

DEPRESIÓN POR EXOGAMIA Y BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *NYMPHAEA AMPLA* (SALISB.) DC. (NYMPHAEACEAE)

Outbreeding depression and reproductive biology of *Nymphaea ampla* (Salisb.) DC. (Nymphaeaceae)

Yeni BARRIOS¹ y Nelson RAMÍREZ²

Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias,
Instituto de Biología Experimental, Centro de Botánica Tropical,
Apdo. 48312, Caracas 1041A, Venezuela.

¹ yeniceleste@gmail.com, ² nramirez@reacciun.ve

RESUMEN

La biología reproductiva de *Nymphaea ampla* fue estudiada en un humedal herbáceo de la costa oriental del Lago de Maracaibo, estado Zulia, Venezuela. La antesis es diurna, las flores permanecen abiertas desde las 8:00 hasta las 15:00 h durante 3 a 4 días consecutivos. Las flores son adicógamas, la dehiscencia de las anteras ocurre en la yema floral y los estigmas son receptivos durante el primer día de antesis. La temprana dehiscencia de las anteras y las visitas de *Apis mellifera* facilitan la autopolinización. La actividad de las abejas fue mayor entre las 9:30 y 11:30 h con una frecuencia de 14,28 visitas por flor cada media hora. La carga de polen depositada naturalmente sobre los estigmas fue 5,72 veces mayor que el número de óvulos por flor y el porcentaje de granos de polen germinados fue 50,23%. La alta tasa de producción natural de frutos por flor (96,29%) y semillas por óvulos (98,64%), así como el bajo nivel de semillas abortadas, contribuyeron a una alta fecundidad relativa (89%). *N. ampla* exhibió un sistema de apareamiento con predominancia de autogamia, el cual está correlacionado con una baja relación polen/óvulo (195,8), baja asignación de biomasa masculina pre- (0,23) y post-cigótica (0,01) en la flor y una baja relación pericarpo/semilla (0,14). La proporción de frutos y semillas producidos por autofertilización fue considerablemente mayor que la proporción producida por fertilización cruzada, lo cual sugiere que altos niveles de autogamia pueden estar asociados a una depresión por exogamia que favorece la permanencia de genotipos altamente adaptados a cuerpos de agua donde la población permanece relativamente aislada.

Palabras clave: Autogamia, biomasa floral, depresión por exogamia, eficiencia reproductiva, *Nymphaea ampla*, polinización

ABSTRACT

The reproductive biology of *Nymphaea ampla* was studied in a herbaceous wetland of the Oriental Coast of Maracaibo Lake, Zulia State, Venezuela. Anthesis is diurnal; flowers remain open from 8:00 until the 15:00 h during 3 to 4 continuous days. The flowers are adicogamous, anther dehiscence occurs in buds and stigmas are receptive during the first day of anthesis. The early dehiscence of anthers and visits by *Apis mellifera* facilitate self-pollination. The highest activity of bees occurs during the morning, between 9:30 and 11:30 h, with 14,28 visits per flower each 30 min. Pollen load deposited naturally on the stigmas was 5,72 times higher than the number of ovules per flower, and the percentage of germination was 50,23%. Natural fruit set (96,29%), seed set per ovule (98,64%), and the lowest le-

vels of seeds abortion contributed to a high relative fecundity (89%). *N. ampla* has a mating system with autogamy predominance, which was correlated with a low pollen/ovule ratio (195,8), low pre - (0,23) and post-cigotic (0,01) biomass allocation to male function in the flower, and a low pericarp/seed ratio (0,14). The proportion of fruit and seed set via self-fertilization was considerably higher than via outcrossing which suggests that high levels of autogamy may be associated with outbreeding depression, favouring genotypes highly adapted to water bodies where the population remains relatively isolated.

Key words: Autogamy, floral biomass, *Nymphaea ampla*, outbreeding depression, pollination, reproductive efficiency

INTRODUCCIÓN

La alogamia o polinización cruzada es considerada la forma de reproducción sexual más común en comunidades de plantas tropicales por ser más ventajosa desde el punto de vista biológico (Ruiz-Zapata & Arroyo 1978; Faegri & van der Pijl 1979). No obstante, aunque este sistema confiere a la población la ventaja de evitar los efectos deletéreos de la endogamia, las especies con fertilización cruzada obligada resultan ser totalmente dependientes de agentes externos que actúen como vectores de polen entre los individuos (Badano & Schlumpberger 2001). Debido a esto, la autogamia puede haber evolucionado como un mecanismo de seguridad que garantiza la fertilización si falla la polinización cruzada (Faegri & van der Pijl 1979; Lloyd & Schoen 1992), e inclusive, existen casos en los cuales la condición autógena es el sistema de apareamiento predominante de una especie (Raimúndez & Ramírez 1998; Valerio & Ramírez 2003). Las situaciones de aislamiento geográfico que reducen las posibilidades de flujo génico, la presencia de polinizadores no frecuentes e inespecializados y la presencia de sistemas de autocompatibilidad en especies herbáceas y/o de vida corta, pueden favorecer la adquisición del sistema autógeno como principal estrategia reproductiva en muchas angiospermas, tal como es reportado por Ramírez & Brito (1990) en una comunidad acuática de morichal.

Dentro del género *Nymphaea* (Nymphaeaceae) se conocen al menos 10 especies que utilizan la autogamia como alternativa reproductiva a la xenogamia y geitonogamia, nueve de ellas son de amplia distribución tropical (Conard 1905; Schneider 1982; Wiersema 1988; Bonilla *et al.* 2000). La importancia de esta estrategia en las especies tropicales de *Nymphaea* se basa en que garantiza la producción de semillas en ausencia de polinizadores potenciales, y del mismo modo aumenta dicha producción cuando la xenogamia o geitonogamia se vuelven ineficientes (Wiersema 1988). Particularmente, en *N. ampla*, distribuida desde el sur de Texas (EEUU) hasta el centro de Brasil, la autogamia ha sido considerada la forma de reproducción predominante, con polinización cruzada ocasional, efectuada por abejas del género *Trigona* (Prance & Anderson 1976). En este sentido, si los factores de dispersión no son limitantes, el sistema autógeno puede facilitar el establecimiento y la sobrevivencia a largo plazo de las especies, en nuevos hábitats ubicados más allá del área de distribución de sus polinizadores habituales (Wiersema 1988).

Los estudios realizados sobre la biología reproductiva de *N. ampla* (Conard 1905; Prance & Anderson 1976; Wiersema 1988) sólo describen algunos aspectos de la biología floral a partir de observaciones directas en campo. De acuerdo a lo reportado por estos autores, *N. ampla* posee una antesis diurna, longevidad floral de 3 a 4 días, y apertura diaria de 7:00 a 15:00 h aproximadamente; las flores son homogamas, no hercógamas, y la dehiscencia de las anteras ocurre en las yemas florales, previo a la antesis, lo cual asegura la autofertilización. Según estos autores, el número de granos de polen que pueden transportar abejas de la especie *Trigona spinipes* es mínimo comparado con las grandes cantidades de polen que caen desde las anteras hacia el área estigmática a lo largo del periodo de antesis. Los autores sostienen que el comportamiento de estos insectos facilita la autofertilización, ya que durante cada visita se depositan cantidades considerables de polen provenientes de las anteras sobre la superficie estigmática. Además, debido a que no se conoce ningún tipo de barrera bioquímica o fisiológica de autoincompatibilidad, ni tampoco la condición agamospérmica en la familia Nymphaeaceae, la efectividad de la autofertilización es deducida a partir de la abundancia de frutos encontrados con semillas aparentemente viables en las zonas estudiadas, lo cual parece sugerir la condición autógama de *N. ampla*. No obstante, estos trabajos son superficiales y carecen de estudios experimentales detallados para establecer sistemas de reproducción y agentes polinizantes. En función de caracterizar la biología reproductiva de *N. ampla* en un humedal herbáceo de la costa oriental del Lago de Maracaibo, en el presente trabajo se estudió la biología floral, los mecanismos de polinización, las estrategias reproductivas, así como la relación entre estos atributos, y se determinó la influencia de los caracteres reproductivos en la producción natural de frutos y semillas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio se realizó en la Ciénaga El Mene, municipio Santa Rita, estado Zulia (10°27' Lat. N, 71°27' Long. O). Esta zona comprende un área pantanosa y cenagosa de aproximadamente 80,83 ha, formada por la desembocadura del río Mene en terrenos de poca pendiente en la costa oriental del Lago de Maracaibo, específicamente entre el límite de los municipios Santa Rita y Cabimas. El clima del área es cálido y seco, y se caracteriza por altas temperaturas (29-30°C) y escasas precipitaciones (500 mm anuales), las lluvias ocurren en dos períodos, mayo y octubre-noviembre y tienen la particularidad que son fuertes pero muy cortas (Mapoteca Agustín Codazzi de La Universidad del Zulia 2005).

La población de *N. ampla* estudiada se encuentra ubicada en la zona norte del humedal, formando extensas manchas en áreas tranquilas de hasta 150 cm de profundidad. Las plantas se encuentran enraizadas sobre sedimentos arcillosos, de bajo pH (4,25-5,57), y con un bajo porcentaje de carbono orgánico (0,39-1,02%), y las propiedades físico-químicas del agua tienden a variar con respecto al período

del año: la salinidad aumenta desde 0,1 hasta 1,2 g/l durante la sequía, el pH varía de 6,8 a 8,32 y el oxígeno disuelto de 3 hasta 1,62 g/l (Barrios *et al.* 2007).

Biología floral

La morfología, color, forma y dimensiones florales fueron examinadas en condiciones naturales de campo. La clasificación de los tipos florales se realizó según Leppik (1977) y Faegri & van der Pijl (1979), y la caracterización morfológica de las partes florales y el tipo de placentación se describieron según Radford (1974). Para un total de 60 flores se contaron el número de pétalos, estambres, carpelos y óvulos. El número de óvulos por flor se calculó de manera indirecta en 60 flores en anthesis o en yemas bien desarrolladas a través del conteo bajo microscopio estereoscópico del número de óvulos en uno de los carpelos de la flor y multiplicando este resultado por el número total de carpelos. La longevidad floral fue evaluada en 20 flores por observaciones directas desde la apertura floral hasta el cierre definitivo de la flor. El proceso de anthesis, la dehiscencia de las anteras, la disponibilidad de polen en el tiempo y la receptividad estigmática, se establecieron por observación directa con una lupa de campo a intervalos de 1/2 h. Los estigmas fueron considerados receptivos por la presencia de líquido estigmático. Todas estas observaciones permitieron estimar la disponibilidad de polen y receptividad estigmática en función del tiempo. Además, se determinó si efectivamente la presencia de expresión sexual masculina y femenina ocurría simultáneamente (adigamia) o se expresaban desfasadas en el tiempo (dicogamia).

Polinización

Los visitantes florales fueron capturados durante dos días de observación, para un total de 18 horas. Los insectos capturados fueron examinados cuidadosamente para determinar el lugar de transporte y abundancia del polen transportado. Posteriormente, se discriminó entre visitantes florales y polinizadores de acuerdo a la abundancia de polen adherido al insecto, el contacto de la carga de polen con el estigma durante la visita y la relación del tamaño de la flor (diámetro) con la del visitante floral. La frecuencia de visitas para cada especie visitante fue establecida para el tiempo de observación.

El número de granos de polen sobre cada parte del cuerpo del visitante floral se cuantificó en 10 individuos por especie. Cada porción se colocó por separado en una solución de glicerina (0,2 ml) al 50% con agitación en un vórtex, y posteriormente se tomó una alícuota de la preparación y se contó el número de granos de polen en cámara de Neubauer. Este conteo se realizó en cinco réplicas para cada parte del cuerpo del visitante floral.

Eficiencia reproductiva

El número de semillas totales y abortadas por fruto se calculó de manera indirecta en 60 frutos maduros producidos de forma natural, a través del conteo bajo microscopio estereoscópico del número de semillas en uno de los lóculos y

posterior multiplicación de este resultado por el número total de lóculos por fruto. Es importante señalar que el número de semillas por fruto incluye las semillas abortivas, es decir, aquellas mal formadas, de tamaño reducido, aplastadas o carentes de embrión. La fracción de semillas abortadas se calculó dividiendo el número total de semillas abortadas por fruto entre el número promedio de semillas por fruto.

La producción natural de frutos por flor se determinó a partir del seguimiento de 27 flores en anthesis hasta la maduración del fruto. La división entre el número de frutos formados y el número inicial de flores marcadas representa la eficiencia natural. La producción de semillas por óvulo fue determinada dividiendo el número promedio de semillas por fruto entre el número promedio de óvulos por flor. La eficiencia reproductiva o fecundidad relativa (Ramírez 1992) fue estimada de la siguiente forma: restando al número de semillas por fruto el de semillas abortadas por fruto, multiplicando este resultado por el número promedio de frutos producidos por flor, y dividiendo el valor obtenido entre el producto del número de óvulos/flor por el número promedio de flores por inflorescencia.

Biomasa de frutos y semillas

El peso seco fruto y peso seco semilla de 20 unidades se determinó a partir de frutos secados en una estufa a 40°C durante cuatro semanas. El peso de las semillas por fruto se determinó multiplicando el peso promedio de las semillas por el número de semillas por fruto. La relación pericarpo:semilla se estimó restando al peso promedio del fruto, el peso de semillas por fruto y el resultado obtenido se dividió entre el peso de semillas por fruto. Esta relación proporciona una medida relativa del costo de la inversión materna:progenie. También se estimó el cambio de biomasa que ocurre desde la condición floral a la fase final de frutos producidos por la relación peso fruto/peso flor.

Biomasa floral

Cáliz, corola, androceo y gineceo de 20 flores fueron separados y secados en una estufa a 40°C hasta peso constante. El peso de la flor se estimó sumando los pesos secos promedios de cada verticilo floral. Tres índices de la inversión masculina (androceo) fueron estimadas a partir de la biomasa de los verticilos florales: 1- relación biomasa androceo: biomasa gineceo; 2- la biomasa masculina relativa fue estimada de acuerdo a la fórmula $M_1 = a/(a+g)$, donde a y g son los pesos secos promedios del androceo y gineceo respectivamente (Schoen 1982); y 3- la biomasa masculina post-cigótica fue estimada como $M_2 = a/(a+s)$, donde a representa el peso seco del androceo y s el peso total de semillas por fruto (Ramsey 1993).

Relación polen-óvulo

El número de granos de polen por antera se cuantificó en tres preparaciones con tres anteras de diferentes flores (individuos). En cada preparación, el número

de granos de polen fue contado en cinco alícuotas, y se determinó el número de granos de polen por antera como el promedio de las tres preparaciones. Finalmente el número de granos de polen por flor fue estimado multiplicando el número de granos de polen por antera por el número promedio de anteras por flor, el cual se cuantificó en 60 yemas florales. La relación polen: óvulo se calculó dividiendo el número de granos de polen por flor entre el número promedio de óvulos por flor. De acuerdo a Cruden (1977, 2000), la relación p/o refleja el sistema reproductivo de las especies. En el presente estudio, la relación p/o es usada como un parámetro adicional del sistema reproductivo estimado por los cruces controlados.

Carga de polen y germinación

La carga de polen sobre los estigmas se determinó en 10 estigmas expuestos a polinización natural y colectados 6 horas después de la antesis. El número total de granos de polen y los tubos polínicos que se desarrollaron en cada estigma fueron cuantificados. Para estimar la superficie estigmática, se colocaron los estigmas húmedos sobre papel, y se recortaron y pesaron cada una de las áreas obtenidas, luego se pesó un área de papel conocida y se hizo la equivalencia con cada uno de los estigmas. Debido a las grandes dimensiones de los estigmas, el conteo de polen y tubos polínicos se realizó en submuestras de 0,5 cm² diluidas en 0,2 ml de glicerina y en cámara de Neubauer; este valor posteriormente se extrapoló a cada una de las áreas estigmáticas respectivas.

Estrategia reproductiva

Se realizaron polinizaciones manuales controladas cubriendo los tratamientos polinización automática, autofertilización y fertilización cruzada, siguiendo la metodología descrita por Ruiz-Zapata & Arroyo (1978) y Sobrevila & Arroyo (1982) para un mínimo de diez individuos por prueba. Para evaluar la agamosperma, las flores fueron emasculadas en estado de yemas y aisladas para establecer la posible producción de frutos. Para la prueba de polinización automática, las yemas fueron aisladas en bolsas de material sintético hasta la producción de frutos y semillas sin la intervención de agentes externos. Para la autofertilización se aislaron las yemas un día antes de la apertura floral y fueron autopolinizadas manualmente durante la antesis, colocando polen de la misma flor sobre el estigma receptivo, lo cual permite determinar la capacidad de producir frutos y semillas por autopolinización bajo condiciones de aislamiento. Para la prueba de fertilización cruzada, las yemas fueron emasculadas antes de la antesis, polinizadas con polen proveniente de flores de otros individuos, y posteriormente aisladas hasta la producción de frutos y semillas. Este procedimiento permite cuantificar la eficiencia de la polinización cruzada bajo condiciones experimentales. Para cada tratamiento se contó el número de frutos y semillas producidas. El número de óvulos por prueba fue determinado multiplicando el número de flores bajo experimentación por el promedio de óvulos por flor.

La estrategia reproductiva de la especie se determinó utilizando tres índices,

cada uno de ellos calculado a nivel de fruto y a nivel de semillas (Ruiz-Zapata & Arroyo 1978): 1) El índice de autoincompatibilidad se calculó a partir de la relación frutos/flor y semillas/óvulos producidos por flor autofertilizada manual dividido entre frutos/flor y semillas/óvulos producidos por fertilización cruzada manual respectivamente; 2) El índice de autogamia (o Autopolinización Automática) se obtuvo dividiendo la relación de frutos/flor y semillas/óvulos producidos por autofertilización automática entre la relación de frutos/flor y semillas/óvulos producidos por autofertilización controlada; y 3) La condición de autogamia (Lloyd & Schoen 1992) se midió a partir de la relación de frutos/flor y semillas/óvulos producidos por polinización automática entre la relación de frutos y semillas producidos por polinización cruzada. Índices con valores mayores de 0,2 indican autogamia y autocompatibilidad genética, y valores menores indican autoincompatibilidad.

Biología de diseminación

Los frutos y semillas fueron caracterizados morfológicamente, incluyendo las dimensiones y estructuras asociadas a la diseminación. Las dimensiones de frutos (N = 42) y semillas (N = 50) fueron medidas tomando el largo y ancho para cada estructura. El síndrome de dispersión se determinó de acuerdo a las características generales del fruto y a las observaciones de campo, tomando en cuenta la clasificación de van der Pijl (1972).

RESULTADOS

Biología floral

Nymphaea ampla posee flores solitarias, emergentes, diurnas, hermafroditas, conspicuas, haplomórficas (Leppik 1977), con perianto actinomorfo y forma de plato o tazón (Faegri & van der Pijl 1979). El perianto es diclamídeo, compuesto por cuatro sépalos oblongo-lanceolados, verdes con líneas negras y por 10-20 (\bar{x} = 13,81; DE = 1,96) pétalos oblongo-lanceolados, de color blanco crema que contrastan con los 38-76 (\bar{x} = 61,26; DE = 7,23) estambres laminares amarillos. El ovario es apocárpico, constituido por 12-22 (\bar{x} = 18,56; DE = 2,33) carpelos lateralmente conniventes, cuya parte superior comprende la superficie estigmática de la flor. La placentación de los óvulos en el ovario es de tipo laminar, y éstos se encuentran rodeados por un mucílago transparente persistente en el fruto. El número de óvulos por flor fue de 3178-18 102 (\bar{x} = 8903,1; DE = 3636,27).

Las dimensiones florales fueron: diámetro externo \bar{x} = 10,98 cm (DE = 3,56), diámetro interno \bar{x} = 2,2 cm (DE = 0,62), y largo \bar{x} = 5,85 cm (DE = 1,76). La longevidad de las flores fue de 3 a 4 días, con una máxima apertura floral diaria de 7 horas desde las 8:00 hasta las 15:00 h. La dehiscencia de las anteras ocurre en la yema floral, de manera que al momento de la antesis gran parte del polen ya ha sido liberado y depositado sobre el estigma que también se encuentra receptivo. La producción de líquido estigmático ocurre durante el primer día de antesis conjun-

tamente con la emisión de un aroma dulce; al final del primer día de antesis el estigma ya se encuentra seco, la fragancia se hace menos intensa y los estambres han liberado la mayor parte del polen. Hacia el tercer y cuarto día de longevidad la flor comienza a marchitarse, y después del último cierre, la flor se sumerge nuevamente dentro del agua hasta la maduración del fruto.

Polinización

Las flores de *N. ampla* fueron visitadas por cinco especies de insectos pertenecientes a los órdenes Hymenoptera y Coleoptera, y distribuidas en las familias Apidae, Vespidae, Halictidae y Coccinellidae (Tabla 1). El principal visitante floral, el más frecuente fue *Apis mellifera*. Estas abejas se mueven rápidamente de flor en flor, deteniéndose brevemente unos pocos segundos en cada flor para coleccionar el polen que trasladan en sus patas posteriores. Este comportamiento ocasiona que grandes cantidades de polen propio caigan sobre el estigma, y eventualmente estas visitas en flores del primer día de antesis también podrían acarrear entrecruzamiento. En este sentido, si durante la actividad colectora el insecto hace contacto con la superficie estigmática la polinización cruzada puede ser factible debido a las relativamente grandes cantidades de polen que transportan estos animales principalmente en abdomen y extremidades (Tabla 2). La actividad de *A. mellifera* fue mayor entre las 9:30 y 11:30 h, con un promedio de 14, 28 visitas por flor cada media hora durante este período (Fig. 1). El resto de los insectos muestran ausencia de cargas de polen, y una rara y muy breve incidencia de visitas, por lo cual sólo fueron capturados esporádicamente fuera de los muestreos (Tabla 1).

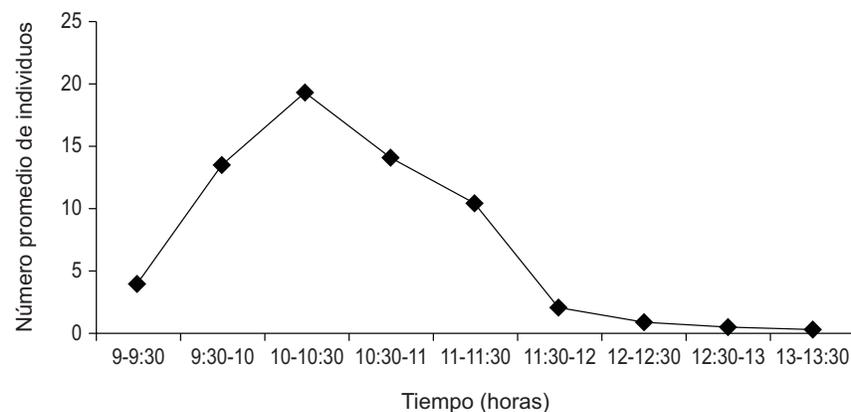
Tabla 1. Insectos visitantes de *Nymphaea ampla* en la ciénaga El Mene, municipio Santa Rita, estado Zulia.

ORDEN	Familia Especie	Tasa de visitas (individuos/hora)	Sitio transporte de polen	Tipo de actividad
HYMENOPTERA				
	Apidae			
	<i>Apis mellifera</i> L.	28,56	c, t, a, p	Polinizador
	Halictidae			
	<i>Augochlora</i> sp.	0,05	sp	Visitante
	Vespidae			
	<i>Brachygastra</i> sp.	0,05	sp	Visitante
	<i>Polybia</i> sp.	0,05	sp	Visitante
COLEOPTERA				
	Coccinellidae			
	<i>Coleomegilla maculata</i> DeGeer	0,11	sp	Visitante

c = cabeza, t = tórax, a = abdomen, p = patas, sp = sin polen

Tabla 2. Sitio de transporte y cargas de polen en *Apis mellifera*.

Sitio de transporte	Número de granos de polen \bar{X}	DE
Cabeza	250,0	294,62
Torax	987,5	1092,03
Abdomen	6000,0	15 490,47
Patas	30 537,5	46 369,66
Total	37 775,0	-

**Fig. 1.** Frecuencia de visitas de *Apis mellifera* en flores de *Nymphaea ampla* en la ciénaga El Mene, municipio Santa Rita, estado Zulia.

Carga de polen y germinación

El valor del área estigmática fue de 2,66 cm² (DE = 0,78) y el número promedio de granos de polen encontrado sobre los estigmas después de seis horas de antes corresponde a un promedio de 50 952,5 (N = 10), con un porcentaje de polen germinado de 50,23%. El número de granos de polen encontrados sobre los estigmas representa 5,72 veces el número promedio de óvulos por flor, sin embargo, sólo representa 2,92% del total de granos de polen producidos por flor. No obstante, esto concuerda con lo reportado por Cruden (1977), quien señala que de dos a siete granos de polen por óvulo son suficientes para maximizar la producción de semillas.

Biomasa floral

La fracción de biomasa asignada a cada verticilo floral fue mayor para el gineceo y menor para el androceo (Tabla 3). La relación biomasa reproductiva: biomasa vegetativa fue de 0,89, indicando un balance entre estos verticilos. En contraste, la relación biomasa androceo: gineceo fue de 0,31. La biomasa masculina

relativa a la biomasa reproductiva de la flor fue 0,23 y la biomasa reproductiva masculina post-cigótica fue aún menor (0,01), lo cual evidencia mayor asignación a la biomasa femenina comparada con la biomasa masculina de la flor.

Tabla 3. Valores de biomasa seca de los verticilos florales de *Nymphaea ampla*.

	Peso (mg)		Porcentaje (%)
	\bar{X}	DE	
Cáliz	296,37	161,86	33,69
Corola	167,81	91,41	19,07
Androceo	99,37	34,18	11,29
Gineceo	316,44	247,32	35,93
Flor	879,67	509,49	

Relación polen-óvulo

La relación polen-óvulo fue baja (Tabla 4), lo que cataloga a esta planta como autógama obligada o autógama facultativa de acuerdo a Cruden (1977).

Tabla 4. Número de estambres por flor, número de granos de polen por antera y por flor, número de óvulos por flor, y relación polen: óvulo en *Nymphaea ampla*.

Variables	N	\bar{X}	DE
Nº estambres/flor	60	61,3	7,2
Nº granos de polen/antera	9	28 455,6	-
Nº granos de polen/flor		1 743 187,6	-
Nº óvulos/flor	60	8903,1	3636,3
Relación polen/óvulo		195,8	-

Eficiencia reproductiva

La producción natural de frutos por flor y semillas por óvulos fue de 96,29% y 98,64%, respectivamente. El número promedio de semillas por fruto fue 8782,28 (DE = 3065,8) y el número promedio de semillas abortadas por fruto fue 522,97 (DE = 566,69). La alta tasa de producción natural de frutos por flor y semillas por óvulos, y los bajos niveles de semillas abortadas contribuyeron a una alta fecundidad relativa (89%).

Biomasa de frutos y semillas

El peso seco promedio del fruto fue 8,06 g (DE = 4,79) y el peso seco promedio de la semilla 0,8 mg (DE = 0,34). El peso total de semillas por fruto fue de 7,02 g, y el peso del pericarpio 1,03 g, en consecuencia la relación pericarpio: semilla fue baja (0,14), indicando que existe una mayor inversión de biomasa en la producción de semillas que en la producción de pericarpio del fruto. La relación peso fruto: peso flor también fue baja (9,16), lo cual indica una baja asignación de biomasa desde la fase floral hasta la formación del fruto.

Estrategia reproductiva

Las pruebas reproductivas indican que *N. ampla* es una especie no agamosperma, autocompatible (Tabla 5). La proporción de frutos producidos por autopolinización fue igual entre las pruebas de polinización automática y autopolinización manual, mientras que la proporción de semillas producidas por autopolinización manual fue mayor que las producidas por polinización automática. Por otra parte, la proporción de frutos/flor y semillas/óvulos producidos por autopolinización manual también fueron mayores que las proporciones obtenidas por polinización cruzada. Este resultado indica gran afinidad por el polen propio, mientras que parece haber rechazo del polen procedente de diferentes individuos de la población.

Tabla 5. Resultados de las pruebas experimentales reproductivas en *Nymphaea ampla*.

Prueba aplicada	Nº flores	Frutos producidos N (%)	Semillas producidas N (%)
Agamospermia	15	0 (0)	0 (0)
Polinización automática	19	19 (100,0)	39 836 (23,3)
Autopolinización manual	15	15 (100,0)	136 703 (100,0)*
Polinización cruzada	15	13 (86,7)	4681 (3,5)

* El porcentaje de semillas producidas fue mayor a 100% (102,4%) debido a que la producción de semillas formadas fue mayor a la estimada a partir del promedio de óvulos examinados.

Los índices de autocompatibilidad genética difieren en cuanto a los niveles obtenidos a nivel de fruto (1,16) y a nivel de semilla (29,24), aunque ambos indican autocompatibilidad. Los índices de autogamia de acuerdo a Ruiz-Zapata & Arroyo (1978) a nivel de fruto (1,00) y de semilla (0,22), y los índices de autogamia de Lloyd & Schoen (1992) también calculados para fruto (1,16) y semilla (6,67), sugieren una condición autógena para la especie.

Biología de diseminación

El fruto de *N. ampla* es una baya globosa color verde, plurilocular, de exocarpio fuerte y generalmente revestida por el perianto y androceo persistente. Los frutos miden en promedio 3,08 cm de largo (DE = 0,49) y 4,22 cm de ancho (DE = 0,73). La dehiscencia del fruto ocurre de forma irregular por hinchamiento del mucílago bajo el agua. Las semillas son de color verde, esféricas, cubiertas de tricomas y envueltas en un arilo translúcido que les confiere flotabilidad. Las semillas miden en promedio 1,71 mm de largo (DE = 0,28) y 1,41 mm de ancho (DE = 0,6); la dispersión principalmente es de tipo hidrocora, las semillas flotan hasta que se sumergen por la pérdida del arilo, pero también se observaron aves acuáticas alimentándose de los frutos, por lo que no puede descartarse la zoocoria.

DISCUSIÓN

Según Conard (1905), *Nymphaea ampla* pertenece al subgénero de distribución pantropical *Brachyceras*; este taxón junto con los miembros de los subgéneros *Anecphyta* y *Nymphaea* que también presentan anthesis diurna, parecen ser polinizados por himenópteros o dípteros (Schneider 1982; Capperino & Schneider 1985; Wiersema 1988). Algunas características florales de *N. ampla*, tales como el período de apertura floral diurna, el contraste de los estambres amarillos con el perianto blanco, la emisión de fragancia dulce, y el gran número de óvulos por flor, también podrían sugerir la presencia de abejas como agente polinizador, tal como sucede en otras especies de los subgéneros anteriormente citados. De hecho, Prance & Anderson (1976) reportan a la abeja *Trigona spinipes* como el principal visitante floral de esta especie en una localidad en el centro de Brasil, aunque aseguran que debido a la baja densidad de estos insectos y a la poca cantidad de polen que pueden transportar en comparación con las grandes cantidades de polen propio que se depositan sobre el estigma, la autogamia debe ser el mecanismo de polinización predominante.

En este trabajo el principal visitante floral de *N. ampla* resultó ser la abeja introducida *Apis mellifera*, la cual también ha sido reportada como uno de los polinizadores principales y efectivos de *Nymphaea mexicana* en el estado de Texas, EEUU (Capperino & Schneider 1985). Sin embargo, al comparar las dimensiones florales de *N. ampla* con el tamaño de los polinizadores reportados en el presente estudio y por Prance & Anderson (1976) en Brasil, se observa que la relación actual no parece corresponder con los agentes polinizadores que seleccionaron las características morfológicas y morfométricas de *N. ampla* originalmente. En tal sentido, puede ser sugerido un anacronismo floral, debido a que los polinizadores actuales de esta especie no muestran armonía con relación a las características florales. Lepik (1977) establece que el tipo de flor haplomórfica característico de los géneros filogenéticamente primitivos como *Nymphaea*, son libremente accesibles a todos los insectos, pero visitadas principalmente por escarabajos, moscas y otros polinizadores inexpertos. De acuerdo a lo anterior pareciera que las características florales de *N. ampla* fueron moldeadas a través de interacciones evolutivas con otro tipo de insectos, y que posiblemente factores como la ampliación de los rangos de distribución más allá de su centro de origen han resultado en la utilización de polinizadores generalistas poco eficientes en la dispersión del polen y/o en la adquisición de mecanismos de reproducción por autopolinización.

En este contexto, aunque *A. mellifera* posee tasa de visitas por flor y puede transportar relativamente grandes cantidades de polen principalmente en abdomen y extremidades, el papel principal de estos insectos en las flores de *N. ampla* parece ser el de facilitar la autofertilización, tal como lo reportan Prance & Anderson (1976) con la abeja *Trigona* en esta misma especie. Con relación a esto, Lloyd & Schoen (1992) reconocen que el comportamiento de algunos insectos forrajeros puede promover lo que ellos denominan como autopolinización facilitada, y que la efectividad del proceso va a depender del tipo de movimiento del animal, el tiem-

po que permanece en cada flor, y la posición de anteras y estigmas. Del mismo modo, otros factores como la autopolinización previa, o dehiscencia de las anteras y receptividad del estigma antes de la anthesis (Lloyd & Schoen 1992), que también ha sido previamente reportado en esta especie por Prance & Anderson (1976) y Wiersema (1988), y en *Nymphaea stellata* por Conard (1905), aunado a la producción de 100% de frutos y semillas por autofertilización manual, permiten determinar que la autogamia prevalece como principal estrategia reproductiva en *N. ampla*, tal como se había reportado anteriormente por Prance & Anderson (1976).

La adquisición de la autogamia como estrategia reproductiva en el género *Nymphaea*, y fundamentalmente en el subgénero *Brachyceras*, ha sido principalmente relacionada con sucesos de distribución de especies. Si las barreras iniciales de dispersión son superadas, entonces el establecimiento y sobrevivencia de las especies en nuevos ambientes estarían fuertemente vinculados con la capacidad reproductiva de maximizar la producción de semillas en ausencia de polinizadores potenciales, y al mismo tiempo producir cierta cantidad de progenie con características de adaptación a las condiciones ambientales similares a las de la planta madre. Del mismo modo, bajo situaciones de colonización, esta estrategia eliminaría la necesidad de un segundo individuo para llevar a cabo la polinización, aunque este obstáculo también podría ser superado fácilmente por propagación vegetativa o geitonogamia en individuos multifloreos si existen vectores eficientes para el transporte de polen (Wiersema 1988).

Con relación a lo expuesto anteriormente, si se considera que la condición autógena en *N. ampla* es un carácter secundario o adquirido, entonces llama la atención que en este trabajo la producción de frutos y semillas por polinización cruzada fuera considerablemente menor con relación a los producidos por autopolinización. Estos resultados podrían considerarse como depresión por exogamia, ya que una de las medidas de depresión es la reducción en el número de semillas que se producen (Raimúndez & Ramírez 1998; Valerio & Ramírez 2003), y en este sentido, el rechazo por el polen externo puede verse como una respuesta de una planta altamente adaptada a su ambiente, que evita la variación genética y promueve la fijación de dichos genotipos altamente adaptados (Richards 1990).

Otros atributos que también soportan la condición autógena en *N. ampla* se relacionan con la tendencia hacia minimizar los costos reproductivos y maximizar la eficiencia reproductiva: en primer lugar la baja relación polen-óvulo (195,79), de acuerdo al criterio de Cruden (1977) corresponde con valores señalados para especies con autogamia facultativa de ambientes perturbados o estados sucesionales tempranos. Además, según Cruden (1977), este tipo de flores tiende a presentar autopolinización previa, de manera que la exposición del estigma receptivo a los posibles polinizadores ocurre después que se ha efectuado la autopolinización. En segundo lugar, la baja asignación relativa de biomasa masculina pre- y post-cigótica y el balance entre la inversión en biomasa sexual y en biomasa floral vegetativa también han estado generalmente relacionadas con el incremento en los niveles de autocompatibilidad. Puesto que la seguridad de la polinización reduce la inversión

prefertilización en estructuras sexuales, principalmente masculinas, y en estructuras de atracción a los polinizadores, los recursos pueden invertirse en estructuras femeninas postfertilización, es decir, frutos y semillas (Charlesworth & Charlesworth 1987; Brunet 1992; Raimúndez & Ramírez 1998). En tercer lugar, la baja relación pericarpo/semilla indica bajo costo de inversión materna (pericarpo) con relación a la inversión en progenie (semillas), es decir, se hace un uso más económico y eficiente de los recursos maternos empaquetando la mayor cantidad de semillas mientras se reduce el costo de la pared del fruto. Esta condición contribuye al éxito reproductivo de estas especies, y está particularmente asociada a plantas donde el transporte de polen ocurre en masas, en la cual la rivalidad entre semillas parece ser menor por la baja diversidad genética de la progenie (Ramírez & Berry 1993).

Por otra parte, la alta eficiencia en la producción de frutos y semillas en *N. ampla* implican una eficiencia reproductiva considerablemente alta. La tasa de producción de frutos/flor (92,28%) fue incluso superior que la reportada por Sutherland & Delph (1984) para plantas hermafroditas autocompatibles (72,5%). En este sentido, Sutherland (1986) supone que la autogamia reduce la competencia entre granos de polen y por lo tanto la asignación de recursos a la función masculina es reducida, con lo cual aumenta la aptitud femenina. El mismo autor también plantea que la autopolinización promueve la homocigosis, y en consecuencia disminuye la variación genética de las semillas a la vez que purga los genes letales y subletales; este carácter reduce las bases para la retención selectiva de frutos que ocurre en algunas especies y en consecuencia resulta en mayor producción de frutos y semillas. Otros factores señalados por Sutherland (1986) como determinantes de la producción de frutos en plantas autocompatibles incluyen la latitud y el tipo de fruto. De acuerdo a esto, en un análisis sobre una muestra de 447 especies de plantas, este autor encontró que las especies tropicales se encuentran correlacionadas con la producción de frutos costosos y en consecuencia con mayor proporción de abortos y menor producción de frutos por flor. Su designación de frutos costosos y económicos se basó en una evaluación cualitativa del tipo morfológico de fruto, en la cual los frutos tipo baya son catalogados como costosos. Sin embargo, en este trabajo la relación peso fruto: peso flor en *N. ampla* fue incluso menor que la reportada por Ramírez & Berry (1993) para frutos económicos en un análisis de 232 especies de plantas, lo cual sugiere que el éxito reproductivo en esta especie se encuentra asociado con un mayor balance energético entre los eventos pre- y post-fertilización.

En cuanto al tipo de dispersión, Ramírez & Berry (1993) comentan que cuando la semilla es la unidad de dispersión, hay una baja relación pericarpo: semilla y aumentan los niveles de óvulos abortados (27,22%), probablemente como resultado de la competencia entre los miembros de la progenie que a bajos valores de la relación pericarpo: semilla requieren o demandan más recursos que el óptimo materno. Sin embargo, en este trabajo el porcentaje de semillas abortadas (5,95%) fue extremadamente bajo, y en este sentido, la condición apocárpica podría estar disminuyendo la rivalidad entre los miembros de la camada durante

la formación del fruto e incrementando la relación semilla: óvulo (Ramírez & Berry 1993).

El número de semillas por fruto y el tamaño de las semillas también pueden afectar la capacidad de dispersión, ya que para muchas especies del género *Nymphaea* la producción de numerosas semillas de pequeño tamaño parece estar relacionada con amplios rangos de distribución (Wiersema 1988). Otros factores muy importantes para la dispersión se relacionan con las características intrínsecas de las semillas de *Nymphaea*, como por ejemplo la presencia de mucílago y burbujas de aire dentro del arilo que facilitan la flotación y diseminación de las semillas (Conard 1905). Bonilla *et al.* (2000) reportan que en *N. ampla*, y en general en el subgénero *Brachyceras*, el arilo cubre una proporción del 50-75% de la semilla, y aunque no se conoce exactamente el período de flotabilidad en esta especie, puede compararse con *Nymphaea rudgeana* del subgénero *Hidrocallis*, también de distribución neotropical, en la cual el arilo tiene una duración aproximada de 10-20 horas (Castillo *et al.* 1993), tiempo suficiente para que la semilla pueda ser trasladada por las corrientes lejos del competitivo hábitat parental. No obstante, hay que considerar que en ambientes lénticos la dispersión hidrocóra sólo permite el desplazamiento de la semilla en las vecindades de la planta madre lo cual podría limitar la dispersión de genes dentro de la población, y a su vez influenciar los patrones de entrecruzamiento, de tal modo que sólo por medio de períodos de inundación eventuales las semillas podrían tener un rango relativamente mayor de desplazamiento.

En conclusión, en *N. ampla* se observa una continua variación de los mecanismos iniciales de polinización melitófila considerados primitivos en el subgénero *Brachyceras*, y en contraste, se ha adoptado el sistema autógeno como alternativa reproductiva a la dependencia total de xenogamia y geitonogamia. Además, la adquisición de esta estrategia permite ampliar los rangos de distribución, y facilita el establecimiento en ambientes con polinizadores ausentes, inespecializados o ineficientes, al mismo tiempo que le permite independizarse de los factores externos impredecibles y dirigir mayor cantidad de recursos a la producción de frutos y semillas. Este patrón podría ser muy beneficioso en cuerpos de agua donde las poblaciones permanecen aisladas, no obstante, la alta adaptación al ambiente puede llegar a ser tan extrema que conlleva al rechazo del polen no propio, resultando en una depresión por exogamia.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a N.H. Barrios, N.J. Barrios, J. Parra, M. Padrón y a la familia Cotez Gómez por su valiosa colaboración en las actividades de campo, y al Profesor J. Camacho por la identificación de los insectos. A J.M. Nassar y un árbitro anónimo por sus valiosas sugerencias y comentarios. Este trabajo es el producto de la asignatura Biología Reproductiva de Angiospermas, Postgrado en Botánica, Universidad Central de Venezuela.

BIBLIOGRAFÍA

- Badano, E. & B. Schlumpberger. 2001. Sistema de cruzamiento y estimaciones en la eficiencia de polinización sobre *Trichocereus pasacana* (Cactaceae) en dos poblaciones del noroeste argentino. *Gayana Bot.* (58)2: 115-122.
- Barrios, Y., J.O. Zambrano, D. Pacheco, M. Pietrangeli & J. Fuenmayor. 2007. Vegetación acuática de la ciénaga El Mene, municipio Santa Rita, estado Zulia, Venezuela. *Revista Fac. Agron. (LUZ)*. 24(1): 405-410.
- Bonilla, J., A. Novelo, Y. Hornelas & J. Márquez-Guzman. 2000. Comparative seed morphology of Mexican *Nymphaea* species. *Aquatic Bot.* 68: 189-204.
- Brunet, J. 1992. Sex allocation in hermaphroditic plants. *Trends Ecol. Evol.* 7: 79-84.
- Capperino, M. & E. Schneider. 1985. Floral biology of *Nymphaea mexicana* Zucc. (Nymphaeaceae). *Aquatic Bot.* 23: 83-93.
- Castillo, M., J. Vélasquez & N. Enrech. 1993. Biología floral de *Nymphaea rudgeana* G.F.W. Meyer (Nymphaeaceae). *Acta Biol. Venez.* 14(2): 11-38.
- Conard, H.S. 1905. The waterlilies: a monograph of the genus *Nymphaea*. *Publ. Carnegie Inst. Wash.* 4: 1-279.
- Cruden, R.W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.
- Cruden, R.W. 2000. Pollen grains: why so many? *Pl. Syst. Evol.* 222:143-165.
- Faegri, K. & L. van der Pijl. 1979. *The principles of Pollination Ecology*. Pergamon Press, New York.
- Leppik, E. 1977. *Floral evolution in relation to pollination ecology*. Today & Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi.
- Lloyd, D. & D. Schoen. 1992. Self-and cross fertilization in plants. I. Functional dimensions. *Int. J. Plant Sci.* 153(3): 358-369.
- Mapoteca Agustín Codazzi de La Universidad del Zulia. 2005. El Zulia y sus municipios. Entrega N° 3.
- Prance, G. & A. Anderson. 1976. Studies of the biology of neotropical Nymphaeaceae. *Acta Amazon.* 6(2): 163-170.
- Radford, A.E., W.C. Dickison, J.R. Massey & C.R. Bell. 1974. *Vascular plant systematics*. Harper & Row, Nueva York.
- Raimúndez, E. & N. Ramírez. 1998. Estrategia reproductiva de una hierba perenne: *Hypoxis decumbens* (Hypoxidaceae). *Revista Biol. Trop.* 46(3): 555-565.
- Ramírez, N. 1992. Las características de las estructuras reproductivas, niveles de aborto y semillas producidas. *Acta Ci. Venez.* 43: 167-177.
- Ramírez, N & P. Berry. 1993. Producción y costo de frutos y semillas relacionados a los tipos morfológicos de frutos, unidad de dispersión y síndromes de dispersión. *Ecotropicos* 6(1): 43-61.

- Ramírez, N. & Y. Brito. 1990. Reproductive biology of a tropical palm swamp community in the Venezuelan llanos. *Amer. J. Bot.* 77(19): 1260-1271.
- Ramsey, M. 1993. Floral morphology, biology and sex allocation in disjunct populations of christmas bell (*Blandfordia grandiflora*, Liliaceae) with different breeding systems. *Australian J. Bot.* 41: 749-762.
- Richards, A.J. 1990. *Plant breeding systems*. George Allen & Unwin (Publishers) Ltd., London.
- Ruiz-Zapata, T. & M.T.K. Arroyo. 1978. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous forest in Venezuela. *Biotropica* 10: 221-230
- Schneider, E. 1982. Notes on the floral biology of *Nymphaea elegans* (Nymphaeaceae) in Texas. *Aquatic Bot.* 12: 197-200.
- Schoen, D.J. 1982. Male reproductive effort and breeding system in a hermaphrodite plant. *Oecología* 53: 255-257.
- Sobrevila, C. & M.T.K. Arroyo. 1982. Breeding systems in a montane tropical cloud forest in Venezuela. *Pl. Syst. Evol.* 140: 19-37.
- Sutherland, S. 1986. Patterns of fruit-set: what controls fruit-flower ratios in plants? *Evolution* 40: 117-128.
- Sutherland, S. & L. Delph. 1984. On the importance of male fitness in plants: Patterns of fruit set. *Ecology* 65(4): 1092-1104.
- Valerio, R. & N. Ramírez. 2003. Depresión exogámica y biología reproductiva de *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertner (Portulacaceae). *Acta Bot. Venez.* 26(2): 111-124.
- van der Pijl, L. 1972. *Principles of dispersal in higher plants*. Second edition. Springer-Verlag. Berlin.
- Wiersema, J. 1988. Reproductive biology of *Nymphaea* (Nymphaeaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 75: 795-804.

