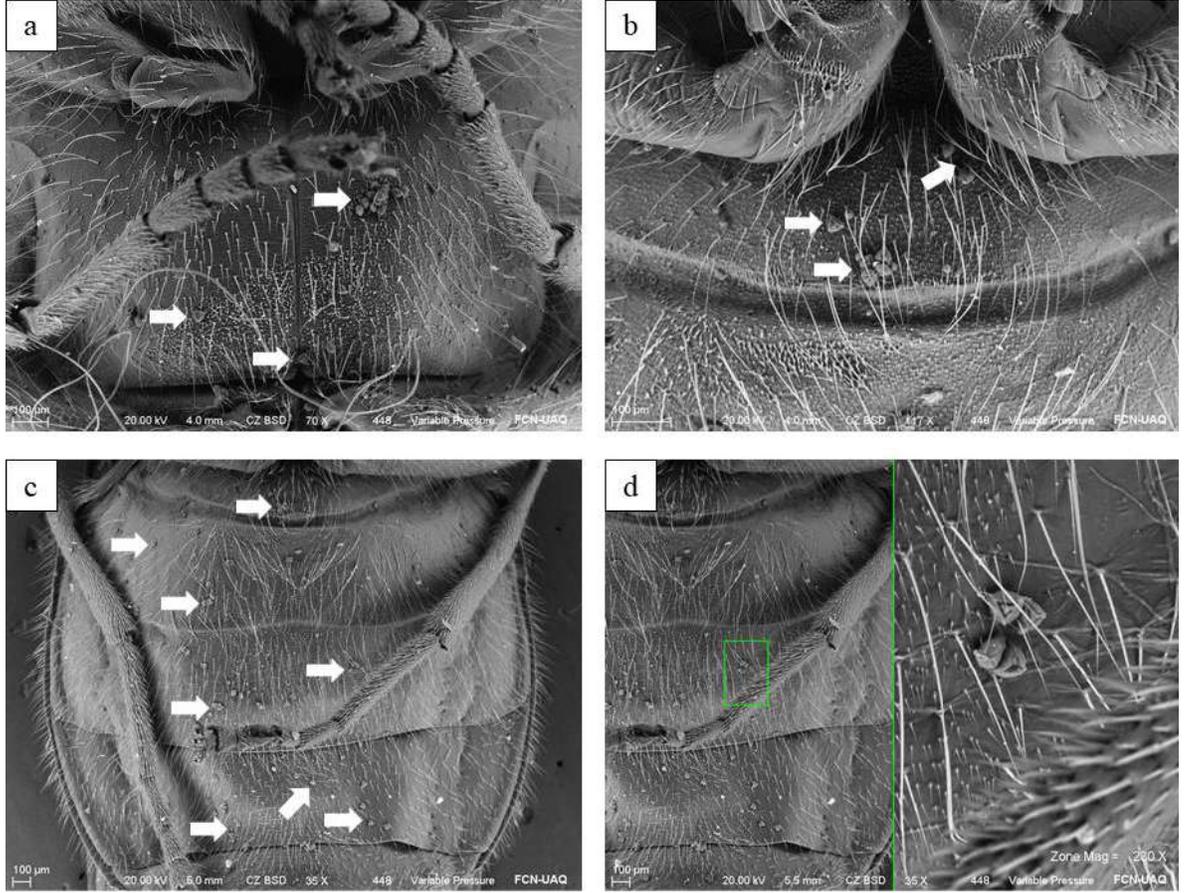


Figura 29. Carga polínica de *Nymphoides fallax* en la parte dorsal de tórax (a y b) y abdomen (c y d) de un díptero (familia Stratiomyidae). Se muestra un acercamiento a cuatro granos de polen (d). Fuente: Fotografía de Ana Lucía Tovar.

7. DISCUSIÓN

El modelo de longevidad floral óptima de Ashman y Schoen (1997), considera la duración de la flor como resultado de una estrategia de asignación de recursos, que se compone de la interacción de varios factores, incluyendo el costo de mantenimiento de una flor y su relación con el costo de formación de una nueva, la tasa a la que se recibe polen para fecundar a los óvulos y la tasa a la que el polen es dispersado, entrando en competencia para fecundar óvulos de otras flores. En esta investigación se observó que las flores de *Nymphoides fallax* son diurnas y tienen una duración de un solo día. Esto también ocurre en otras especies del género, incluyendo *N. peltata* y *N. geminata* (van-der-Velde y van-der-Heijden, 1981; Haddadchi y Fatemi, 2015). Es probable que la corta duración de las flores de *N. fallax*, se relacione con un costo alto de mantenimiento, esto se ha observado en especies que florecen de manera secuencial donde se superponen la floración y fructificación (Ashman y Schoen, 1997), como lo hace *N. fallax* en poblaciones de humedales temporales en tierras altas del centro de México. *Nymphoides fallax* tiene una época de floración amplia de junio a noviembre y cada individuo tiene un número alto de botones florales (96.81 ± 88.78) y frutos (121.25 ± 91.13) pero pocas flores en anthesis de manera simultánea (5.81 ± 4.36) (Lobato de Magalhães y Martínez, 2020). La longevidad de las flores también contribuye a determinar el tamaño del despliegue floral y su duración, e influye en el atractivo de la planta y en el patrón de apareamiento (Primack, 1985; Ashman, 2004). *Nymphoides fallax* frecuentemente presenta una sola flor por inflorescencia (Lobato de Magalhães y Martínez, 2020), esto podría reducir la posibilidad de geitonogamia (Ashman, 2004). Además, al encontrarse ambas funciones reproductivas en la flor, de manera simultánea, se infiere que la reducción de la interferencia sexual depende solamente de la heterostilia (Dai y Galloway, 2011). Asimismo, se registró alta viabilidad de los granos de polen (69 - 100%), como anteriormente se ha reportado para otras especies heterostílicas de la familia Menyanthaceae (i.e., *Ornduffia parnassifolia* y *Liparophyllum lasiospermum*) (Ornduff, 1986).

La relación polen/óvulo es un indicador conservador del sistema de apareamiento de las plantas, sin embargo, hay múltiples casos donde los valores observados no concuerdan con lo esperado, ya sea que cambie la magnitud de diferencia en el gradiente xenogamia-

cleistogamia (i.e., Plitmann y Levin, 1990) o son valores completamente diferentes, influenciados por otras características de la especie, por ejemplo en aquellas que dispersan polen agregado y no granos individuales, (i.e., Nazarov y Gerlach, 1997; Wyatt *et al.*, 2000). La relación polen/óvulo encontrada en esta investigación (5089.91 ± 1641.19) sugiere que el sistema de apareamiento de las poblaciones de *N. fallax* estudiadas es la xenogamia según Cruden (1977) y Erbar y Langlotz (2005). En otras especies del género *Nymphoides* nativas de Australia, se han registrado valores más bajos para la relación polen/óvulo; en *N. geminata* (especie homostílica con relación polen/óvulo de 110.53) y en *N. montana* (especie distílica, morfo L: relación polen/óvulo de 780.76, morfo S: 499.42; promedio: 640.09 (Haddadchi, 2013; Haddadchi y Fatemi, 2015).

La relación polen/óvulo puede ser útil para proponer hipótesis sobre el sistema reproductivo, y posteriormente probarlas con evidencia directa (Dafni, 1992; Erbar y Langlotz, 2005), por ejemplo, con un experimento de polinización controlada, como fue realizado en esta investigación. Es importante destacar, que la relación polen/óvulo y el sistema de apareamiento no son características fijas a nivel específico, puede existir variación entre las poblaciones, especialmente hacia los extremos de distribución de la especie (Erbar y Langlotz, 2005; Whitehead *et al.*, 2018). *Nymphoides fallax* se distribuye desde el norte de México hasta Guatemala (Ornduff, 1969) o Megaméxico II de acuerdo con Rzedowski (1991), las poblaciones estudiadas en esta investigación se encuentran hacia el centro de distribución de la especie, por lo tanto, es necesario evaluar la relación polen/óvulo y el sistema de apareamiento en otras zonas geográficas.

En especies heterostílicas, comúnmente el único tipo de fecundación exitosa es resultado de polinización legítima o intermorfo, debido a la presencia de un sistema de autoincompatibilidad que evita la fecundación después de un evento de autopolinización y polinización intramorfo (Barrett y Shore, 2008). Los resultados del experimento de polinización controlada coinciden que la xenogamia puede ser el sistema de apareamiento de *Nymphoides fallax* y confirman la existencia de autoincompatibilidad heteromórfica. Las cruza intermorfo fueron casi exclusivamente las únicas exitosas en la producción de frutos (S \times L: 90%; L \times S: 80%) y contuvieron un número promedio mayor de semillas por fruto (S \times L: 11.78; L \times S: 9.88) en comparación a los tratamientos intermorfo, autopolinización y control. En

otras especies heterostíficas de la familia Menyanthaceae se ha encontrado también la presencia de autoincompatibilidad heteromórfica (i.e., *Liparophyllum capitatum*, *L. latifolium*, *L. congestiflorum* y *Ornduffia parnassifolia*) y de varias otras familias (Ornduff, 1982; 1986; Barrett y Cruzan, 1994).

Sin embargo, la producción de semillas aquí registrada fue menor a la observada en frutos colectados en poblaciones naturales por Lobato-de Magalhães y Martínez (2020) (S: promedio 18.92; L: promedio 17.24). Esta variación en el número de semillas obtenido en un experimento de polinización controlada en plantas cultivadas, en contraste a plantas con polinización abierta en poblaciones naturales, puede ser resultado de limitación de polen debido a que se usó polen de una sola flor, mientras que las flores abiertas pueden ser polinizadas por múltiples visitantes e incrementar la producción de semillas (Karron *et al.*, 2006). También podría reflejar una variación poblacional de la especie en el número de óvulos y semillas (i.e., Müller *et al.*, 2000).

En poblaciones heterostíficas con autoincompatibilidad se espera una proporción equitativa de los morfos promovida por el apareamiento selectivo negativo (*disassortative mating*), es decir fecundación intermorfo (Barrett y Shore, 2008). Cinco de las siete poblaciones donde se realizó conteo de morfos son dimórficas (tienen ambos morfos) y en todas, su proporción fue cercana a 1:1, sin embargo, dos poblaciones son monomórficas (solo tienen el morfo L). En especies con amplia capacidad de reproducción vegetativa pueden ser más frecuentes las poblaciones monomórficas o con proporciones de los morfos sesgadas, particularmente en especies acuáticas, como *Decodon verticillatus*, *Hottonia palustris*, *Menyanthes trifoliata* y *Nymphoides indica* (Eckert y Barrett, 1995; Thompson *et al.*, 1998; Shibayama y Kadono, 2003; Brys *et al.*, 2007). Cabe destacar que durante el conteo de morfos y observación de insectos, en las poblaciones dimórficas se observó una gran cantidad de semillas flotando en la superficie del agua, mientras que en las poblaciones monomórficas estaban ausentes. No se recopilaron datos acerca de la cantidad de semillas flotando en la superficie o su presencia en el fondo de los humedales, pero se realizó colecta de semillas para estudios futuros. El acomodo espacial de los morfos en poblaciones heterostíficas es otro aspecto que puede tener efecto en el éxito reproductivo, algunas plantas con capacidad de

reproducción vegetativa pueden formar parches con alta abundancia de un solo morfo, promoviendo baja deposición de polen legítimo (i.e., Hicks *et al.*, 1985; Nic-Lughadha y Parnell, 1989; Thompson *et al.*, 1998). A pesar de tener capacidad de reproducción vegetativa en *Nymphoides fallax* es frecuente que individuos de ambos morfos se encuentren cercanos (Lobato-de Magalhães com. pers.), por lo que es necesario evaluar el efecto del acomodo espacial de los morfos en las poblaciones de *N. fallax* sobre el éxito reproductivo.

En la teoría de síndromes de polinización, las flores que son polinizadas por grupos de insectos como Diptera y Hymenoptera se encuentran entre las que tienen características más diversas entre sí y algunas de las menos especializadas (Rosas-Guerrero *et al.*, 2014). El registro de visitas a las flores de *Nymphoides fallax* incluye 28 taxa de seis ordenes de insectos y uno de arácnidos. Los visitantes florales más destacados por su número de visitas fueron los dípteros, por representar un poco más de la mitad de todas las visitas en 13 morfoespecies diferentes, mientras que del resto de ordenes solo se registraron de 1 a 3 morfoespecies. Los himenópteros también sobresalen con el 46.19% de las visitas, notablemente, casi la totalidad de las visitas de este grupo corresponden a la abeja melífera (*Apis mellifera*), una especie introducida ampliamente generalista (Geslin *et al.*, 2017; Hung *et al.*, 2018). Es destacable que se observó un comportamiento de forrajeo similar en las abejas melíferas y los dípteros de las familias Stratiomyidae y Syrphidae, aprovechando el polen y posiblemente néctar, debido a que en algunas visitas los insectos tocaban la base del tubo floral. Aunque es necesario confirmar la existencia de néctar floral en *Nymphoides fallax* y el mecanismo de secreción. Comúnmente en las plantas de la familia Menyanthaceae, las flores producen néctar en la base del ovario (Kadereit, 2007).

Algunas de las interacciones entre insectos y flores de plantas acuáticas no están mediadas por ningún tipo de recompensa, sino están relacionadas al uso de las flores como sitio de apareamiento, refugio o captura de presas (Philbrick y Les, 1996), posiblemente esto se debe a que las flores representan un espacio terrestre disponible en medio del agua. Es probable que este sea el caso de algunos visitantes florales de *Nymphoides fallax*, incluyendo los odonatos, hemípteros, coleópteros y la única araña que fue registrada visitando una flor, debido a que su dieta se especializa en otras fuentes de alimento diferentes a las recompensas

florales (comúnmente polen y néctar) por ejemplo, otros invertebrados o tejidos vegetales (Motta y Uieda, 2004). Su baja frecuencia también sugiere que son visitantes accidentales y potencialmente con menor impacto en la reproducción de *N. fallax* (Shrestha *et al.*, 2012; Honěk *et al.*, 2016). Además, algunos visitantes como los dípteros de la familia Ephydriidae, hemípteros y odonatos también fueron observados sobre otros órganos de *N. fallax* como hojas y tallos, posiblemente reflejando un uso más general de toda planta y no de los recursos florales en particular (van-der-Velde y van-der-Heijden, 1981). Aunque recientemente, ha surgido interés por el estudio de visitantes florales poco frecuentes y los efectos indirectos que pueden tener en la reproducción de las plantas (i.e., Su *et al.*, 2020). En otras plantas acuáticas heterostílicas como *Pontederia cordata*, *Eichhornia paniculata* y *Nymphoides peltata*, también se han registrado visitantes florales de varios grupos taxonómicos, en los que se destacan también himenópteros (abejas, en particular) y dípteros, por la frecuencia de sus visitas y por su comportamiento de forrajeo, aunque en las especies americanas *P. cordata* y *E. paniculata* se registraron abejas nativas y algunas menos generalistas que *Apis mellifera*. Otros visitantes menos frecuentes fueron lepidópteros y una especie de colibrí (van-der-Velde y van-der-Heijden, 1981; Wolfe y Barrett, 1987; 1988; Husband y Barrett, 1992).

La presencia de carga polínica de *Nymphoides fallax* en algunos de los visitantes florales más frecuentes, apoya a la idea que pueden ser polinizadores efectivos de la especie, debido a que evaluación de carga polínica es uno de los primeros acercamientos para conocer el subconjunto de polinizadores entre el total de visitantes florales porque la efectividad de un polinizador puede no estar relacionada con su abundancia y frecuencia de visitas (Schemske y Horvitz, 1984; Johnson y Steiner, 2000; Jędrzejewska-Szmek y Zych, 2013). En particular se ha observado que las cargas polínicas de las abejas generalmente son mayores a las de los dípteros y su composición en ambos está más relacionado con su tamaño y especialización ecológica, que con la composición de recursos florales disponibles (Cullen *et al.*, 2021). Aunque en los insectos observados en esta investigación, la mayoría de la carga polínica corresponde a *Nymphoides fallax*, se encontraron otros dos tipos de granos de polen: de una especie de Asteraceae y de una monocotiledónea (observado en los dípteros de las familias Stratiomyidae y Syrphidae).

8. CONCLUSIONES

Los resultados de esta investigación corroboran las evidencias de la importancia de la reproducción sexual en *Nymphoides fallax*. Esta tesis de licenciatura complementa el conocimiento sobre la biología sexual en la especie, destacando el rol de la distília en la producción de frutos y semillas, y otros aspectos de reproductivos, como la duración de la flor, su viabilidad, relación polen/ovulo, presencia de visitantes florales que en conjunto ofrecen un panorama más amplio acerca la reproducción sexual de *N. fallax*. La relación polen/óvulo encontrada es concordante con la proporción típica de las especies xenógamas y la producción de semillas casi exclusivamente resultado de las cruza intermorfo, confirman este sistema de apareamiento, destacando la importancia de la polinización cruzada promovida por la hercogamia recíproca. Además, se comprobó la presencia de un sistema de autoincompatibilidad heteromórfica, asegurando la producción de semillas solamente después de polinización cruzada intermorfo. Se encontraron dos tipos de poblaciones; dimórficas con una proporción casi equitativa entre los morfos, y poblaciones monomórficas, solo con el morfo de estilo largo. Asimismo, las flores son visitadas por una amplia gama de insectos, se destacan los dípteros por la riqueza de visitantes florales y la frecuencia de las visitas de algunos taxa, así como la especie introducida y generalista *Apis mellifera*. El comportamiento de algunos de los visitantes más frecuentes sugiere que visitan para la recolección de recompensas florales, además, se observó que pueden transportar granos de polen en su cuerpo, sugiriendo que pueden llevar a cabo polinización efectiva.

De manera general, se contribuye al entendimiento de la heterostilia en un grupo peculiar de plantas acuáticas, que comúnmente cuentan también con una amplia capacidad de reproducción vegetativa; pero al menos en algunas poblaciones de *Nymphoides fallax* la reproducción sexual parece ser prevalente. La importancia de la reproducción sexual radica en promover la diversidad genética, y potencialmente permitir la adaptación de los individuos a condiciones diversas e incrementar la probabilidad de la persistencia de las poblaciones, sobre todo en ambientes acuáticos temporales con alta degradación y presiones antrópicas, como los que habita *N. fallax* en las tierras altas de centro de México.

LITERATURA CITADA

- Ackerman, J. D. 2000. Abiotic pollen and pollination: ecological, functional, and evolutionary perspectives. *Plant Syst. Evol.* 222:167-185.
- Adamec, L. 2018. Ecophysiological characteristics of turions of aquatic plants: a review. *Aquat. Bot.* 148:64-77.
- Allen, A. M., y S. J. Hiscock. 2008. Evolution and phylogeny of self-incompatibility systems in angiosperms. En: V. E. Franklin-Tong. (Ed). *Self-incompatibility in flowering plants.* p 73. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Ashman, T. 2004. Flower longevity. En: L. D. Noodén. (Ed). *Plant cell death processes.*
- Ashman, T., y D. J. Schoen. 1997. The cost of floral longevity in *Clarkia tembloriensis*: an experimental investigation. *Evol. Ecol.* 11:289-300.
- Barrett, S. C. H. 1980. Dimorphic incompatibility and gender in *Nymphoides indica* (Menyanthaceae). *Can. J. Bot.* 58:1938–1942.
- Barrett, S. C. H. 1988. Evolution of breeding systems in *Eichhornia* (Pontederiaceae): a review. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 75:741-760.
- Barrett, S. C. H. 1992. Heterostylous genetic polymorphisms: model systems for evolutionary analysis. En: S. C. H. Barrett. (Ed). *Evolution and function of heterostyly.* p 1. Springer-Verlag, New York.
- Barrett, S. C. H. 2002a. The evolution of plant sexual diversity. *Nat. Rev. Genet.* 3:274-284.
- Barrett, S. C. H. 2002b. Sexual interference of the floral kind. *Heredity (Edinb).* 88:154-159.
- Barrett, S. C. H. 2003. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing–selfing paradigm and beyond. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 358:991-1004.
- Barrett, S. C. H. 2010. Understanding plant reproductive diversity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 365:99-109.
- Barrett, S. C. H. 2013. The evolution of plant reproductive systems: how often are transitions irreversible? *Proc. R. Soc. Lond. B.* 280:20130913.
- Barrett, S. C. H. 2019. ‘A most complex marriage arrangement’: recent advances on heterostyly and unresolved questions. *New Phytol.* 224:1051-1067.

- Barrett, S. C. H., y J. H. Richards. 1990. Heterostyly in tropical plants. En: G. Gottsberger y G. T. Prance. (Ed). Reproductive biology and evolution of tropical woody angiosperms. *Memoirs of the New York Botanical Garden*.
- Barrett, S. C. H., y M. B. Cruzan. 1994. Incompatibility in heterostylous plants. En: E. G. Williams, R. B. Knox y A. E. Clarke. (Ed). Genetic control of self-incompatibility and reproductive development in flowering plants. p 189. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Barrett, S. C. H., y J. S. Shore. 2008. New insights on heterostyly: comparative biology, ecology and genetics. En: V. E. Franklin-Tong. (Ed). Self-incompatibility in flowering plants – evolution, diversity, and mechanisms. p 3. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg.
- Barrett, S. C. H., y L. D. Harder. 2017. The ecology of mating and its evolutionary consequences in seed plants. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 48:135-157.
- Barrett, S. C. H., C. G. Eckert, y B. C. Husband. 1993. Evolutionary processes in aquatic plant populations. *Aquat. Bot.* 44:105-145.
- Barrett, S. C. H., L. K. Jesson, y A. M. Baker. 2000. The evolution and function of stylar polymorphisms in flowering plants. *Ann. Bot.* 85:253-165.
- Bateman, R. M., J. Hilton, y P. J. Rudall. 2006. Morphological and molecular phylogenetic context of the angiosperms: contrasting the 'top-down' and 'bottom-up' approaches used to infer the likely characteristics of the first flowers. *J. Exp. Bot.* 57:3471-3503.
- Berger, F., Y. Hamamura, M. Ingouff, y T. Higashiyama. 2008. Double fertilization – caught in the act. *Trends Plant Sci.* 13:437-443.
- Brys, R., H. Jacquemyn, y M. Hermy. 2007. Impact of mate availability, population size, and spatial aggregation of morphs on sexual reproduction in a distylous, aquatic plant. *Am. J. Bot.* 94:119-127.
- Busch, J. W., y L. F. Delph. 2012. The relative importance of reproductive assurance and automatic selection as hypotheses for the evolution of self-fertilization. *AoB. Plants.* 109:553-562.
- Calderón-de Rzedowski, G., y J. S. Marroquín. 2010. Menyanthaceae. En: G. Calderón-de Rzedowski y J. Rzedowski. (Ed). *Flora fanerogámica del valle de México*. p 557. Instituto de Ecología A.C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán.
- Casper, B. B. 1992. The application of sex allocation theory to heterostylous plants. En: S. C. H. Barrett. (Ed). *Evolution and function of heterostyly*. p 209. Springer-Verlag, New York.

- Casper, B. B., y E. L. Charnov. 1982. Sex allocation in heterostylous plants. *J. Theor. Biol.* 96:143-149.
- Cesaro, A. C., y J. D. Thompson. 2004. Darwin's cross-promotion hypothesis and the evolution of stylar polymorphism. *Ecol. Lett.* 7:1209-1215.
- Chambers, P. A., P. Lacoul, K. J. Murphy, y S. M. Thomaz. 2008. Global diversity of aquatic macrophytes in freshwater. *Hidrobiologia.* 595:9-26.
- Christenhusz, M. J. M., y J. W. Byng. 2016. The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa.* 261:201-217.
- Chuang, T. I., y R. Ornduff. 1992. Seed morphology and systematics of Menyanthaceae. *Am. J. Bot.* 79:1396-1406.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 2022. Geoportal. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>. Fecha de consulta: 21 de marzo de 2021.
- Cook, C. D. K. 1990. Seed dispersal of *Nymphoides peltata* (S.G. Gmelin) O. Kuntze (Menyanthaceae). *Aquat. Bot.* 37:325-340.
- Cook, C. D. K. 1999. The number and kinds of embryo-bearing plants which have become aquatic: a survey. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 2:79-102.
- Corbet, S. A. 1990. Pollination and the weather. *Isr. J. Plant Sci.* 39:13-30.
- Costa, J., S. Castro, J. Loureiro, y S. C. H. Barrett. 2017. Experimental insights on the function of ancillary pollen and stigma polymorphisms in plants with heteromorphic incompatibility. *Evolution.* 71:121-134.
- Cox, P. A. 1988. Hydrophilous pollination. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 19:261-279.
- Cronk, J. K., y M. S. Fennessy. 2009. Wetland plants. En: G. E. Likens. (Ed). *Encyclopedia of inland waters.* p. 590. Academic Press.
- Cruden, R. W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution.* 31:32-46.
- Cullen, N., J. Xia, N. Wei, R. Kaczorowski, G. Arceo-Gómez, E. O'Neill, R. Hayes, y T. Ashman. 2021. Diversity and composition of pollen loads carried by pollinators are primarily driven by insect traits, not floral community characteristics. *Oecologia.* 196:131-143.

- Dafni, A. 1992. Pollination ecology a practical approach. Oxford University Press. New York.
- Dai, C., y L. F. Galloway. 2011. Do dichogamy and herkogamy reduce sexual interference in a self-incompatible species? *Funct. Ecol.* 25:271-278.
- Darwin, C. 1877. The different forms of flowers on plants of the same species. London, UK: John Murray.
- de-Jager, M. L., y A. G. Ellis. 2014. Floral polymorphism and the fitness implications of attracting pollinating and florivorous insects. *Ann. Bot.* 113:213-222.
- Dellinger, A. S. 2020. Pollination syndromes in the 21st century: where do we stand and where may we go? *New Phytol.* 228:1193-1213.
- Devaux, C., C. Lepers, y E. Porcher. 2014. Constraints imposed by pollinator behaviour on the ecology and evolution of plant mating systems. *J. Evol. Biol.* 27:1413-1430.
- Dietzsch, A. C., D. A. Stanley, y J. C. Stout. 2011. Relative abundance of an invasive alien plant affects native pollination processes. *Oecologia*: 167:469-479.
- Du, Z., y Q. Wang. 2014. Correlations of life form, pollination mode and sexual system in aquatic angiosperms. *PLoS One.* 9:e115653.
- Dulberger, R. 1975. Intermorph structural differences between stigmatic papillae and pollen grains in relation to incompatibility in Plumbaginaceae. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 188:257-274.
- Dulberger, R. 1992. Floral polymorphism and their functional significance in the heterostylous syndrome. En: S. C. H. Barrett. (Ed). *Evolution and function of heterostyly.* p 41. Springer-Verlag, New York.
- Eckert, C. G. 2000. Contributions of autogamy and geitonogamy to self-fertilization in a mass-flowering, clonal plant. *Ecology.* 81:532-542.
- Eckert, C. G., y S. C. H. Barrett. 1995. Style morph ratios in tristylous *Decodon verticillatus* (Lythraceae): selection vs. historical contingency. *Ecology.* 76:1051-1066.
- Erbar, C., y M. Langlotz. 2005. Pollen to ovule ratios: standard or variation — compilation. *Bot. Jahrb. Syst. Pflanzenges. Pflanzengeogr.* 126:71-132.
- Espinosa-Rodríguez, C. A., S. S. S. Sarma, y S. Nandini. 2021. Zooplankton community changes in relation to different macrophyte species: effects of *Egeria densa* removal. *Ecohydrol. Hydrobiol.* 21:153-163.

- Fenster, C. B., W. S. Armbruster, P. Wilson, M. R. Dudash, y J. D. Thomson. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35:375-403.
- Fernandes-Cardoso, J. C., M. Lacerda-Viana, R. Matias, M. T. Furtado, A. P. de Souza-Caetano, H. Consolaro, y V. C. Garcia-de Brito. 2018. Towards a unified terminology for angiosperm reproductive systems. *Acta Bot. Brasilica.* 32:329-348.
- Friedman, J., y S. C. H. Barrett. 2009. Wind of change: new insights on the ecology and evolution of pollination and mating in wind-pollinated plants. *Ann. Bot.* 103:1515-1527.
- Ganders, F. R. 1979. The biology of heterostyly. *N. Z. J. Bot.* 17:607-635.
- Geslin, B., B. Gauzens, M. Baude, I. Dajoz, C. Fontaine, M. Henry, L. Ropars, O. Rollin, E. Thébault, y N. J. Vereecken. 2017. Massively introduced managed species and their consequences for plant-pollinator interactions. En: D. A. Bohan, A. J. Dumbrell y F. Massol. (Ed). *Advances in ecological research.* p. 147. Academic Press.
- Gibbs, P. E. 2017. Head over heels about floral polymorphism: a novel floral dimorphism based on resupination. *Plant Ecol. Divers.* 10:1-3.
- González-Gutiérrez, A. G., A. Gutiérrez-Mora, y B. Rodríguez-Garay. 2014. Embryo sac formation and early embryo development in *Agave tequilana* (Asparagaceae). *Springerplus.* 3:575.
- Grace, J. B. 1993. The adaptive significance of clonal reproduction in angiosperms: an aquatic perspective. *Aquat. Bot.* 44:159-180.
- Haddadchi, A. 2013. Stylar polymorphism, reciprocity and incompatibility systems in *Nymphoides montana* (Menyanthaceae) endemic to southeastern Australia. *Plant Syst. Evol.* 299:389-401.
- Haddadchi, A., y M. Fatemi. 2015. Self-compatibility and floral traits adapted for self-pollination allow homostylous *Nymphoides geminata* (Menyanthaceae) to persist in marginal habitats. *Plant Syst. Evol.* 301:239-250.
- Haddadchi, A., M. Fatemi, y C. L. Gross. 2014. Clonal growth is enhanced in the absence of a mating morph: a comparative study of fertile stylar polymorphic and sterile monomorphic populations of *Nymphoides montana* (Menyanthaceae). *Ann. Bot.* 113:523-532.
- Hamamura, Y., S. Nagahara, y T. Higashiyama. 2012. Double fertilization on the move. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15:70-77.
- Heuch, I. 1979. The effect of partial self-fertilization on type frequencies in heterostylous plants. *Ann. Bot.* 44:611-616.

- Hicks, D. J., R. Wyatt, y T. R. Meagher. 1985. Reproductive biology of distylous partridge-berry, *Mitchella repens*. *Am. J. Bot.* 72:1503-1514.
- Honěk, A., Z. Martinková, J. Skuhrovec, M. Barták, J. Bezděk, P. Bogusch, J. Hadrava, J. Hájek, P. Janšta, J. Jelínek, J. Kirschner, V. Kubáň, S. Pekár, P. Průdek, P. Štys, y J. Šumpich. 2016. Arthropod fauna recorded in flowers of apomictic *Taraxacum* section *Ruderalia*. *Eur. J. Entomol.* 113:173-183.
- Hung, K. J., J. M. Kingston, M. Albrecht, D. A. Holway, y J. R. Kohn. 2018. The world importance of honey bees as pollinators in natural habitats. *Proc. Royal Soc. B.*
- Husband, B. C., y S. C. H. Barrett. 1992. Pollinator visitation in populations of tristylous *Eichhornia paniculata* in northeastern Brazil. *Oecologia.* 89:365-371.
- Igic, B., R. Lande, y J. R. Kohn. 2008. Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences. *Int. J. Plant Sci.* 169:93-104.
- Inouye, D. W. 2013. Pollinators, role of. En: S. A. Levin. (Ed). *Encyclopedia of biodiversity* (second edition). p 140. Academic Press.
- Jędrzejewska-Szmek, K., y M. Zych. 2013. Flower-visitor and pollen transport networks in a large city: structure and properties. *Arthropod Plant Interact.* 7:503-516.
- Johnson, S. D., y K. E. Steiner. 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends Ecol. Evol.* 15: 140-143.
- Kadereit, G. 2007. Menyanthaceae. En: J. W. Kadereit y C. Jeffrey. (Ed). *Flowering Plants · Eudicots: Asterales*. p 599. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Karron, J. D., R. J. Mitchell, y J. M. Bell. 2006. Multiple pollinator visits to *Mimulus ringens* (Phrymaceae) flowers increase mate number and seed set within fruits. *Am. J. Bot.* 93:1306-1312.
- Kearns, C. A., y D. W. Inouye. 1993. *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado.
- Kearns, C. A., D. W. Inouye, y N. M. Waser. 1998. Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 29:83-112.
- Keller, B., J. D. Thomson, y E. Conti. 2014. Heterostyly promotes disassortative pollination and reduces sexual interference in Darwin's primroses: evidence from experimental studies. *Funct. Ecol.* 28:1413-1425.
- Kenrick, P., y R. P. Crane. 1997. The origin and early evolution of plants on land. *Nature.* 389:33-39.

- Klein, D. E., L. Freitas, y M. D. Cunha. 2009. Self-incompatibility in a distylous species of Rubiaceae: is there a single incompatibility response of the morphs? *Sex. Plant. Reprod.* 22:121-131.
- Les, D. H. 1994. Molecular systematics and taxonomy of lake cress (*Neobeckia aquatica*; Brassicaceae), an imperiled aquatic mustard. *Aquat. Bot.* 49:149-165.
- Les, D. H., M. A. Cleland, y M. Waycott. 1997. Phylogenetic studies in Alismatidae, II: evolution of marine angiosperms (seagrasses) and hydrophily. *Syst. Bot.* 22:443-463.
- Lloyd, D. G. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *Int. J. Plant Sci.* 153:370-380.
- Lloyd, D. G., y D. J. Schoen. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *Int. J. Plant Sci.* 153:358-369.
- Lloyd, D. G., y C. J. Webb. 1992a. The evolution of heterostyly. En: S. C. H. Barrett. (Ed). *Evolution and function of heterostyly.* p 151. Springer-Verlag, New York.
- Lloyd, D. G., y C. J. Webb. 1992b. The selection of heterostyly. En: S. C. H. Barrett. (Ed). *Evolution and function of heterostyly.* p 179. Springer-Verlag, New York.
- Lobato-de Magalhães, T., y M. Martínez. 2018. Temporary freshwater wetlands floristics in central Mexico highlands. *Bot. Sci.* 96:138-156.
- Lobato-de Magalhães, T., y M. Martínez. 2020. Insights into distyly and seed morphology of the aquatic plant *Nymphoides fallax* Ornduff (Menyanthaceae). *Flora.* 262:151526.
- Lobato-de Magalhães, T., D. Cabrera-Toledo, y M. Martínez. 2019. Microsatellite loci transferability and genetic diversity of the aquatic plant *Nymphoides fallax* Ornduff (Menyanthaceae), endemic to the Mexican and Guatemalan highlands. *Limnology (Tokyo).* 20:233-241.
- Lobato-de Magalhães, T., Y. Rico, D. Cabrera-Toledo, y M. Martínez. 2020. Plant functional connectivity of *Nymphoides fallax* in geographically isolated temporary wetlands in Mexican highlands. *Aquat. Bot.* 164:103215.
- Lot, A. 2017. Menyanthaceae. En: A. Lot. (Ed). *Plantas acuáticas mexicanas una contribución a la flora de México. Volumen II, Parte 1, Dicotiledóneas.* Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Malezas de México. 2022. Disponible en: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/onagraceae/oenothera-tetraptera/fichas/pagina1.htm>. Fecha de consulta: 21 de marzo de 2022.

- Márquez, J., R. Wong, M. Pérez, L. López, y G. Munguía. 2016. Técnicas de laboratorio para el estudio del desarrollo en angiospermas. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Martínez, M., y A. García-Mendoza. 2001. Flora y vegetación acuáticas de localidades secas del estado de Querétaro. *Acta Bot. Mex.* 54:1-23.
- Martínez, M., y M. Gómez-Sánchez. 2006. Descripción anatómica vegetativa de dos especies de *Nymphoides* (Menyanthaceae). *Rev. Mex. Biodivers.* 77:81-87.
- Massinga, P. H., S. D. Johnson, y L. D. Harder. 2005. Heteromorphic incompatibility and efficiency of pollination in two distylous *Pentanisia* species (Rubiaceae). *Ann. Bot.* 95:389-399.
- Müller, N., J. J. Scheneller, y R. Holderegger. 2000. Variation in breeding system among populations of the common woodland herb *Anemone nemorosa* (Ranunculaceae). *Plant Syst. Evol.* 221:69-76.
- Murphy, K., A. Efremov, T. A. Davidson, E. Molina-Navarro, K. Fidanza, T. C. C. Betiol, P. Chambers, J. Tapia Grimaldo, S. V. Martins, I. Springuel, M. Kennedy, R. P. Mormul, E. Dibble, D. Hofstra, B. A. Lukács, Daniel Gebler, L. Bastrup-Spohr, y J. Urrutia-Estrada. 2019. World distribution, diversity and endemism of aquatic macrophytes. *Aquat. Bot.* 158:103127.
- Motta, R. L., y V. S. Uieda. 2004. Diet and trophic groups of an aquatic insect community in a tropical stream. *Braz. J. Biol.* 64:809-817.
- Nazarov, V. V., y G. Gerlach. 1997. The potential seed productivity of orchid flowers and peculiarities of their pollination systems. *Lindleyana.* 12:188-204.
- Nic-Lughadha, E. M., y J. A. N. Parnell. 1989. Heterostyly and gene-flow in *Menyanthes trifoliata* L. (Menyanthaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 100:337-354.
- Ollerton, J. 2017. Pollinator diversity: distribution, ecological function, and conservation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 48:353-376.
- Ollerton, J., R. Winfree, y S. Tarrant. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos.* 120:321-326.
- Ollerton, J., A. R. Rech, N. M. Waser, y M. V. Price. 2015. Using the literature to test pollination syndromes — some methodological cautions. *J. Pollinat. Ecol.* 16:119-125.
- Ornduff, R. 1966. The origin of dioecism from heterostyly in *Nymphoides* (Menyanthaceae). *Evolution.* 20:309-314.

- Ornduff, R. 1969. Neotropical *Nymphoides* (Menyanthaceae): meso-american and west indian species. *Brittonia*. 21:346-352.
- Ornduff, R. 1970. Cytogeography of *Nymphoides* (Menyanthaceae). *Taxon*. 19:715-719.
- Ornduff, R. 1982. Heterostyly and incompatibility in *Villarsia capitata* (Menyanthaceae). *Taxon*. 31:495-497.
- Ornduff, R. 1986. Comparative fecundity and population composition of heterostylous and non-heterostylous species of *Villarsia* (Menyanthaceae) in western Australia. *Am. J. Bot.* 73:282-286.
- Osborne, J. L., y J. B. Free. 2003. Flowering and reproduction | Pollination. En: B. Thomas. (Ed). *Encyclopedia of applied plant sciences*. p 315. Elsevier Academic Press.
- Pfannebecker, K. C., M. Lange, O. Rupp, y A. Becker. 2017. Seed plant-specific gene lineages involved in carpel development. *Mol. Biol. Evol.* 34:925-942.
- Philbrick, C. T., y D. H. Les. 1996. Evolution of aquatic angiosperm reproductive systems. *Bioscience*. 46:813-826.
- Plant Teaching Collection. University of Wisconsin. 2022. Disponible en: <https://botit.botany.wisc.edu/Resources/Systematics/Magnoliophyta/Magnoliopsida/Myrtales/Lythraceae/Lythrum/L%20salicaria/Dissected%20flower%20RT.jpg.html>. Fecha de consulta: 21 de marzo de 2022.
- Plants of the World Online (POWO). 2022. Facilitado por el Real Jardín Botánico de Kew. Disponible en: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:30013186-2>. Fecha de consulta: 21 de marzo de 2022.
- Plitmann, U., y D. A. Levin. 1990. Breeding systems in the Polemoniaceae. *Plant Syst. Evol.* 170:205-214.
- Primack, R. B. 1985. Longevity of individual flowers. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 16:15-37.
- Quiroz-Flores, A., P. Ramírez-García, y A. Lot-Helgueras. 2014. Variación anual de la biomasa de *Nymphoides fallax* Ornduff (Menyanthaceae) en la laguna de Tecocomulco, Hidalgo, México. *Polibotanica*. 37:93-108.
- Riener, D. N. 1984. *Introduction to freshwater vegetation*. Avi Publishing Company.
- Rosas-Guerrero, V., R. Aguilar, S. Martín-Rodríguez, L. Ashworth, M. Lopezaraiza-Mikel, J. M. Bastida, y M. Quesada, 2014. A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators? *Ecol. Lett.* 17:388-400.

- Rzedowski, J. 1991. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Bot. Mex.* 14:3-21.
- Schemske, D. W., y C. C. Horvitz. 1984. Variation among floral visitors in pollination ability: a precondition for mutualism specialization. *Science.* 225:519-521.
- Schmidt, A., M. W. Schmid, y U. Grossniklaus. 2015. Plant germline formation: common concepts and developmental flexibility in sexual and asexual reproduction. *Development.* 142:229-241.
- Schoen, D. J., M. O. Johnston, A. L'Heureux, y J. V. Marsolais. 1997. Evolutionary history of the mating system in *Amsinckia* (Boraginaceae). *Evolution.* 51:1090-1099.
- Sculthorpe, C. D. 1985. The biology of aquatic vascular plants. Koeltz Scientific Books. Königstein, West Germany.
- Scutt, C. P. 2021. The origin of angiosperms. En: L. Nuño-de la Rosa y G. B. Müller. (Ed). *Evolutionary developmental biology.* p 663. Springer Nature. Switzerland.
- Shibayama, Y., y Y. Kadono. 2003. Floral morph composition and pollen limitation in the seed set of *Nymphoides indica* populations. *Ecol. Res.* 18:725-737.
- Shrestha, M., J. E. Garcia, J. H. J. Chua, S. R. Howard, T. Tscheulin, A. Dorin, A. Nielsen, y A. G. Dyer. 2019. Fluorescent pan traps affect the capture rate of insect orders in different ways. *Insects.* 10:1-12.
- Silvertown, J. 2008. The evolutionary maintenance of sexual reproduction: evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. *Int. J. Plant Sci.* 169:157-168.
- Simpson, M. G. 2019a. Evolution of flowering plants. En: M. G. Simpson. (Ed). *Plant systematics (third edition).* p 167. Elsevier Academic Press.
- Simpson, M. G. 2019b. Plant reproductive biology. En: M. G. Simpson. (Ed). *Plant systematics (third edition).* p 595. Elsevier Academic Press.
- Specht, C. D., y M. E. Bartlett. 2009. Flower evolution: the origin and subsequent diversification of the angiosperm flower. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40:217-243.
- Stewart, A. B., y P. Waitayachart. 2020. Year-round temporal stability of a tropical, urban plant-pollinator network. *PloS One.* 15:e0230490.
- Su, Q., L. Qi, W. Zhang, Y. Yun, Y. Zhao, y Y. Peng. 2020. Biodiversity survey of flower-visiting spiders based on literature review and field study. *Environ. Entomol.* 49:673-682.

- Taylor, P. 1989. The genus *Utricularia*: a taxonomic monograph. Kew Bull. 14:1-724.
- Thompson, F. L., L. A. Hermanutz, y D. J. Innes. 1998. The reproductive ecology of island populations of distylous *Menyanthes trifoliata* (Menyanthaceae). Can. J. Bot. 76:818-828.
- Tipperry, N. P., y D. H. Les. 2009. A new genus and new combinations in australian *Villarsia* (Menyanthaceae). Novon (St Louis). 19:404-411.
- Tipperry, N. P., y D. H. Les. 2011. Phylogenetic relationships and morphological evolution in *Nymphoides* (Menyanthaceae). Syst. Bot. 36:1101-1113.
- Tipperry, N. P., D. H. Les, D. J. Padgett, y S. W. L. Jacobs. 2008. Generic circumscription in Menyanthaceae: a phylogenetic evaluation. Syst. Bot. 33:598-612.
- Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 2022. Nuevo Atlas Nacional de México. Disponible en: http://www.igeograf.unam.mx/Geodig/nvo_atlas/index.html/5_naturaleza_ambiente/4_clima/NA_IV_13.jpg. Fecha de consulta: 21 de marzo de 2022.
- Vallejo-Marín, M., M. E. Dorken, y S. C. H. Barrett. 2010. The ecological and evolutionary consequences of clonality for plant mating. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 41:193-213.
- van-der-Velde, G., y L. A. van-der-Heijden. 1981. The floral biology and seed production of *Nymphoides peltata* (Gmel.) O. Kuntze (Menyanthaceae). Aquat. Bot. 10:261-293.
- Villaseñor, J. L. 2003. Diversidad y distribución de las Magnoliophyta de México. Interciencia. 28:160-167.
- Villaseñor, J. L., y E. Ortiz. 2014. Biodiversidad de las plantas con flores (división Magnoliophyta) en México. Rev. Mex. Biodivers. 85:134-142.
- Vogler, D. W., y S. Kalisz. 2001. Sex among the flowers: the distribution of plant mating systems. Evolution. 55:202-204.
- Ward, M., C. W. Dick, R. Gribel, y A. J. Lowe. 2005. To self, or not to self... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. Heredity (Edinb). 95:246-254.
- Whitehead, M. R., R. Lanfear, R. J. Mitchell, y J. D. Karron. 2018. Plant mating systems often vary widely among populations. Front. Ecol. Evol. 6:38.
- Wilson, J. S., y O. Messinger-Carril. 2016. The bees in your backyard: a guide to North America's bees. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.

Wolfe, L. M., y S. C. H. Barrett. 1987. Pollinator foraging behavior and pollen collection on the floral morphs of tristylous *Pontederia cordata* L. *Oecologia*. 74:347-351.

Wolfe, L. M., y S. C. H. Barrett. 1988. Temporal changes in the pollinator fauna of tristylous *Pontederia cordata*, an aquatic plant. *Can. J. Zool.* 66:1421-1424.

Wyatt, R., S. B. Broyles, y S. R. Lipow. 2000. Pollen-ovule ratios in milkweeds (Asclepiadaceae): an exception that probes the rule. *Syst. Bot.* 25:171-180.

Zamudio, S., J. Rzedowski, E. Carranza, y G. Calderón-de-Rzedowski. 1992. La vegetación en el estado de Querétaro, panorama preliminar. Instituto de Ecología A.C., México.

Zepeda, C., A. Lot, X. A. Nemiga, y J. Manjarrez. 2014. Seed bank and established vegetation in the last remnants of the Mexican Central Plateau wetlands: the Lerma marshes. *Rev. Biol. Trop.* 62:455-472.

APÉNDICES

Apéndice A. Carta de otorgamiento de beca de investigación expedida por la Society of Wetland Scientists.



Abstract Title:	Understanding reproductive aspects of the distylous aquatic plant <i>Nymphoides fallax</i> Ornduff (Menyanthaceae)
Average Score:	69.42

Luis Enrique Olguín Chávez
luisenriqueoch@gmail.com

Dear Luis Enrique,

On behalf of the Society of Wetland Scientists, we are pleased to inform you that you have been selected as a **2021 SWS International Chapter – Latin America Grant recipient**. Congratulations!

Your application was evaluated by a panel of wetland scientists, and based on their scores, was selected to be funded. We are providing you with your average scores from the reviewers for your information. If you would like more details, please reach out.

Please complete and submit the award form. Once the award form is received, SWS staff will issue and mail a check with these funds. You are expected to use the grant funds in accordance with the proposed budget. You are also required to complete a final report as a condition of accepting the grant. Your final report will be due on June 20, 2022. Your report must include a brief update on the status of the research and a description of the actual use of provided funds.

If a recipient is unable to complete the research as approved, unexpended funds must be returned to the SWS. Finally, you are required to acknowledge funding of this work in any oral presentation or written product based on research funded in part by this grant.

Thank you for submitting your application to SWS and best wishes in successfully completing your exciting research.

Sincerely,

David Bailey
Chair, Student Grants Subcommittee of SWS

1818 Parmenter Street Suite 300, Middleton, Wisconsin 53562
(608) 310-7855 | (608) 251-5941 fax | www.sws.org

Apéndice B. Protocolo de campo. Fuente: Elaboración propia.

PROTOCOLO DE CAMPO

Visitantes florales y proporción de morfos de *Nymphoides fallax*

Objetivos

- Estimar la tasa de visitas a las flores de *Nymphoides fallax* en mínimo tres poblaciones del estado de Querétaro.
- Identificar el ensamblaje de visitantes florales en estas poblaciones;
- Estimar la proporción de morfos en poblaciones naturales (al menos las 3 poblaciones ya mencionadas y algunas adicionales).

A. Tasa/frecuencia de visitas a las flores

Para estimar la tasa de visitas a las flores, en cada visita a las poblaciones se realizarán observaciones por tiempo de 15 minutos, en ocho unidades de muestreo. Se registrará el número de flores y las visitas de insectos que tengan contacto con el androceo y/o gineceo de la flor o en la parte interna de la flor, identificando al menor nivel taxonómico posible, considerando los grandes grupos taxonómicos: himenópteros, dípteros, lepidópteros, odonatos, etcétera. En caso de ser un insecto de fácil reconocimiento se registrará también la especie, género o familia (i.e. *Apis mellifera*, *Bombus* sp.). Los plots deben tener un mínimo de 20 flores de *N. fallax* y mínimo 5 m de distancia entre cada unidad de muestra. Siguiendo la metodología modificada de Dietzsch *et al.* (2011).

De ser posible, los plots serán establecidos en cuadrantes hacia los cuatro puntos cardinales (dos plots para cada cuadrante), teniendo 2 h de muestreo/humedal/día (Figura 1.a). Las observaciones serán realizadas en días soleados entre 9:30 am y 1:00 pm, cuando se espera una mayor tasa de visitantes (sección C).

Se usará registro fotográfico como información complementaria y también para ilustrar las interacciones. Las colectas de insectos serán realizadas con caminata aleatoria en los cuatro cuadrantes del humedal (Figura 1.b), considerando preferencialmente zonas con la presencia de la especie *N. fallax*.

B. Conteo de morfos

Se recorrerá el humedal en transectos paralelos yendo de un borde a otro, para registrar el morfo de 100 individuos en la población, considerando individuos con mínimo de 3 m de distancia entre sí (figura 1.c).

C. Itinerario de campo

La colecta de datos será en octubre y noviembre (1 salida de campo/humedal/mes). La colecta de datos será entre 9:30 am y 2:30 pm, de acuerdo con el plan propuesto a seguir:

Observación y colecta de insectos

9:30 - 9:45 - Observación plot 1

9:50 - 10:05 - Observación plot 2

10:10 - 10:25 - Observación plot 3

10:30 - 10:45 - Observación plot 4

10:45 - 11:15 – Registro fotográfico

11:15 - 11:30 - Observación plot 5

11:35 - 11:50 - Observación plot 6

11:55 - 12:10 - Observación plot 7

12:15 - 12:30 - Observación plot 8

1:00 - 2:30 – Registro fotográfico y conteo de morfos

D. Lista de materiales

Vadeador (mínimo 2)

Plot de PVC con 1m²

Cámara fotográfica (1)

F. Anexo

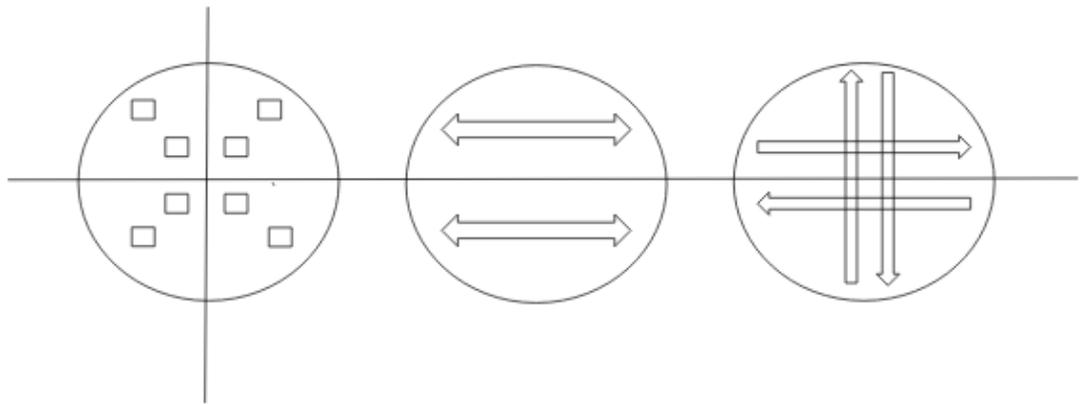


Figura 1. Esquema representando el muestreo de visitantes florales y proporción de morfos. (a) Los cuadrados representan los ocho plots divididos en cuatro cuadrantes. (b) Las flechas representan los dos recorridos para la colecta de insectos dividiendo el humedal en dos cuadrantes. (c) Las flechas representan los cuatro cuadrantes para el conteo de morfos y su dirección.

Literatura citada

Dietzsch, A. C., D. A. Stanley, y J. C. Stout. 2011. Relative abundance of an invasive alien plant affects native pollination processes. *Oecologia*: 167:469-479.