



Universidad
Nacional
de Córdoba



Facultad de
Ciencias Exactas
Físicas y Naturales

Carrera de Ciencias Biológicas

Dicogamia, sistema reproductivo, producción
de néctar y comportamiento de los
polinizadores en *Salvia stachydifolia*
Benth., una especie de polinización mixta
2019

Tesinista: Barrionuevo Camila Nerea

Firma:

Director: Dr. Benitez-Vieyra Santiago

Firma:

Codirector: Dr. Sazatornil Federico

Firma:

Lugar de trabajo: Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV, CONICET-UNC).



Universidad
Nacional
de Córdoba

I M B I V



Dicogamia, sistema reproductivo, producción de néctar y comportamiento de los polinizadores en *Salvia stachydifolia* Benth., una especie de polinización mixta.

Tribunal examinador

Nombre y Apellido: Dr. Gabriel Bernardello **Firma:**

Nombre y Apellido: Dr. Claudio Sosa **Firma:**

Nombre y Apellido: Dra. Susana Peluc **Firma:**

Calificación:

Fecha: 28 de Febrero de 2019.

Índice

Resumen	1
Palabras clave	1
Introducción.....	2
Materiales y Métodos	4
Sistema de estudio.....	4
Caracterización de la fase sexual	4
Sistema reproductivo	6
Comportamiento de los polinizadores	7
Resultados.....	7
Antesis y fases sexuales	7
Dinámica de producción de néctar.....	9
Sistema reproductivo	11
Horarios de visita de los diferentes gremios de polinizadores.....	12
Comportamiento de cada gremio de polinizadores en una planta	13
Discusión y Conclusiones.....	15
Referencias Bibliográficas.....	17

Título: Dicogamia, sistema reproductivo, producción de néctar y comportamiento de los polinizadores en *Salvia stachydifolia* Benth., una especie de polinización mixta.

Resumen

El principio del polinizador más efectivo propone que las características de las flores son moldeadas por la selección ejercida por los polinizadores más frecuentes y eficientes, generando características convergentes en diferentes especies de plantas, lo que se identifica como síndrome de polinización. Sin embargo, plantas con características asociadas a un síndrome particular suelen presentar polinización mixta, siendo visitadas por más de un gremio de polinizadores. Este tipo de polinización podría representar una situación evolutivamente inestable. Para analizar la eficiencia de ambos gremios de polinizadores, utilizamos una especie polinizada por insectos y picaflores, *Salvia stachydifolia* Benth., e indagamos la relación entre el comportamiento de los polinizadores y tres aspectos de la biología floral: las fases sexuales (dicogamia), la producción de néctar a diferentes horas y el sistema reproductivo (grado de compatibilidad).

Observamos que mientras los picaflores visitan entre las 8:00 y las 10:00 h y luego entre las 19:00 y las 21:00 h, los insectos lo hacen entre las 9:00 y las 19:00 h. Sin embargo no existen diferencias importantes respecto a su comportamiento dentro de cada planta, promoviendo de igual forma la geitonogamia. *S. stachydifolia* posee un abanico de estrategias reproductivas, desde la polinización cruzada hasta la autopolinización y reproducción asexual, por lo que puede asegurar su reproducción en diferentes escenarios, siendo parcialmente autógena. No obstante, encontramos que el sistema reproductivo es parcialmente autocompatible, siendo más eficiente la polinización cruzada. Por otro lado, *S. stachydifolia* es parcialmente dicógama ya que en las primeras horas luego de la apertura de las flores, más del 60% se encontraron en fase masculina. Luego, las flores entran en fase hermafrodita, la cual perdura durante el resto de su vida. Respecto a la dinámica del néctar, la tendencia indica una mayor disponibilidad de recompensa cuando predominan las visitas de insectos. La alta concentración y bajo volumen del néctar encontrados son característicos de plantas polinizadas por abejas, pero no excluyen a los picaflores.

Los diferentes gremios de polinizadores serían igualmente eficientes, aunque los picaflores podrían favorecer la polinización cruzada al visitar las flores en las primeras horas de la mañana, cuando parte de ellas se encuentran en fase masculina. Un cambio persistente en las condiciones ecológicas que aumentara la frecuencia de visitas de picaflores, podría generar la transición hacia la polinización por aves.

Palabras clave: *Salvia*, fases sexuales, néctar, sistema reproductivo, abejas, picaflores.

Introducción

El principio del polinizador más efectivo (Stebbins 1970) propone que las características de las flores son moldeadas por la selección ejercida por los polinizadores más frecuentes y eficientes. En consecuencia, especies que comparten el mismo gremio de polinizadores poseen características convergentes, lo que se conoce como síndrome de polinización. De esta forma, ciertas características florales (por ejemplo, tamaño, color y forma) y tipos de recompensas (por ejemplo, cantidad y concentración de néctar) permiten inferir quiénes pueden ser los polinizadores más efectivos (Van Der Pijl 1961, Fenster *et al.* 2004, Willmer 2011). Más allá de la presencia de plantas con polinización generalista, en muchos casos se ha observado que especies de plantas con características claramente asociadas a un síndrome particular presentan polinización mixta, siendo visitadas por más de un gremio de polinizadores (Thomson y Wilson 2008). Este fenómeno ha sido propuesto como la persistencia de “polinizadores secundarios” por Rosas-Guerrero *et al.* (2014). Sin embargo, este tipo de polinización mixta podría representar una situación evolutivamente inestable. En estos casos, ciertos rasgos florales como la antesis, el sistema reproductivo y la producción de néctar, determinan si la polinización puede ser llevada a cabo exitosamente por más de un gremio de polinizadores.

Una de las transiciones entre síndromes de polinización más frecuentes es entre la polinización por abejas (melitofilia) y la polinización por aves (ornitofilia), particularmente por picaflores (Grant y Grant 1968, Thomson y Wilson 2008, Abrahamczyk y Renner 2015). Diferentes explicaciones se han propuesto para estas transiciones. En primer lugar, mutaciones en loci genéticos de efecto grande podrían generar diferencias en la cantidad de néctar, pigmentos, la orientación de los pétalos y la exserción de anteras y estigmas. Cada una de estas diferencias podría permitir, a una población adaptada a la polinización por abejas, "saltar" hacia un estado de adaptación a los picaflores (Bradshaw y Schemske 2003, Thomson y Wilson 2008). En segundo lugar, el número relativo de visitas de los polinizadores establece un umbral en el cual la contribución de un polinizador cambia de beneficiosa a parasitaria. Un cambio en las circunstancias ecológicas podría aumentar la frecuencia de visitas de picaflores lo suficiente para cruzar este umbral (Thomson y Wilson 2008), desencadenando la transición entre diferentes síndromes de polinización. El componente ambiental juega un papel fundamental en la diferenciación de las tasas de visitas, ya sea porque una especie es colonizadora y durante la adaptación al nuevo hábitat las abejas presentan menor actividad que las aves, o por la baja en la tasa de visitas de abejas durante ciertas horas del día (por presencia de niebla por ejemplo) y la presencia de picaflores durante ese mismo periodo (Cruden 1972). Si la nueva condición persiste durante un tiempo suficiente, la selección favorecerá los rasgos asociados con la polinización por aves y que los hacen menos atractivos para las abejas. Se ha propuesto, además, que las diferencias en la eficiencia de la transferencia de polen por las abejas y las aves,

producto de comportamientos de forrajeo distintos, podrían ser un factor clave en el proceso de transición (Castellanos *et al.* 2003; Thomson y Wilson 2008).

Sabemos que no sólo el comportamiento de los polinizadores determina la eficiencia en la polinización, sino que también lo hacen aquellos rasgos florales que las plantas exponen a estos. En plantas de polinización mixta, rasgos morfológicos pueden limitar la efectividad de uno de los polinizadores, por ejemplo excluyendo a las abejas menos eficientes (Castellanos *et al.* 2004, Muchhala 2007, Strelin *et al.* 2017). La dinámica en la producción del néctar, su concentración y volumen, pueden favorecer las visitas de uno u otro gremio de polinizadores si es que estos difieren en sus preferencias alimenticias. En aquellas plantas que presentan dicogamia, la eficiencia de los polinizadores también puede variar según su horario de visita. Finalmente, otros rasgos como el sistema reproductivo, podrían determinar la eficiencia en cuanto a la calidad de la polinización, dependiendo del comportamiento de los polinizadores dentro de una planta y su eficiencia para transportar polen de una planta a otra.

El género *Salvia* comprende unas 1000 especies, de las cuales aproximadamente dos tercios (subgen. *Calosphace*; 602 especies) habitan en el Nuevo Mundo. Muchas de ellas (31%) son polinizadas por picaflores (Trochilidae), el 58% son polinizadas por abejas (Hymenoptera: Apidae), mientras que el 11% no muestra una morfología floral que pueda ser relacionada a un síndrome (Wester y Claßen-Bockhoff 2011). Análisis filogenéticos proponen que la transición evolutiva de melitofilia a la ornitofilia ha ocurrido en repetidas ocasiones de manera independiente en *Salvia* subgen. *Calosphace* (Fragoso-Martínez *et al.* 2018). Según Wester y Claßen-Bockhoff (2011), *Salvia stachydifolia* forma parte del grupo de especies melitófilas. Sin embargo, si bien los polinizadores más frecuentes pertenecen al gremio de las abejas, la morfología no excluye a picaflores (Wester y Claßen-Bockhoff 2011, Benitez-Vieyra *et al.* 2014, Strelin *et al.* 2017). Observaciones a campo (Strelin *et al.* 2017, Sazatornil y Benitez-Vieyra 2015, Sazatornil *et al.* 2017) indican que los picaflores también visitan las flores de esta especie y transportan polen en sus picos (obs. pers) siendo polinizadores legítimos.

En este trabajo, indagamos la relación entre el comportamiento de los polinizadores de *Salvia stachydifolia* y tres aspectos de la biología floral de esta especie, con el objeto de analizar la eficiencia de ambos gremios de polinizadores: abejas y picaflores. Para esto examinamos la diferenciación horaria de las visitas de abejas y picaflores a las flores de *S. stachydifolia* y el número de visitas consecutivas dentro de una misma planta. También evaluamos si existen diferencias en la eficiencia de estos dos gremios de polinizadores, debido a sus diferentes comportamientos, determinada por su interacción con las fases sexuales (dicogamia), la producción de néctar a diferentes horas y el sistema reproductivo (grado de compatibilidad) de *S. stachydifolia*.

Materiales y Métodos

Sistema de estudio

Salvia stachydifolia Benth., es una hierba perenne o subarbusto perteneciente a la familia Lamiaceae, con distribución entre los 1500-3500 msnm en las provincias de Catamarca, Jujuy, Salta y Tucumán, Argentina y en centro-sur de Bolivia (Wood 2007). Presenta flores azuladas formando pseudoracimos terminales de hasta 20 cm longitud, de simetría zigomorfa con labio superior entero, cóncavo, y labio inferior tetralobulado, más largo que el superior (Fig. 1). El gineceo es súpero formado por dos carpelos soldados, dividiéndose en cuatro partes debido a la formación de un falso tabique en cada carpelo. Cada lóculo cuenta con un óvulo de placentación basal, formando así un total de cuatro semillas por flor (Orfila *et al.* 1996). En *Salvia*, el androceo está compuesto por dos estambres dispuestos sobre un sistema de palanca que deposita el polen en el dorso o pico de los polinizadores. Este mecanismo de antera-palanca es una estructura única entre las angiospermas y se considera una innovación clave, ya que permitió al género radiar en diferentes síndromes de polinización (Claßen Bockhoff *et al.* 2004). En cuanto al néctar, este se acumula en la parte inferior del tubo de la corola.

Las observaciones de visitantes florales y su comportamiento se realizaron en la localidad de Tafi del Valle (26°47'48''S, 65°43'22''O, Provincia de Tucumán). En esta área, *S. stachidyfolia* está generalmente presente en la ladera húmeda de caminos de montaña. La población en estudio involucra 60 plantas aproximadamente. Para el estudio de sistema reproductivo, fases sexuales y dinámica del néctar se utilizaron 30 plantas cultivadas desde semilla en el umbráculo del IMBIV, derivadas de la misma población natural (Fig. 1).

Caracterización de la fase sexual

Registramos el horario de apertura de la flor, horario de apertura de las anteras (inicio de la fase masculina) y caída de la corola de la flor en 70 flores. No se consignó el horario de despliegue del estigma ya que todas las flores observadas abren con su estigma ya desplegado. Comprobamos la receptividad del estigma en cinco a ocho flores en diferentes momentos de la vida de la flor utilizando peróxido de hidrógeno al 5% v/v (Dafni *et al.* 2005) con una mínima cantidad de detergente (para romper la tensión superficial), considerando los estigmas como receptivos si emiten burbujas de forma notable, parcialmente receptivos con burbujeo de mediana intensidad y no receptivos si no emitían burbujas.

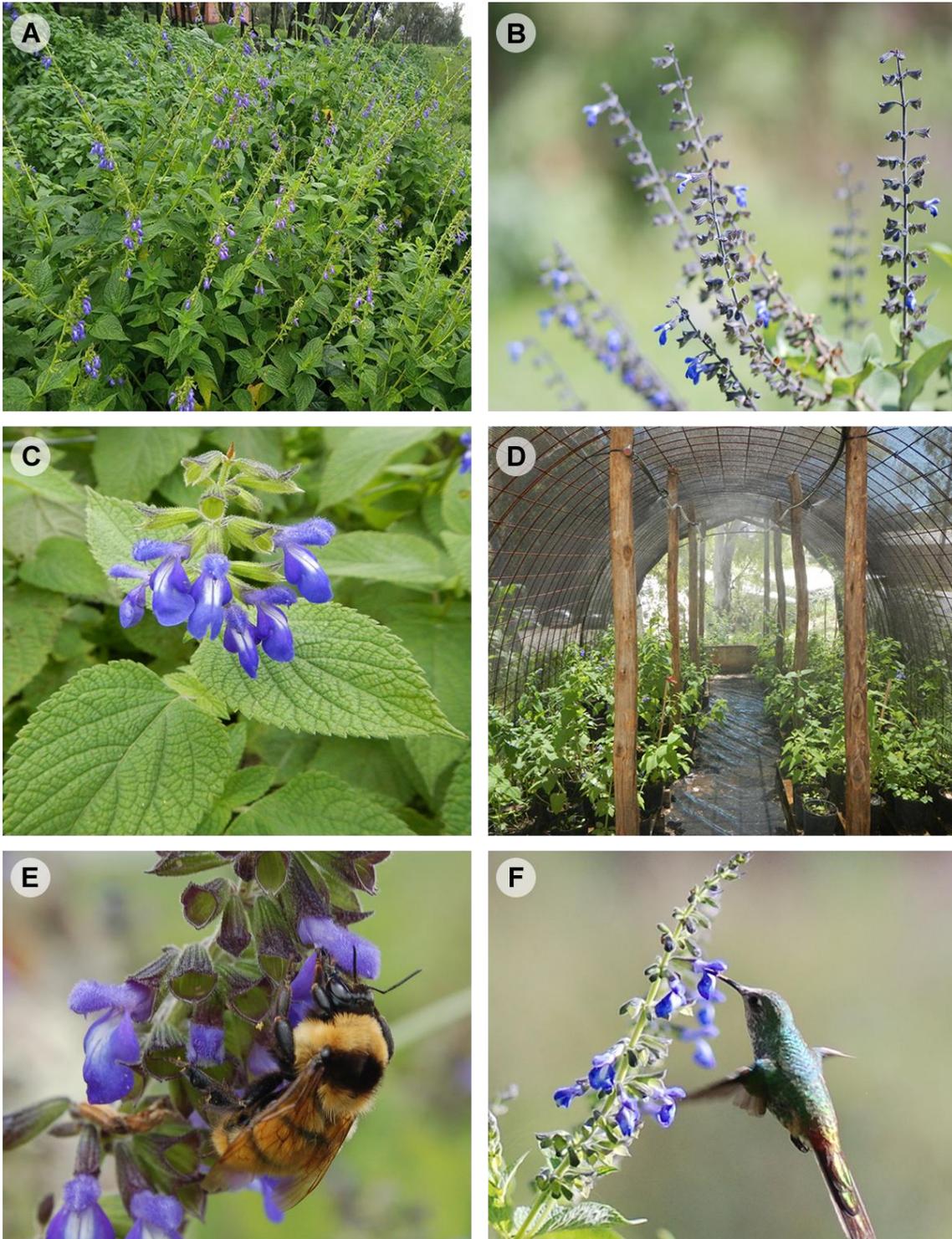


Figura 1. **A.** Planta de *S. stachydifolia* en su hábitat natural; **B.** Inflorescencia terminal de *S. stachydifolia*; **C.** Flores desplegadas; **D.** Plantas cultivadas en el umbráculo del instituto **E.** *Bombus opifex* (reina) tomando néctar de la flor; **F.** *Sappho sparganura* tomando néctar de la flor.

Volumen y concentración del néctar.

Obtuvimos datos entre las 6:00 h y las 18:00 h del mismo día. Realizamos muestreos a cada hora a lo largo de dicho periodo, tomando cinco flores de diferentes plantas en cada hora. Los pimpollos fueron embolsados el día anterior para evitar que la visita de polinizadores modifique los niveles de néctar presentes. Al momento de embolsar los pimpollos, fueron retiradas las flores que ya se encontraban abiertas para asegurar que las mediciones se realizaran con flores del primer día de vida. Las flores fueron descartadas una vez colectado el néctar. Medimos el volumen de néctar con microcapilares graduados y luego registramos la concentración de azúcares mediante refractómetro manual (Atago Master-T, 0-33 Brix y Atago Master-2T, 28-62 Brix). La cantidad de azúcar en el néctar se calculó siguiendo a Galletto y Bernardello (2005).

Sistema reproductivo

Realizamos cuatro tratamientos: polinización cruzada manual (cm, n=16 flores), geitonogamia manual (ge, n=26 flores), apomixis (ap, n= 22 flores) y autopolinización espontánea (ae, n=35 flores). Para estimar la tasa de autopolinización espontánea marcamos con pintura los cálices de pimpollos y luego los embolsamos hasta la formación de frutos. Para estimar los demás tratamientos (cm, ge y ap), se marcaron los cálices de la misma manera pero en flores previamente emasculadas, que se mantuvieron embolsadas desde el estado de pimpollo hasta la formación de frutos. En los dos primeros (cm y ge) las flores previamente emasculadas fueron polinizadas con polen proveniente de otra planta o de otras flores de la misma planta, respectivamente.

Las piezas femeninas fueron colectadas al momento de su caída para comprobar la presencia/ausencia de granos de polen en el estigma. Esto fue particularmente importante en el tratamiento de apomixis, ya que nos permitió descartar que los posibles frutos producidos fueran producto de autopolinización accidental. Para esto montamos los estigmas en un portaobjetos y los teñimos con floxina – verde de metilo siguiendo la metodología de Dafni *et al.* (2005). En todos los tratamientos, los frutos se colectaron a los siete días de polinizadas las flores y se contabilizó el número de semillas formadas. Se estimó el éxito reproductivo como la proporción de fructificación (frutos/flores) y como el número medio de semillas por fruto. Para conocer si existen diferencias significativas entre los tratamientos se utilizaron modelos lineales generalizados con estructura de residuos binomial.

Por otra parte, se calculó el Índice de Autoincompatibilidad (ISI) como número promedio de semillas producidas por autopolinización espontánea / número promedio de semillas producidas por polinización cruzada manual y el Índice de Autopolinización Automática (IAA) como número promedio de semillas producidas bajo autopolinización espontánea / número promedio de semillas producidas por geitonogamia manual (Ruiz Zapata y Kalin Arroyo 1978).

Comportamiento de los polinizadores

En la población de Tafí del Valle se observó la tasa de visitas (número de visitas · número de flores⁻¹ · h⁻¹) durante 52 períodos de media hora entre las 7:00 y las 21:00 h, repartidos a lo largo de cuatro días durante dos temporadas de floración (enero 2017 y enero 2018). Examinamos si hay diferencias horarias en el pico de mayor actividad de los polinizadores. Los polinizadores fueron identificados hasta especie cuando fue posible, o hasta orden en el caso contrario.

Se analizó si hay diferencias en el comportamiento de los dos principales gremios de polinizadores (aves e insectos) y las cuatro principales especies de polinizadores, comparando el número medio de visitas consecutivas dentro de la misma planta (racha de visitas). Para examinar si la longitud de las rachas difería entre estos grupos se aplicaron modelos lineales generalizados con estructura de errores Poisson.

Resultados

Antesis y fases sexuales

Las flores de *S. stachydifolia*, inician su apertura alrededor de las 3:00 h, aumentando progresivamente a medida que pasan las horas, observándose el número máximo de flores abiertas alrededor de las 6:00 h de ese mismo día (Fig. 2). Las flores tienen una duración máxima de siete días, pero la mayoría de ellas no vive más de cuatro días. La caída de las corolas de las flores ocurre de manera progresiva; al cuarto día sólo permanecen el 50% de ellas.

La apertura de las anteras ocurre a partir de la primera hora de vida de las flores, aproximadamente. Esto genera un patrón en el cual se observa siempre un número apenas menor de flores con anteras abiertas, respecto al número de flores abiertas totales. Al tercer día de vida, todas las flores ya tienen las anteras abiertas (Fig. 2).

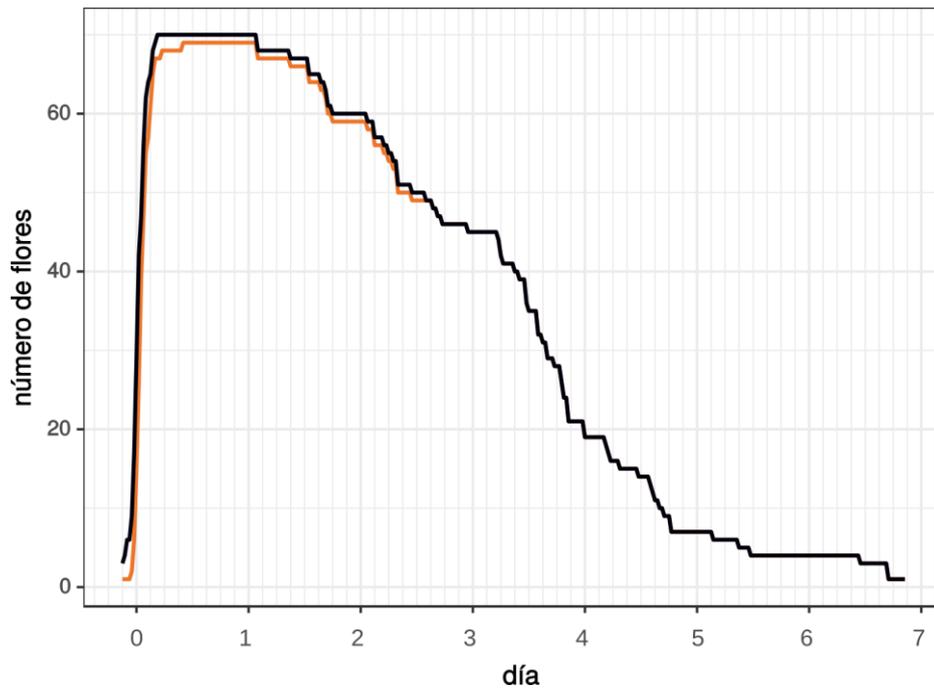


Figura 2. Fenología de *S. stachydifolia*. Apertura de flor (negro) y apertura de anteras (naranja) vs. Día. n = 70.

No se observaron flores abiertas con estigmas cerrados. Sin embargo se observaron diferencias en la receptividad, medida mediante la prueba del H₂O₂. Es así, que a las 3:00 h del primer día, el 57% de las flores no presentaron estigmas receptivos, mientras que el resto, si bien presentó receptividad, lo hizo en forma intermedia (Fig. 3). A las 9:00 h, todas las flores presentaron estigmas receptivos en algún grado, comenzando a decaer hacia el final del tercer día.

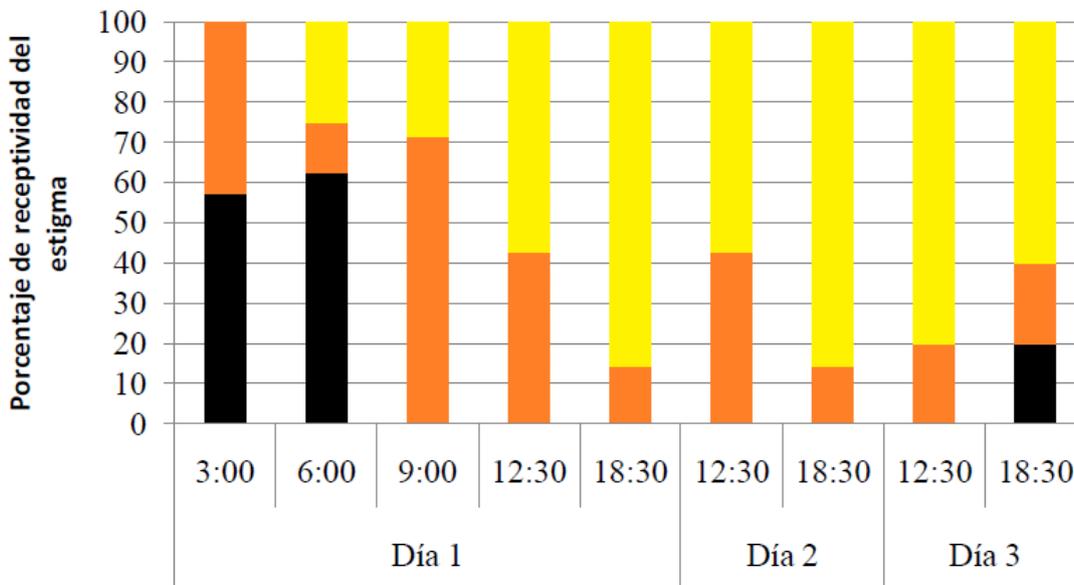


Figura 3. Receptividad del estigma a lo largo de la vida de las flores de *S. stachydifolia*. Receptivo: amarillo, Receptividad intermedia: naranja, No receptivo: negro.

Al agrupar los datos y observar las fases sexuales de todas las flores, encontramos cómo se distribuyen en la población durante un mismo día, obteniendo una “fotografía temporal” (Fig. 4), similar a la existente en la población natural, donde en un mismo momento pueden encontrarse flores que abrieron en días diferentes. El mayor número de flores abiertas, independientemente del día de su apertura, se presentó a las 7:00 h aproximadamente. Momento a partir del cual, comenzó a disminuir su número. Por otro lado, encontramos que el número de flores con estambres abiertos siempre fue menor al número de flores abiertas.

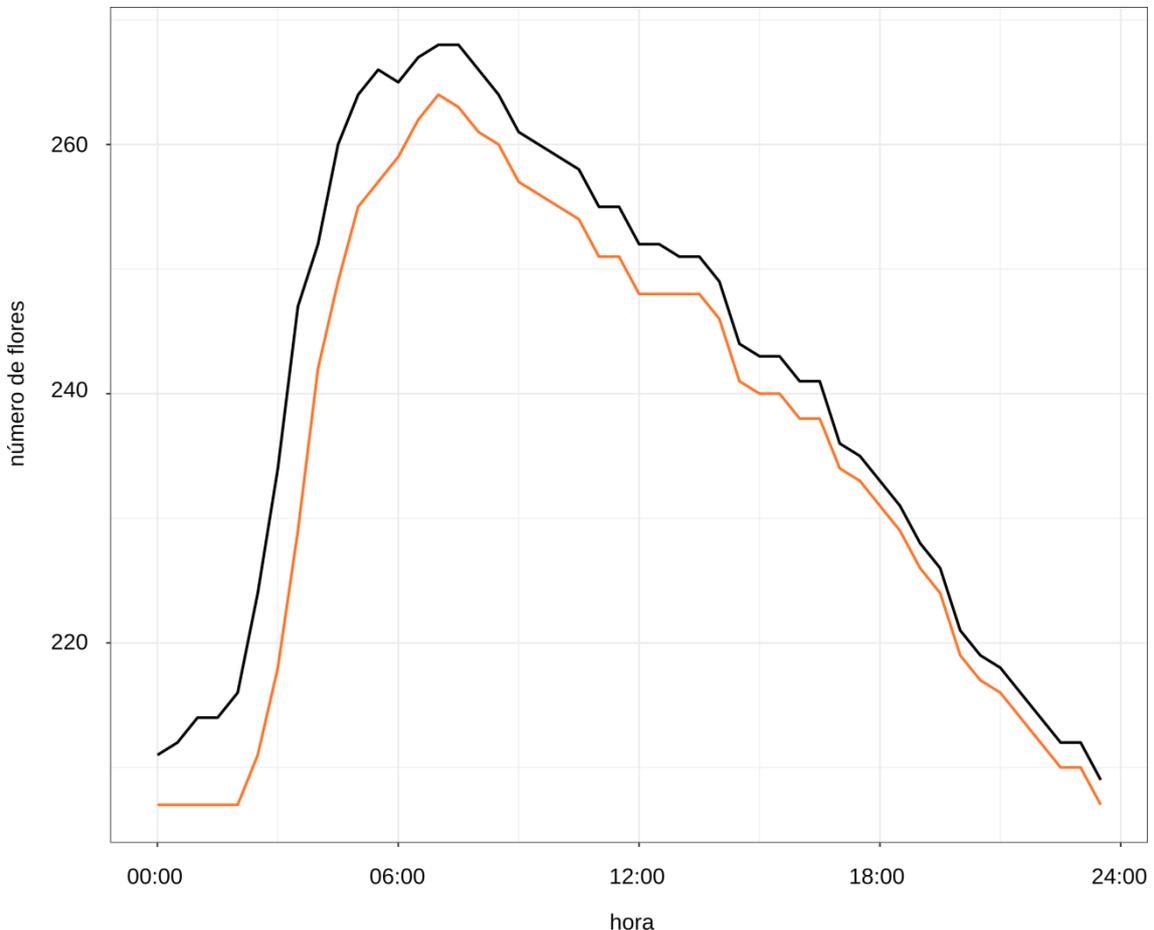


Figura 4. Número de flores abiertas (negro) y con anteras abiertas (naranja) en diferentes momentos del día.

Dinámica de producción de néctar

La dinámica de producción de néctar desde las 6:00 h hasta las 18:00 h del primer día de vida de la flor se muestra en la Fig. 5 a-c. Encontramos que, tanto en la concentración de néctar como en la cantidad de azúcar se observó una tendencia a la disminución hacia las 12:00 h, momento a partir del cual se apreció un leve aumento. Por otro lado, el volumen parece mantenerse constante a lo largo del día.

En cuanto a los valores máximos y mínimos de cada medición, la concentración de néctar presentó su mínimo a las 12:00 h con 0,423 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y el máximo a las 16:00 h con 0,712 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Respecto al volumen de néctar, su mínimo a las 8:00 h con 0,881 μl y su máximo a las 18:00 h con 2,387 μl . Finalmente la cantidad de azúcar presentó su valor mínimo a las 12:00 h con 0,44 μg y el máximo a las 15:00 h con 1,514 μg .

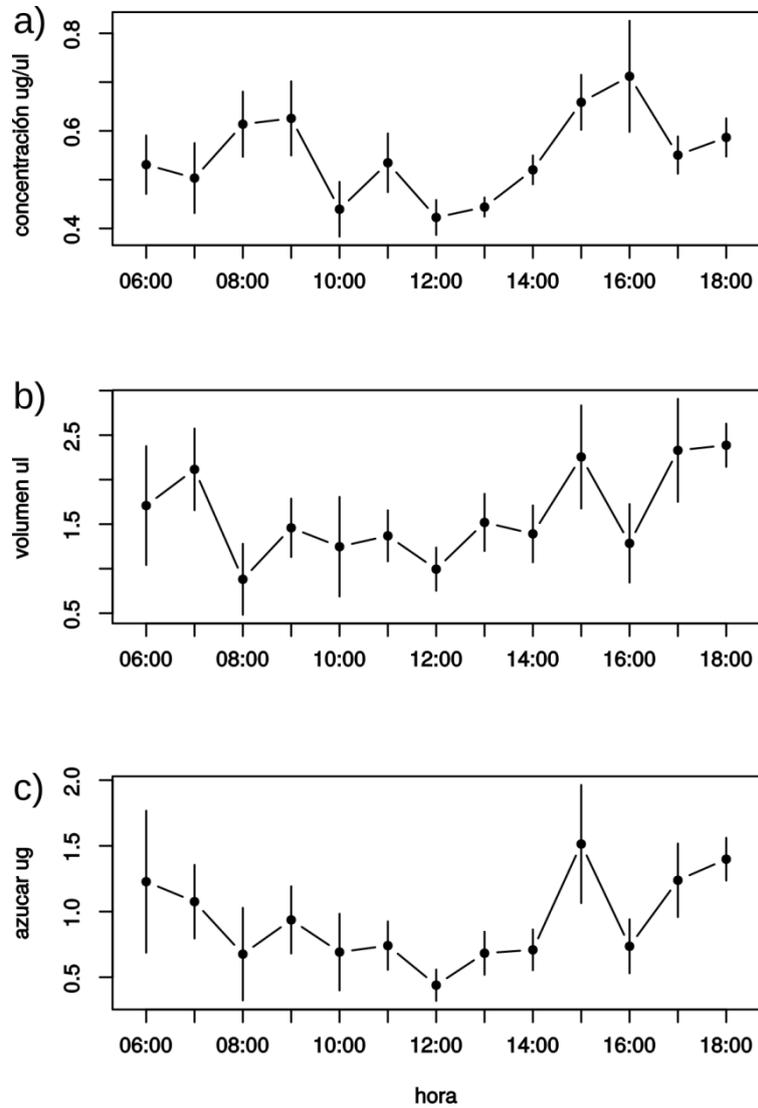


Figura 5. Valores de producción de néctar acumulada a cada hora durante el primer día de vida de las flores de *S. stachydifolia*. **a-** concentración de néctar ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$). **b-** volumen de néctar (μl). **c-** cantidad de azúcar (μg).

Sistema reproductivo

El tratamiento de cruzamiento manual entre flores de distintas plantas obtuvo el 100% de efectividad en la producción de frutos (Fig. 6). En menor proporción (70%) encontramos al tratamiento de geitonogamia. Por último, tanto los tratamientos de autopolinización espontánea como el de apomixis, obtuvieron porcentajes notablemente inferiores (< 30%).

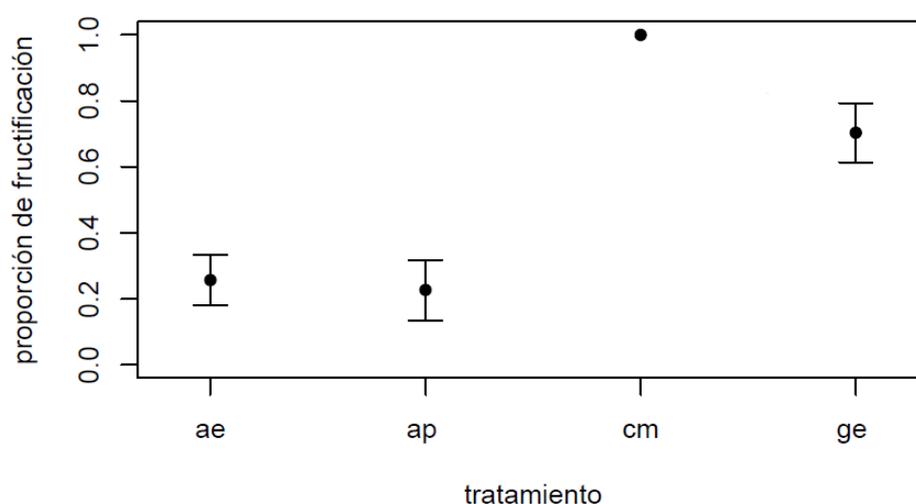


Figura 6. Proporción de flores que generaron fruto en cada uno de los tratamientos de polinización en *S. stachydifolia*: ae (autopolinización espontánea), ap (apomixis), cm (cruzada manual) y ge (geitonogamia).

Respecto a la producción de semillas, hallamos resultados similares a los encontrados en la proporción de fructificación (Fig. 7). Se encontraron diferencias significativas entre tratamientos en el número de óvulos que formaron semillas (Dev. = 101,78; g.l. = 3; $P < 0.0001$). El tratamiento que generó en promedio un mayor número de semillas fue el de cruzamiento manual, seguido por el de geitonogamia. La menor producción de semillas se encuentra en los tratamientos de autopolinización espontánea y apomixis.

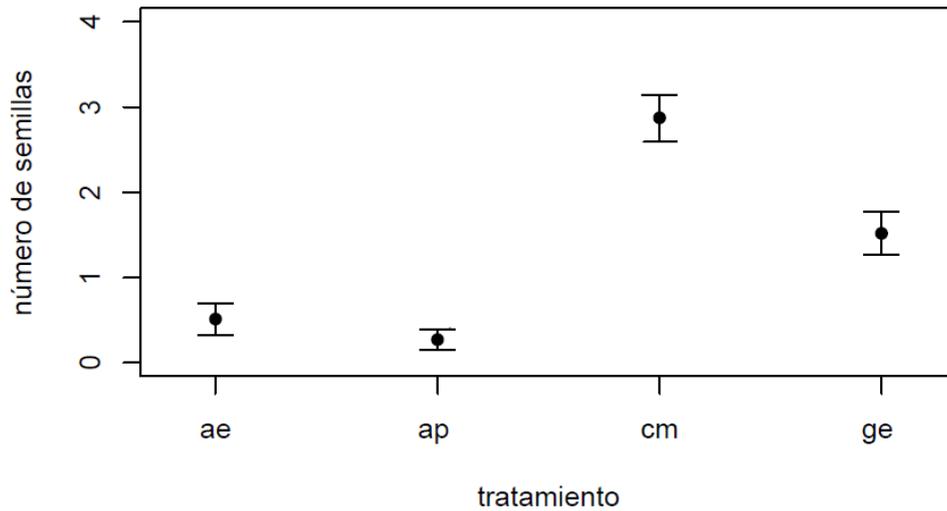


Figura 7. Número promedio de semillas generadas en cada tratamiento: ae (autopolinización espontánea), ap (apomixis), cm (cruzada manual) y ge (geitonogamia).

Por otra parte, encontramos que el índice de autoincompatibilidad (ISI) fue de 0.528, lo que indica que *S. stachydifolia* es parcialmente autocompatible (Ruiz Zapata y Kalin Arroyo 1978). Mientras que, el índice de autopolinización automática (IAA) fue de 0.339, lo cual indica que *S. stachydifolia* es parcialmente autógena (Ruiz Zapata y Kalin Arroyo 1978).

Horarios de visita de los diferentes gremios de visitantes florales.

Al analizar las visitas, separadas por gremios de visitantes florales en los diferentes horarios, pudimos observar que existe una diferenciación horaria en las visitas de ambos (Fig. 8).

En el momento de las observaciones, no pudieron obtenerse datos entre las 16:00 y 17:00 h debido a las lluvias persistentes en la zona, durante todos los días de muestreo.

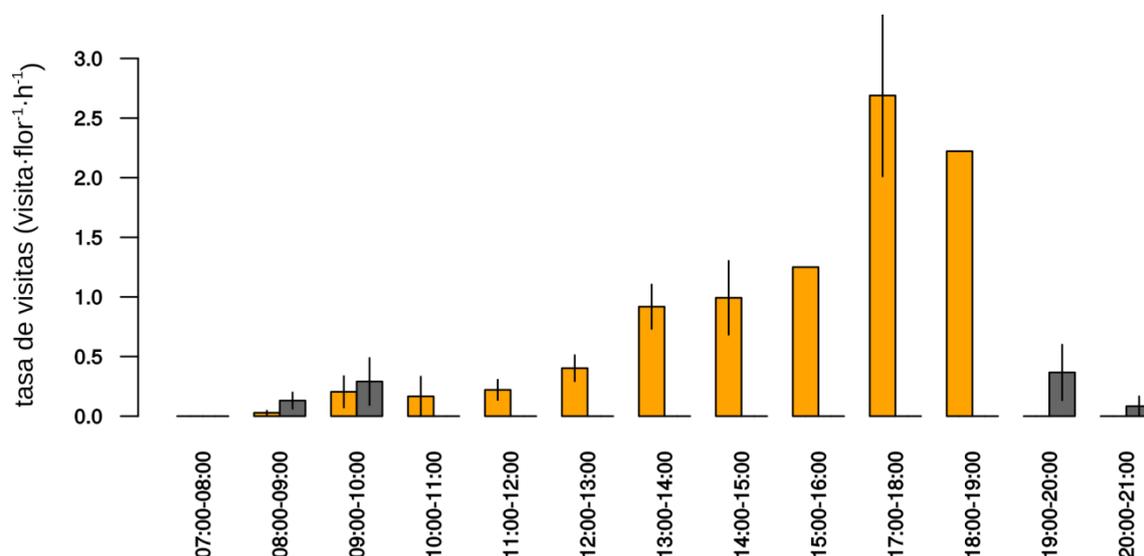


Figura 8. Tasa de visitas (visitas · flor⁻¹ · h⁻¹) de los diferentes gremios. En color gris el gremio de los picaflores, en color naranja el gremio de los insectos (principalmente himenópteros).

Los principales visitantes florales observados fueron himenópteros y picaflores. Ocasionalmente se observaron dípteros de la familia Nemestrinidae (Tabla 1).

Visitantes florales	visitas · flor ⁻¹ · h ⁻¹	Porcentaje de visitas	visitas por gremio
Hymenoptera:Apidae <i>Bombus opifex</i> (reina)	0,294	46%	85%
Hymenoptera:Apidae <i>Anthophora paranensis</i>	0,132	21%	
Hymenoptera:Apidae <i>Bombus opifex</i> (obrera)	0,078	12%	
Otros himenópteros	0,04	6%	
Trochiliformes:Trochilidae <i>Sappho sparganura</i>	0,074	12%	12%
Diptera:Nemestrinidae	0,019	3%	3%

Tabla 1. Tasa de visitas y porcentaje de representación de cada polinizador.

Comportamiento de cada gremio de visitantes florales en una planta

Encontramos que no hay diferencias entre el gremio de las abejas y el de picaflores, respecto a las rachas (número de flores visitadas consecutivamente) dentro de una planta. La mediana encontrada en el gremio de insectos fue de 6 flores y la del

gremio de los picaflores fue de 5 flores (Fig. 9), no existiendo diferencias significativas entre ambos grupos ($F_{1,360} = 0,021$; $P = 0,884$).

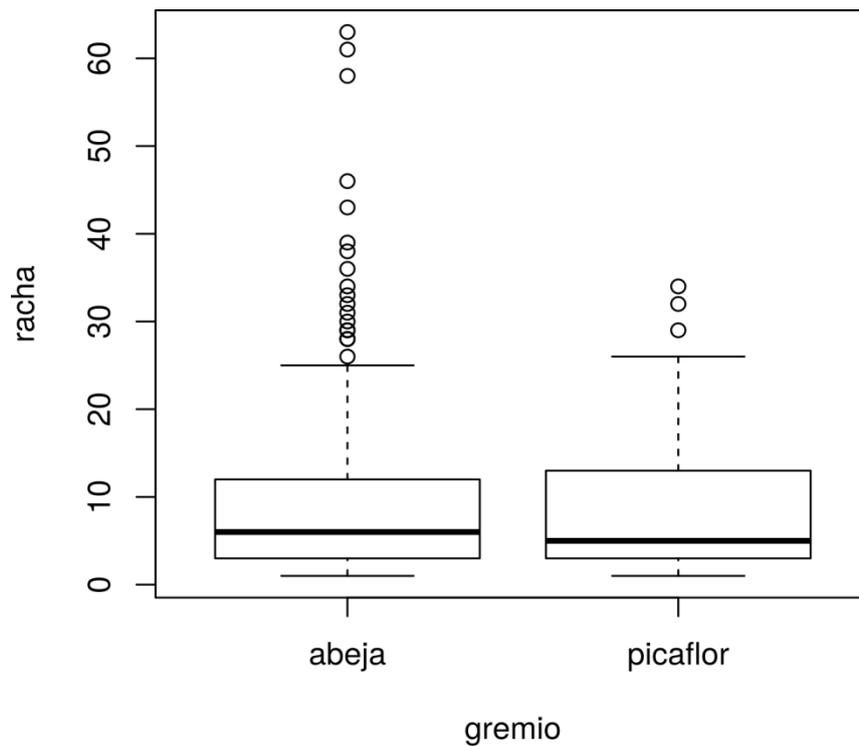


Figura 9. Número de flores visitadas secuencialmente por un mismo individuo en una misma planta (racha) en función del gremio de visitantes florales.

Al realizar este mismo análisis entre los cuatro visitantes florales más abundantes en *S. stachydifolia* encontramos diferencias significativas ($F_{3,321} = 10,918$; $P < 0,0001$) (Fig.10). Las medianas encontradas en los distintos polinizadores fueron las siguientes: *A. paranensis* con 5, *B. opifex* (Reina) con 9, *B. opifex* (Obrera) con 6 y *S. sparganura* con 5.

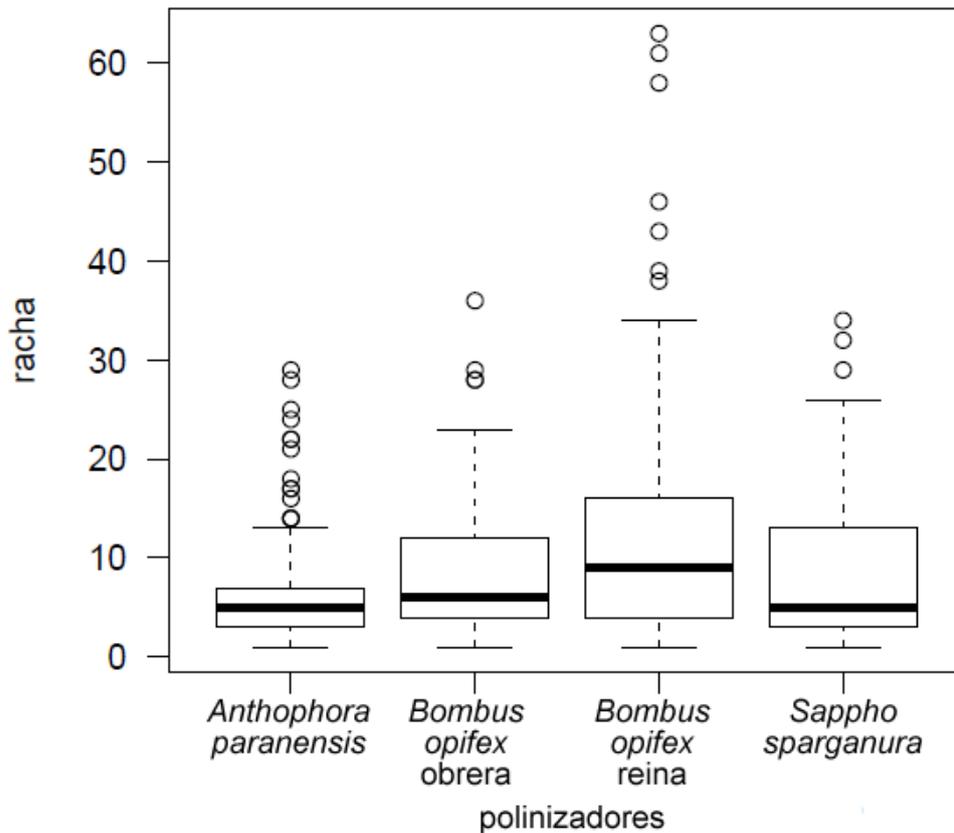


Figura 10. Número de flores visitadas secuencialmente en una planta por un mismo individuo (racha) en función de cada uno de los principales polinizadores.

Discusión y Conclusiones

Salvia stachydifolia es una especie mayormente dependiente de los polinizadores para su reproducción. Sin embargo, posee un abanico de estrategias reproductivas, desde la polinización cruzada hasta la autopolinización y reproducción asexual, por lo que puede asegurar su reproducción en diferentes escenarios. La población estudiada presenta un sistema de polinización mixta por insectos (mayormente abejas) y, minoritariamente, por picaflores. Encontramos que existen diferencias en el horario de visita de los polinizadores, ya que no observamos picaflores entre las 10:00 y las 19:00 h. Sin embargo, no existen diferencias importantes respecto a su comportamiento dentro de cada planta. Por lo tanto, los diferentes polinizadores de *S. stachydifolia* serían igualmente eficientes, aunque los picaflores podrían favorecer la polinización cruzada al visitar las flores en las primeras horas de la mañana, cuando parte de ellas se encuentran en fase masculina.

S. stachydifolia es parcialmente dicógama, al igual que otras especies estudiadas del mismo género (Cuevas García *et al.* 2013, Rosas Guerrero *et al.* 2017). Si bien existe una pequeña proporción de flores que no abren sus anteras al momento de apertura de la flor, en el pico de apertura de las flores (cercano a las 7:00 h) se encuentra un 37.5% de hermafroditas, de las cuales presentan receptividad intermedia en un 12,5% y alta en un 25%. El resto de las flores no son receptivas en ese horario, encontrándose en fase masculina. El porcentaje de flores en fase hermafrodita aumenta progresivamente hacia el mediodía. Respecto a la interacción de los polinizadores con las fases sexuales de la flor, encontramos que los picaflores son quienes visitan las plantas cuando éstas se encuentran en transición entre las fases masculina y hermafrodita por la mañana, y flores hermafroditas por la tarde. Los insectos, por otra parte, visitan principalmente flores en fase hermafrodita.

Si bien, confirmamos que la especie en estudio es mayormente dependiente de los polinizadores, encontramos que al igual que otras salvias, *S. stachydifolia* es parcialmente autocompatible (Cuevas *et al.* 2018; Cuevas-García *et al.* 2013; Rosas-Guerrero *et al.* 2017; Izquierdo 2014), ya que el tratamiento de geitonogamia arrojó valores inferiores al tratamiento de polinización cruzada manual. La polinización cruzada manual resultó ser el tratamiento más eficiente en cuanto a la proporción de fructificación y número de semillas por flor. Podríamos pensar que los picaflores serían ligeramente más eficientes ya que visitan flores en fase masculina, promoviendo así la polinización cruzada por la mañana, aunque sus visitas se dan en menor proporción comparativamente con abejas. Estudios realizados en otras especies de polinización mixta, han determinado que picaflores son más eficientes que las abejas en la transferencia de polen ya que no presentan comportamientos de aseo o recolección de polen que llevan a la pérdida sustancial de polen (Castellanos *et al.* 2003). Por otra parte, los picaflores no se diferenciaron de los insectos respecto al número de visitas consecutivas dentro de una misma planta, ambos gremios promoverían de igual forma la geitonogamia.

En cuanto a la dinámica del néctar, si bien la tendencia indica una mayor disponibilidad de recompensa cuando predominan las visitas de insectos por la tarde. Ambos gremios de polinizadores acceden al néctar durante sus visitas a las flores. Sin embargo, la alta concentración y bajo volumen del néctar son característicos de plantas polinizadas por abejas (Willmer 2011), si bien éstas características no excluyen a los picaflores. Estudios complementarios como los de caracterización de la flora del sitio de estudio podrían ayudarnos a determinar si los picaflores están siendo sensibles a una baja disponibilidad de flores ornitófilas, por lo cual responden de manera oportunista a una presencia masiva de flores melitófilas, a las cuales pueden acceder manera relativamente fácil (Espino-Espino *et al.* 2014). Según Castellanos *et al.* (2003) la polinización por aves suele ser ocasional en *Penstemon*, antes de que las abejas comiencen a visitar, temprano en la mañana o a la madrugada, pero a su vez asocian las

visitas particularmente a altas densidades de flores melitófilas o bajas densidades de fuentes de néctar de importancia.

Si bien indicios como el patrón de la producción de néctar, la superposición en las fases sexuales o el tipo de sistema reproductivo que presenta la especie, pueden indicar cambios en el síndrome de polinización de la especie, no contamos con datos determinantes que avalen ésta hipótesis. Los polinizadores de *S. stachydifolia* parecen ser igualmente eficientes, aunque los picaflores podrían favorecer la polinización cruzada. Ese escenario permitiría que un aumento en la frecuencia de visitas de los picaflores promueva un cambio en el sistema de polinización (Thomson y Wilson 2008). Estudios en otras poblaciones donde las condiciones ambientales sean lo suficientemente diferentes, favoreciendo la presencia de picaflores, podría ayudarnos a dilucidar la dinámica de estos cambios. Comprender si la diferenciación marcada en los horarios de visita de los picaflores está relacionada con su preferencia por horarios más fríos y condiciones nubosas, con una mayor capacidad de colonización en un rango geográfico y climático más amplio (Serrano-Serrano *et al.* 2017) y/o con evitar la competencia con los insectos, es un paso de gran importancia para determinar cuál de los gremios resulta ser más eficiente en la polinización de *S. stachydifolia*.

Referencias Bibliográficas

- Abrahamczyk, S. & Renner, S.S. (2015). The temporal build-up of hummingbird/plant mutualisms in North America and temperate South America. *BMC evolutionary biology*, 15(1), 104.
- Benitez-Vieyra S., Fornoni J., Pérez-Alquicira J., Boege K. y Domínguez C.A. (2014). The evolution of signal–reward correlations in bee-and hummingbird-pollinated species of *Salvia*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 281:20132934.
- Bradshaw H.D., Schemske D.W. (2003). Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. *Nature* 426:176–78
- Castellanos, M.C., Wilson, P., & Thomson, J.D. (2003). Pollen transfer by hummingbirds and bumblebees, and the divergence of pollination modes in *Penstemon*. *Evolution*, 57(12), 2742-2752.)
- Castellanos, M.C., Wilson, P. & Thomson, J.D. (2004). “Anti-bee” and “pro-bird” changes during the evolution of hummingbird pollination in *Penstemon* flowers. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 876–885.
- Claßen-Bockhoff, R., Speck, T., Tweraser, E., Wester, P., Thimm, S., & Reith, M. (2004). The staminal lever mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae): a key innovation for adaptive radiation? *Organisms Diversity & Evolution*, 4(3), 189–205. doi:doi: DOI: 10.1016/j.ode.2004.01.004

- Cuevas, E., Espino, J., y Marques, I. (2018). Reproductive isolation between *Salvia elegans* and *S. fulgens*, two hummingbird-pollinated sympatric sages. *Plant Biology*, 20(6), 1075–1082. doi:10.1111/plb.12874
- Cuevas-García, E., Alcalá-Guerra, A., Baños-Bravo, Y. E., y Flores-Palacios, A. (2013). Biología reproductiva y robo de néctar en *Salvia gesneriflora* (Lamiaceae) y sus consecuencias en el éxito reproductivo. *Botanical Sciences*, 91(3), 357–362.
- Cruden R.W. (1972). Pollinators in high-elevation ecosystems: relative effectiveness of bees and birds. *Science* 176:1439–1440.
- Dafni A, Kevan P.G, y Husband B.C. (2005). *Practical pollination biology*. Enviroquest Ltd. Cambridge, Canada.
- Dafni, A., Pacini, E. y Nepi, M. (2005). Pollen and stigma biology. In A. Dafni, P. G. Kevan, & B. C. Husband (Eds.), *Pollination ecology: a practical approach*. (pp. 83-146). Ontario, Canada.: Enviroquest Ltd.
- Espino-Espino, J., Rosas, F., & Cuevas-García, E. (2014). Variación temporal de visitantes florales en dos especies simpátricas de *Salvia* con floración simultánea y síndrome de polinización contrastante. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85(1), 161-166.
- Fenster C.B., Armbruster WS, Wilson P., Dudash M.R. y Thomson J.D. (2004). Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 35:375-403.
- Fragoso-Martínez, I., Martínez-Gordillo, M., Salazar, G. A., Sazatornil, F., Jenks, A. A., Peña, M. del R. G., Barrera Aveleida, G., Benitez-Vieyra, S., Magallón, S., Cornejo Tenorio, G., Mendoza, C. G. (2018). Phylogeny of the Neotropical sages (*Salvia* subg. *Calosphace*; Lamiaceae) and insights into pollinator and area shifts. *Plant Systematics and Evolution*, 304(1), 43–55. doi:10.1007/s00606-017-1445-4
- Galetto, L., y Bernardello, G. (2005). Nectar. In A. Dafni, P. G. Kevan, & B. C. Husband (Eds.), *Pollination ecology: a practical approach*. (pp. 156–212). Ontario, Canada.: Enviroquest Ltd.
- Grant, K. A., & Grant, V. (1968). *Hummingbirds and their flowers*. Columbia University Press.
- Izquierdo, J. 2014 Rol adaptativo de la variabilidad intraindividual en la producción de néctar y de la honestidad de las señales florales en *Salvia cuspidata ssp. gilliesii*. Tesina de Licenciatura. Escuela de Biología, F.C.E.F.yN., Universidad Nacional de Córdoba.
- Muchhala, N. (2007) Adaptive trade-off in flower morphology mediates specialization for flowers pollinated by bats and hummingbirds. *Am. Nat.* 169: 494–504. doi:10.1086/512047
- Orfila E.N., Farina E.L. y Novara L. (1996). Lamiaceae. *Aportes Botánicos de Salta-Serie Flora*, 4(2):1-77.
- Rosas-Guerrero, V., Aguilar, R., Martín-Rodríguez, S., Ashworth, L., Lopezaraiza-Mikel, M., Bastida, J.M., et al. (2014). A quantitative review of pollination

- syndromes: do floral traits predict effective pollinators? *Ecology Letters* 17: 388–400.
- Rosas-Guerrero, V., Hernández, D., & Cuevas, E. (2017). Influence of pollen limitation and inbreeding depression in the maintenance of incomplete dichogamy in *Salvia elegans*. *Ecology and Evolution*, 7(12), 4129–4134. doi:10.1002/ece3.2827
- Ruiz Zapata T. y Kalin Arroyo M.T. (1978). Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica* 10:221-230.
- Sazatornil F., Barrionuevo C.N. y Benitez-Vieyra S.(2017). Selección fenotípica sobre la forma floral en *Salvia stachydifolia*: camino a la divergencia adaptativa mediada por polinizadores. IV Encuentro de Morfometría, La Rioja, Argentina.
- Sazatornil F. y Benitez-Vieyra S.(2015). Duelo de gremios: Preferencia de flores por abejas y colibríes en *Salvia stachydifolia* (Lamiaceae). Primera Reunión Argentina de Biología Evolutiva. Valle Hermoso, Córdoba, Argentina.
- Stebbins, G. L. (1970). Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1(1), 307-326.
- Strelin MM, Sazatornil F, Benitez-Vieyra S y Ordano M. (2017). Bee, hummingbird or mixed pollinated *Salvia* species mirror pathways to pollination optimization: a morphometric analysis based on the Pareto front concept. *Botany* 95(2):139-146.
- Thomson JD y Wilson P. (2008). Explaining evolutionary shifts between bee and hummingbird pollination: convergence, divergence, and directionality. *International Journal of Plant Sciences*, 169(1): 23-38.
- Van der Pijl, L. (1961). Ecological aspects of flower evolution. II. Zoophilous flower classes. *Evolution*, 15(1), 44-59.
- Wester P y Claßen-Bockhoff R. (2011). Pollination syndromes of New World *Salvia* species with special reference to bird pollination. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 98(1):101-155.
- Willmer, P. (2011). *Pollination and floral ecology*. Princeton University Press.
- Wood, J. R. I. (2007). The *Salvias* (Lamiaceae) of Bolivia. *Kew Bulletin*, 177-221.