



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales

Cuernavaca, Morelos, a 17 de mayo del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Raúl Ernesto Alcalá Martínez (director de tesis CIBYC-UAEM)

Dr. Juan Enrique Fornoni Agnelli (IE-UNAM)

Dr. César Augusto Domínguez Pérez Tejada (IE-UNAM)

Dra. Sandra Milena Ospina Garcés (FC-UNAM)

Dra. Marcela Osorio Beristain (CIBYC-UAEM)

Dra. Concepción Martínez Peralta (EESJ-UAEM)

Dra. Paula Vargas Pellicer (CIBYC-UAEM)

Tesis: "Selección fenotípica y depresión por endogamia en la planta carnívora *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae)"

Alumno que lo presenta a revisión: SARA GABRIELA SÁNCHEZ VILLEGAS

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. RAÚL ERNESTO ALCALÁ MARTÍNEZ



Cuernavaca, Morelos, a 17 de mayo del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Raúl Ernesto Alcalá Martínez (director de tesis CIBYC-UAEM)

Dr. Juan Enrique Fornoni Agnelli (IE-UNAM)

Dr. César Augusto Domínguez Pérez Tejada (IE-UNAM)

Dra. Sandra Milena Ospina Garcés (FC-UNAM)

Dra. Marcela Osorio Beristain (CIBYC-UAEM)

Dra. Concepción Martínez Peralta (EESJ-UAEM)

Dra. Paula Vargas Pellicer (CIBYC-UAEM)

Tesis: "Selección fenotípica y depresión por endogamia en la planta carnívora *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae)"

Alumno que lo presenta a revisión: SARA GABRIELA SÁNCHEZ VILLEGAS

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE



DR. JUAN ENRIQUE FORNONI AGNELLI



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DES de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Naturales



Cuernavaca, Morelos, a 17 de mayo del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Raúl Ernesto Alcalá Martínez (director de tesis CIBYC-UAEM)

Dr. Juan Enrique Fornoni Agnelli (IE-UNAM)

Dr. César Augusto Domínguez Pérez Tejada (IE-UNAM)

Dra. Sandra Milena Ospina Garcés (FC-UNAM)

Dra. Marcela Osorio Beristain (CIBYC-UAEM)

Dra. Concepción Martínez Peralta (EESJ-UAEM)

Dra. Paula Vargas Pellicer (CIBYC-UAEM)

Tesis: "Selección fenotípica y depresión por endogamia en la planta carnívora *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae)"

Alumno que lo presenta a revisión: SARA GABRIELA SÁNCHEZ VILLEGAS

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. CÉSAR AUGUSTO DOMÍNGUEZ PÉREZ TEJADA

Cuernavaca, Morelos, a 17 de mayo del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Raúl Ernesto Alcalá Martínez (director de tesis CIBYC-UAEM)

Dr. Juan Enrique Fornoni Agnelli (IE-UNAM)

Dr. César Augusto Domínguez Pérez Tejada (IE-UNAM)

Dra. Sandra Milena Ospina Garcés (FC-UNAM)

Dra. Marcela Osorio Beristain (CIBYC-UAEM)

Dra. Concepción Martínez Peralta (EESJ-UAEM)

Dra. Paula Vargas Pellicer (CIBYC-UAEM)

Tesis: "Selección fenotípica y depresión por endogamia en la planta carnívora *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae)"

Alumno que lo presenta a revisión: SARA GABRIELA SÁNCHEZ VILLEGAS

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO



ATENTAMENTE

DRA. SANDRA MILENA OSPINA GARCÉS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 17 de mayo del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Raúl Ernesto Alcalá Martínez (director de tesis CIBYC-UAEM)

Dr. Juan Enrique Fornoni Agnelli (IE-UNAM)

Dr. César Augusto Domínguez Pérez Tejada (IE-UNAM)

Dra. Sandra Milena Ospina Garcés (FC-UNAM)

Dra. Marcela Osorio Beristain (CIBYC-UAEM)

Dra. Concepción Martínez Peralta (EESJ-UAEM)

Dra. Paula Vargas Pellicer (CIBYC-UAEM)

Tesis: "Selección fenotípica y depresión por endogamia en la planta carnívora *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae)"

Alumno que lo presenta a revisión: SARA GABRIELA SÁNCHEZ VILLEGAS

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. MARCELA OSORIO BERISTAIN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA MARCELA OSORIO BERISTAIN | Fecha:2021-11-06 07:20:32 | Firmante

OhIWJNqdyVT5epdm+DtuQfnKfMpaXoHm+graRSS291LobehmMxhCEgqjXQb0w+ZkVZdJVr9nqWfcDVbcQY42NmghoDNWLAzccqLKuSplYpq6rTWux3259ZCKub4822E8K4S1vlg6ABxgLTpPEknGuPn3L7sg/4PDYvGfgVpy2r7CvT1L6nJD+ySyplHdmAPpL7wgD2ju/rYIUQhtGX3YVSalYqd43vWdFLzSltr/+57w2Mw+4w8QmMYbfzsoJLQD0ealsxMbwml2+Nhnrnh/sr+BkPCQEXGZZKMSJgxbCIZlxN2o9Xhq37uj7LFRFucM4KwuREdjkDwKd6dgpVPw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[QzIIKENc1](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/RHOqHZAB5arPlxqfbYzMKimixq2WkTZm>





Cuernavaca, Morelos, a 17 de mayo del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Raúl Ernesto Alcalá Martínez (director de tesis CIBYC-UAEM)

Dr. Juan Enrique Fornoni Agnelli (IE-UNAM)

Dr. César Augusto Domínguez Pérez Tejada (IE-UNAM)

Dra. Sandra Milena Ospina Garcés (FC-UNAM)

Dra. Marcela Osorio Beristain (CIBYC-UAEM)

Dra. Concepción Martínez Peralta (EESJ-UAEM)

Dra. Paula Vargas Pellicer (CIBYC-UAEM)

Tesis: "Selección fenotípica y depresión por endogamia en la planta carnívora *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae)"

Alumno que lo presenta a revisión: SARA GABRIELA SÁNCHEZ VILLEGAS

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. CONCEPCIÓN MARTÍNEZ PERALTA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

CONCEPCION MARTINEZ PERALTA | Fecha:2021-11-30 11:26:03 | Firmante

a1bkPW+e6MTQBrKniITkzpzWG2832T5eDkGx7dNHn+iMDSgrt0/y5Z9L/MY5UYfqYYLyQaNtKH/6skrJMmBJOhO8tKwXfTM4jqHWDSyDYu7dYDlLoV5CbGxLAHPX8OTsyT6/9dM+13ZhU1jzMGzrY+fDya56z97UCFVHcvvx4f/SXr+Q3aDUsQWoB/9gCRQPzdU/m5gTXuSjYGwnGBCj/TUP2uuvvCAv+uX6lDYjaylh0il601ErGoNyv12Zr94pASNrsiINWmmp3UevtEI0lrg/O9H38vmofyEUjaFAEGuPZTf9mG8GjUaQyutYi7MC6htxqkAaFxrDgSRS/mjHA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[iH2kCdGbB](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/UDlwyvRQk0TMsqL3mEQAbsF3AhsKDRv>





Cuernavaca, Morelos, a 17 de mayo del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Raúl Ernesto Alcalá Martínez (director de tesis CIBYC-UAEM)

Dr. Juan Enrique Fornoni Agnelli (IE-UNAM)

Dr. César Augusto Domínguez Pérez Tejada (IE-UNAM)

Dra. Sandra Milena Ospina Garcés (FC-UNAM)

Dra. Marcela Osorio Beristain (CIBYC-UAEM)

Dra. Concepción Martínez Peralta (EESJ-UAEM)

Dra. Paula Vargas Pellicer (CIBYC-UAEM)

Tesis: "Selección fenotípica y depresión por endogamia en la planta carnívora *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae)"

Alumno que lo presenta a revisión: SARA GABRIELA SÁNCHEZ VILLEGAS

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. PAULA VARGAS PELLICER



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

PAULA VARGAS PELLICER | Fecha:2021-10-26 23:22:29 | Firmante

K7LGDYJ5KJ/ZRI0Q6aQP+55p4AxBoY3EShn66ZsT8M+3NShTqzspqYn1pOtKkoz/pWjAdTrPTfRsSiTM/dbWfTylNc3Ra75wm5cYwMyXFt3ZxvutRv2wLc7if0Vb83xzCloTimhboVmt+PoUO9cWXtd20z82M7vnSsy8jip81sEK9hBjNVd+gbUqveCb/m90Rve/cYlJZ+5o9NiFzBqtcLe7LEuVv8T01HeDuatkXwBXTvwsgQ43vk1n6ho1xpj8W5Aw+M8Obb9Bz+P+XnmWvJq7QS2XwqYfJwll6+8TaAFKtFkybiV9LQbdVqp7A2mAoXkB51D05FDE2yNcUBBDg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[kyE5Sbn0x](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ErMetos0FIQcbVXKvI0ytveH7uYle9dv>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

**SELECCIÓN FENOTÍPICA Y DEPRESIÓN POR ENDOGAMIA EN
LA PLANTA CARNÍVORA *Pinguicula moranensis*
(LENTIBULARIACEAE)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS NATURALES

PRESENTA:

M. en BByC SARA GABRIELA SÁNCHEZ VILLEGAS

DIRECTOR: DR. RAÚL ERNESTO ALCALÁ MARTÍNEZ

CUERNAVACA, MORELOS

FEBRERO 2022

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de manutención (no. 307402) otorgada durante el doctorado.

Al Dr. Raúl Alcalá por dirigir este trabajo.

Al comité sinodal: Dra. Sandra Ospina, Dr. Juan Fornoni, Dr. César Domínguez y Dra. Ana Almendra por sus valiosos aportes al proyecto.

Al Dr. Pedro Valverde, Dra. Dulce Figueroa, Dra. Sofía Solórzano, Dra. Ana Almendra, Dr. Eduardo Cuevas, Dr. Juan Fornoni, Dra. Concepción Martínez, Dra. Marcela Osorio y Dra. Paula Vargas, quienes hicieron importantes aportes durante las evaluaciones de los exámenes de permanencia, predoctoral y de grado.

A Marco González por su esfuerzo y dedicación para la obtención de datos en campo.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| Resumen..... | 4 |
| Introducción..... | 6 |
| Capítulo I: Polinización en plantas carnívoras con énfasis en la familia Lentibulariaceae..... | 12 |
| Capítulo II: Historia natural de <i>Pinguicula moranensis</i> | 19 |
| Capítulo III: Effects of crossing distance on fitness components in the carnivorous plant <i>Pinguicula moranensis</i> (Lentibulariaceae)..... | 27 |
| Capítulo IV: Is there phenotypic selection on floral traits in a carnivorous plant exhibiting zygomorphic corollas?..... | 38 |
| Discusión General..... | 56 |
| Consideraciones Finales..... | 61 |
| Literatura Citada..... | 62 |

RESUMEN

El hábito carnívoro ha permitido a algunos linajes de plantas adaptarse a hábitats pobres en nutrientes, pero como el resto de las angiospermas requieren de agentes bióticos para su polinización. Si bien, la interacción con sus presas ha sido estudiada ampliamente, los componentes que median la interacción con sus polinizadores apenas comienzan a ser estudiados. El primer capítulo contiene una breve revisión acerca del conocimiento que se tiene sobre la ecología reproductiva en especies de plantas carnívoras de la familia Lentibulariaceae, destacando que estas especies se caracterizan por tener corolas zigomorfas que sugieren una interacción estrecha con polinizadores. En el segundo capítulo se hace una recapitulación de los aspectos más relevantes de la historia natural de *Pinguicula moranensis* L. Dada su condición sésil, las plantas dependen en buena parte de la atracción de insectos para su polinización, por lo que la caracterización del patrón de transferencia de polen es determinante para descifrar sus posibles consecuencias sobre la adecuación de las plantas. Por lo tanto, en el tercer capítulo, se pone a prueba la hipótesis de una distancia óptima de polinización, por lo que se reportan los resultados de un experimento de polinización manual en el que se analiza el efecto de la distancia a la que se mueve el polen (0, 1, 4, 460 y 9,900 m) sobre el número de semillas, la germinación y la sobrevivencia de plántulas en condiciones *in situ* y *ex situ*. Los valores de depresión por endogamia encontrados (0.94 a 0.98) corresponden a valores obtenidos en especies que tienden a la entrecruza y son forzadas a autofertilización. No se encontró evidencia de depresión por exogamia. El movimiento de polen a distancias mayores a 1 m parece ser suficiente para evadir efectos negativos de apareamientos endogámicos. En el cuarto capítulo, se evaluó la intensidad y la forma de la selección fenotípica que opera sobre atributos florales (forma de corola, área de corola, longitud de espolón, área de guía de néctar, longitud de escapo y área de roseta). Para evaluar el papel relativo de los polinizadores como agentes selectivos se

compararon los gradientes de selección en plantas que recibieron polinización manual y plantas con polinización natural. Se encontró evidencia de limitación por polen utilizando como variables de respuesta el número de semillas por fruto (PL= 0.39) y el *fruit set* (PL = 0.37), pero no evidencia de selección mediada por polinizadores. En general, aunque las características florales de *P. moranensis* están relacionadas a un grupo particular de polinizadores su adecuación pareciera estar más determinada posiblemente por su hábito carnívoro que por la interacción con polinizadores.

INTRODUCCIÓN

Las adaptaciones son atributos que forman parte del fenotipo de los individuos y que han sido moldeados por la selección natural (Brodie et al., 1995; Wood & Brodie 2016). Esto significa que, a lo largo de las generaciones, los atributos fenotípicos cambian incrementando la eficiencia de los individuos para lidiar con algún problema que el ambiente plantea, ya sea desde el medio abiótico o producto de las interacciones con otras especies. Las adaptaciones también están vinculadas con el incremento en la diversidad al representar el desarrollo de atributos novedosos que anteriormente no existían y que permiten la evolución de los linajes que las desarrollaron (Gottlieb 1984; Wood & Brodie 2016).

En el caso de las plantas, se han reconocido asombrosas adaptaciones que les han permitido resolver problemas asociados con la escasez de recursos como agua, nutrientes o luz (Vance et al., 2003; Jones 2011; Field et al., 2013). También se han documentado algunas adaptaciones derivadas de su interacción con los animales, como los mecanismos asociados con la defensa en contra de herbívoros (Unsicker et al., 2009; Mithöfer & Boland 2012), atributos que favorecen la polinización (Raguso et al., 2003; Muchhala 2006; Rosas-Guerrero et al., 2014) o la dispersión de semillas (Willson & Traveset 2000; Nathan et al., 2008).

A diferencia de las anteriores, existe otra interacción con animales que específicamente se vincula con la obtención de nutrientes. La evolución del hábito carnívoro, en la que las plantas capturan y se alimentan de pequeñas presas, se considera una adaptación a la escasez crónica de nutrientes (Givnish et al., 1984; Ellison 2006). Las plantas carnívoras llamaron la atención de Darwin refiriéndose a ellas como "The most wonderful plants in the world". Su interés por comprender las implicaciones adaptativas y funcionales en este grupo quedó plasmado en la publicación de "*Las plantas insectívoras*" (1875) en

el que mostró por primera vez que las plantas inician la secreción de enzimas digestivas al ser estimuladas con sustancias nitrogenadas provenientes de las presas. Desde entonces, el interés por el estudio de las plantas carnívoras se ha extendido entre los científicos a nivel mundial.

Una planta se considera carnívora si presenta hojas modificadas en trampas especializadas, a partir de las cuales captura y digiere pequeñas presas, de las que absorbe y utiliza los nutrientes para el crecimiento y desarrollo (Ellison & Adamec 2018). Por lo tanto, la cantidad de presas capturadas por planta y la eficiencia del uso de las mismas, son los principales factores que determinan los beneficios ecológicos y de adecuación para las plantas carnívoras en condiciones naturales (Król et al., 2012).

La estrategia de obtener nutrientes a partir de la captura de presas ha evolucionado independientemente al menos cinco veces dentro de las angiospermas (Ellison & Gotelli 2001; Cieslak et al., 2005; Ellison & Adamec 2018; Cross et al., 2020). De hecho, la distribución geográfica de las más de 800 especies de plantas carnívoras ubicadas en diez familias está característicamente restringida a sitios pobres en recursos minerales (Tabla 1) (Givnish et al., 1984; Juniper et al., 1989; Farnsworth & Ellison 2008; Cross et al., 2020). Así, aunque existe una gran diferencia en la riqueza específica desde géneros monotípicos como *Catopsis*, *Dionaea*, *Aldrovanda*, *Cephalotus*, hasta otros muy diversos como *Pinguicula*, *Nepenthes*, *Drosera*, o *Utricularia*, o diferencias marcadas en el rango geográfico, desde especies presentes en una sola localidad del planeta hasta otras con una distribución continental (Tabla 1), las diferentes especies se encuentran colonizando substratos infértiles inaccesibles para la mayoría de las plantas no carnívoras (Givnish et al., 1984; Juniper et al., 1989; Król et al., 2012).

Tabla 1. Ubicación taxonómica y distribución de hábitats de las plantas carnívoras. Tomada y modificada de Król et al., (2012).

| División | Clase | Orden | Familia | Género/Especie | No. especies | Distribución de hábitats | |
|--------------------|------------------|---|------------------|---------------------------------|--------------------------------|--|---|
| Anthophyta | Monocotyledoneae | Poales | Bromeliaceae | <i>Brocchinia</i> | 2 | Endémica de Guyana, Venezuela y Colombia (altitud 500-2,900 m). | |
| | | | | <i>Catopsis berteroniana</i> | 1 | Sur de Estados Unidos, América Latina y Brasil. | |
| | Dicotyledoneae | Caryophyllales | Dioncophyllaceae | <i>Triphyophyllum peltatum</i> | 1 | Sierra Leona, Liberia, Costa de Marfil. | |
| | | | | Droseraceae | <i>Aldrovanda vesiculosa</i> | 1 | Europa Central, este de Asia, África, Australia. |
| | | | | | <i>Dionaea muscipula</i> | 1 | California del Norte y del Sur. |
| | | | Drosophyllaceae | <i>Drosera</i> | >184 | Todos los continentes menos la Antártida. | |
| | | | | <i>Drosophyllum lusitanicum</i> | 1 | Endémica de Portugal, sur de España y norte de Marruecos. | |
| | | | | Nepenthaceae | <i>Nepenthes</i> | >110 | Regiones subtropicales de Asia (China, Singapur, India, Tailandia, Vietnam, Camboya, Filipinas, Península de Malaca), Australia, Seychelles y Madagascar. |
| | | | | | <i>Cephalotus follicularis</i> | 1 | Endémica del suroeste de Australia. |
| | | | Ericales | Roridulaceae | <i>Roridula</i> | 2 | Endémicas de Sudáfrica |
| | | | | Sarraceniaceae | <i>Heliamphora</i> | 18 | Endémica de las tierras altas de Guyana. |
| | | | | | <i>Sarracenia</i> | 9 | Norte, este y América del Norte. |
| | | | | <i>Darlingtonia californica</i> | 1 | Montañas de Sierra Nevada en el sur de Oregón y Norte de California (elevación hasta 2,500 m). | |
| | | | Lamiales | Lentibulariaceae | <i>Pinguicula</i> | >96 | Europa, América del Norte, norte de Asia, África Occidental y costa occidental de América del Sur. |
| | | | | | <i>Genlisea</i> | >22 | Tierras altas de Guyana, Angola, Zambia, Tanzania, Madagascar. |
| <i>Utricularia</i> | >250 | Todos los continentes menos la Antártida. | | | | | |
| <i>Byblis</i> | >7 | Nativa de Australia y Nueva Guinea | | | | | |

Varios estudios han mostrado las características morfofisiológicas que permiten la captura de presas en distintos sistemas de trampa, algunos de ellos involucrando movimiento, ya sea para atrapar (*Dionaea*, *Utricularia*, *Aldrovanda*) o para incrementar la superficie de contacto con las presas retenidas (*Drosera* y *Pinguicula*). Otros estudios han mostrado que además de los sistemas que retienen a las presas existen otras características asociadas con la atracción de presas. Entre estas estrategias de atracción se encuentran la producción de néctar extrafloral, de volátiles (Bennett & Ellison 2009; Jürgens et al., 2009), la presencia de tricomas comestibles (Merbach, et al., 2002), proyecciones de color y patrones UV (Moran, et al., 1999; Schaefer & Ruxton 2008). Otros estudios han evidenciado que las plantas carnívoras son capaces de obtener nutrientes minerales de las presas (Millett et al., 2015; Pavón et al., 2011), y de incorporarlos a procesos como la fotosíntesis, el crecimiento o la reproducción (Adamec 2006; Hájek & Adamec 2010). En otros casos se ha demostrado una relación entre la variación en atributos asociados con las trampas con la habilidad para retener presas (Gaume et al., 2004; Reifenrath et al., 2006; Gibson & Waller 2009; Bauer et al., 2011). Pero existe un solo estudio en el que se ha medido de manera explícita la intensidad de la selección fenotípica en rasgos relacionados a la carnivoría (Alcalá & Domínguez 2005). En este estudio se mostraron efectos directos e indirectos de los atributos asociados con el hábito carnívoro sobre la producción de botones florales. Asimismo, se mostró que la intensidad de la selección varía espacialmente a lo largo de un gradiente ambiental determinado principalmente por la luz, humedad del sustrato, y disponibilidad de presas.

Aún con toda la evidencia sobre la habilidad de las plantas carnívoras para beneficiarse de la captura de presas, cabe la posibilidad de que algunos componentes de la adecuación como la producción de frutos y semillas puedan depender de otros factores. Además de enfrentar la presión de selección derivada de la escasez de nutrientes, las plantas carnívoras requieren mover

sus gametos para realizar la polinización. Diversos estudios han sugerido interacciones con polinizadores con cierto grado de especialización particularmente con especies con flores zigomorfas que indican una tendencia hacia la entrecruza (Molau 1993; García et al., 1994; Hobbhahn et al., 2006; Clivati et al., 2014; Molano-Flores et al., 2018; Villegas & Alcalá 2018; Plachno et al., 2019), aunque también se han reportado especies que se autofertilizan de manera facultativa (Khosla et al., 1998; Araki & Kodono 2003; Chaudhary et al., 2018; Tagawa et al., 2018). Sin embargo, en comparación con la información disponible sobre la relación que las plantas carnívoras guardan con sus presas, los estudios sobre aspectos de su reproducción siguen siendo comparativamente más escasos.

Con base en la evidencia que sustenta la interacción entre las plantas carnívoras con polinizadores (Molau 1993; García et al., 1994; Hobbhahn et al., 2006; Clivati et al., 2014, Aranguren et al., 2018; Molano-Flores et al., 2018; Villegas & Alcalá 2018; Plachno et al., 2019), se espera que su adecuación no solo esté influenciada por la ganancia de nutrientes derivada de la captura de presas, sino también por dicha interacción. Utilizando como modelo a la especie *Pinguicula moranensis* Kunth, este proyecto pretende profundizar el conocimiento sobre su ecología reproductiva a través de dos objetivos particulares que se tratarán en capítulos independientes:

- 1) Describir los aspectos más relevantes de la ecología reproductiva de las plantas carnívoras proponiendo a la familia Lentibulariaceae como un modelo que sugiere especialización en el servicio de los polinizadores.
- 2) Describir los aspectos de la historia natural de *Pinguicula moranensis* que entrelazan la ecología del hábito carnívoro con la biología reproductiva.

- 3) Estimar el efecto de la distancia de entrecruza sobre componentes de adecuación (producción de semillas, geminación y sobrevivencia de plántulas).
- 4) Cuantificar selección fenotípica sobre atributos florales (forma de corola, área de corola, longitud de espolón, área de guía de néctar, longitud de escapo y área de roseta).

CAPÍTULO I

Polinización en plantas carnívoras con énfasis en la familia Lentibulariaceae

La simetría es una característica fundamental de la diversidad floral; hay dos tipos la radial y la bilateral (Citerne et al., 2010). Las plantas carnívoras de géneros como *Drosera*, *Sarracenia*, *Nepenthes* presentan flores con simetría radial lo que sugiere una gama más amplia de especies que las polinizan (Ne'eman et al., 2006; Anderson 2010; Handayani 2017; Figura 1). En contraste, los géneros de la familia Lentibulariaceae (*Pinguicula*, *Utricularia* y *Genlisea*) presentan flores bilaterales o zigomorfas que favorecen una interacción más específica, al menos a nivel de gremio (i.e., polinizadores de lengua larga) (Clivati et al., 2014; Aranguren et al., 2018; Villegas & Alcalá 2018; Figura 1)

La familia Lentibulariaceae aporta más del 40% del total de las especies de plantas carnívoras reconocidas actualmente (Król et al., 2012; Ellison & Adamec 2018). Las características florales dentro de esta familia, incluyen como rasgo más distintivo la presencia de corolas bilabiadas, con el labio inferior interpretado como un espacio de “aterrizaje”. El estigma extendido más allá de las anteras, sensible al tacto y espolón posterior con nectarios, características que generalmente favorecen la polinización cruzada (Legendre 2000; Schnell 2002; Fenster et al., 2004; Fischer et al., 2004; Chaudhary et al., 2018) (Figura 1).



Figura 1. Variación floral y polinizadores en miembros de la familia Lentibulariaceae. De izquierda a derecha: *Drosera cistiflora*, *Sarracenia purpurea*, *Nepenthes mirabilis*, *Pinguicula moranensis*, *Utricularia reniformis* y *Genlisea violácea*.

Néctar y otras características florales

La presencia de espolones en las flores se ha interpretado como evidencia de interacción estrecha con polinizadores (Darwin, 1862). Se ha evidenciado la presencia de néctar en los espolones de flores de los tres géneros de Lentibulariaceae (García et al., 1994; Hobbhahn et al., 2006; Aranguren et al., 2018; Płachno et al., 2018; 2019; Lustofin et al., 2020). En general, la presencia de néctar en el espolón se correlaciona con el hecho de que los visitantes florales en Lentibulariaceae suelen estar restringidos a insectos voladores de lengua larga, entre los que se encuentran abejas, abejorros, moscas y

mariposas diurnas (Molau 1993; García et al., 1994; Hobbhahn et al., 2006; Clivati et al., 2014; Aranguren et al., 2017; Molano-Flores et al., 2018; Villegas & Alcalá 2018), incluso se ha reportado polinización por colibríes (Płachno et al., 2019). Sin embargo, volúmenes bajos de néctar parecen ser una característica de la familia. Por ejemplo, en *Pinguicula longifolia* se reportan valores promedio de 0.04 μ l (García et al., 1994) mientras que en especies de *Utricularia* los valores van de 0.03 a 0.06 μ l. Incluso, cerca de un tercio de las flores revisadas no presentaron evidencia de néctar (Hobbhahn et al., 2006). Aunque valores bajos de producción de néctar se relacionan con la polinización generalista, podrían también sugerir polinización por engaño si hubiera otras especies floreciendo simultáneamente (Abrahamczyk et al., 2017). Para el caso de *Pinguicula moranensis* o *P. heterophylla*, la floración coincide con la de otras herbáceas como *Oxalis alpina*, *Begonia gracilis* y otras especies presentes en las mismas paredes rocosas. Por lo que los polinizadores podrían visitar flores de distintas especies para cubrir sus requerimientos.

Es probable que la baja producción de néctar esté asociada con la baja tasa de visita a las flores en un escenario de polinización por engaño. Para especies de *Pinguicula* se reportan de cuatro a siete visitas por hora (Zamora 2002; Molano-Flores et al., 2018; Villegas & Alcalá 2018) mientras que para *Genlisea* y *Utricularia* la tasa es de solo dos visitas por hora (Hobbhahn et al., 2006; Clivati et al., 2014; Aranguren et al., 2017). Por otra parte, la baja tasa de visita podría explicar a su vez el hecho de que las flores permanecen abiertas por largos periodos; desde 15 hasta 34 días en *Pinguicula* (García et al., 1994; Molano-Flores et al., 2018; Villegas & Alcalá 2018) y hasta 20 días en especies de *Utricularia* (Clivati et al., 2014; Hobbhahn et al., 2006). Las flores longevas de Lentibulariaceae podrían recibir visitas aun con tasas bajas y con baja producción de néctar si estuvieran compartiendo polinizadores con otras especies. Por ejemplo, la captura y obtención de granos de polen del cuerpo de mariposas que visitaron flores de *P. moranensis* mostraron granos de polen

tanto de *P. moranensis* como de alguna especie de Asteraceae, Plantaginaceae y Scrophulariaceae (Sánchez-Villegas 2016).

Sistema de apareamiento

Pese a la presencia del conjunto de rasgos que en general promueven la entrecruza, se han reportado variaciones en el sistema de apareamiento dentro de Lentibulariaceae. En *Utricularia*, la autogamia mediada por insectos parece ser frecuente (Kausik & Raju 1955; Dore-Swamy & Mohan-Ram 1971; Jérémie 1989; Yamamoto 1990; Khosla et al., 1998; Araki & Kadono 2003; Chaudhary et al., 2018), con algunas excepciones (Hobbhahn et al., 2006; Clivati et al., 2014). En *Pinguicula*, la autopolinización parece ocurrir mayormente en especies con flores pequeñas o blanquecinas (Molau 1993; Zamora 2002) que podrían ser polinizadas por pequeños insectos caminadores (Zamora 2002). En contraste, las especies de *Pinguicula* con flores grandes y coloridas parecen tender a la entrecruza (Molau 1993; García et al., 1994; Molano-Flores et al., 2018; Villegas & Alcalá 2018; Płachno et al., 2019). Cabe hacer notar que el estrés ambiental puede estar relacionado con el sistema de apareamiento como se muestra con las diferencias reportadas entre tres especies simpátridas que difieren en el tiempo de floración (antes o durante la caída de nieve) y por consiguiente en su dependencia de polinizadores (Molau 1993). Las variaciones en el microclima también determinan la cantidad de visitas a las flores; en *Pinguicula vallisneriifolia* las flores de plantas en condiciones sombreadas reciben comparativamente menos visitas que las flores de plantas ubicadas en sitios soleados (Zamora 2002).

Selección mediada por polinizadores

A pesar de la evidencia sobre polinización biótica en las plantas carnívoras no se ha evaluado el valor adaptativo de las diferentes características florales motivadas por el supuesto de que los polinizadores son los agentes selectivos. Esta hipótesis sobre el valor adaptativo de los caracteres florales supone, entre

otras cosas, que exista limitación por polen, lo que conllevaría a incrementar la competencia por la visita de polinizadores. La limitación por polen se evidencia mostrando que el *fruit set* o el *seed set* es mayor en tratamientos de entrecruza manual con respecto a tratamientos de polinización natural (Parachnowitsch & Kessler 2010). En general, los tratamientos experimentales de polinización han mostrado limitación por polen en varias especies dentro de Lentibulariaceae (Clivati et al., 2014; Molano-Flores 2018; Villegas & Alcalá 2018).

Aunque existen trabajos que han estimado diversos componentes de la biología reproductiva en especies de plantas carnívoras, no se conoce alguno que explícitamente haya evaluado selección fenotípica sobre rasgos florales o el papel relativo de los polinizadores como agentes de selección. Igual que la limitación por polen, la selección fenotípica mediada por polinizadores se ha identificado comparando los gradientes de selección entre plantas con polinización natural y plantas con polinización manual suplementaria (Parachnowitsch & Kessler 2010; Lavi & Sapir 2015). En teoría, las plantas con polinización natural están expuestas a todos los agentes selectivos (i.e., polinizadores, herbívoros, nutrientes), mientras que, en las plantas con polinización manual se elimina la posible influencia de los polinizadores a través de la eliminación experimental de la limitación por polen. En este caso, si los polinizadores fueran los agentes de selección se espera que la selección sea más débil o ausente en el tratamiento de polinización manual (Parachnowitsch & Kessler 2010; Lavi & Sapir 2015). Por lo tanto, identificar los rasgos florales que son blanco de selección, así como el sistema de apareamiento que presentan las plantas, se vuelven temas clave para comprender el efecto de los visitantes florales sobre la adecuación y los patrones de variación genética dentro de las poblaciones (Barret 2003). En general las especies en la familia Lentibulariaceae dependen de insectos para su polinización, la cual puede tender, en algunos casos hacia la autogamia facultativa y hacia la entrecruza en el otro extremo. Se esperaría una selección

más intensa en atributos florales en especies tendientes a la entrecruza que en aquellas que son autógamas.

Distancia de polinización y consecuencias sobre el desempeño

En plantas polinizadas por insectos el movimiento de gametos vía polen tiende a ser espacialmente limitado (Levin & Kerster 1974; Sork & Smouse 2006; Pluess et al., 2009). Dicha limitación resulta en apareamientos entre individuos relacionados, lo que incrementa la proporción de genotipos idénticos por descendencia (endogamia) (Charlesworth & Charlesworth 1999; Keller & Waller 2002). En general la endogamia tiene efectos negativos sobre la fecundidad de los padres y la adecuación de la progenie, teniendo efectos inmediatos en aquellas especies de entrecruza (Husband & Schemske 1996; Griffin & Eckert 2003; Colling et al., 2004). En este contexto, la distancia a la que se mueve el polen es un factor necesario para entender las consecuencias en adecuación en especies de entrecruza. En algunos casos se ha reportado un efecto positivo sobre la producción de semillas y crecimiento del tubo polínico con el aumento en la distancia de polinización (Rigney 1995; Souto et al., 2002), otros han detectado un impacto negativo sobre la adecuación de la progenie en el grupo de autofertilización, pero no en cruza con el vecino más cercano (Hauser & Loeschcke 1994; Oostermeijer et al., 1995). En el otro extremo tenemos efectos negativos dados por distancias de apareamiento muy grandes conocidos como depresión por exogamia (Lynch 1991), que se explica generalmente porque los padres se adaptan a diferentes condiciones locales (Montalvo & Ellstrand 2001; Pélabon et al., 2005). Por lo tanto, es de esperarse que exista una distancia de entrecruza óptima que permita evadir los efectos negativos de la endogamia y la exogamia (Price & Waser 1979; Waser & Price 1989; McCall et al., 1991; Oostermeijer et al., 1995; Colling et al., 2004; Robertson & Ulappa 2004).

En el caso de las plantas carnívoras esta información es limitada, particularmente para especies de la familia Lentibulariaceae que pueden ser visitadas por polinizadores que varían en su comportamiento de forrajeo. Por ejemplo, en especies con flores poco coloridas como *P. ionantha*, *P. vallisneriifolia* y *P. alpina* las especies que las polinizan van desde abejas, abejorros, trips e incluso pequeños escarabajos (Molau 1993; Zamora 1999; Molano-Flores et al., 2018). Mientras que en especies como *P. moranensis* y *P. macrophylla* que tienen flores coloridas las especies que polinizan se limitan a mariposas, lo que podría sugerir una interacción más estrecha entre las flores y sus polinizadores. Es claro que la adecuación final de una planta carnívora, y la evolución de sus poblaciones, podrían depender en gran medida de su interacción con polinizadores, ya que no solo afecta componentes del desempeño reproductivo mediante el gradiente endogamia-exogamia, sino que afecta el potencial para el flujo de genes y con ello la estructura demográfica y genética de las poblaciones.

CAPÍTULO II

Historia natural de *Pinguicula moranensis*

P. moranensis es una hierba perenne con hojas dimórficas que durante los meses secos forma una roseta epigea llamada “roseta de invierno” que consta de 30 a 100 o más hojas espatuladas de 0.5-4.0 cm de largo y 0.1-1.0 cm de ancho (Figura 2-A) (Zamudio 2006). Durante los meses lluviosos forma la “roseta de verano” con 4 a 14 hojas corto-pecioladas de 5.5-13.0 cm de largo y 3.0-10.0 cm de ancho que en conjunto forman rosetas de hasta 23 cm de diámetro, color verde, aunque llegan a tomar tonalidades café-rojizas al exponerse al sol (Figura 2-B) (Zamudio 2001; 2006). La superficie de estas hojas está cubierta de tricomas glandulares que al secretar mucílago facilitan la captura de presas. La temporada con mayor captura de presas ocurre de agosto a septiembre, siendo Diptera el orden más prevalente (Alcalá & Domínguez 2003; Pavón et al., 2011), dentro de este orden Sciaridae representa hasta 64% de las presas capturadas (Pavón et al., 2011). No obstante, la abundancia de presas puede variar notablemente entre ambientes y temporadas. Alcalá y Domínguez (2003) reportan una marcada heterogeneidad ambiental (luz, agua, nitrógeno) y biótica (disponibilidad de presas) entre cinco poblaciones, que van desde bosques de pino-encino hasta matorrales desérticos. La disponibilidad y captura de presas aumentaron hacia la población más sombría, húmeda y fértil. La proporción de plantas reproductivas por población y la producción promedio de botones florales alcanzaron su punto máximo en medio del gradiente ambiental, lo que sugiere que los beneficios derivados de la carnivoría se maximizan en los sitios que compensan entre luz, humedad y la disponibilidad de presas.

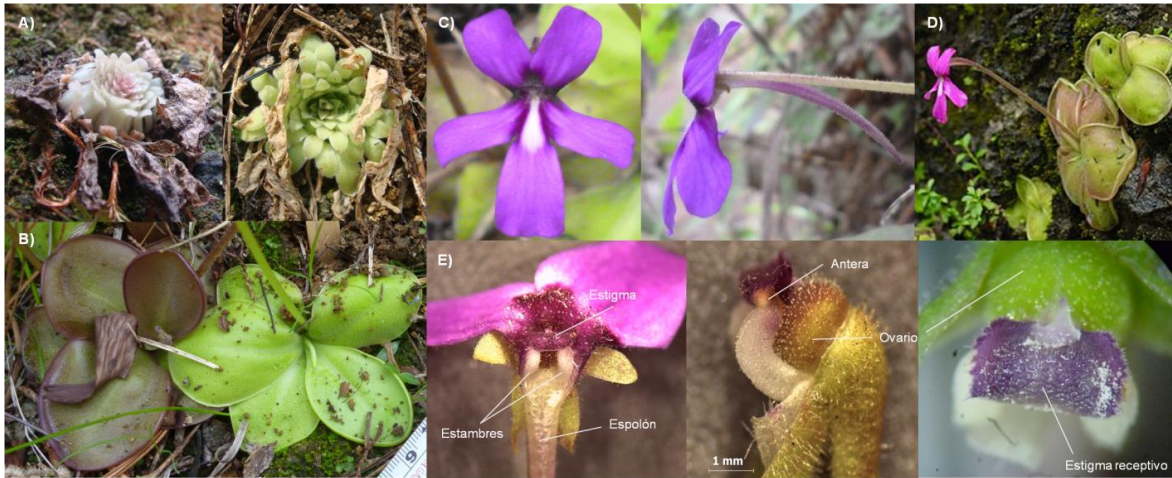


Figura 2. Características morfológicas en *Pinguicula moranensis*. A) Roseta de invierno, B) roseta de verano, C) vista frontal mostrando guías de néctar a la entrada de la corola y vista lateral de la flor mostrando el espolón. D) Longitud del escapo, E) vista frontal y lateral de la posición del estigma y las anteras, el estigma se extiende y cubre los dos estambres, la superficie del estigma se aprecia húmeda cuando es receptivo.

Dado el impacto del ambiente sobre la disponibilidad de presas, Alcalá y Domínguez (2005) estimaron selección fenotípica sobre atributos relacionados a la carnivoría (glándulas de captura y digestivas) en cuatro poblaciones de *P. moranensis* a lo largo de un gradiente ambiental. Sus resultados reportan que la selección natural favoreció una mayor asignación de recursos para glándulas de captura en hábitats con baja disponibilidad de presas. Asimismo, la eficiencia de captura y los beneficios de adecuación derivados de la captura de presas también se maximizan en dichos hábitats. Por el contrario, se favorece una mayor asignación a las glándulas digestivas en hábitats con alta disponibilidad de presas donde la probabilidad de captura es relativamente alta. Aunque se encontró evidencia de selección direccional positiva sobre la densidad de glándulas de captura y sobre el área de la roseta, en general reportan un régimen heterogéneo de selección a través de los diferentes ambientes en los que habita.

P. moranensis tiene una amplia área de distribución, principalmente en bosque de encino, pino-encino y mesófilo de montaña, en un intervalo altitudinal de 800-3,200 msnm (Zamudio 1999; 2001; Cieslak et al., 2005). En general, las poblaciones presentan distribución discontinua a lo largo de las cadenas montañosas; desde Nuevo León, Tamaulipas, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro e Hidalgo, en donde se interrumpe para continuar en Michoacán, México, Morelos, Guerrero, Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Guatemala (Figura 3) (Zamudio 2001). Una característica al interior de las poblaciones es la distribución en forma de parches que pueden variar en densidad, pudiendo encontrarse hasta 38 individuos reproductivos por m² (observación personal) (Figura 3).



Figura 3. Distribución geográfica de *Pinguicula moranensis*, a la derecha se muestra la distribución espacial cercana de los individuos al interior de las poblaciones.

La floración de *P. moranensis* alcanza su máximo a mediados del mes de julio. Las plantas producen de una a tres flores de 2.7 a 5.0 cm de largo (incluyendo el espolón), corola bilabiada; labio inferior 3-lobado casi hasta su base y labio superior 2-lobado hasta $\frac{1}{2}$ o $\frac{3}{4}$ de su longitud. La coloración de las

flores va de violeta-purpúrea a rojo-purpúrea, con una mancha blanca y otras oscuras a la entrada de la corola que se interpretan como guías de néctar. El espolón mide de 1.6 a 3.8 cm de largo, recto o ligeramente incurvado, con coloración verde a morado (Figura 2-C). Al interior ha sido evidenciada la presencia de nectarios (Lustofin et al., 2020) aunque no se ha cuantificado la cantidad de néctar. Las flores se insertan individualmente en escapos de 7.0 a 30.0 cm de longitud (Zamudio 2006). Las flores permanecen abiertas hasta por 9 ± 4.5 días, y los estigmas receptivos durante toda la vida de la flor (Figura 2-D); son flores hermafroditas y autocompatibles (Villegas & Alcalá 2018).

Las flores de *P. moranensis* son polinizadas principalmente por miembros del grupo Lepidoptera (86%). En un censo realizado en 2015 *Eurema mexicana* Boisduval (Figura 4) registró el número más alto de visitas ($n = 17$) y de flores visitadas ($n = 44$) (Villegas & Alcalá 2018). Aunque esta especie no registró el valor más alto de manipulación floral, sí presenta la longitud promedio de espiritrompa más larga (2.29 cm), lo que garantiza que alcanza el fondo del espolón de las flores (2.21 cm). La tasa de visita en *P. moranensis* es baja; cerca de 4 visitas por hora (Figura 4).

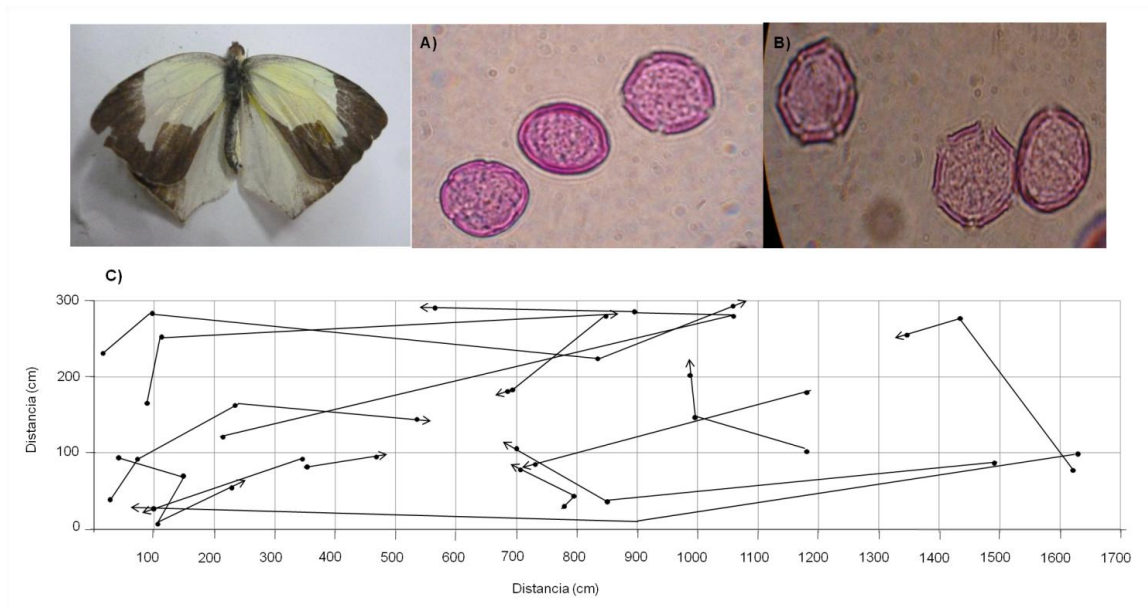


Figura 4. *Eureka mexicana*; polinizador principal de *Pinguicula moranensis*. A) Granos de polen encontrados sobre la espiritrompa de ejemplares de *E. mexicana*. B) Granos de polen de *Pinguicula moranensis*. C) Rutas de vuelo realizadas por *E. mexicana*, cada punto corresponde a una flor, las flechas indican el orden y la dirección en que las flores fueron visitadas (Villegas & Alcalá 2018).

La maduración de los frutos y dispersión de semillas ocurre entre julio y agosto. Los frutos producen hasta 700 semillas que son dispersadas por viento. En condiciones *in situ* la germinación llega a ser del 60% mientras que en condiciones *ex situ* alcanza el 70% (Villegas et al., 2020); las semillas utilizadas fueron colectadas y sembradas dentro de la misma temporada (agosto-noviembre 2017). En especies como *P. vulgaris* y *P. grandiflora* las semillas germinan una temporada posterior a la dispersión, lo que indica un periodo de latencia (Heslop-Harrison, 2004). En *P. moranensis* no ocurre lo mismo, de una muestra almacenada ($n = 3,400$) durante dos años (2018-2020) solo germinó el 0.02% (datos no publicados). Esto sugiere que la dispersión, germinación y establecimiento de plántulas ocurre dentro de la misma temporada reproductiva.

La ruptura de la testa y surgimiento de los cotiledones en *P. moranensis* ocurre en los primeros 8 días (Figura 5-A), desde este momento ya son visibles las glándulas sobre la superficie de las hojas (Figura 5-B). La sobrevivencia de plántulas después de un año va del 66 al 68% (Villegas et al., 2020). El crecimiento es relativamente lento, individuos con dos años de edad obtenidos mediante autofertilización presentan en promedio rosetas con 10 hojas y 0.8 cm de diámetro, mientras que aquellos que son producto de entrecruza tienen rosetas promedio con 15 hojas y 1.32 cm de diámetro (Figura 5C-D) (datos no publicados).

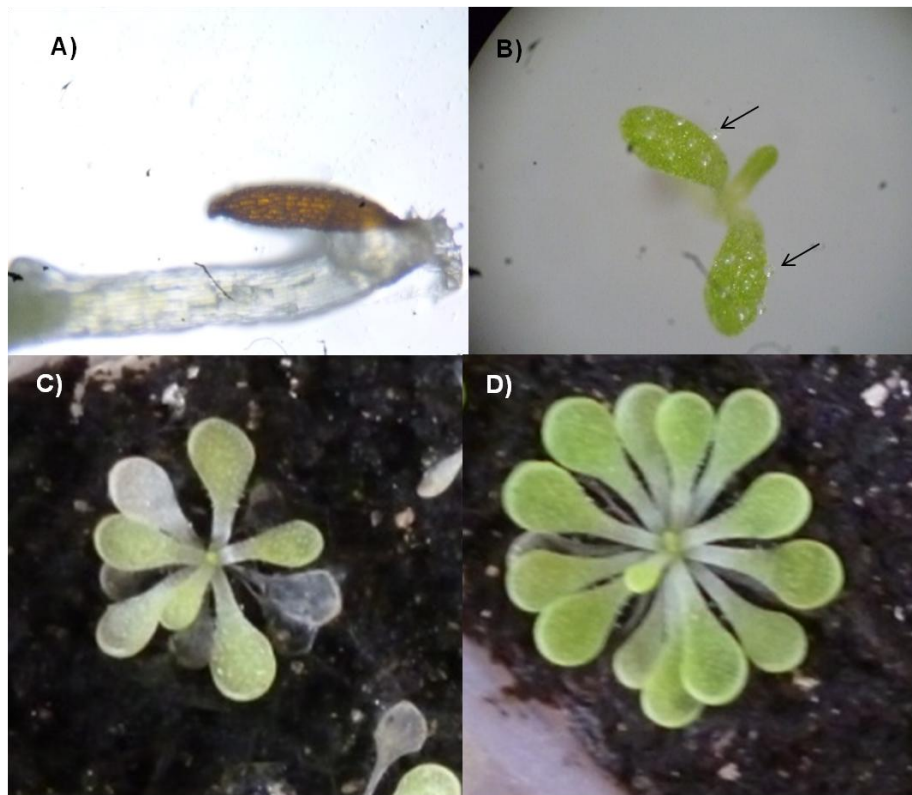


Figura 5. Germinación de semillas en *Pinguicula moranensis*. A) ruptura de la testa. B) Plántula en la que ya son visibles las glándulas sobre la superficie de las hojas (flechas). Rosetas de dos años; C) roseta obtenida vía autofertilización y D) vía entrecruza.

A partir de un estudio con marcadores de ADN amplificados al azar (RAPD) se sabe que *P. moranensis* presenta de moderada a alta diversidad

genética al interior de sus poblaciones y una estructura genética marcada a escala local (Alcalá & Domínguez 2012). Además del patrón de distribución geográfica, algunas características de historia de vida pueden explicar estos resultados (Nybom & Barthish 2000). La elevada estructuración está asociada al hecho de que *P. moranensis* presenta una distribución alpina discontinua además de que la mayoría de las poblaciones están restringidas a paredes rocosas húmedas y acantilados orientados al norte, lo que produce un efecto de tipo insular que se correlaciona frecuentemente con una marcada diferenciación genética. Por otro lado, el flujo de genes en *P. moranensis* parece ser limitado. Primero, porque la dispersión de semillas no es muy eficiente debido a que los individuos dentro de las poblaciones se distribuyen muy cerca unos de otros. Cuando los frutos abren las semillas tienden a caer y germinar cerca de la planta madre, la dispersión a larga distancia se logra mediante el viento pero en la mayoría de casos las semillas quedan sobre las trampas de plantas vecinas (Alcalá & Domínguez 2012). Segundo, porque la distancia de vuelo de polinizadores parece estar restringida. Los polinizadores de *P. moranensis* realizan vuelos a distancias cortas con un promedio de 2.17 ± 3.01 m, su polinizador principal (*E. mexicana*) realiza vuelos promedio de 2.93 ± 2.71 m (Figura 4-C) (Villegas & Alcalá 2018). Esta distancia de vuelo está fuertemente relacionada con la distribución espacial en parches al interior de la población (Figura 3). Adicionalmente se ha visto que el flujo de genes vía polinizadores puede ser limitado por la marcada heterogeneidad espacial abiótica de los hábitats colonizados por *Pinguicula* (Zamora 2002). Tercero, es probable que la variación en las respuestas de adecuación en hábitats contrastantes sea un factor clave en la alta diferenciación genética a escala local (Alcalá & Domínguez 2012).

Como el resto de las plantas, *P. moranensis* experimenta daño por herbívoros, el porcentaje de daño foliar en general es bajo (2.4%), aunque se han reportado plantas con área foliar consumida hasta en un 39% (Suárez-Piña

et al., 2016). Los herbívoros también consumen estructuras reproductivas, cerca del 8% de los individuos en floración sufren florivoría, el daño por insectos chupadores provoca el marchitamiento progresivo de los escapes reproductivos, mientras que el daño de los insectos que pican conduce a la pérdida inmediata de flores. La heterogeneidad ambiental (luz) es un factor importante en la interacción con herbívoros, plantas en sitios con mayor exposición a la luz reciben hasta cuatro veces más daño que plantas en sitios sombreados (Suárez-Piña et al., 2016). Las plantas en condiciones de sombra presentan menor probabilidad de reproducción y similar probabilidad de florivoría, lo que representa una situación particularmente costosa. Así, mientras que los individuos de *P. moranensis* son capaces de colonizar sitios que varían en condiciones de luz, algunos parches o poblaciones pueden experimentar condiciones bióticas o abióticas negativas que no favorecen el mantenimiento del hábito carnívoro (Alcalá & Domínguez 2003; Suárez-Piña et al., 2016).

CAPÍTULO III

Effects of crossing distance on fitness components in the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae). *Plant Species Biology*, 35(3), 175-184.

<https://doi.org/10.1111/1442-1984.12271>

Effects of crossing distance on fitness components in the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae)

Sara Gabriela Villegas¹ | Sandra Milena Ospina-Garcés² | Juan Fornoni³ |
César Augusto Domínguez³ | Raúl Ernesto Alcalá¹

¹Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mexico

²Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

³Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

Correspondence

Sara Gabriela Villegas, Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Chamilpa, 62209, Cuernavaca, Morelos, Mexico.
Email: sara.gabriela@uaem.mx

Funding information

National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT), Grant/Award Number: scholarship (#307402)

[Correction added on 25 June 2021, after first online publication: author names have been updated from 'Villegas Sara Gabriela, Ospina-Garcés Sandra Milena, Fornoni Juan, Domínguez César Augusto, Alcalá Raúl Ernesto' to 'Sara Gabriela Villegas, Sandra Milena Ospina-Garcés, Juan Fornoni, César Augusto Domínguez, Raúl Ernesto Alcalá'.]

Abstract

Plant species vary in the pollination distance at which negative fitness effects are expressed, and it has been proposed that optimal mating should occur at a distance large enough to diminish the risks of inbreeding, but short enough to prevent outbreeding depression. In a natural population of *Pinguicula moranensis* we assessed the fitness of plants (seeds per fruit) and their progeny (germination and seedling survival) as a function of pollination distance by hand-pollinating with donors from five distances: 0 m (self-fertilization), 1, 4 and 460 m (within-population) and 9,900 m (between-population) under *in situ* and *ex situ* conditions. We found that average values for fitness components were consistently lower in the *in situ* experiment than in the *ex situ* experiment. Under both conditions, the self-fertilization treatment had the lowest values. Inbreeding depression values were high (0.94 to 0.98), corresponding with the values expected for an outcrossing species subjected to self-fertilization. Overall, no evidence of outbreeding depression was detected. Considering that our experiment was restricted to one single donor population and one recipient population, our results indicate that despite the within-population patchy distribution of individuals, biparental inbreeding could occur at low rates, due in part to short seed dispersal distance. However, pollen movement of at least 1 m is apparently sufficient to reverse negative effects.

KEYWORDS

ex situ experiment, *in situ* experiment, inbreeding depression, optimal crossing distance, outbreeding depression

1 | INTRODUCTION

In insect-pollinated plants, pollen movement tends to be spatially limited (Levin & Kerster, 1974; Pluess et al., 2009; Sork & Smouse, 2006). Pollen deposition occurs frequently between neighbor plants, between flowers within the same individual, or even within the same flower (Jersáková & Johnson, 2006; Kropf & Renner, 2008). The resulting low pollen movement can affect the

distribution of genetic variation within populations, increasing the proportion of identical-by-descent genotypes (Charlesworth & Charlesworth, 1999; Keller & Waller, 2002). Inbreeding, in turn, may have significant consequences on parental fecundity and progeny fitness (Keller & Waller, 2002; Lande & Schemske, 1985). A short-term negative effect is expected when outcrossing plant species are subjected to self-fertilization (Colling, Reckinger, & Matthies, 2004; Griffin & Eckert, 2003;

Husband & Schemske, 1996), but even cross-pollination between near neighbors can result in biparental inbreeding due to the higher genetic similarity between individuals that are close together (Colling et al., 2004; Keller & Waller, 2002; Paschke, Abs, & Schmid, 2002; Souto, Aizen, & Premoli, 2002).

Species vary in the pollination distance at which negative fitness effects are expressed. Although some studies showed a clear positive effect of increasing pollination distance (Rigney, 1995; Souto et al., 2002), others have experimentally detected a negative impact only in the selfing group, with no effect of the nearest neighbor pollination treatments (Hauser & Loeschke, 1994; Oostermeijer, Altenburg, & Nijs, 1995). On the other hand, longer distance between mating pairs can also impose negative effects on their progeny if their parents are adapted to different local conditions (Fischer & Matthies, 1997; Montalvo & Ellstrand, 2001; Pélabon, Carlson, Hansen, & Ambruster, 2005). This effect is known as outbreeding depression (Lynch, 1991). Given the possibility of both inbreeding and outbreeding depression, it has been proposed that there might be an optimal intermediate mating distance that avoids both phenomena (Colling et al., 2004; McCall, Mitchell-Olds, & Waller, 1991; Oostermeijer et al., 1995; Price & Waser, 1979; Robertson & Ulappa, 2004; Waser & Price, 1989).

It is well known that carnivorous plants benefit from the interaction with insects caught in their traps (Cook, Newton, & Millett, 2017; Ne'eman, Ne'eman, & Ellison, 2006; Schulze, Schulze, Schulze, & Oren, 2001; Skates et al., 2019). However, as occurs in most angiosperm species, the flowers of carnivorous plants are expected to be visited by insects (Ollerton, Winfree, & Tarrant, 2011). Thus, the fitness of carnivorous species could depend on interactions with both prey and pollinators (Jürgens, Sciligo, Witt, El-Sayed, & Suckling, 2012). Carnivorous plants display wide diversity of reproductive systems, and studies addressing reproductive ecology have documented variation in flower structure and histochemistry, flower phenology and longevity, mating system, pollination syndrome, and visitation rate, among others (Adam, 1998; Chua, 2000; Clivati, Cordeiro, Plachno, & Miranda, 2014; Hobbhahn, Kuchmeister, & Porembski, 2006; Kato, 1993; Lowrie, 2001; Meindl & Mesler, 2011; Molano-Flores et al., 2018; Molau, 1993; Murza & Davis, 2003; Ne'eman et al., 2006; Olivencia, Claver, & Alcaraz, 1995; Plachno et al., 2018; Renner, 1989; Schnell, 1983; Villegas & Alcalá, 2017). These studies have identified selfing and outbreeding species, but the information on the effects of varying distance to pollen donors is scarce in carnivorous plant species. Apparently, only Sheridan and Karowe (2000) have addressed this issue in carnivorous plants, as they found a strong inbreeding depression

and higher fitness in between-sites crosses with respect to within-site matings in *Sarracenia flava*. This information is needed to improve our understanding of the fitness consequences of outbreeding species when exposed to inbreeding. This scenario is likely to occur as a result of the spatial distribution of individual plants and the foraging pattern of pollinators, despite traits promoting outcrossing (Clivati et al., 2014; Hobbhahn et al., 2006; Molano-Flores et al., 2018; Villegas & Alcalá, 2017).

Pinguicula L. is a genus comprised of nearly 100 species (Ellison et al., 2003) recognized as a member of the extant carnivorous lineages (Casper, 1966; Legendre, 2000). This genus has spurred zygomorphic flowers that majorly depend on long-tongued insects for fruit production (García, Antor, & Villar, 1994; Lustofin, Świątek, Miranda, & Plachno, 2019; Molano-Flores et al., 2018; Molau, 1993; Zamora, 2002). Xenogamous and self-compatible species have been commonly reported, but see Molau (1993) for autogamy in *P. villosa*. Xenogamous species share large, long lasting and often colored (i.e., yellow, pink, purple and blue) corollas with nectar guides (García et al., 1994; Molano-Flores et al., 2018; Molau, 1993). The relative position of the stigma surface, extending beyond the two anthers (i.e., herkogamy), is predicted as a mechanism promoting cross-pollination (Schnell, 1979), which has been observed in xenogamous species of *Pinguicula* (García et al., 1994; Molano-Flores et al., 2018; Molau, 1993) and *Utricularia* (Clivati et al., 2014). This is because a pollinator probing its tongue toward the spur will deposit outcrossed pollen grains on the receptive lip of the stigma. Upon retracting its tongue, the pollinator collects pollen from anthers. With this movement, the pollinator also lifts the receptive lip, exposing the non-receptive surface. Pollen grains are thus prevented from touching the receptive surface and are subsequently used to pollinate a different individual (Villegas & Alcalá, 2017).

Despite the presence of these floral traits that encourage outcrossing in *Pinguicula*, interestingly some species could be exposed to inbreeding in the form of crosses between genetically related individuals (biparental inbreeding). This is because *Pinguicula* species exhibit a characteristic patchy distribution; individuals tend to be clumped in groups of variable size (ca., 5–20 plants per square meter, Villegas S. G., unpublished data). Although seeds of *Pinguicula* are wind dispersed, most of them fall near the parent plant due to the short length of reproductive stalks (ca., 10 cm, Zamudio, 1999). In fact, seeds are frequently observed lying on the capture rosettes of clumped individuals (R. E. Alcalá, pers. com.). Thus, a high relatedness is expected among individuals within clumps or even between nearby patches (Cieślak, Cieślak, Szelag, & Ronikier, 2015).

On the other hand, gene flow via pollen can be restricted between plants inhabiting contrasting habitats. Some studies have provided evidence that carnivorous plants experience marked spatial environmental heterogeneity. Sites can differ in orders of magnitude in terms of light availability, (Alcalá & Domínguez, 2003; Zamora, Gómez, & Hódar, 1998) and can vary in soil humidity and fertility and prey availability (Alcalá & Domínguez, 2003; Primer, Molano-Flores, Zaya, Helm, & Coons, 2018). Because pollinators prefer to visit flowers in sunny sites, it has been predicted that the spatial heterogeneity of the light environment could be a particularly strong factor favoring local adaptation (Zamora, 2002). Thus, *Pinguicula* species could also be exposed to outbreeding depression, as parents could be locally adapted to site-specific biotic and abiotic conditions.

Pinguicula moranensis Kunth represents an interesting model to test the effect of mating distance on fitness components. We have shown elsewhere that the mean flight distance of pollinators between two consecutive flowers is less than 2 m, including that of its most frequent pollinator (Villegas & Alcalá, 2017). This foraging pattern, along with the patchy distribution of plants, potentially increases the probability of crossing between genetically related individuals. Therefore, we hypothesize that although *P. moranensis* exhibits a suite of traits promoting outcrossing, individuals could experience inbreeding depression due to the potential relatedness among closely located individuals. In addition, crosses between individuals of distinct populations could result in outbreeding depression.

To address these hypotheses, we performed hand-pollination experiments including self-fertilization and both within- and between-population crosses. We measured parental fecundity and progeny fitness to estimate the magnitude of inbreeding and outbreeding depression (Becker, Reinhold, & Matthies, 2006; Byers, 1998; Colling et al., 2004; Fenster & Sork, 1988; Oostermeijer et al., 1995). In particular, we predict a positive relationship between crossing distance and fitness in within-population crosses (decreasing inbreeding depression with increasing distance), but a negative effect in crosses performed between plants belonging to different populations (increasing outbreeding depression with increasing distance).

2 | METHODS

2.1 | Study system

Pinguicula moranensis is a rosette-perennial herb with dimorphic leaves. In summer (June to October), the

rosette is composed of leaves (4 to 14) 6 to 13 cm long, covered with a sticky mucilage produced by stalked secretory glands. In the drier winter months, the plants have tiny leaves (9 to 40 mm) that comprise the resistance rosette (Zamudio, 1999, 2001). *P. moranensis* produces purple zygomorphic corollas individually inserted on reproductive stalks (Zamudio, 2001). The corolla exhibits a three-lobed lower lip and a bilobed upper lip (Zamudio, 2001). Fruit production occurs from late July to the end of September. Five to 6 weeks after pollination, up to 600 1 mm-long seeds are wind dispersed from ripened capsules (Zamudio, 2001).

The recipient population is located to the northwest of Cuernavaca City (18°58'N, 99°17'W, 2,170 m a.s.l.), in an area in which *Pinus* and *Quercus* spp. are conspicuous members of the vegetation. At this site, nearly 2,000 *P. moranensis* individuals grow along a north-oriented rocky wall that is approximately 500 m long. Flowers are visited mainly by members of five families of Lepidoptera; *Eurema mexicana* Boisduval is the most frequent pollinator (Villegas & Alcalá, 2017). The donor population (Zempoala) (19°03'N, 99°19'W, 2,850 m a.s.l.) is located 9.9 km to the north of the recipient population, also within a pine-oak forest. The Zempoala population is composed of nearly 500 individuals growing on a southwest-oriented rocky wall. Both populations are clearly differentiated based on genotypic information inferred from inter-simple sequence repeat (ISSR) markers (Álvarez Caballero, 2007) and MatK/TrnK chloroplast sequences (Osuna-López, 2012).

2.2 | Experimental design

To determine the spatial scale at which crosses have negative fitness effects (Colling et al., 2004; Oostermeijer et al., 1995; Waser & Price, 1989), we designed an experiment consisting of performing within- and between-population crosses. In July 2017, 50 plants bearing floral buds were marked in the Cuernavaca population and randomly assigned to five hand-pollination treatments ($n = 10$ per treatment). This sample size was previously used in earlier studies to characterize the pollination system of *P. moranensis* (Villegas & Alcalá, 2017) and other *Pinguicula* species (Molano-Flores et al., 2018). The treatments performed within the recipient population were: self-fertilization (0 m) and crosses performed at four distances (1, 4, 460 and 9,900 m). The 9,900 m treatment comprised crosses with pollen obtained from the donor population.

Floral buds were bagged with nylon mesh to prevent natural pollination. Hand-pollination was performed at anthesis by rubbing a toothpick against anthers of the

donor flower and depositing the pollen promptly on the surface of the recipient stigma. In all cases, recipient flowers were previously emasculated to avoid contamination with self-pollen. We lifted the receptive lip of the stigma with a toothpick to expose anthers, which were carefully removed with dissection forceps (Adsom C-D 12 cm, H.P. Hergom, Mexico, available <https://hergom-medical.com/producto.php?art=1643>) without touching the receptive surface. It was not possible to include the four distance treatments on the same plant because each plant mostly had one or two flowers; therefore, one flower per plant was haphazardly assigned to receive pollen from a given distance (Oostermeijer et al., 1995). Self-fertilization (0 m) consisted of collecting and depositing pollen of the same flower. For within-population crosses, the first distance (1 m) represents crosses within a clump (a group of 5 to 15 plants). The second distance (4 m) represents crosses between clumps within a patch (composed of two to six clumps). The distance of 460 m includes crosses between patches. Finally, the distance of 9,900 m includes between-population crosses. Flowers were pollinated with a mixture of pollen from two to three individuals located at the assigned distance. Flowers from the Zempoala population were collected early in the morning. Floral stalks were included in flasks containing distilled water to be transported to the Cuernavaca population. Flowers were used in the hand-pollination experiments approximately 45 min after collection. Inspection with a magnifying lens (10 \times) revealed no sign of wilting of the flowers or pollen grains during this time. Experimental flowers were bagged again to prevent further pollination and were monitored (2–5 days) until fruit production.

2.3 | Fitness components

The effect of variation in pollination distance on fitness components was evaluated using seed number per capsule, percent seed germination and percent seedling survival. Seeds were counted under a 10 \times stereoscopic microscope. Because inbreeding depression tends to be ameliorated in *ex situ* conditions compared to natural habitats (Hauser & Loeschcke, 1994; Keller & Waller, 2002), we measured seed germination and seedling survival in both *ex situ* and *in situ* conditions. *Ex situ* germination was evaluated following protocols developed for *Pinguicula* (Gonçalves, Escapa, Grevenstuck, & Romano, 2008; Grevenstuck & Romano, 2012). We deposited 36 seeds per fruit on Petri dishes containing 25 mL of bacteriological agar (Sigma-Aldrich A5306, Merck KGaA, U.S. available www.sigmaaldrich.com/). Petri dishes were sealed with parafilm and exposed to photoperiods of 8 hr,

with an average temperature of 25°C. We registered seed germination daily for 30 days. After that period, seedlings were transplanted to plastic pots (5 \times 5 \times 5 cm) containing a mixture of peat moss (50%), perlite (25%) and vermiculite (25%). For *in situ* germination, in the Cuernavaca population we attached nylon grids to the rocky wall to delimit five squares (5 \times 5 cm) previously cleared from other plant species and vegetation debris (three replicates). We deposited 36 seeds (previously haphazardly selected) in each square from each pollination distance (0, 1, 4, 460 and 9,900 m). The seeds were individually placed on the substrate of the rocky wall using a toothpick and a binocular magnifier lens (10 \times). We registered seed germination daily for a period of 30 days. In both conditions (*in situ* and *ex situ*), survival was scored as the percentage of surviving plants after 1 year.

2.4 | Statistical analyses

We explored the relationship between the three fitness components (seed number, seed germination and seedling survival) through the estimation of partial Pearson correlation coefficients. To test the effect of pollination distance on seed number per capsule, we applied a generalized linear model (GLM) including the categories of distance to pollen donors as the independent variable, demonstrating a Poisson distribution and a log link function. In the case of the other two dependent variables we used one-way analyses of variance (one-way ANOVA). In these cases, seed germination and seedling survival (expressed as percentage) were transformed to $\log(y/[1 - y])$, following Warton and Hui (2011), to fulfill assumptions on residuals for each model. For simultaneous paired comparisons between pollination distances we applied Tukey's test.

For each group (*in situ* and *ex situ* conditions) and for each pollination distance (1, 4, 460 and 9,900 m) inbreeding depression was calculated as 1 - cumulative relative fitness (Husband & Schemske, 1996; Johnston & Schoen, 1994; Sakai, Karoly, & Weller, 1989; Winn et al., 2011). Cumulative relative fitness was calculated by multiplying the relative fitness of each component (seed number, seed germination and seedling survival). The relative fitness is the ratio of fitness for selfed versus outcrossed progeny (Husband & Schemske, 1996). The analyses were performed using R software (Core Team, 2017).

3 | RESULTS

The fruit set in all hand-pollination experiments was 100%. The mean values for seed number ranged from

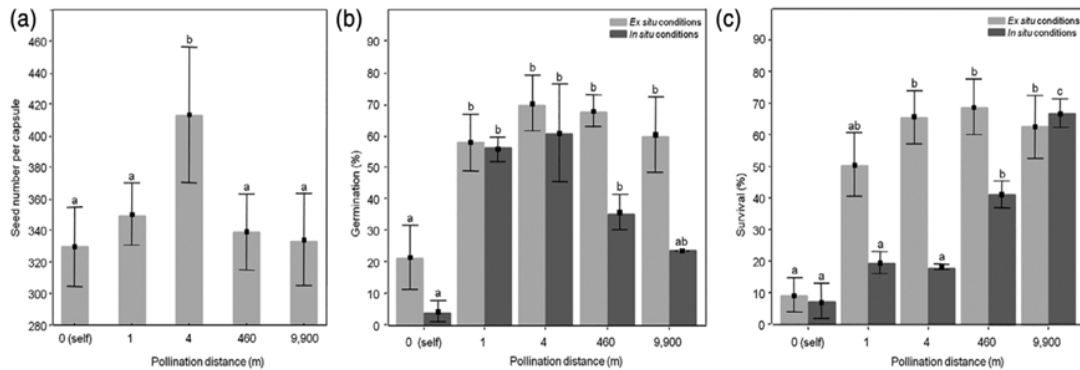


FIGURE 1 Mean values (± 1 standard error [SE]) for three fitness components: seed number per capsule (a), seed germination (b) and seedling survival (c), under each pollination distance treatment in *Pinguicula moranensis*. Bars that do not share a letter are significantly different (Tukey's test, $p < .05$). In panels (b) and (c), means are shown for both the *ex situ* and *in situ* experiments and letters indicate significant differences within each experiment (not between experiments)

TABLE 1 Effect of pollination distance on three fitness components in *Pinguicula moranensis*

| Fitness components | | W | p | | |
|--------------------|----|-------|-------|-------|-------|
| Seed number | | 120.7 | <.001 | | |
| Experiment | SS | MS | F | p | |
| Seed germination | ES | 63.82 | 15.95 | 5.11 | .002 |
| | IS | 27.39 | 6.84 | 10.06 | .001 |
| Seedling survival | ES | 76.00 | 19.00 | 7.41 | <.001 |
| | IS | 13.00 | 3.25 | 29.40 | <.001 |

Note: For seed number, the analysis used a Poisson distribution. Results for seed germination and seedling survival are shown separately for the *ex situ* (ES) and *in situ* (IS) experiments.

Abbreviations: MS, mean square; SS, sum of squares.

330 to 413 (Figure 1a). Seed germination varied from 4.4% to 60.7% and from 21.2% to 70.1% in the *in situ* and *ex situ* conditions, respectively (Figure 1b). Seedling survival ranged from 6.7% to 66.7% and from 9.1% to 68.6% in the *in situ* and *ex situ* conditions, respectively (Figure 1c). The GLM performed on seed number showed that plants receiving pollen from donors located 4 m away produced 1.24 more seeds per capsule than selfed plants (Figure 1a, Table 1). The one-way ANOVA performed on seed germination showed that the mean value in plants receiving pollen from individuals located beyond 1 m was around 2.76 times higher (*ex situ*) and 11 times higher (*in situ*) than the germination rate of selfed plants (Figure 1b, Table 1). In the *ex situ* experiment, the results of the one-way ANOVA showed that seedling survival was 6.5 times higher in plants receiving pollen from donors 4 m away than in selfed plants (Figure 1c, Table 1). Seedling survival was around five times higher in plants receiving pollen from 460 m away than in plants at shorter distances, including selfed plants (Figure 1c).

TABLE 2 Pearson's correlation coefficients between the fitness components in plants of *Pinguicula moranensis* across the different pollination distances

| | Seed number | Seed germination | Seedling survival |
|-------------------|-------------|------------------|-------------------|
| Seed number | – | 0.38** | 0.41** |
| Seed germination | 0.64** | – | 0.71*** |
| Seedling survival | 0.16 | –0.06 | – |

Note: The correlations for the *ex situ* and the *in situ* experiments are shown above (gray shaded) and below the diagonal, respectively. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$.

The fitness components were partly correlated (Table 2). In the *ex situ* conditions, seed number was positively correlated with both seed germination and seedling survival, whereas in the *in situ* conditions seed

TABLE 3 Relative fitness for each fitness component, cumulative fitness and inbreeding depression under different pollination distance treatments in the *ex situ* and *in situ* experiments

| Pollination distance (m) | <i>Ex situ</i> | | | | | <i>In situ</i> | | | | |
|--------------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|------------------|------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|
| | Relative fitness | | | | | Relative fitness | | | | |
| | Seed number | Seed germination | Seedling survival | Cumulative fitness | Inbreeding depression | Seed number | Seed germination | Seedling survival | Cumulative fitness | Inbreeding depression |
| 1 | 0.96 | 0.37 | 0.18 | 0.06 | 0.94 | 0.96 | 0.08 | 0.34 | 0.03 | 0.97 |
| 4 | 0.88 | 0.30 | 0.14 | 0.04 | 0.96 | 0.88 | 0.07 | 0.36 | 0.02 | 0.98 |
| 460 | 0.93 | 0.31 | 0.13 | 0.04 | 0.96 | 0.93 | 0.12 | 0.16 | 0.02 | 0.98 |
| 9,900 | 1.02 | 0.35 | 0.15 | 0.05 | 0.95 | 1.02 | 0.19 | 0.10 | 0.02 | 0.98 |

number was only correlated with seed germination (Table 2).

Cumulative fitness ranged from 0.04 to 0.06 in the *ex situ* experiment (Table 3). Accordingly, inbreeding depression values ranged from 0.94 to 0.96 (Table 3). For the *in situ* experiment, cumulative fitness ranged from 0.02 to 0.03 (Table 3) and inbreeding depression ranged from 0.97 to 0.98 (Table 3).

4 | DISCUSSION

The evolution of traits that could reduce the probability of self-fertilization is expected in angiosperm plant species as a mechanism to mitigate the negative effects of inbreeding (Charlesworth, 2006; Faegri & Van der Pijl, 1971; Nilsson, 1988; Stebbins, 1970). Within this framework, we focused on the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* to experimentally explore the consequences of variation in the distance of the pollen source, which ranged from self-fertilization to between-population crosses. Our study addressed the possibility of a predominantly outcrossed species to be exposed to biparental inbreeding and/or to outbreeding depression.

4.1 | Fitness components

Overall, our experiments provided evidence of a positive correlation between seed number and both seed germination and seedling survival. Because seed set depends mainly on resources gathered, stored and allocated by plants over the growing season, this correlation could indicate a positive maternal effect on progeny fitness (Grindeland, 2008; Oostermeijer et al., 1995). In addition, we found an effect of distance to pollen source on all of the fitness components. First, plants in the self-fertilization treatment did produce fruits, confirming previous reports of self-compatibility in *P. moranensis* (Villegas & Alcalá, 2017), similar to other *Pinguicula* (García et al., 1994; Molano-Flores et al., 2018; Molau, 1993; Zamora, 2002). On the other hand, fitness variables in self-fertilization plants tended to be low compared to those in within-population crosses. This effect was even stronger in progeny fitness components as the difference between the outcrossing treatments with selfed plants was much higher than that observed for seed number, which is a component of maternal fitness. These results help explain the presence of a set of traits related to the breeding system of some *Pinguicula*. For example, the relatively large, colored corollas bearing nectar guides could be involved in the attraction of flower visitors (García et al., 1994; Molau, 1993). In addition, the spurred

corollas could favor the interaction with long-tongue pollinators (García et al., 1994; Lustofin et al., 2019; Molau, 1993). Finally, flowers exhibit herkogamy, a mechanism that enhances outcrossing (Molano-Flores et al., 2018; Villegas & Alcalá, 2017). The evidence showing negative fitness effects in outcrossing species forced to self-fertilize (Robertson & Ulappa, 2004; Sheridan & Karowe, 2000) emphasizes the importance of evolution of traits enhancing outcrossing in angiosperm plant species.

The second important result was related to the effect of variation in mating distance. Some studies have shown higher fitness values at short distances, for example for *Delphinium nelsonii* (Price & Waser, 1979; Waser & Price, 1991) and *Espeletia schultzii* (Sobrevila, 1989). The opposite pattern was observed in *Lychnis flos-cuculi* (Hauser & Loeschcke, 1994), *Gentiana pneumonanthe* (Oostermeijer et al., 1995) and *Alstroemeria aurea* (Souto et al., 2002). In this study, there was no monotonic increase in fitness as within-population distances increased; rather, some distances were better for particular fitness components. Our results indicate that pollen movement of at least 1 m should be enough to assure higher relative fitness. This indicates that mating occurring within very closely located individuals could produce negative effects. In a previous study with *P. moranensis*, we had suggested that a mean flight distance of pollinators of about 2 m could lead to restricted pollen movement (Villegas & Alcalá, 2017). However, due to our measurements of fitness components it seems that the foraging behavior of pollinators could reduce the probability of biparental inbreeding, because the mean flight distance of the most frequent pollinator is 2.9 m, with some flights of up to 9 m (Villegas & Alcalá, 2017). It is also possible that pollen carry-over or some long-distance flights could contribute to pollen movements longer than expected, given the average flight distance (Hauser & Loeschcke, 1994). Pollen carry-over is possible within our study system because some pollinators made up to seven flights before they left the study area (Villegas & Alcalá, 2017). In addition, we observed that around 27% of the total observations corresponded to butterflies that entered the studied area and visited one single flower, suggesting an important influx of outside pollen (Villegas & Alcalá, 2017).

The third result derived from our study is the absence of differences between the within-population crosses and the mating involving individuals from a distinct population. This result did not support our second prediction, which was based on the fact that the two populations have clear genetic differences in both nuclear and chloroplast loci (Álvarez Caballero, 2007; Osuna-López, 2012). The genetic differentiation revealed with nuclear markers indicates restricted gene flow, which could be a prerequisite for the occurrence of local adaptation. However,

despite the relatively large geographic separation of Zempoala (ca., 9 km) and evidence that *Pinguicula* differ in investment in carnivory-related traits and fitness components due to variation in biotic and abiotic conditions (Alcalá & Domínguez, 2003; Zamora et al., 1998) we did not find evidence of outbreeding depression.

4.2 | In situ and ex situ conditions and inbreeding depression

We found that average values for fitness components in the *in situ* experiment were consistently lower than those in the *ex situ* experiment. This is likely to be because seeds germinated under laboratory conditions experienced a more benign environment (Hauser & Loeschcke, 1994; Keller & Waller, 2002). Despite this difference, in both cases the fitness of plants subjected to self-fertilization confirmed the initial pattern, showing a negative effect of self-fertilization. In within-population crosses, fitness benefits derived from seed germination in both experimental conditions peaked at a relatively short distance of pollen donors. The results for seedling survival obtained in the *in situ* experiment showed higher fitness as distance increased, supporting our first prediction.

On the other hand, it has been shown that when outcrossing species are subjected to self-fertilization the negative effects tend to be severe during one or several life stages (Robertson & Ulappa, 2004; Sheridan & Karowe, 2000), for example from the production and performance of pollen (Souto et al., 2002; Waser & Price, 1991) to the production of fruits and seeds (Becker et al., 2006; Hauser & Loeschcke, 1994; Oostermeijer et al., 1995; Robertson & Ulappa, 2004; Sakai et al., 1989; Sobrevila, 1989). In the case of *P. moranensis*, the self-fertilization treatment produces 1.25 times fewer seeds than the outcrossing treatments. However, based on the high values of relative fitness, the self-fertilization treatment is as good as the outcrossed treatments in the seed set. At the later stages of seed germination and survival, the scenario changes and the outcrossed values are better than the self-fertilization values. Therefore, the relative fitness values decrease and the cumulative fitness is greater in *ex situ* conditions, possibly because *in situ* condition individuals face major environmental changes and potential competition (Sakai et al., 1989).

In *Pinguicula moranensis* the values of inbreeding depression ranged from 0.94 to 0.98 in the two experimental conditions (*ex* and *in situ*). Similar values have been reported in species such as *Schiedea globosa* and *Schiedea salicaria* (Sakai et al., 1989) and in the carnivorous plant *Sarracenia flava* (Sheridan & Karowe, 2000). Average values of inbreeding depression ranging from 0.2

to 0.8 are interpreted to indicate a species with a mixed mating system (Winn et al., 2011), whereas average values higher than 0.9 indicate outcrossing species subjected to self-fertilization (Sakai et al., 1989).

5 | CONCLUSIONS

The experiments carried out in this work based on varying the distance of pollen donors for controlled pollination suggest that the study population is spatially structured. This is because mating involving pollen from a distance of at least 1 m away increases fitness compared to self-fertilized plants. Our current view of this system is that biparental inbreeding is likely to occur due to short seed dispersal distance, as has been stated elsewhere (Cieślak et al., 2015). However, the foraging behavior of floral visitors could reduce the probability of biparental inbreeding. Future work on the population's genetic structure and reproductive system, particularly measuring the outcrossing rate (t), will provide clearer data on the relationship between the mating system and levels of inbreeding depression. Additionally, to reach a more comprehensive understanding of the effect of inbreeding, monitoring and evaluation of later fitness components is required, as a strong effect of inbreeding depression could be expected at the end of the life cycle in this carnivorous plant species.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the National Council of Science and Technology of Mexico (CONACYT) for the scholarship (#307402) granted to S.G. Villegas through the Doctoral Program in Natural Sciences. We are grateful to M.A. González for field assistance. We appreciate comments on earlier drafts provided by two anonymous reviewers. The English was reviewed by Professor Lynna Kiere.

ORCID

Sara Gabriela Villegas  <https://orcid.org/0000-0001-6091-0813>

REFERENCES

- Adam, J. H. (1998). Reproductive biology of Bornean *Nepenthes* (Nepenthaceae) species. *Journal of Tropical Forest Science*, 10, 456–471.
- Alcalá, R. E., & Domínguez, C. A. (2003). Patterns of prey capture and prey availability among populations of the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae) along an environmental gradient. *American Journal of Botany*, 90, 1341–1348. <https://doi.org/10.3732/ajb.90.9.1341>
- Álvarez Caballero, R. I. (2007). *Estructura genética de Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae), una planta carnívora de amplia distribución en México (Master's thesis). Cuernavaca, Mexico: University of the State of Morelos.
- Becker, U., Reinhold, T., & Matthies, D. (2006). Effects of pollination distance on reproduction and offspring performance in *Hypochoeris radicata*: Experiments with plants from three European regions. *Biological Conservation*, 132, 109–118. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.03.018>
- Byers, D. L. (1998). Effect of cross proximity on progeny fitness in a rare and a common species of *Eupatorium* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, 85, 644–653. <https://doi.org/10.2307/2446533>
- Casper, S. J. (1966). Monographie der Gattung *Pinguicula* L. *Bibliotheca Botanica*, 127/128, 1–209.
- Charlesworth, B., & Charlesworth, D. (1999). The genetic basis of inbreeding depression. *Genetics Research*, 74, 329–340.
- Charlesworth, D. (2006). Evolution of plant breeding systems. *Current Biology*, 16, R726–R735. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.068>
- Chua, L. S. L. (2000). The pollination biology and breeding system of *Nepenthes macfarlanei* (Nepenthaceae). *Journal of Tropical Forest Science*, 12, 635–642.
- Cieślak, E., Cieślak, J., Szeląg, Z., & Ronikier, M. (2015). Genetic structure of *Galium cracoviense* (Rubiaceae): A naturally rare species with an extremely small distribution range. *Conservation Genetics*, 16, 929–938. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0711-7>
- Clivati, D., Cordeiro, G. D., Plachno, B. J., & Miranda, V. F. O. (2014). Reproductive biology and pollination of *Utricularia reniformis* a. St.-Hil. (Lentibulariaceae). *Plant Biology*, 16, 677–682. <https://doi.org/10.1111/plb.12091>
- Colling, G., Reckinger, C., & Matthies, D. (2004). Effects of pollen quantity and quality on reproduction and offspring vigor in the rare plant *Scorzonera humilis* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, 91, 1774–1782. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.11.1774>
- Cook, J. L., Newton, J., & Millett, J. (2017). Environmental differences between sites control the diet and nutrition of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. *Plant and Soil*, 423, 41–58.
- Core Team, R. (2017). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.R-project.org/>
- Ellison, A. M., Gotelli, N. J., Brewer, J. S., Cochran-Stafira, D. L., Kneitel, J. M., Miller, T. E., & Zamora, R. (2003). The evolutionary ecology of carnivorous plants. *Advances in Ecological Research*, 33, 1–74. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(03\)33009-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(03)33009-0)
- Faegri, K., & van der Pijl, L. (1971). *The principles of pollination ecology*. Oxford, UK: Pergamon Press.
- Fenster, C. B., & Sork, V. L. (1988). Effect of crossing distance and male parent on in vivo pollen tube growth in *Chamaecrista fasciculata*. *American Journal of Botany*, 75, 1898–1903. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1988.tb11270.x>
- Fischer, M., & Matthies, D. (1997). Mating structure and inbreeding and outbreeding depression in the rare plant *Gentianella germanica* (Gentianaceae). *American Journal of Botany*, 84, 1685–1685. <https://doi.org/10.2307/2446466>
- García, M. B., Antor, R. J., & Villar, L. (1994). Phenomorphology and reproductive biology of *Pinguicula longifolia* Ramond ex DC. Subsp. *longifolia* (Lentibulariaceae), a carnivorous endemic plant of the Pyrenees. *Acta Botanica Gallica*, 141, 343–349. <https://doi.org/10.1080/12538078.1994.10515167>

- Gonçalves, S., Escapa, A. L., Grevenstuk, T., & Romano, A. (2008). An efficient *in vitro* propagation protocol for *Pinguicula lusitanica*, a rare insectivorous plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95, 239–243. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9423-8>
- Grevenstuk, T., & Romano, A. (2012). *In vitro* plantlet production of the endangered *Pinguicula vulgaris*. *Central European Journal of Biology*, 7, 48–53. <https://doi.org/10.2478/s11535-011-0103-z>
- Griffin, C. A., & Eckert, C. G. (2003). Experimental analysis of biparental inbreeding in a self-fertilizing plant. *Evolution*, 57, 1513–1519. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00359.x>
- Grindeland, J. M. (2008). Inbreeding depression and outbreeding depression in *Digitalis purpurea*: Optimal outcrossing distance in a tetraploid. *Journal of Evolutionary Biology*, 21, 716–726. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01519.x>
- Hauser, T. P., & Loeschke, V. (1994). Inbreeding depression and mating-distance dependent offspring fitness in large and small populations of *Lychnis flos-cuculi* (Caryophyllaceae). *Journal of Evolutionary Biology*, 7, 609–622. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1994.7050609.x>
- Husband, B. C., & Schemske, D. W. (1996). Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution*, 50, 54–70. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb04472.x>
- Jersáková, J., & Johnson, S. D. (2006). Lack of floral nectar reduces self-pollination in a fly-pollinated orchid. *Oecologia*, 147, 60–68. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0254-6>
- Johnston, M. O., & Schoen, D. J. (1994). On the measurement of inbreeding depression. *Evolution*, 48, 735–741. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1994.tb02209.x>
- Jürgens, A., Sciligo, A., Witt, T., El-Sayed, A. M., & Suckling, D. M. (2012). Pollinator-prey conflict in carnivorous plants. *Biological Reviews*, 87, 602–615. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2011.00213.x>
- Kato, M. (1993). Floral biology of *Nepenthes gracilis* (Nepenthaceae) in Sumatra. *American Journal of Botany*, 80, 924–927. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1993.tb15313.x>
- Keller, L. F., & Waller, D. M. (2002). Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 17, 230–241. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02489-8](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02489-8)
- Kropf, M., & Renner, S. S. (2008). Pollinator-mediated selfing in two deceptive orchids and a review of pollinium tracking studies addressing geitonogamy. *Oecologia*, 155, 497–508. <https://doi.org/10.1007/s00442-007-0919-4>
- Lande, R., & Schemske, D. W. (1985). The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution*, 39, 24–40. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb04077.x>
- Legendre, L. (2000). The genus *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae): An overview. *Acta Botanica Gallica*, 147, 77–95. <https://doi.org/10.1080/12538078.2000.10515837>
- Levin, D. A., & Kerster, H. W. (1974). Gene flow in seed plants. In: Dobzhansky, T., Hecht, M. K., Steere W. C. (eds) *Evolutionary biology* (pp. 139–220). Boston, MA: Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6944-2_5
- Lowrie, A. (2001). Floral mimicry and pollinator observations in carnivorous plants. *Bulletin of the Australian Carnivorous Plant Society*, 20, 10–11.
- Lustofin, K., Świątek, P., Miranda, V. F., & Plachno, B. J. (2019). Flower nectar trichome structure of carnivorous plants from the genus butterworts *Pinguicula* L. (Lentibulariaceae). *Protoplasma*, 257, 1–15. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01433-8>
- Lynch, M. (1991). The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution*, 45, 622–629.
- McCall, C., Mitchell-Olds, T., & Waller, D. M. (1991). Distance between mates affects seedling characters in a population of *Impatiens capensis* (Balsaminaceae). *American Journal of Botany*, 78, 964–970. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1991.tb14500.x>
- Meindl, G. A., & Mesler, M. R. (2011). Pollination biology of *Darlingtonia californica* (Sarracenaceae), the California pitcher plant. *Madrono*, 58, 22–31. <https://doi.org/10.3120/0024-9637-58.1.22>
- Molano-Flores, B., Primer, S., Annis, J., Feist, M. A., Coons, J., & Digges, R. (2018). Reproductive ecology of three rare north American *Pinguicula* species. *Plant Species Biology*, 33.
- Montalvo, A. M., & Ellstrand, N. C. (2001). Nonlocal transplantation and outbreeding depression in the subshrub *Lotus scoparius* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, 88, 258–269. <https://doi.org/10.2307/2657017>
- Murza, G. L., & Davis, A. R. (2003). Comparative flower structure of three species of sundew (*Drosera anglica*, *Drosera linearis*, and *Drosera rotundifolia*) in relation to breeding system. *Canadian Journal of Botany*, 81, 1129–1142. <https://doi.org/10.1139/b03-104>
- Ne'eman, G., Ne'eman, R., & Ellison, A. M. (2006). Limits to reproductive success of *Sarracenia purpurea* (Sarracenaceae). *American Journal of Botany*, 93, 1660–1666. <https://doi.org/10.3732/ajb.93.11.1660>
- Nilsson, L. A. (1988). The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature*, 334, 147–149.
- Olivencia, A. O., Claver, J. P. C., & Alcaraz, J. A. D. (1995). Floral and reproductive biology of *Drosophyllum lusitanicum* (L.) Link (Droseraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 118, 331–351. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1995.tb00475.x>
- Ollerton, J., Winfree, R., & Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120, 321–326.
- Oostermeijer, J. G. B., Altenburg, R. G., & Nijs, H. (1995). Effects of outcrossing distance and selfing on fitness components in the rare *Gentiana pneumonanthe* (Gentianaceae). *Plant Biology*, 44, 257–268. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.1995.tb00784.x>
- Osuna-López, F. (2012). *Filogeografía de la planta carnívora Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae) (Master's thesis). Cuernavaca, Mexico: University of the State of Morelos.
- Paschke, M., Abs, C., & Schmid, B. (2002). Relationship between population size, allozyme variation, and plant performance in the narrow endemic *Cochlearia bavarica*. *Conservation Genetics*, 3, 131–144. <https://doi.org/10.1023/A:1015293530776>
- Pélabon, C., Carlson, M. L., Hansen, T. F., & Ambruster, W. S. (2005). Effects of crossing distance in *Dalechampia scandens*

- (Euphorbiaceae). *American Journal of Botany*, 92, 842–851. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.5.842>
- Plachno, B. J., Stpczyńska, M., Świątek, P., Lambers, H., Miranda, V. F., Nge, F. J., & Cawthray, G. R. (2018). Floral micromorphology of the bird-pollinated carnivorous plant species *Utricularia menziesii* R. Br. (Lentibulariaceae). *Annals of Botany*, 123, 213–220. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy163>
- Pluess, A. R., Sork, V. L., Dolan, B., Davis, F. W., Grivet, D., Merg, K., & Smouse, P. E. (2009). Short distance pollen movement in a wind-pollinated tree, *Quercus lobata* (Fagaceae). *Forest Ecology and Management*, 258, 735–744. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.05.014>
- Price, M. V., & Waser, N. M. (1979). Pollen dispersal and optimal outcrossing in *Delphinium nelsoni*. *Nature*, 277, 294–297.
- Primer, S., Molano-Flores, B., Zaya, D. N., Helm, C., & Coons, J. (2018). Effect of habitat structure on reproduction and prey capture of a rare carnivorous plant, *Pinguicula lutea*. *Arthropod-Plant Interactions*, 12, 671–683. <https://doi.org/10.1007/s11829-018-9632-y>
- Renner, S. S. (1989). Floral biological observations on *Heliamphora tatei* (Sarraceniaceae) and other plants from Cerro de la Neblina in Venezuela. *Plant Systematics and Evolution*, 163, 21–29. <https://doi.org/10.1007/BF00936149>
- Rigney, L. P. (1995). Postfertilization causes of differential success of pollen donors in *Erythronium grandiflorum* (Liliaceae): Non-random ovule abortion. *American Journal of Botany*, 82, 578–584. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1995.tb11502.x>
- Robertson, I. C., & Ulappa, A. C. (2004). Distance between pollen donor and recipient influences fruiting success in slickspot peppergrass, *Lepidium papilliferum*. *Canadian Journal of Botany*, 82, 1705–1710. <https://doi.org/10.1139/b04-138>
- Sakai, A. K., Karoly, K., & Weller, S. G. (1989). Inbreeding depression in *Schiedea globosa* and *S. salicaria* (Caryophyllaceae), subdioecious and gynodioecious Hawaiian species. *American Journal of Botany*, 76, 437–444. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1989.tb11332.x>
- Schnell, D. E. (1983). Notes on the pollination of *Sarracenia flava* L. (Sarraceniaceae) in the Piedmont province of North Carolina. *Rhodora*, 85, 405–420.
- Schnell, D. E. (1979). *Carnivorous plants of the United States and Canada*. Blair, Winston-Salem, NC: John F.
- Schulze, W., Schulze, E., Schulze, I., & Oren, R. (2001). Quantification of insect nitrogen utilization by the venus fly trap *Dionaea muscipula* catching prey with highly variable isotope signatures. *Journal of Experimental Botany*, 52, 1041–1049.
- Sheridan, P. M., & Karowe, D. N. (2000). Inbreeding, outbreeding, and heterosis in the yellow pitcher plant, *Sarracenia flava* (Sarraceniaceae), in Virginia. *American Journal of Botany*, 87, 1628–1633. <https://doi.org/10.2307/2656739>
- Skates, L. M., Paniw, M., Cross, A. T., Ojeda, F., Dixon, K. W., Stevens, J. C., & Gebauer, G. (2019). An ecological perspective on 'plant carnivory beyond bogs': Nutritional benefits of prey capture for the Mediterranean carnivorous plant *Drosophyllum lusitanicum*. *Annals of Botany*, 124, 65–76. <https://doi.org/10.1093/aob/mcz045>
- Sobrevila, C. (1989). Effects of pollen donors on seed formation in *Espeletia schultzii* (Compositae) populations at different altitudes. *Plant Systematics and Evolution*, 166, 45–67. <https://doi.org/10.1007/BF00937875>
- Sork, V. L., & Smouse, P. E. (2006). Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. *Landscape Ecology*, 21, 821–836.
- Souto, C. P., Aizen, M. A., & Premoli, A. C. (2002). Effects of crossing distance and genetic relatedness on pollen performance in *Alstroemeria aurea* (Alstroemeriaceae). *American Journal of Botany*, 89, 427–432. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.3.427>
- Stebbins, G. L. (1970). Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1, 307–326. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.01.110170.001515>
- Villegas, S. G., & Alcalá, R. E. (2017). Reproductive ecology of the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae). *Plant Biology*, 20, 205–212. <https://doi.org/10.1111/plb.12652>
- Warton, D. I., & Hui, F. K. C. (2011). The arc-sine is asinine: The analysis of proportions in ecology. *Ecology*, 92, 3–10. <https://doi.org/10.1890/10-0340.1>
- Waser, N. M., & Price, M. V. (1989). Optimal outcrossing in *Ipomopsis aggregata*: Seed set and offspring fitness. *Evolution*, 43, 1097–1109. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb02554.x>
- Waser, N. M., & Price, M. V. (1991). Outcrossing distance effects in *Delphinium nelsonii*: pollen loads, pollen tubes, and seed set. *Ecology*, 72, 171–179. <https://doi.org/10.2307/1938912>
- Winn, A. A., Elle, E., Kalisz, S., Cheptou, P. O., Eckert, C. G., Goodwillie, C., & Vallejo-Marin, M. (2011). Analysis of inbreeding depression in mixed-mating plants provides evidence for selective interference and stable mixed mating. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 65, 3339–3359. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01462.x>
- Zamora, R. (2002). Importancia de la heterogeneidad ambiental en la ecología de plantas carnívoras mediterráneas: implicaciones para la conservación. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75, 17–26. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2002000100003>
- Zamora, R., Gómez, J. M., & Hódar, J. A. (1998). Fitness responses of a carnivorous plant in contrasting ecological scenarios. *Ecology*, 79, 1630–1644. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(1998\)079\[1630:FROACP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(1998)079[1630:FROACP]2.0.CO;2)
- Zamudio, S. (1999). Notas sobre la identidad de *Pinguicula moranensis* H. B. K., con la descripción de una variedad nueva. *Acta Botánica Mexicana*, 49, 23–34.
- Zamudio, S. (2001). *Revisión de la sección Orcheosanthus, del género Pinguicula (Lentibulariaceae) (doctoral dissertation)*. Mexico: National Autonomous University of Mexico, Faculty of Sciences.

How to cite this article: Villegas SG, Ospina-Garcés SM, Fornoni J, Domínguez CA, Alcalá RE. Effects of crossing distance on fitness components in the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae). *Plant Species Biol.* 2020;35: 175–184. <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12271>

CAPÍTULO IV

Is there phenotypic selection on floral traits in a carnivorous plant exhibiting zygomorphic corollas?

ABSTRACT

Although there is abundant information on the positive effect of carnivory-related traits on fitness of carnivorous plants, the studies on the role of phenotypic variation of floral traits is comparatively limited, even when the presence of zygomorphy, colorful corollas ending into a posterior spur are often thought to promote specialized interactions with pollinators. *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae) is a carnivorous plant that meets these characteristics. Therefore, in this study by contrasting the statistical significance of the selection differentials and selection gradients between open pollinated and pollen-supplemented plants, we estimated the role of pollinators as selection agents acting on six floral traits (corolla shape, corolla size, spur length, nectar guide size, stalk length and rosette size) through female fitness (seed number per fruit). Despite the presence of pollen limitation via seed set (PL = 0.39) and fruit set (PL = 0.37), we found no evidence supporting the hypothesis of pollinator mediated selection on the floral attributes of *P. moranensis*. On the other hand, we obtained evidence of selection through selection differentials (δ) on corolla shape and trough quadratic gradients (γ) for corolla shape and nectar guide size in hand-pollinated treatment. Although the flower traits related to attracting and efficiency on the pollination in *P. moranensis* are not subject to pollinator-mediated selection, maybe can affect the seed set and fruit set thought pollinator visitation. We advanced several likely causes explaining absence of selection on floral traits.

Keywords: phenotypic selection, *Pinguicula*, geometric morphometric, pollen limitation.

Introduction

The evolution of botanic carnivory has been interpreted as an adaptive response to the chronic scarcity of nutrients characteristic of the habitats colonized by carnivorous plants (Givnish 1984; Ellison & Adamec 2018). An extraordinary phenotypic evolution visualized through impressive foliar modifications facilitating the attraction, capture and assimilation of prey has been documented in the nearly 800 extant species of carnivorous plants (Givnish 2015; Cross et al., 2020). Substantial evidence indicates how carnivorous plants benefits from the interaction with prey (Ellison & Gotelli 2001; Ellison & Adamec 2018; Cross et al., 2020).

Carnivorous plants also show a striking diversity in floral traits (Juniper et al., 1989; Ellison & Adamec 2018), probably associated with their generalized dependence on biotic pollination (Molau 1993; García et al., 1994; Hobbhahn et al., 2006; Clivati et al., 2014; Molano-Flores et al., 2018; Villegas & Alcalá 2018; Płachno et al., 2019). Thus, selective pressures exerted by pollinators could have contributed to the evolution of floral traits (Bartkowska & Johnston 2012). It has been stated that floral evolution of carnivorous plants could have been partially conditioned by the prey-pollinator conflict (Jürgens et al., 2012; El-Sayed et al., 2016; Cross et al., 2020).

Several studies have documented the role of the phenotypic variation related to carnivory on prey capture efficiency in the genus *Pinguicula* L. (Antor & García 1994; Zamora 1995; 1999). Specifically inter-population differences in the magnitude of the direct and indirect effects of carnivory-related traits on reproductive success have been identified associated to an environmental gradient (Alcalá & Domínguez 2005). In contrast, although there are some studies addressing several components of the reproductive ecology of species of *Pinguicula* (Molau 1993; García et al., 1994; Molano-Flores

2018; Villegas & Alcalá 2018), to our knowledge, no studies on the role of phenotypic variation on floral traits are available.

The flowers of *Pinguicula* are visited by several guilds of pollinators, including members of Hymenoptera and Diptera (Molau 1993; Zamora 1999; Heslop-Harrison 2004; Molano-Flores et al., 2018), Lepidoptera (Zamudio 2001; Abrahamczyk et al., 2017; Molano-Flores et al., 2018, Villegas & Alcalá, 2018) and even Apodiformes (Lampard et al., 2016). Some species display classic adaptations favoring cross pollination: a tubular flared and spurred corollas, and herkogamy (stigma exerted beyond anthers) (Villegas & Alcalá 2018; Molano-Flores et al., 2018). In contrast, other species seem to have evolved to tolerate self-fertilization (Molau 1993; Zamora 2002). On the other hand, the colored corollas presented in solitary reproductive stalks could be interpreted as a trait increasing the visibility of flowers to pollinators and in species pollinated by small visitants, as a trait increasing the distance between the flowers and the trap thus reducing the probability of capturing pollinators (Anderson & Midgley 2001; El-Sayed et al., 2016; Cross et al., 2020).

Pollinator-mediated phenotypic selection has been identified by comparing the strength of selection in open-pollinated plants with that measured in plants receiving supplemental hand-pollination (Fishman & Willis 2008; Sandring & Ågren 2009, Parachnowitsch & Kessler 2010; Sletvold et al., 2010). A stronger selection is expected in plants with natural pollination thought to be exposed to pollen limitation than in hand-pollinated individuals, since, by manually saturating the stigma with pollen, both, the benefit of being attractive to pollinators and pollen limitation are eliminated (Parachnowitsch & Caruso 2008; Bartkowska & Johnston 2012). Considering that there is substantial evidence about the relationship between flowers of carnivorous plants with pollinators (Molau 1993; García et al., 1994; Zamora 2002; Heslop-Harrison 2004; Hobbhahn et al., 2006; Clivati et al., 2014; Aranguren et al., 2017; Molano-Flores et al., 2018; Villegas & Alcalá 2018; Płachno et al., 2019),

direct estimates of phenotypic selection on floral traits are necessary to identify targets of selection.

In this study we aimed on to estimate the presence, magnitude and direction of the phenotypic selection acting on floral traits of the carnivorous plant *Pinguicula moranensis*. By comparing selection differentials and selection gradients between open and hand pollinated plants we expected to find evidence of pollen limitation in open pollinated plants and consequently, evidence of phenotypic selection. In contrast no selection was expected in plants subjected to hand-pollination.

Methods

Study system

Pinguicula moranensis Kunth is a rosetted perennial herb with dimorphic leaves. In summer (June to October), the capture rosette is composed by leaves (6 to 13 cm long), covered with a sticky mucilage produced by stalked secretive glands. In the winter or drier months plants display tiny non-carnivorous leaves (9 to 40 mm) that comprises the resistance rosette (Zamudio 1999; 2001). *P. moranensis* produces from one to three purple zygomorphic corollas individually inserted in reproductive stalks. The spurred corollas exhibit five lobes, three in the lower lip being the central lobe the largest one and a bilobed upper lip (Zamudio 2001). Fruit production occurs from July to late September. After some 5-6 weeks after pollination, up to 600 1-mm length seeds are wind dispersed from ripen capsules (Zamudio 2001).

The guild of pollinators of *P. moranensis* includes members of Lepidoptera (86%), Hymenoptera (12%) and Diptera (2%). *Eurema mexicana* Boisduval was reported as the most frequent pollinator at our study site (Villegas & Alcalá 2018). It seems to be an effective pollinator of *P. moranensis* because individuals of *E. mexicana* make contact with the reproductive organs of the plant with a mean handling time per flower ranging from 3.71 to 25.45 s (Villegas & Alcalá 2018). In Lepidoptera, high values of flower handling time have frequently been observed (Herrera 1989; Thompson 2001) and according to Sahli & Conner (2007) members of Lepidoptera can produce efficient pollination due to their effectiveness for high seed set.

Field experiments

In July 2018, we haphazardly chosen and tagged 200 *P. moranensis* plants in a natural population growing at northwest Cuernavaca City, Morelos, Mexico (18°58'N, 99°17'W, 2, 170 m a.s.l.). A single flower per plant was used as the focal flower for measurements and treatments; plants were randomly assigned

either to the open pollinated or to the hand pollinated treatment. We used individuals separated at least 1 m to decrease the likelihood of sampling genetically closer individuals (Villegas et al., 2020).

The open-pollination treatment (N = 100) consisted of leaving the plants exposed to natural pollinators without any further experimental manipulation. For the hand-pollination treatment, plants (N = 100) were bagged with nylon mesh to prevent natural pollination and pollen transfer was performed after anthesis by rubbing a toothpick on the stigma surface of the recipient flower with previously mixed pollen of at least 2 individuals. After hand-pollination, the plants were bagged and monitored until fruit formation.

Phenotypic traits

We measured corolla shape, corolla size (area), spur length, nectar guide size (area), stalk length and rosette size (area) because these traits are presumably related to interaction with pollinators. Corolla size and nectar guide size are expected to increase flower attractiveness (Sletvold et al., 2016; De Jager et al., 2017; Zhang et al., 2017; Van der Kooi et al., 2019), whereas corolla shape variation could be involved in facilitating landing or handling flowers by pollinators (Gómez et al., 2010; De Ibarra et al., 2015). Stalk length is related to fitness either as a trait increasing flower visibility and /or by reducing the prey pollinator conflict (Jürgens et al., 2012; El-Sayed et al., 2016; Cross et al., 2020). Spur length could affect seed number by promoting the interaction with more efficient long tongue pollinators (Fenster et al., 2004; Fischer et al., 2004). Finally, although the size of the rosette is not directly selected by pollinators, it was included because could affect seed production via maternal effects (Oostermeijer et al., 1995; Grindeland 2008).

Corolla shape variation was quantified through a two-dimensional geometric morphometrics protocol. In the field, we photographed one flower per plant (front view, white cardboard as background and a linear scale). From

these images and by using the program tpsDig (version 2.29) we obtained a configuration to define the corolla shape by setting 10 landmarks and 40 semilandmarks (Figure 1). Corolla shape was quantitatively obtained via Generalized Procrustes Analysis, which minimizes the effects of the scale, orientation and rotation of the images (Goodall 1991) (Figure 1). Semilandmarks were declared and aligned along the contour using a protocol to minimize the bending energy necessary to produce the change in the target outline to the consensus shape (Gunz & Mitteroecker 2013). Finally, we used Procrustes distance (distance of the corolla shape of each individual with respect to the consensus corolla shape) to describe corolla shape variation in a univariate way. The geometric morphometrics procedures were carried out in the package *geomorph* 3.2.1 (Adams et al., 2020) in statistical software R 4.0.2 (Core Team 2020). Areas of the corollas, nectar guides and rosettes were obtained in the program tpsDig (version 2.29). The length of the spur and stalk were obtained directly in the field using a digital caliper (0.01 mm). Finally for each phenotypic trait were calculated mean, standard deviation and coefficient of variation (CV).

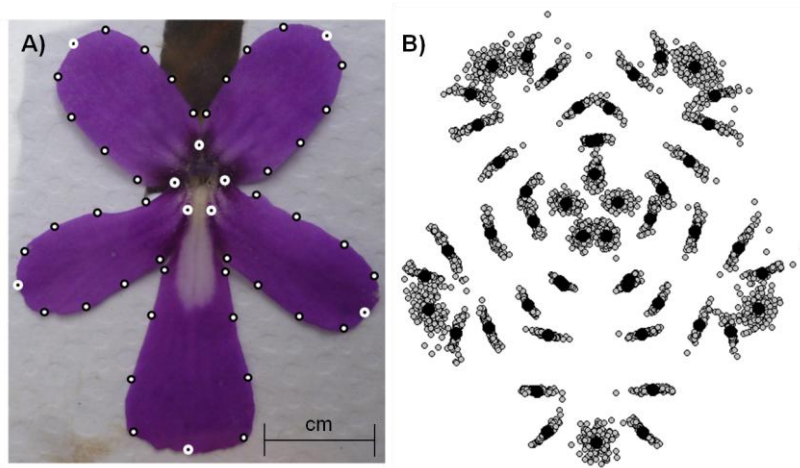


Figure 1. A) Landmarks (white outline circles) and semilandmarks (black outline circles) used to define the corolla shape of *Pinguicula moranensis*. B) Shows Procrustes alignment with respect to consensus shape (black circles).

We use seed number per fruit as a proxy of female reproductive success. For all statistical analyses the seed number per fruit was relativized within each treatment (individual value/treatment mean) and the phenotypic traits values were standardized to mean 0 and variance 1 ((individual value - treatment mean)/treatment SD) within each treatment.

Pollen limitation

Hand-pollination treatment allows estimating the magnitude of pollen limitation. Differences between treatments were assessed by means of one-way ANOVA on seed number and fruit set. We also calculated a pollen limitation index: $PL = 1 - (P_O/P_H)$, where P_O is the percent fruit/seed set of open-pollinated and P_H is the percent fruit/seed set by plants that received hand pollination (Larson & Barrett 2000).

Phenotypic selection analyses

Due to fungal attack and consumption by herbivores the total sample size was reduced to 126 plants (63 per treatment). First for each treatment we obtained the standardized selection differentials calculated with the covariance between the relative fitness (seed set) and six phenotypic traits. Statistical significance was estimated by the probability of the Pearson correlation coefficient between traits and fitness.

To test the effect of treatment (open pollination vs. hand pollination) on the relationship between fitness and phenotypic variation we performed an ANCOVA with independent slopes. The model included relative fitness (seed set) as the dependent variable, treatments as a fixed factor and the six standardized traits as covariates (corolla shape, corolla size, spur length, nectar guide size, stalk length and rosette size). The statistical significance of the interaction term pollination treatment \times phenotypic trait was used to indicate that directional selection gradients differ between pollination treatments. Similarly, in a separate ANCOVA a significant pollination

treatment \times (phenotypic trait)² would indicate differences between pollination treatment in the curvature of the selection pattern (Fornoni et al., 2004).

To estimate selection acting on six phenotypic traits of *P. moranensis* we applied multivariate selection analyses. Directional selection was estimated using linear regressions of relative fitness (seed set) as the response variable and standardized phenotypic trait values as explanatory variables, and stabilizing/disruptive selection was estimated using linear and quadratic terms in the regression analysis (Lande & Arnold 1983). All analyses were performed using the statistical software R (Core-Team 2020).

Results

Phenotypic traits

The mean values of phenotypic traits of *Pinguicula moranensis* are showed in the Table 1. Overall, phenotypic traits showed substantial variation within the studied population. Corolla shape, rosette size and nectar guide were the most variable, while stalk length, spur length and corolla size were more homogeneous (Table 1).

Table 1. Mean \pm SD and coefficient of variation (CV) per treatment of pollination (N = 63) of six phenotypic traits of *Pinguicula moranensis*.

| Trait | Open-pollination | | Hand-pollination | |
|-------------------|------------------|------|------------------|------|
| | Mean \pm SD | CV | Mean \pm SD | CV |
| Corolla shape | 0.02 \pm 0.06 | 0.31 | 0.02 \pm 0.07 | 0.36 |
| Corolla size | 2.9 \pm 0.7 | 0.24 | 3.3 \pm 0.6 | 0.21 |
| Spur length | 2.1 \pm 0.4 | 0.23 | 2.2 \pm 0.5 | 0.22 |
| Nectar guide size | 0.09 \pm 0.03 | 0.35 | 0.09 \pm 0.03 | 0.37 |
| Stalk length | 14.7 \pm 2.9 | 0.20 | 16.5 \pm 3.0 | 0.19 |
| Rosette size | 23.9 \pm 9.7 | 0.41 | 28.7 \pm 16.6 | 0.58 |

The morphospace of the geometric configurations that describe the variation in the shape of the corolla indicates greater deformations in relation to the width and proximity of the lobes. The figure 2 show the deformations of the first two components; the PC 1 retained variation regarding the width of the lobes and tridimensionality of corolla. At the positive end specimens tend to show thinner lobes and a closer position of upper lobes. In the case of PC 2, the variation is given mainly by the inclination of the middle lobes appearing closer to the lowest lobe towards the negative end (Figure 2).

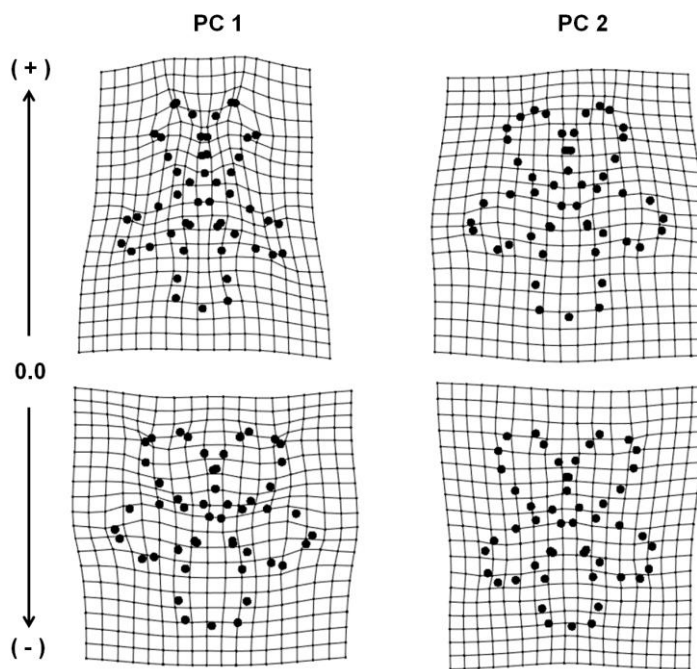


Figure 2. Variation in deformations of corolla shape of *Pinguicula moranensis* produced by the first two principal components.

Pollen limitation

We found significant pollen limitation via seed set (PL = 0.39) and fruit set (PL= 0.37) in *P. moranensis*. The seed number ($F_{1, 124} = 22.11$, $P < 0.001$) and fruit set ($F_{1, 124} = 35.65$, $P < 0.0001$) differed between open- and hand-pollination plants (Figure 3). Plants in the open-pollination treatment exhibited a fruit set of 63% and mean (\pm SD) production of 236 (\pm 215) seeds per fruit. In the hand-pollination treatment we observed a fruit set of 100% and 390 (\pm 146) seeds per fruit.

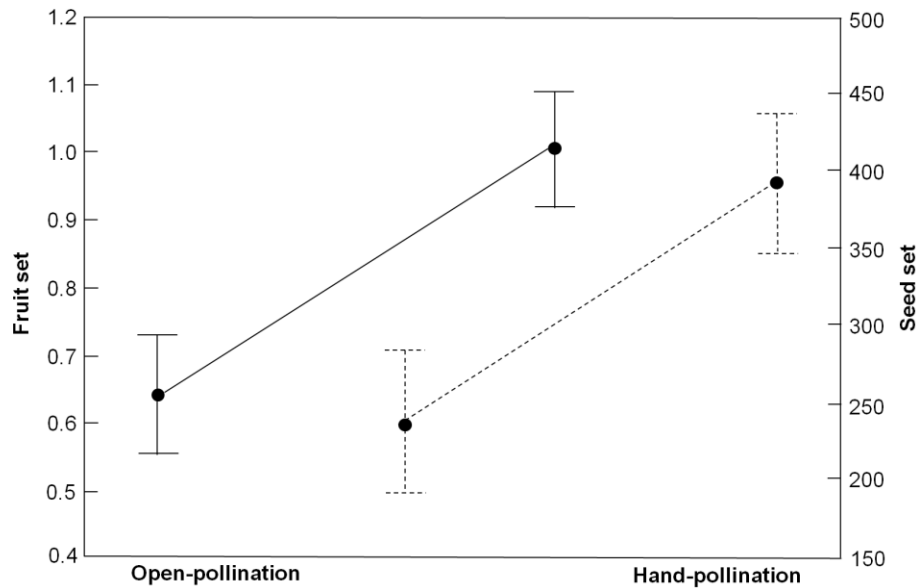


Figure 3. Mean (\pm SE) for fruit set and seed number production of plants of *Pinguicula moranensis* with open-hand pollination treatments.

Phenotypic selection

We not found effect of treatment (open-pollination vs. hand-pollination) on the relationship between fitness and phenotypic variation traits (Table 2).

Table 2. ANCOVA results (lineal term: β and quadratic term: γ) that examine differences in selection gradients between pollination treatments (open and hand-pollination).

| Treatment interaction with: | β | | | | γ | | | <i>P</i> |
|--------------------------------|---------|------|------|----------|----------|-------|------|----------|
| | SS | MS | F | <i>P</i> | SS | MS | F | |
| Corolla shape | 2.20 | 1.10 | 2.30 | 0.10 | 1.09 | 0.54 | 1.10 | 0.33 |
| Corolla size | 0.73 | 0.36 | 0.76 | 0.46 | 1.02 | 0.51 | 1.04 | 0.35 |
| Spur length | 0.13 | 0.06 | 0.14 | 0.86 | 0.01 | 0.006 | 0.01 | 0.98 |
| Nectar guide size | 1.10 | 0.55 | 1.15 | 0.31 | 1.07 | 0.53 | 1.09 | 0.33 |
| Stalk length | 0.61 | 0.30 | 0.64 | 0.52 | 0.11 | 0.05 | 0.12 | 0.88 |
| Rosette size | 2.12 | 1.06 | 2.23 | 0.11 | 1.09 | 0.54 | 1.10 | 0.33 |

We found no evidence of selection in the open-pollination treatment as none selection differential or selection gradient was statistically significant (Table 3). In contrast, in the hand-pollination treatment we obtained evidence of disruptive selection on the corolla shape and nectar guide size (Table 3).

Table 3. Standardized selection differentials (δ), directional (β) and quadratic (γ) gradients \pm SE of six floral traits of *Pinguicula moranensis* through seed number per fruit (relative fitness) measured on plants with open and hand-pollination treatments.

| Trait | Open-pollination | | | Hand-pollination | | |
|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------|------------------|----------------------------------|
| | N=63 | | | N= 63 | | |
| | δ | $\beta \pm$ SE | $\gamma \pm$ SE | δ | $\beta \pm$ SE | $\gamma \pm$ SE |
| Corolla shape | -0.13 | -0.19 \pm 0.12 | -0.03 \pm 0.04 | 0.08* | 0.06 \pm 0.04 | 0.05\pm0.02* |
| Corolla size | 0.02 | -0.10 \pm 0.12 | -0.07 \pm 0.06 | 0.09 | 0.08 \pm 0.06 | -0.01 \pm 0.04 |
| Spur length | 0.07 | -0.002 \pm 0.12 | -0.002 \pm 0.07 | -0.01 | -0.05 \pm 0.04 | -0.01 \pm 0.03 |
| Nectar guide size | 0.06 | 0.14 \pm 0.12 | -0.04 \pm 0.05 | 0.06 | -0.01 \pm 0.06 | 0.07\pm0.03* |
| Stalk length | 0.16 | 0.11 \pm 0.14 | 0.01 \pm 0.09 | 0.03 | -0.02 \pm 0.05 | 0.03 \pm 0.03 |
| Rosette size | 0.16 | 0.20 \pm 0.13 | 0.08 \pm 0.07 | 0.08 | 0.07 \pm 0.05 | 0.003 \pm 0.02 |

*** $P < 0.0001$; ** $P < 0.001$; * $P < 0.05$

Discussion

In this study we explored the relationship between phenotypic variation in floral traits with fitness components of the carnivorous plant *Pinguicula moranensis*. Despite we found evidence of pollen limitation which is interpreted as a condition favoring pollinators-mediated selection, our experiments comparing open vs. hand-pollination showed no evidence of phenotypic selection. We discussed on the implications that pollen limitation could have on the reproductive ecology of carnivorous plants as well as the likely causes explaining the absence of selection on flower reproductive traits.

Impacts of pollen limitation on female fitness

We found pollen limitation in the study population of *Pinguicula moranensis*. Plants with hand-pollination produced up to 37% more fruits and 60% more seeds than open-pollinated plants. Pollen limitation is naturally due to the absence of visits by pollinators, a fact that seems to be recurrent in the genus *Pinguicula*. The negative effects of pollen limitation are muffled in tardy autogamous species that guarantee fertilization in the absence of pollinators, as has been reported in species as *P. vulgaris* and *P. villosa* (Molau 1993; Worley & Harder 1999). On the other hand, in self-compatible species that forcibly require pollinating agents such as in *P. moranensis*, *P. alpina* and *P. vallisneriifolia*, the pollen limitation is recurrent (Molau 1993; Zamora 1999; Villegas & Alcalá 2018) and although, floral longevity seems to compensate for the lack of visitants, the negative effects of pollen limitation in a reproductive season could not be compensated in later seasons, as happens in two species of orchids that share life history characteristics with *P. moranensis* (colorful, self-compatible flowers and no autogamus) (Tye et al., 2020).

It is said that in a scenario of pollen limitation, the attributes influencing visitation rate and pollination efficiency could be subjected to selection (Sletvold & Ågren 2011). However, pollen limitation does not always favors

pollinator-mediated selection (Bartkowska & Johnston 2012). It is noteworthy that *P. moranensis* cannot produce seeds in the absence of pollinators (Villegas & Alcalá 2018). The compatibility of flowers and the reproductive system are important factors that affect the fruit set. The self-compatible hermaphrodite flowers as those exhibited by *P. moranensis*, are interpreted as traits that characteristically favor a relatively high fruit set, as the observed in this study with a fruit set of 63% in natural conditions.

Floral traits variation and phenotypic selection

The coefficients of variation of the floral attributes measured in *P. moranensis* are relatively high when compared with the average value obtained from the analysis of 151 animal-pollinated plant species (Cresswell 1998). Overall, in plant species that depend on animal vectors for their pollination, intraspecific morphological variation is usually low and a type of stabilizing selection is maintained, since any value above or below the average would alter pollen deposition due to mechanical adjustment between the flower and the pollinator (Cresswell 1998; Herrera 2005). Our results indicate that pollinators are not operating as selective agents on floral traits through female fitness. However, pollinators may be the most important selection agents for floral traits through male fitness (Morgan & Conner 2001), an aspect that we did not measure in this study. On the other hand, floral characteristics of *P. moranensis* suggest a specialized floral morphology, in reality as like many zygomorphic species show quite high levels of ecological generalization (e.g. Lázaro et al., 2008; 2010) and its flowers are being visited by more groups than expected, as occurs in *Ipomopsis aggregata*, where flowers adapted and visited more frequently by hummingbirds they are better pollinated by bumblebees (Mayfield et al. 2001).

Based on the assumption that pollinators are the selective agents when the selection is stronger in plants subjected to open pollination *vs.* plants experimentally supplemented with pollen (Parachnowitsch & Caruso 2008;

Parachnowitsch & Kessler 2010; Bartkowska & Johnston 2012); we found no evidence of pollinator-mediated selection in floral traits of the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* via female fitness. But we found evidence of selection on corolla shape and nectar guide size of plants subjected to hand pollination. Several reasons that are not mutually exclusive could explain these results on the studied traits.

We originally started our experiments with 100 plants per treatment, but several reproductive stalks were lost due to fungal attack and owing to florivory. Thus our sample size was highly reduced to 63 plants per treatment. Floral selection has been detected in sample sizes ranging from 25 to more than 130 individuals. For example, our sample size is fairly similar to that reported for *Lobelia siphilitica*, in which selection was imposed by herbivory (Parachnowitsch & Caruso 2008), but was nearly a half of the reported in the pollinator-mediated selection on *Penstemon digitalis* (Parachnowitsch & Kessler 2010).

Although the main function of flowers is to assure pollen transfer (Barrett & Harder 1996), selection on floral traits could be mediated not only by pollinators but by other biotic and abiotic agents. For example, herbivores and environmental context (i.e. flowering species, vegetation height, abiotic ambient) have the potential of influencing the patterns of selection acting on flowers. For example, in the case of *Dactylorhiza lapponica*, in tall vegetation, pollinators favored taller plants with more flowers and longer spurs. In contrast, when rounded by short vegetation, there was no significant selection on plant height and pollinator-mediated selection on flower number and spur length was reduced by 52% and 25%, respectively (Sletvold et al., 2013). In species such as *Lobelia siphilitica* (Parachnowitsch & Caruso 2008), *Mimulus guttatus* (Fishman & Willis 2008), *Dalechampia scandens* (Pérez-Barrales et al., 2013) and *Silene latifolia* (Burkhardt et al., 2012), herbivores exerted greater selection than pollinators. In our case, it has been demonstrated that

herbivores may reduce fitness of carnivorous plants (Zamora 1996; Atwater et al., 2006; Moon et al., 2008; Lamb & Kalies 2020). Although the mean herbivory level experienced by *P. moranensis* is relatively low (2.4%; Suárez-Piña et al., 2016), individual damage exhibits an ample range (ca., 0-40%). Hence, these two agents of selection (herbivores and pollinators) could simultaneously and synergistically affect *P. moranensis* fitness. In the case of abiotic effects, we already know that environmental gradients influence fitness variation in *P. moranensis* (Alcalá & Domínguez 2003). Therefore, it is necessary to evaluate the relationship between environmental context and selective agents on floral traits in *P. moranensis*.

Other factor that directly affects selection estimates is the intensity of inbreeding. When populations are partially inbred due to population structure or a mixed mating system, some individuals will be more inbred than others. This heterogeneity between individuals in the history of inbreeding can greatly affect selection estimates (Willis 1996) and it is probable that *P. moranensis* experience this phenomenon, since performs as a predominantly outbreeding species (Villegas & Alcalá 2018) and it is known that seed production experiences high levels of inbreeding depression (0.94 to 0.98) both in *ex situ* and *in situ* conditions (Villegas et al., 2020).

The estimation of selection over various years, as well as the manipulation of other likely selection agents including the direct and the indirect effects that carnivory could impose on floral traits should be considered in future studies. For example, there is evidence of phenotypic selection on density of capture glands and rosette area as traits favoring prey capture (Alcalá & Domínguez 2005), which in consequence could have indirect effects on fitness. Estimates of the relationship between floral traits variation with visit rate and/or pollination efficiency of different insect species are needed to understand better the selective regime. In this study, we did not measure visits so we are not able to identify the role of floral traits variation on particular

species, for example the most efficient pollinators. In addition, estimates of phenotypic selection considering both male and female fitness, are necessary to fully understand the evolutionary trajectory of populations of this carnivorous plant.

DISCUSIÓN GENERAL

La mayor parte del interés por el estudio de las plantas carnívoras se ha centrado por obvias razones en entender los aspectos relacionados con el hábito carnívoro y por ende en la interacción con sus presas. Sin embargo, los estudios sobre la biología reproductiva han aparecido muy recientemente y son todavía comparativamente escasos, por lo que falta información sobre los aspectos finos que determinan la adecuación de las plantas por la vía reproductiva. En este contexto, usando como modelo de estudio a la planta carnívora *Pinguicula moranensis*, la finalidad de este trabajo fue la de profundizar principalmente en dos de estos aspectos: i) Conocer el impacto de la distancia a la cual se lleva a cabo la polinización modulada por la conducta de polinizadores y ii) conocer el efecto de la variación fenotípica en un conjunto de rasgos florales implícitos en la atracción de polinizadores considerando diferencias en las limitación por polen.

Cuando las especies que tienden a la entrecruza son forzadas a la endogamia los efectos negativos sobre la adecuación suelen ser más severos (Griffin & Eckert 2003). La endogamia puede ocurrir a través de la autofecundación o por endogamia biparental (Ellstrand & Elam 1993). Las plantas carnívoras del género *Pinguicula* representan un sistema interesante en este contexto porque por un lado, algunas han desarrollado flores con características que favorecen la entrecruza (Zamora 2002; Molano-Flores et al., 2018; Villegas & Alcalá 2018), y con ello se podría suponer que al menos en parte, se podrían librar de la endogamia al evitar la autofecundación. Pero por otra parte, las especies de plantas carnívoras del género *Pinguicula* comparten la característica de presentar una distribución agrupada al interior de las poblaciones, presumiblemente producto de una baja capacidad de dispersión de las semillas. Así, esta característica, junto con distancias de vuelo cortas por parte de los polinizadores podría generar endogamia biparental (Villegas & Alcalá 2018). En este trabajo se mostraron dos resultados relevantes que

surgen de la interacción que *Pinguicula moranensis* mantiene con sus polinizadores. Mediante cruza controladas de polen, se encontró evidencia de que la autofertilización produce los mayores efectos negativos y que en términos de la endogamia biparental, ésta se diluye si la polinización ocurre entre individuos separados entre uno y cuatro metros, dependiendo de la variable analizada. También se encontraron valores altos de depresión endogámica que van de 0.94 a 0.98 en tres componentes de adecuación (número de semillas, germinación y sobrevivencia), siendo más altos que los reportados en otras especies de plantas carnívoras como *Sarracenia purpurea* (Parisod et al., 2005) y *Sarracenia flava* (Sheridan & Karowe 2000) ambas polinizadas por insectos. Además, se encontró que los efectos negativos de la depresión endogámica son acumulativos en esta especie a lo largo de las etapas de crecimiento, como se ha mostrado en otros casos (Sheridan & Karowe 2000). En *P. moranensis* este patrón es muy marcado aumentando desde la producción de semillas a su germinación y luego a la sobrevivencia al año (Villegas et al., 2020). En consecuencia, aún con la presencia de flores zigomorfas que promueven la entrecruza, la interacción con sus polinizadores puede contribuir a la disminución del establecimiento de nuevos individuos, considerando que en este trabajo, los efectos negativos de la endogamia se intensificaron en los experimentos realizados en campo (Villegas et al., 2020).

En este trabajo también se evaluó la existencia de limitación por polen (PL, en adelante) en la planta carnívora *Pinguicula moranensis*. La PL indica que la producción de semillas está limitada porque no llegan suficientes granos de polen a los estigmas de las flores. La PL es un fenómeno generalizado ya que más del 87% de especies de plantas con flores son polinizadas por animales (Ollerton et al., 2011) y cerca del 60% experimentan PL en algún momento o lugar (Burd 1994; Ashman et al., 2004). De acuerdo a los resultados derivados de este trabajo, *P. moranensis* experimenta PL de 0.37. Entre las causas directas inmediatas de PL se encuentran la escasez de polen, escasez de

polinizadores o un suministro de baja calidad (Aizen & Harder 2007). Otras condiciones ecológicas como la presencia de especies co-floreando (Bell et al., 2005), herbivoría, robo de néctar, depredación de semillas y fragmentación del hábitat también determinan los niveles de PL (Vázquez & Simberloff 2004; González-Varo et al., 2009; Spliger & Chang 2009). Un estudio con 224 especies pertenecientes a 64 familias determinó que las características de historia de vida también son un factor clave que influencia el grado de PL que las especies experimentan (Larson & Barret 2000). Se podría decir, que la limitación por polen en *P. moranensis* se debe, por un lado a aspectos de su historia de vida; como el hecho de que es una herbácea, autocompatible, no autógama, con flores especializadas y presencia de néctar (Larson & Barret 2000). Y por otro, a la baja tasa de visita de polinizadores (4 visitas por hora; Villegas & Alcalá 2018). La herbivoría floral influye en la PL directamente por el consumo de gametos e indirectamente al reducir la visita de polinizadores en flores dañadas. En *P. moranensis* cerca del 8% de los individuos en floración sufren daño a estructuras reproductivas (Suárez-Piña et al., 2016), por lo que es probable que sea más determinante la baja tasa de visita por polinizadores que la herbivoría; como ocurre en la planta carnívora *Sarracenia alata* (Ne'eman et al., 2006).

Plantas con una sola flor experimentan mayor limitación por polen, producen menos frutos y semillas comparadas con las plantas con múltiples flores (Sun et al., 2018). *P. moranensis* produce de una a tres flores por temporada reproductiva, por lo que esta característica también podría explicar la presencia de PL. En el caso de la longevidad floral, aunque es un factor importante porque se espera que flores receptivas por mayor tiempo incrementen la probabilidad de visita, en especies como *Gentiana straminea* la longevidad floral prolongada no compensó la limitación por polen (Duan et al., 2007). En contraste, la amplia longevidad floral observada en *P. moranensis* (ca.,14 días) con flores abiertas las 24 horas y con estigmas receptivos durante

toda la vida de la flor (Villegas & Alcalá 2018) podría compensar y explicar que los valores de PL no hayan sido tan altos.

Finalmente, aún con la presencia de flores zigomorfas que facilitan cierto grado de especialización en el servicio de polinizadores y en la identificación previa de un polinizador que destaca por su mayor frecuencia de visita y tiempo de manejo floral (Villegas & Alcalá 2018) y evidencia de limitación por polen que incrementa la oportunidad de que los polinizadores influyan en el fenotipo de las plantas (Bartkowska & Johnston 2012,) en este trabajo no se encontró selección mediada por polinizadores en atributos florales de la planta carnívora *Pinguicula moranensis*. Algunos de los atributos presuntamente están relacionados con la variación en la capacidad de atracción de polinizadores y otros podrían estar vinculados con facilitar la labor de los polinizadores y por lo tanto la eficiencia en la polinización. El resultado es similar al encontrado en *Aconitum gymnantrum* (Lu et al., 2021), que es una especie de herbácea que comparte características con *P. moranensis* como la presencia de flores longevas, zigomorfas y polinizadas por insectos. Por otro lado, Lu et al., (2021) atribuyeron la ausencia de selección mediada por polinizadores a la falta de limitación por polen en *Aconitum gymnantrum*. En el caso de *P. moranensis* se encontró limitación por polen, pero a un nivel considerado relativamente bajo (0.37), lo que pudo haber reducido la oportunidad de detectar selección.

Los atributos florales relacionados con la interacción con polinizadores también están expuestos a otros agentes selectivos como herbívoros, patógenos, depredadores de semillas así como a condiciones abióticas (Strauss & Whittall 2006). En este trabajo solo se evaluó el efecto de los polinizadores como agentes selectivos y considerando únicamente efectos directos. Por lo tanto, es necesario considerar posibles efectos indirectos de los atributos fenotípicos sobre la conducta de los distintos polinizadores mediante los llamados análisis de rutas. En estos análisis es posible incluir también efectos directos e indirectos de otros agentes de selección (herbívoros, presas, nutrientes). Es necesario también

realizar evaluaciones a lo largo de varias temporadas reproductivas y en varias poblaciones, ya que, los agentes selectivos y la intensidad de selección varía tanto espacial como temporalmente (Siepielski et al., 2009).

CONSIDERACIONES FINALES

En general, los resultados de este trabajo muestran que, aunque los atributos florales de *Pinguicula moranensis* no experimentaron selección mediada por polinizadores, el movimiento del polen y la interacción con los mismos si influyen su éxito reproductivo. Aun hay vacíos en el conocimiento sobre la dinámica ecológica y evolutiva de esta especie. Algunas consideraciones para trabajos futuros serían:

- ✓ Estimar selección en sus efectos directos e indirectos en diferentes temporadas reproductivas y diferentes poblaciones.
- ✓ Estimar selección usando como variable de respuesta la adecuación masculina y/o diferentes etapas de crecimiento.
- ✓ Evaluar diferentes agentes selectivos en la misma temporada reproductiva (polinizadores, nutrientes, presas, etc).
- ✓ Evaluar la dinámica de la producción de néctar y su impacto en los polinizadores.

LITERATURA CITADA

- Abrahamczyk, S., Kessler, M., Hanley, D., Karger, D. N., Müller, M. P., Knauer, A. C., & Humphreys, A. M. (2017). Pollinator adaptation and the evolution of floral nectar sugar composition. *Journal of Evolutionary Biology*, 30(1), 112-127.
- Adamec, L. (2006). Respiration and photosynthesis of bladders and leaves of aquatic *Utricularia* species. *Plant Biology*, 8(6), 765-769.
- Adams, D. C., Collyer, M., Kaliontzopoulou, A., & Sherratt, E. (2016). Geomorph: Software for geometric morphometric analyses. R package version 3.2.1. <https://cran.r-project.org/package=geomorph>.
- Aizen, M. A., & Harder, L. D. (2007). Expanding the limits of the pollen-limitation concept: effects of pollen quantity and quality. *Ecology*, 88(2), 271-281.
- Alcalá, R. E., & Domínguez, C. A. (2003). Patterns of prey capture and prey availability among populations of the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae) along an environmental gradient. *American Journal of Botany*, 90(9), 1341-1348.
- Alcalá, R. E., & Domínguez, C. A. (2005). Differential selection for carnivory traits along an environmental gradient in *Pinguicula moranensis*. *Ecology*, 86(10), 2652-2660.
- Alcalá, R. E., & Domínguez, C. A. (2012). Genetic structure of the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae) on the transvolcanic Mexican Belt. *Biochemical Genetics*, 50(5), 416-427.
- Anderson, B. (2010). Did *Drosera* evolve long scapes to stop their pollinators from being eaten?. *Annals of Botany*, 106(4), 653-657.
- Anderson, B., & Midgley, J. J. (2001). Food or sex; pollinator-prey conflict in carnivorous plants. *Ecology Letters*, 4(6), 511-513.
- Antor, R. J., & Garcia, M. B. (1994). Prey capture by a carnivorous plant with hanging adhesive traps: *Pinguicula longifolia*. *American Midland Naturalist*, 128-135.
- Araki, S., & Kadono, Y. (2003). Restricted seed contribution and clonal dominance in a free-floating aquatic plant *Utricularia australis* R. Br. in southwestern Japan. *Ecological Research*, 18(5), 599-609.
- Aranguren, Y., Płachno, B. J., Stpiczyńska, M., & Miranda, V. F. O. (2018). Reproductive biology and pollination of the carnivorous *Genlisea violacea* (Lentibulariaceae). *Plant Biology*, 20(3), 591-601.

- Ashman, T. L., & Morgan, M. T. (2004). Explaining phenotypic selection on plant attractive characters: male function, gender balance or ecological context?. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(1539), 553-559.
- Atwater, D. Z., Butler, J. L., & Ellison, A. M. (2006). Spatial distribution and impacts of moth herbivory on northern pitcher plants. *Northeastern Naturalist*, 13(1), 43-56.
- Barrett, S. C. (2003). Mating strategies in flowering plants: the outcrossing–selfing paradigm and beyond. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358(1434), 991-1004.
- Barrett, S. C., & Harder, L. D. (1996). Ecology and evolution of plant mating. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(2), 73-79.
- Bartkowska, M. P., & Johnston, M. O. (2012). Pollinators cause stronger selection than herbivores on floral traits in *Lobelia cardinalis* (Lobeliaceae). *New Phytologist*, 193(4), 1039-1048.
- Bauer, U., Grafe, T. U., & Federle, W. (2011). Evidence for alternative trapping strategies in two forms of the pitcher plant, *Nepenthes rafflesiana*. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3683-3692.
- Bell, J. M., Karron, J. D., & Mitchell, R. J. (2005). Interspecific competition for pollination lowers seed production and outcrossing in *Mimulus ringens*. *Ecology*, 86(3), 762-771.
- Bennett, K. F., & Ellison, A. M. (2009). Nectar, not colour, may lure insects to their death. *Biology Letters*, 5(4), 469-472.
- Brodie III, E. D., Moore, A. J., & Janzen, F. J. (1995). Visualizing and quantifying natural selection. *Trends in Ecology & Evolution*, 10(8), 313-318.
- Burd, M. (1994). Bateman's principle and plant reproduction: the role of pollen limitation in fruit and seed set. *The Botanical Review*, 60(1), 83-139.
- Burkhardt, A., Ridenhour, B. J., Delph, L. F., & Bernasconi, G. (2012). The contribution of a pollinating seed predator to selection on *Silene latifolia* females. *Journal of Evolutionary Biology*, 25(3), 461-472.
- Charlesworth, B., & Charlesworth, D. (1999). The genetic basis of inbreeding depression. *Genetics Research*, 74(3), 329-340.
- Chaudhary, A., Yadav, S. R., & Tandon, R. (2018). Delayed selfing ensures reproductive assurance in *Utricularia praeterita* and *Utricularia babui* in Western Ghats. *Journal of Plant Research*, 131(4), 599-610.

- Cieslak, T., Polepalli, J. S., White, A., Müller, K., Borsch, T., Barthlott, W., & Legendre, L. (2005). Phylogenetic analysis of *Pinguicula* (Lentibulariaceae): chloroplast DNA sequences and morphology support several geographically distinct radiations. *American Journal of Botany*, 92(10), 1723-1736.
- Citerne, H., Jabbour, F., Nadot, S., & Damerval, C. (2010). The evolution of floral symmetry. *Advances in Botanical Research*, 54, 85-137.
- Clivati, D., Cordeiro, G. D., Płachno, B. J., & de Miranda, V. F. O. (2014). Reproductive biology and pollination of *Utricularia reniformis* A. S t.-H il.(Lentibulariaceae). *Plant Biology*, 16(3), 677-682.
- Colling, G., Reckinger, C., & Matthies, D. (2004). Effects of pollen quantity and quality on reproduction and offspring vigor in the rare plant *Scorzonera humilis* (Asteraceae). *American Journal of Botany*, 91(11), 1774-1782.
- Cresswell, J. E. (1998). Stabilizing selection and the structural variability of flowers within species. *Annals of Botany*, 81(4), 463-473.
- Cross, A. T., Krueger, T. A., Gonella, P. M., Robinson, A. S., & Fleischmann, A. S. (2020). Conservation of carnivorous plants in the age of extinction. *Global Ecology and Conservation*, e01272.
- Darwin, C. (1862). On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effect of intercrossing. London: John Murray.
- Darwin, C. (1875). Insectivorous plants. Londres, John Murray, Albemarle Street.
- De Ibarra, N. H., Langridge, K. V., & Vorobyev, M. (2015). More than colour attraction: behavioural functions of flower patterns. *Current Opinion in Insect Science*, 12, 64-70.
- De Jager, M. L., Willis-Jones, E., Critchley, S., & Glover, B. J. (2017). The impact of floral spot and ring markings on pollinator foraging dynamics. *Evolutionary Ecology*, 31(2), 193-204.
- Dore-Swamy, R., & Mohan-Ram, H. Y. (1971). Studies on growth and flowering in axenic cultures of insectivorous plants. II. Induction of flowering and development of flower in *Utricularia inflexa*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*.
- Duan, Y. W., Zhang, T. F., & Liu, J. Q. (2007). Interannual fluctuations in floral longevity, pollinator visitation and pollination limitation of an alpine plant (*Gentiana straminea* Maxim., Gentianaceae) at two altitudes

- in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Plant Systematics and Evolution*, 267(1), 255-265.
- Ellison, A. M. (2006). Nutrient limitation and stoichiometry of carnivorous plants. *Plant Biology*, 8(06), 740-747.
- Ellison, A. M., & Adamec, L. (Eds.). (2018). Carnivorous plants: physiology, ecology, and evolution. Oxford University Press.
- Ellison, A. M., & Gotelli, N. J. (2001). Evolutionary ecology of carnivorous plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(11), 623-629.
- Ellstrand, N. C., & Elam, D. R. (1993). Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1), 217-242.
- El-Sayed, A. M., Byers, J. A., & Suckling, D. M. (2016). Pollinator-prey conflicts in carnivorous plants: When flower and trap properties mean life or death. *Scientific Reports*, 6(1), 1-11.
- Farnsworth, E. J., & Ellison, A. M. (2008). Prey availability directly affects physiology, growth, nutrient allocation and scaling relationships among leaf traits in 10 carnivorous plant species. *Journal of Ecology*, 96(1), 213-221.
- Fenster, C. B., Armbruster, W. S., Wilson, P., Dudash, M. R., & Thomson, J. D. (2004). Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 35, 375-403.
- Field, K. J., George, R., Fearn, B., Quick, W. P., & Davey, M. P. (2013). Best of both worlds: simultaneous high-light and shade-tolerance adaptations within individual leaves of the living stone *Lithops aucampiae*. *PloS one*, 8(10), e75671.
- Fischer, E., Barthlott, W., Seine, R., & Theisen, I. (2004). Lentibulariaceae. In Flowering Plants · Dicotyledons (pp. 276-282). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Fishman, L., & Willis, J. H. (2008). Pollen limitation and natural selection on floral characters in the yellow monkeyflower, *Mimulus guttatus*. *New Phytologist*, 177(3), 802-810.
- Fornoni, J., Valverde, P. L., & Nunez-Farfan, J. (2004). Population variation in the cost and benefit of tolerance and resistance against herbivory in *Datura stramonium*. *Evolution*, 58(8), 1696-1704.
- García, M. B., Antor, R. J., & Villar, L. (1994). Phenomorphology and reproductive biology of *Pinguicula longifolia* Ramond ex DC. subsp.

- longifolia (Lentibulariaceae), a carnivorous endemic plant of the Pyrenees. *Acta Botanica Gallica*, 141(3), 343-349.
- Gaume, L., Perret, P., Gorb, E., Gorb, S., Labat, J. J., & Rowe, N. (2004). How do plant waxes cause flies to slide? Experimental tests of wax-based trapping mechanisms in three pitfall carnivorous plants. *Arthropod Structure & Development*, 33(1), 103-111.
- Gibson, T. C., & Waller, D. M. (2009). Evolving Darwin's 'most wonderful' plant: ecological steps to a snap-trap. *New Phytologist*, 183(3), 575-587.
- Givnish, T. J. (2015). New evidence on the origin of carnivorous plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(1), 10-11.
- Givnish, T. J., Burkhardt, E. L., Happel, R. E., & Weintraub, J. D. (1984). Carnivory in the bromeliad *Brocchinia reducta*, with a cost/benefit model for the general restriction of carnivorous plants to sunny, moist, nutrient-poor habitats. *The American Naturalist*, 124(4), 479-497.
- Gómez, J. M., & Perfectti, F. (2010). Evolution of complex traits: the case of *Erysimum* corolla shape. *International Journal of Plant Sciences*, 171(9), 987-998.
- González-Varo, J. P., Arroyo, J., & Aparicio, A. (2009). Effects of fragmentation on pollinator assemblage, pollen limitation and seed production of Mediterranean myrtle (*Myrtus communis*). *Biological Conservation*, 142(5), 1058-1065.
- Goodall, C. (1991). Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 53(2), 285-321.
- Gottlieb, L. D. (1984). Genetics and morphological evolution in plants. *The American Naturalist*, 123(5), 681-709.
- Griffin, C. A., & Eckert, C. G. (2003). Experimental analysis of biparental inbreeding in a self-fertilizing plant. *Evolution*, 57(7), 1513-1519.
- Grindeland, J. M. (2008). Inbreeding depression and outbreeding depression in *Digitalis purpurea*: optimal outcrossing distance in a tetraploid. *Journal of Evolutionary Biology*, 21(3), 716-726.
- Gunz, P., & Mitteroecker, P. (2013). Semilandmarks: a method for quantifying curves and surfaces. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24(1), 103-109.
- Hájek, T., & Adamec, L. (2010). Photosynthesis and dark respiration of leaves of terrestrial carnivorous plants. *Biologia*, 65(1), 69-74.

- Handayani, T. R. I. (2017). Flower morphology, floral development and insect visitors to flowers of *Nepenthes mirabilis*. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 18(4), 1624-1631.
- Hauser, T. P., & Loeschcke, V. (1994). Inbreeding depression and mating-distance dependent offspring fitness in large and small populations of *Lychnis flos-cuculi* (Caryophyllaceae). *Journal of Evolutionary Biology*, 7(5), 609-622.
- Herrera, C. M. (1989). Pollinator abundance, morphology, and flower visitation rate: analysis of the “quantity” component in a plant-pollinator system. *Oecologia*, 80(2), 241-248.
- Herrera, C. M. (2005). Plant generalization on pollinators: species property or local phenomenon?. *American Journal of Botany*, 92(1), 13-20.
- Heslop-Harrison, Y. (2004). *Pinguicula* L. *Journal of Ecology*, 92(6), 1071-1118.
- Hileman, L. C. (2014). Bilateral flower symmetry—how, when and why?. *Current Opinion in Plant Biology*, 17, 146-152.
- Hobbhahn, N., Küchmeister, H., & Porembski, S. (2006). Pollination biology of mass flowering terrestrial *Utricularia* species (Lentibulariaceae) in the Indian Western Ghats. *Plant Biology*, 8(06), 791-804.
- Husband, B. C., & Schemske, D. W. (1996). Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution*, 50(1), 54-70.
- Jérémie, J. (1989). Autogamie dans le genre *Utricularia* L.(Lentibulariaceae). *Bulletin du Muséum national d'histoire naturelle. Section B, Adansonia*, 11(1), 17-28.
- Jones, L. A. (2011). Anatomical adaptations of four *Crassula* species to water availability. *Bioscience Horizons*, 4(1), 13-22.
- Juniper, B. E., Robins, R. J., & Joel, D. M. (1989). *The Carnivorous Plants*. Academic Press Ltd. London, UK.
- Jürgens, A., El-Sayed, A. M., & Suckling, D. M. (2009). Do carnivorous plants use volatiles for attracting prey insects?. *Functional Ecology*, 23(5), 875-887.
- Jürgens, A., Sciligo, A., Witt, T., El-Sayed, A. M., & Suckling, D. M. (2012). Pollinator-prey conflict in carnivorous plants. *Biological Reviews*, 87(3), 602-615.
- Kausik, S. B., & Raju, M. V. S. (1955, April). A contribution to the floral morphology and embryology of *Utricularia reticulata* Smith. In

- Proceedings of the Indian Academy of Sciences-Section B (Vol. 41, No. 4, pp. 155-166). Springer India.
- Keller, L. F., & Waller, D. M. (2002). Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(5), 230-241.
- Khosla, C., Shivanna, K. R., & Mohan Ram, H. Y. (1998). Pollination in the aquatic insectivore *Utricularia inflexa* var. *stellaris*. *Phytomorphology*, 48(4), 417-425.
- Król, E., Płachno, B. J., Adamec, L., Stolarz, M., Dziubińska, H., & Trębacz, K. (2012). Quite a few reasons for calling carnivores 'the most wonderful plants in the world'. *Annals of Botany*, 109(1), 47-64.
- Lamb, T., & Kalies, E. L. (2020). An overview of lepidopteran herbivory on North American pitcher plants (*Sarracenia*), with a novel observation of feeding on *Sarracenia flava*. *The Journal of the Lepidopterists' Society*, 74(3), 193-197.
- Lampard, S. (2016). *Pinguicula* of Latin America. Redfern Natural History Productions.
- Lande, R., & Arnold, S. J. (1983). The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, 1210-1226.
- Larson, B. M., & Barrett, S. C. (2000). A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, 69(4), 503-520.
- Lavi, R., & Sapir, Y. (2015). Are pollinators the agents of selection for the extreme large size and dark color in *Oncocylus irises*?. *New Phytologist*, 205(1), 369-377.
- Lázaro, A., Hegland, S. J., & Totland, Ø. (2008). The relationships between floral traits and specificity of pollination systems in three Scandinavian plant communities. *Oecologia*, 157(2), 249-257.
- Lázaro, A., Nielsen, A., & Totland, Ø. (2010). Factors related to the inter-annual variation in plants' pollination generalization levels within a community. *Oikos*, 119(5), 825-834.
- Legendre, L. (2000). The genus *Pinguicula* L.(Lentibulariaceae): an overview. *Acta Botanica Gallica*, 147(1), 77-95.
- Levin, D. A., & Kerster, H. W. (1974). Gene flow in seed plants. In *Evolutionary biology* (pp. 139-220). Springer, Boston, MA.

- Lu, N. N., Ma, Y., Hou, M., & Zhao, Z. G. (2021). The function of floral traits and phenotypic selection in *Aconitum gymnandrum* (Ranunculaceae). *Plant Biology*, 23(6), 931-938.
- Lustofin, K., Świątek, P., Miranda, V. F., & Płachno, B. J. (2020). Flower nectar trichome structure of carnivorous plants from the genus butterworts *Pinguicula* L.(Lentibulariaceae). *Protoplasma*, 257(1), 245-259.
- Lynch, M. (1991). The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution*, 45(3), 622-629.
- Mayfield, M. M., Waser, N. M., & Price, M. V. (2001). Exploring the 'most effective pollinator principle' with complex flowers: bumblebees and *Ipomopsis aggregata*. *Annals of Botany*, 88(4), 591-596.
- McCall, C., Mitchell-Olds, T., & Waller, D. M. (1991). Distance between mates affects seedling characters in a population of *Impatiens capensis* (Balsaminaceae). *American Journal of Botany*, 78(7), 964-970.
- Merbach, M. A., Merbach, D. J., Maschwitz, U., Booth, W. E., Fiala, B., & Zizka, G. (2002). Mass march of termites into the deadly trap. *Nature*, 415(6867), 36-37.
- Millett, J., Foot, G. W., & Svensson, B. M. (2015). Nitrogen deposition and prey nitrogen uptake control the nutrition of the carnivorous plant *Drosera rotundifolia*. *Science of The Total Environment*, 512, 631-636.
- Mithöfer, A., & Boland, W. (2012). Plant defense against herbivores: chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology*, 63, 431-450.
- Molano-Flores, B., Primer, S., Annis, J., Feist, M. A., Coons, J., & Digges, R. (2018). Reproductive ecology of three rare North American *Pinguicula* species. *Plant Species Biology*, 33(2), 129-139.
- Molau, U. (1993). Reproductive ecology of the three Nordic *Pinguicula* species (Lentibulariaceae). *Nordic Journal of Botany*, 13(2), 149-157.
- Montalvo, A. M., & Ellstrand, N. C. (2001). Nonlocal transplantation and outbreeding depression in the subshrub *Lotus scoparius* (Fabaceae). *American Journal of Botany*, 88(2), 258-269.
- Moon, D. C., Rossi, A., Stokes, K., & Moon, J. (2008). Effects of the pitcher plant mining moth *Exyra semicrocea* on the hooded pitcher plant *Sarracenia minor*. *The American Midland Naturalist*, 159(2), 321-326.
- Moran, J. A., Booth, W. E., & Charles, J. K. (1999). Aspects of pitcher morphology and spectral characteristics of six Bornean *Nepenthes* pitcher

- Plant Species: Implications for Prey Capture. *Annals of Botany*, 83(5), 521-528.
- Morgan, M. T., & Conner, J. K. (2001). Using genetic markers to directly estimate male selection gradients. *Evolution*, 55(2), 272-281.
- Muchhala, N. (2006). The pollination biology of *Burmeistera* (Campanulaceae): specialization and syndromes. *American Journal of Botany*, 93(8), 1081-1089.
- Nathan, R., Schurr, F. M., Spiegel, O., Steinitz, O., Trakhtenbrot, A., & Tsoar, A. (2008). Mechanisms of long-distance seed dispersal. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(11), 638-647.
- Ne'eman, G., Ne'eman, R., & Ellison, A. M. (2006). Limits to reproductive success of *Sarracenia purpurea* (Sarraceniaceae). *American Journal of Botany*, 93(11), 1660-1666.
- Nybom, H., & Bartish, I. V. (2000). Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 3(2), 93-114.
- Ollerton, J., Winfree, R., & Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals?. *Oikos*, 120(3), 321-326.
- Oostermeijer, G. B., GM Altenburg, R., & CM den Nijs, H. (1995). Effects of outcrossing distance and selling on fitness components in the rare *Gentiana pneumonanthe* (Gentianaceae). *Acta Botanica Neerlandica*, 44(3), 257-268.
- Parachnowitsch, A. L., & Caruso, C. M. (2008). Predispersal seed herbivores, not pollinators, exert selection on floral traits via female fitness. *Ecology*, 89(7), 1802-1810.
- Parachnowitsch, A. L., & Kessler, A. (2010). Pollinators exert natural selection on flower size and floral display in *Penstemon digitalis*. *New Phytologist*, 188(2), 393-402.
- Parisod, C., Trippi, C., & Galland, N. (2005). Genetic variability and founder effect in the pitcher plant *Sarracenia purpurea* (Sarraceniaceae) in populations introduced into Switzerland: from inbreeding to invasion. *Annals of Botany*, 95(2), 277-286.
- Pavón, N. P., Contreras-Ramos, A., & Islas-Perusquía, Y. (2011). Diversity of arthropods preyed upon by the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae) in a temperate forest of Central Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 56(1), 78-82.

- Pélabon, C., Carlson, M. L., Hansen, T. F., & Armbruster, W. S. (2005). Effects of crossing distance on offspring fitness and developmental stability in *Dalechampia scandens* (Euphorbiaceae). *American Journal of Botany*, 92(5), 842-851.
- Pérez-Barrales, R., Bolstad, G. H., Pélabon, C., Hansen, T. F., & Armbruster, W. S. (2013). Pollinators and seed predators generate conflicting selection on *Dalechampia blossoms*. *Oikos*, 122(10), 1411-1428.
- Plachno, B. J., Stpiczyńska, M., Adamec, L., Miranda, V. F. O., & Świątek, P. (2018). Nectar trichome structure of aquatic bladderworts from the section *Utricularia* (Lentibulariaceae) with observation of flower visitors and pollinators. *Protoplasma*, 255(4), 1053-1064.
- Plachno, B. J., Stpiczyńska, M., Świątek, P., Lambers, H., Cawthray, G. R., Nge, F. J., & Miranda, V. F. (2019). Floral micromorphology and nectar composition of the early evolutionary lineage *Utricularia* (subgenus *Polypompholyx*, Lentibulariaceae). *Protoplasma*, 256(6), 1531-1543.
- Pluess, A. R., Sork, V. L., Dolan, B., Davis, F. W., Grivet, D., Merg, K., & Smouse, P. E. (2009). Short distance pollen movement in a wind-pollinated tree, *Quercus lobata* (Fagaceae). *Forest Ecology and Management*, 258(5), 735-744.
- Price, M. V., & Waser, N. M. (1979). Pollen dispersal and optimal outcrossing in *Delphinium nelsoni*. *Nature*, 277(5694), 294-297.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Raguso, R. A., Levin, R. A., Foose, S. E., Holmberg, M. W., & McDade, L. A. (2003). Fragrance chemistry, nocturnal rhythms and pollination “syndromes” in *Nicotiana*. *Phytochemistry*, 63(3), 265-284.
- Reifenrath, K., Theisen, I., Schnitzler, J., Porembski, S., & Barthlott, W. (2006). Trap architecture in carnivorous *Utricularia* (Lentibulariaceae). *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 201(8), 597-605.
- Rigney, L. P. (1995). Postfertilization causes of differential success of pollen donors in *Erythronium grandiflorum* (Liliaceae): nonrandom ovule abortion. *American Journal of Botany*, 82(5), 578-584.
- Robertson, I. C., & Ulappa, A. C. (2004). Distance between pollen donor and recipient influences fruiting success in slickspot peppergrass, *Lepidium papilliferum*. *Canadian Journal of Botany*, 82(12), 1705-1710.

- Rosas-Guerrero, V., Aguilar, R., Martén-Rodríguez, S., Ashworth, L., Lopezaraiza-Mikel, M., Bastida, J. M., & Quesada, M. (2014). A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators?. *Ecology Letters*, 17(3), 388-400.
- Sahli, H. F., & Conner, J. K. (2007). Visitation, effectiveness, and efficiency of 15 genera of visitors to wild radish, *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). *American Journal of Botany*, 94(2), 203-209.
- Sánchez-Villegas (2016). Efecto de la variación inter-individual de la forma de la corola sobre el éxito reproductivo de *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae). Tesis de Maestría. Maestría en Biología Integrativa de la Biodiversidad y la Conservación, Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC-UAEM).
- Sandring, S., & Ågren, J. (2009). Pollinator-mediated selection on floral display and flowering time in the perennial herb *Arabidopsis lyrata*. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 63(5), 1292-1300.
- Schaefer, H. M., & Ruxton, G. D. (2008). Fatal attraction: carnivorous plants roll out the red carpet to lure insects. *Biology Letters*, 4(2), 153-155.
- Schnell, D. E. (2002). Carnivorous plants of the United States and Canada (No. Ed. 2). Timber Press.
- Sheridan, P. M., & Karowe, D. N. (2000). Inbreeding, outbreeding, and heterosis in the yellow pitcher plant, *Sarracenia flava* (Sarraceniaceae), in Virginia. *American Journal of Botany*, 87(11), 1628-1633.
- Siepielski, A. M., DiBattista, J. D., & Carlson, S. M. (2009). It's about time: the temporal dynamics of phenotypic selection in the wild. *Ecology Letters*, 12(11), 1261-1276.
- Sletvold, N., & Ågren, J. (2011). Nonadditive effects of floral display and spur length on reproductive success in a deceptive orchid. *Ecology*, 92(12), 2167-2174.
- Sletvold, N., Grindeland, J. M., & Ågren, J. (2010). Pollinator-mediated selection on floral display, spur length and flowering phenology in the deceptive orchid *Dactylorhiza lapponica*. *New Phytologist*, 188(2), 385-392.
- Sletvold, N., Grindeland, J. M., & Ågren, J. (2013). Vegetation context influences the strength and targets of pollinator-mediated selection in a deceptive orchid. *Ecology*, 94(6), 1236-1242.
- Sletvold, N., Trunschke, J., Smit, M., Verbeek, J., & Ågren, J. (2016). Strong pollinator-mediated selection for increased flower brightness and contrast in a deceptive orchid. *Evolution*, 70(3), 716-724.

- Sork, V. L., & Smouse, P. E. (2006). Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. *Landscape Ecology*, 21(6), 821-836.
- Souto, C. P., Aizen, M. A., & Premoli, A. C. (2002). Effects of crossing distance and genetic relatedness on pollen performance in *Alstroemeria aurea* (Alstroemeriaceae). *American Journal of Botany*, 89(3), 427-432.
- Spigler, R. B., & Chang, S. M. (2009). Pollen limitation and reproduction varies with population size in experimental populations of *Sabatia angularis* (Gentianaceae). *Botany*, 87(3), 330-338.
- Strauss, S. Y., & Whittall, J. B. (2006). Non-pollinator agents of selection on floral traits. *Ecology and Evolution of Flowers*, 120-138.
- Suárez-Piña, J., Rueda-Almazán, J. E., Ayestarán, L. M., & Alcalá, R. E. (2016). Effect of light environment on intra-specific variation in herbivory in the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae). *Journal of Plant Interactions*, 11(1), 146-151.
- Sun, H. Q., Huang, B. Q., Yu, X. H., Tian, C. B., Peng, Q. X., & An, D. J. (2018). Pollen limitation, reproductive success and flowering frequency in single-flowered plants. *Journal of Ecology*, 106(1), 19-30.
- Tagawa, K., Watanabe, M., & Yahara, T. (2018). Pollinator trapping in selfing carnivorous plants, *Drosera makinoi* and *D. toyoakensis* (Droseraceae). *Ecological Research*, 33(2), 487-494.
- Thompson, J. D. (2001). How do visitation patterns vary among pollinators in relation to floral display and floral design in a generalist pollination system?. *Oecologia*, 126(3), 386-394.
- Tye, M., Dahlgren, J. P., & Sletvold, N. (2020). Pollen limitation in a single year is not compensated by future reproduction. *Oecologia*, 192(4), 989.
- Unsicker, S. B., Kunert, G., & Gershenzon, J. (2009). Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), 479-485.
- Van der Kooi, C. J., Dyer, A. G., Kevan, P. G., & Lunau, K. (2019). Functional significance of the optical properties of flowers for visual signalling. *Annals of Botany*, 123(2), 263-276.
- Vance, C. P., Uhde-Stone, C., & Allan, D. L. (2003). Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist*, 157(3), 423-447.

- Vázquez, D. P., & Simberloff, D. (2004). Indirect effects of an introduced ungulate on pollination and plant reproduction. *Ecological Monographs*, 74(2), 281-308.
- Villegas, S. G., & Alcalá, R. E. (2018). Reproductive ecology of the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae). *Plant Biology*, 20(2), 205-212.
- Villegas, S. G., Ospina-Gárces, M., Fornoni, J., Domínguez, C. A., & Alcalá R. E. (2020). Effects of crossing distance on fitness components in the carnivorous plant *Pinguicula moranensis* (Lentibulariaceae). *Plant Species Biology*, 35:175-184.
- Waser, N. M., & Price, M. V. (1989). Optimal outcrossing in *Ipomopsis aggregata*: Seed set and offspring fitness. *Evolution*, 43:1097-1109.
- Willis, J. H. (1996). Measures of phenotypic selection are biased by partial inbreeding. *Evolution*, 50(4), 1501-1511.
- Willson, M. F., & Traveset, A. (2000). The ecology of seed dispersal. *Seeds: the Ecology of Regeneration in Plant Communities*, 2, 85-110.
- Wood, C. W., & Brodie III, E. D. (2016). Evolutionary response when selection and genetic variation covary across environments. *Ecology Letters*, 19(10), 1189-1200.
- Worley, A. C., & Harder, L. D. (1999). Consequences of preformation for dynamic resource allocation by a carnivorous herb, *Pinguicula vulgaris* (Lentibulariaceae). *American Journal of Botany*, 86(8), 1136-1145.
- Yamamoto, I. (1990). A study on the reproductive biology of aquatic *Utricularia* species in southwestern Japan. *Acta Phytotaxonomica et Geobotanica*, 41, 189-200.
- Zamora, R. (1995). The trapping success of a carnivorous plant, *Pinguicula vallisneriifolia*: the cumulative effects of availability, attraction, retention and robbery of prey. *Oikos*, 309-322.
- Zamora, R. (1999). Conditional outcomes of interactions: the pollinator–prey conflict of an insectivorous plant. *Ecology*, 80(3), 786-795.
- Zamora, R. (2002). Importancia de la heterogeneidad ambiental en la ecología de plantas carnívoras mediterráneas: implicaciones para la conservación. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75(1), 17-26.
- Zamora, R., & Gomez, J. M. (1996). Carnivorous plant-slug interaction: a trip from herbivory to kleptoparasitism. *Journal of Animal Ecology*, 154-160.

- Zamudio, S. (1999). Notas sobre la identidad de *Pinguicula moranensis* HBK, con la descripción de una variedad nueva. *Acta Botanica Mexicana*, (49), 23-34.
- Zamudio, S. (2001) Revision de la seccion *Orcheosanthus*, del genero *Pinguicula* (Lentibulariaceae). Doctoral dissertation, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Facultad de Ciencias, Mexico, DF.
- Zamudio, S. (2006). Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: Lentibulariaceae. UNAM.
- Zhang, C., Vereecken, N. J., Wang, L., Tian, B., Dafni, A., Yang, Y., & Duan, Y. (2017). Are nectar guide colour changes a reliable signal to pollinators that enhances reproductive success?. *Plant Ecology & Diversity*, 10(2-3), 89-96.