



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

VARIACIONES EN LA ESTRUCTURA DE LOS  
NECTARIOS FLORALES DE SALVIAS (LAMIACEAE)  
SECCIÓN *CALOSPHERE*, EN RELACIÓN CON SUS  
DIFERENTES POLINIZADORES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ANA MARÍA FLORES GUTIÉRREZ



**DIRECTOR DE TESIS:**

DRA. GUADALUPE JUDITH MÁRQUEZ GUZMÁN

(2014)



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Play, art and science are the spheres of human activity  
where action and aim are not as a rule determined by  
the aims imposed by the necessities of life.*

*...the aims are chosen freely by the artist or student  
himself, and are superfluous; it would cause no  
immediate harm if these aims were not pursued.*

*If this view is accepted we are compelled to see the chief  
and lofty aim of science today as in every other age, in  
the fact that it enhances the general joy of living.*

*- Erwin Schrödinger, Science Theory and Man<sup>1</sup>.*

---

<sup>1</sup> El juego, el arte y la ciencia son esferas de la actividad humana donde la acción y el objetivo no son, generalmente, determinados por los fines impuestos por las necesidades de la vida.  
...las metas son escogidas libremente por el artista o estudiante, y son superfluas; no perseguirlas no causaría ningún daño inmediato.

Si aceptamos esta visión, nos vemos obligados a ver al sublime objetivo de la ciencia hoy en día, de la forma en que se ha visto en siglos anteriores, en el hecho de que acrecienta la alegría general de vivir.

-Erwin Schrödinger, Science Theory and Man

*Para mamá y papá, que me acercaron a la naturaleza*

## AGRADECIMIENTOS

Esta tesis es producto del trabajo conjunto entre dos tutores excepcionales: Juan Fornoni Agnelli y Judith Márquez Guzmán. Me siento honrada de haber estado con dos personas tan admirables y tan distintas. Les agradezco haberme dado la oportunidad de aprender de ellos, de abrir el espacio para plantear un proyecto, darle forma y resolverlo.

A Juan por introducirme de forma casi lúdica, pero compleja, al mundo de las interacciones. Gracias por dejarme participar en diversos proyectos antes de definir una ruta propia y por guiarme una vez que esto sucedió.

A Judith por hacer de este acercamiento a la ciencia uno tan ameno y por trascender la relación alumno-profesor para compartir su experiencia. Gracias por la confianza, por escucharme y aconsejarme, por motivarme a tomar riesgos y por acompañarme a lo largo de este proceso. No hay forma de expresar mi enorme gratitud y lo agradable que fue compartir esta experiencia.

A César Domínguez porque en el momento en que dudé si me gustaba la biología logró transmitirme, en una charla corta, lo fascinante que es preguntarse el mundo y resolver esas dudas con ecología; cuatro años más tarde, en Chamela, no dejó de sorprenderme de cómo esa plática realmente marcó el resto de mi carrera. Gracias por presentarme el Laboratorio de Interacción Planta-Animal (LIPA).

A mis compañeros, pero sobre todo increíbles amigos, del LIPA, en especial a Sergio, Paula, Nora y Fer. Es un placer convivir con gente que disfruta lo que hace y lo comparte de forma tan ligera. Gracias por los momentos dentro y fuera del laboratorio. A Carlitos por estar aún en la distancia. A Blanca, Diego, Luz, Xóchitl y Sofi, por la calidez y el buen ánimo. A los vecinos de abajo, de los que aprendí mucho y a los cuales quiero de igual forma: a Erika por siempre tener una sonrisa y a Memo, por compartir la ñoñez y un sinfín de aventuras. A todos ellos mi cariño y enorme admiración. Ojalá nunca se pierda esa pasión que los distingue y se contagia.

A José Rubén Pérez Ishiwara, por el apoyo en la logística y colecta del material, por el ánimo y las buenas y divertidas pláticas.

A Yolanda Ornelas Orozco, encargada del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, por la toma de fotografías, la ayuda en la interpretación de las imágenes, el buen humor y las altas dosis de café después de la comida.

A Mónica Karina Pérez Pacheco y a José Gonzalo Ricardo Wong, por el apoyo en las técnicas de laboratorio y microscopía, por enseñarme con paciencia lo necesario para obtener los resultados aquí presentes.

Al Laboratorio de Desarrollo en Plantas. A mis compañeros, a Nadia, que siempre me cuestionó y ayudó en el laboratorio. A Mague, por su entusiasmo y a Zoni también.

A los sinodales: Juan Nuñez Farfán, Martha Martínez Gordillo y Zenón Cano Santana, por sus comentarios.

A Martha Martínez, por la ayuda en la identificación de las plantas y por sus valiosos comentarios acerca del complejo y maravilloso género *Salvia*.

A Zenón Cano, no sólo por haber sido un profesor maravilloso, dedicado y exigente; también por haber revisado a detalle esta tesis y haberla mejorado con sus valiosos comentarios y correcciones. Por los consejos, las pláticas y palabras de aliento. Mi profunda admiración, cariño y respeto. Mi corazón ñoño está contento.

A Karina Boege, por llevarme a Chamela y dejarme cumplir uno de mis sueños en biología y en la vida, incluso antes de titularme: vivir en medio de la naturaleza haciendo ciencia.

A la Estación de Biología en Chamela, por las porras, los nuevos amigos y el internet que me deja terminar esta tesis desde acá.

A mis amigos. En especial a los madrileños con los que he compartido cada etapa, y a los de la Fac, con los que compartí esta. A las personas que me inspiran, que comparten y que me cuidan. La vida sería triste sin ustedes.

A mi mamá, porque la tesis no habría terminado sin ella. Gracias por los trámites mientras no estaba, por ganarte a las de ventanillas, por leer con gusto mi tesis y por acompañarme, como siempre, ahora en esta aventura. No sólo somos madre e hija, somos un gran equipo. Y a mi papá, que nos echa porras y nos quiere.

A mi familia, y a las mujeres de mi familia, que son un verdadero ejemplo a seguir, un gran apoyo y una compañía incondicional. A mi abuela, que nos enseñó el camino.

A mis padres, que hacen ver la felicidad como algo sencillo y con el ejemplo me han enseñado a buscar un camino que me haga feliz, porque rompen esquemas a cada rato, porque se reinventan, porque son valientes. Los amo profundamente, gracias por estar conmigo y apoyarme en cada decisión, este es un logro compartido. *Llevo su corazón conmigo (lo llevo en mi corazón)*.

## HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno  
Flores  
Gutiérrez  
Ana María  
044 55 43 61 43 30  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
306185711
2. Datos del tutor  
Dra.  
Guadalupe Judith  
Márquez  
Guzmán
3. Datos del sinodal 1.  
Dr.  
Juan Servando  
Núñez  
Farfán
4. Datos del sinodal 2.  
Dr.  
Juan  
Fornoni  
Agnelli
5. Datos del sinodal 3.  
Dra.  
Guadalupe Judith  
Márquez  
Guzmán
6. Datos del sinodal 4.  
Dra.  
Martha Juana  
Martínez  
Gordillo
7. Datos del sinodal 5.  
Dr.  
Zenón  
Cano  
Santana
8. Datos del trabajo escrito  
Variaciones en la estructura de nectarios florales de salvias (sección *Calosphace*), con diferentes polinizadores  
51 pp.  
2014

## CONTENIDO

Resumen.....	9
Introducción .....	11
Nectarios y néctar .....	11
Anatomía del nectario .....	12
Composición y función del néctar .....	13
Mecanismos de secreción del néctar .....	13
Diversidad de nectarios .....	14
El género <i>Salvia</i> .....	17
El nectario floral en <i>Salvia</i> .....	18
Mecanismo para la polinización .....	19
Síndromes de polinización.....	20
Justificación .....	22
Objetivos e hipótesis .....	23
Método.....	24
Colecta y almacenamiento .....	24
Procesamiento de muestras para la observación en el microscopio electrónico de barrido.....	25
Procesamiento de muestras para realizar cortes semifinos y tinciones histológicas.....	25
Pruebas histoquímicas.....	26
Resultados .....	27
Localización y morfología general .....	27
Anatomía del nectario floral.....	28
Desarrollo del nectario floral.....	31
Estructuras de secreción .....	33
Comparación entre de las diferentes especies.....	35
Discusión .....	39



Desarrollo del nectario floral.....	40
Comparación entre los nectarios de las diferentes especies .....	41
Relación entre los nectarios y el tipo de polinizador.....	42
Conclusiones.....	44
Perspectivas de estudio.....	45
Literatura citada .....	46

Flores-Gutiérrez, A. M. 2014. Variaciones en la estructura de los nectarios florales de salvias (Lamiaceae) sección *Calosphace*, en relación con sus diferentes polinizadores. Tesis Profesional, Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 51 pp. México, Distrito Federal.

## RESUMEN

A partir del estudio de la diversidad de nectarios florales se ha llegado a la conclusión de que éstos evolucionaron de forma independiente en distintos linajes de plantas. La posición y estructuras de liberación del néctar varían entre grupos cercanos filogenéticamente y se ha propuesto que guardan relación con el contexto ecológico; sin embargo, pocos estudios han puesto a prueba esta hipótesis. Previamente se han comparado nectarios entre órdenes y familias de plantas, pero son pocos los estudios en los que se describen los nectarios de especies de un mismo género y que relacionan la variación con el contexto ecológico de las especies. Por esta razón, el presente trabajo se enfoca en describir la variación en los nectarios entre especies de salvias que presentan diferentes polinizadores y analizar si existe alguna relación entre el tipo de polinizador y los nectarios.

Se seleccionaron diez especies de *Salvia* que forman parte de un grupo monofilético del subgénero *Calosphace* y que presentan diferentes polinizadores, se describió el desarrollo del nectario floral y se compararon los nectarios entre especies para probar si existía variación morfológica a este nivel taxonómico. Los nectarios estudiados presentan una morfología general semejante que consta de un disco nectarial y de una proyección del disco, lo que concuerda con estudios previos. Sin embargo, las células por las que se libera el néctar, que son tricomas glandulares y células estomáticas modificadas para la liberación de azúcares, varían entre especies. También se observó que el disco nectarial y los tricomas glandulares surgen en etapas tempranas del desarrollo; mientras que la proyección del disco y los estomas surgen en etapas cercanas a la antesis. Este resultado sugiere que tanto la proyección del disco, como los estomas, son estructuras evolutivamente derivadas en este grupo.

Al comparar las características entre diferentes clados se encontró que la variación, en algunos casos, no refleja las relaciones de parentesco. Lo anterior sugiere que los nectarios tienen caracteres que se pueden ver modificados por el contexto ecológico, sin embargo se requieren más estudios para robustecer esta conclusión.

Existen variaciones en la presencia/ausencia de tricomas y estomas, así como en la localización de estas estructuras en las diferentes especies. En el caso de las especies polinizadas por abejas, la tendencia observada apuntó a la presencia de tricomas y ausencia de estomas, mientras que en las polinizadas por colibríes la relación fue inversa, presencia de estomas y ausencia de tricomas. Lo anterior coincide con que tanto los estomas como el síndrome ornitófilo son derivados, de este modo parecería que los tricomas se perdieron durante la transición a la ornitofilia y se ganaron estomas, lo que se refuerza con el caso de las especies ambófilas, las cuales mantuvieron los tricomas y ganaron estomas.

## INTRODUCCIÓN

La polinización de plantas por animales es una interacción mutualista en la que las plantas logran reproducirse por medio de los animales cuando éstos buscan “recompensas” como néctar, aceites y polen en las flores (Proctor *et al.*, 1996).

El néctar es la principal recompensa ya que además de agua posee carbohidratos, proteínas y lípidos que forman parte de la dieta de los polinizadores (Proctor *et al.*, 1996; Herrera, 2002). La interacción propicia que los animales fecunden las plantas que ofrecen recompensas que se ajustan a sus requerimientos energéticos; los colibríes, por ejemplo, tienen preferencias por néctares poco concentrados y voluminosos, mientras que abejas y mariposas prefieren néctares concentrados y ricos en nutrientes (Cruden *et al.*, 1983).

Los nectarios, estructuras glandulares encargadas de la producción y liberación del néctar, llevan a cabo su función de forma tan diversa en los diferentes linajes de plantas, que lo único que los define es la condición de secretar néctar (Fahn, 1979; Bernardello *et al.*, 1991; Baum *et al.*, 2001). Dicha diversidad ha servido para estudios taxonómicos, pero pocas veces se ha estudiado en el contexto ecológico en el que se encuentran, el cual se presume puede estar relacionado con su evolución (Baker y Baker, 1983; Feinsinger, 1978; Proctor *et al.*, 1996).

## NECTARIOS Y NÉCTAR

Los nectarios son los tejidos epidérmicos especializados de una planta, que secretan una solución de azúcar, conocida como néctar (Schmid, 1988; Nicolson *et al.*, 2007). Estos tejidos pueden presentarse en diferentes partes de la planta, ya sea en órganos reproductivos o vegetativos y no necesariamente presentan la misma estructura y organización, aunque su característica común es que secretan néctar como producto de la fotosíntesis que se lleva a cabo en la planta (Nicolson *et al.*, 2007). Bonnier (1879) identificó dos tipos de nectarios dependiendo de su posición: los florales (NF) y los extraflorales (NEF). Los nectarios, en general, cumplen la función de “recompensar” a los animales que sirven como vectores de transferencia de polen y como defensores para la planta (Nicolson *et al.*, 2007). Desde el punto de vista de las interacciones ecológicas, Delpino (1875) clasificó los nectarios con un criterio funcional en (1) nupciales y (2) extranupciales, reconociendo a los primeros como los involucrados en la polinización, y a los segundos como los que participan en otras funciones, como la atracción de

depredadores o parasitoides (disminuyendo los niveles de daño por herbívoros) (Bentley y Elias, 1983; Narbona y Dirzo, 2010; Villamil *et al.*, 2013).

---

#### ANATOMÍA DEL NECTARIO

*Nectarium* es un término acuñado por Linneo (1735), el cual hace referencia a todos los tejidos que producen néctar dentro de una flor, esto debido a que las estructuras secretoras a veces pueden verse como órganos bien definidos. Sin embargo, muchas otras veces se observan de forma dispersa; un nectario es cualquier estructura que secreta néctar, mientras que el *nectarium* es la unión de todas éstas (Davies *et al.*, 1998).

Los nectarios están constituidos por tres tipos de tejidos, descritos en detalle por Nepi (2007): (1) la epidermis nectarial; (2) el parénquima; y (3) el parénquima subnectarial. Las diferencias entre estos tejidos consisten en la compactación y el tamaño de las células. La epidermis se distingue por tener células más pequeñas que el parénquima, éstas suelen ser poliédricas y con orientación anticlinal. Además, los plástidos de esta zona no acumulan almidón, excepto cuando hay una alta producción de néctar. Cuando la secreción no se da por estomas, la epidermis puede estar involucrada en la secreción del néctar por medio de tricomas o células especializadas. La diferencia entre el parénquima nectarífero y el parénquima subnectarial, es que las células son más grandes en éste último y que el parénquima subnectarial<sup>2</sup>, a diferencia de la epidermis y el parénquima nectarífero, no está directamente involucrado en la producción y almacenamiento de néctar.

Por otro lado, Fahn (1979) observó que las células asociadas a la secreción de néctar presentan una alta cantidad de ribosomas en el citoplasma, de modo que se distinguen por un núcleo de gran tamaño con poco citoplasma a su alrededor.

Los nectarios pueden ser vistos desde un punto de vista fisiológico como las estructuras que permiten liberar presiones hidrostáticas del floema (hipótesis del filtrado del floema; Lorch, 1978; De la Barrera y Nobel, 2004) o, desde una perspectiva de desarrollo, como estructuras que secretan azúcar cuando hay una alta acumulación de ésta debido al rápido crecimiento y a

---

<sup>2</sup> Se usa el término nectarial cuando se habla de un tejido relacionado con la estructura del nectario; cuando se habla de células directamente relacionadas con la producción y secreción de néctar se usa el término nectarífero.

las altas tasas de transpiración de las estructuras florales (hipótesis de la excreción de azúcar; Pacini y Nicolson, 2007).

---

#### COMPOSICIÓN Y FUNCIÓN DEL NÉCTAR

A pesar de ser uno de los elementos principales en la interacción entre plantas y polinizadores, el néctar ha sido poco estudiado desde el punto de vista de sus componentes y de la forma de producción de estos (Schmid, 1988; Nicolson, 1995; Heil, 2011). En el néctar, además de azúcares y aminoácidos, se pueden encontrar metabolitos secundarios (como alcaloides y fenoles), antioxidantes, compuestos volátiles (como la benzil-cetona y la nicotina), y nectarinas (Baker y Baker 1975; Baker y Baker, 1986; Freeman *et al.*, 1991; Adler, 2000).

Los metabolitos secundarios se relacionan con la protección contra robadores de néctar, los compuestos volátiles modifican el olor del néctar y se han relacionado con la atracción de polinizadores; mientras que las nectarinas parecen reducir las infecciones contra microbios (González-Teuber y Heil, 2009).

Lo anterior muestra que existe variación en la composición del néctar, y que dicha composición está asociada a distintos tipos de interacción (Baker y Baker, 1983), lo que significa que hay componentes de atracción y de repulsión para cada grupo funcional. Las sustancias que atraen a los polinizadores son la benzil-cetona y los azúcares y las que atraen defensores son aminoácidos, como la prolina; en contraste, el catapol (un glucósido) y las nectarinas funcionan como repelentes de robadores de néctar y levaduras (Heil, 2011). Un caso curioso lo constituye la gelsemina, la cual repele tanto a robadores de néctar como a polinizadores (Irwin y Adler, 2008).

---

#### MECANISMOS DE SECRECIÓN DEL NÉCTAR

La secreción de néctar tanto en NF como en NEF puede deberse a factores endógenos o exógenos. Los factores endógenos son los que se asocian, por ejemplo, a adaptaciones de la planta como la secreción de néctar en horarios diurnos (Corbert y Delfosse, 1984; Heil *et al.*, 2000). Los factores exógenos, por su parte, son aquéllos que dependen del contexto, y se han identificado gracias a la actividad de los herbívoros, ya que su presencia puede desencadenar una respuesta de la planta en la que se libera jasmonato o ácido jasmónico (AJ), una

fitohormona que, entre otras funciones, promueve la secreción de néctar en los NEF (Kram *et al.*, 2009). Sin embargo, el AJ no sólo tiene relación con la respuesta inducida de la defensa en plantas (Radhika *et al.*, 2010), sino también con la atracción, ya que en NF también se ha encontrado actividad de AJ (Heil, 2001). De este modo, el AJ se identifica como una fitohormona responsable de la liberación del néctar.

Existen estudios recientes acerca de los mecanismos celulares asociados a la secreción del néctar, sin embargo, aún se desconoce la base genética; asimismo, las enzimas o los canales iónicos que podrían estar asociados a la secreción no se han localizado (Heil, 2011).

Por su parte, Fahn (1988) ha reportado que la vascularización en los nectarios no llega directamente a la epidermis nectarial, sino que en un gran número de especies de plantas, la vascularización termina en el parénquima nectarífero. Estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Kram y Carter, 2009) muestran que es muy probable que el prenέctar, que se forma en el parénquima nectarífero, se transporte a través de vesículas vía simplística por medio de plasmodesmo entre las células, y que el néctar se secrete por exocitosis en la epidermis. Se han encontrado proteínas invertasas en el espacio extracelular que pueden estar relacionadas con el transporte de sacarosa del floema al tejido nectarial, de modo que ayudan al movimiento de azúcares en el espacio extracelular y, además, promueven la formación de néctar rico en hexosa (Heil, 2011).

En cuanto a las células de los tejidos nectaríferos, éstas se caracterizan por tener un retículo endoplásmico denso, dictiosomas y aparato de Golgi activos, lo que, aunado a la alta densidad de mitocondrias, sugiere que la mayor actividad metabólica se lleva a cabo en el tejido nectarífero (Heil, 2011).

## DIVERSIDAD DE NECTARIOS

A diferencia de otras estructuras florales, los nectarios no conservan una posición definida ni están determinados por los genes florales homeóticos ABC (Baum *et al.*, 2001), responsables de la posición de los órganos florales durante el desarrollo de la flor y los cuales están altamente conservados entre los linajes de plantas. De este modo, existen especies que presentan nectarios y otras que no (Fahn, 1979); especies con nectarios bien definidos, localizables y con áreas histológicamente diferenciables en las que el néctar se secreta periódicamente (nectarios estructurales) y especies en las que las células secretoras se encuentran en áreas no

diferenciadas y el néctar se secreta esporádicamente (nectarios no-estructurales) (Fahn, 1979; Baum *et al.*, 2001; Bernardello *et al.*, 1991).

También existen especies que secretan el néctar por el rompimiento de la cutícula (Rachmilevitz y Fahn, 1975) o por medio de una epidermis nectarífera, y otras en las que el néctar es secretado a través de estomas o tricomas glandulares (Fahn, 1979). A nivel de especie, aquéllas que tienen polimorfismos florales pueden llegar a presentar diferencias en la morfología del nectario para cada fenotipo distinto (Petanidou, 2007). Ante la diversidad de nectarios observados, se ha llegado a proponer que los nectarios evolucionaron varias veces de forma independiente después de la diversificación de las angiospermas, y que éstos han tenido modificaciones dentro de los diferentes linajes (Brown, 1938; Lee *et al.*, 2005; Hobbhahn *et al.*, 2013). Además, se ha observado que los nectarios pueden ganarse y perderse fácilmente durante la evolución (De la Barrera y Nobel, 2004; Heil, 2011), por lo que es difícil rastrear la secuencia evolutiva de las modificaciones. Identificar las homologías puede ayudar a esclarecer este proceso, pero, debido a que no todos los nectarios tienen un origen común, la forma de estudiar la diversidad queda restringida a la comparación al interior de cada linaje (Bernardello, 2007).

Se desconocen los factores que afectan la evolución y la diversidad de los nectarios; sin embargo, intentos por dilucidarlos muestran que es importante tomar en cuenta el contexto filogenético y ecológico, así como la arquitectura floral (Fahn, 1949; Dafni *et al.*, 1988; Petanidou *et al.*, 2000; Bernardello, 2004; Galetto y Bernardello, 2004).

Al respecto, existe evidencia de diferencias en el tiempo y duración de la secreción, la concentración y el volumen de néctar entre especies de un mismo género (Vesprini *et al.*, 1999; Galetto y Bernardello, 2004).

Vesprini *et al.*, (1999) estudiaron la morfología y fisiología de los nectarios de *Helleborus foetidus* L. y *H. bocconeii* Ten. (Ranunculaceae), que son especies que florecen de forma sincrónica y son polinizadas por abejorros; sin embargo, presentan diferencias en el inicio y duración de la secreción. Los nectarios de estas especies son de tipo discontinuo y disperso, y difieren en número y morfología externa entre ambas. La concentración es más alta y el volumen menor en *H. bocconeii* respecto a *H. foetidus*, lo cual se atribuye a la forma floral, ya que en *H. bocconeii* el néctar y los nectarios se encuentran más expuestos. La producción de néctar es menos continua en *H. foetidus*, lo que podría relacionarse con las diferencias en los nectarios debido a que parte de la producción de néctar se da *in situ* y requiere de fotosíntesis;



en contraste, al estar más expuestos los nectarios de *H. bocconeii* la producción de néctar es mayor y más constante.

Por otro lado, un estudio con seis especies de *Ipomoea* L. (Convolvulaceae), Galetto y Bernardello (2004) mostraron que existe una correlación positiva entre el tamaño de la flor y la producción de néctar, aunque no es significativa debido al tamaño de muestra. También, encontraron que había flores donde el néctar tenía una composición alta de hexosa y otras de sacarosa, y que esto no reflejaba el parentesco filogenético; además, no encontraron una relación entre la composición del néctar y el gremio de polinizadores.

La estructura de los nectarios tiene relación con las dinámicas de secreción del néctar, y éste puede modificarse por factores como el tamaño de la corola y la exposición al medio ambiente. De este modo, la arquitectura floral podría imponer restricciones al cambio en los atributos del néctar. En cuanto a las restricciones filogenéticas, los estudios hechos hasta ahora tienden a mostrar que los atributos del néctar pueden variar entre especies emparentadas (Galetto y Bernardello, 2004) de modo que pareciera que tanto los nectarios como el néctar no son caracteres con arraigo filogenético.

Para nectarios extraflorales de la familia Bignoniaceae Juss., se han hecho pruebas con modelos evolutivos [Brownian motion (BM) y Ornstein–Uhlenbeck model (OU)] que contemplan tanto escenarios de deriva génica como adaptativos, y los resultados muestran que la probabilidad de que evolucionen por adaptaciones es mayor a que evolucionen por deriva (Nogueira *et al.*, 2012); además, las plantas emparentadas filogenéticamente mostraban diferencias en los NEF.

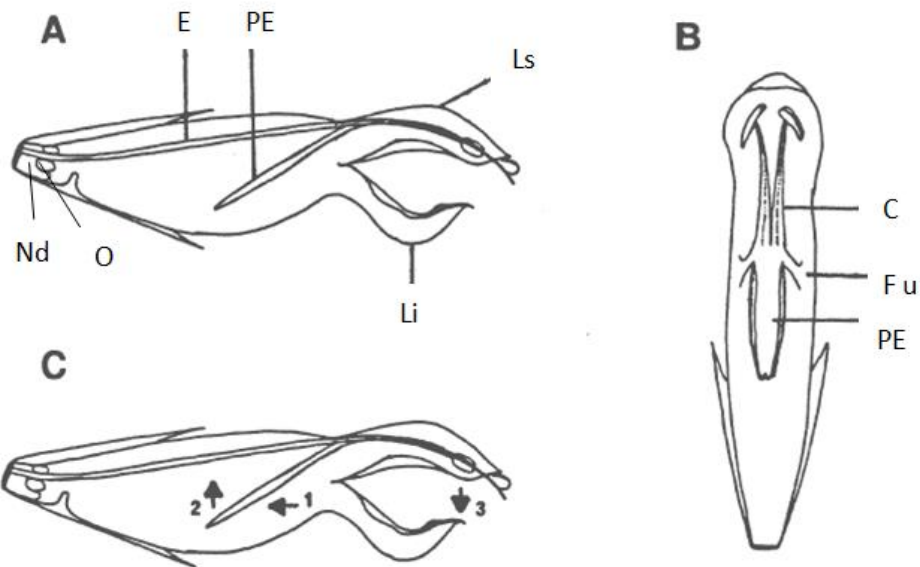
Por otro lado, Ornelas *et al.*, (2007) probaron la hipótesis de que la variación en el néctar floral se podía predecir con atributos como la filogenia, el tamaño de la corola o por la altitud en la que se encontraban las plantas, y encontraron correlaciones positivas entre la filogenia y la corola, y entre ésta última y el volumen del néctar. En este caso, la evolución del néctar puede estar indirectamente mediada por los polinizadores que seleccionan distintos tipos de corolas, un ejemplo son los colibríes que seleccionan corolas largas y consecuentemente néctares voluminosos.

EL GÉNERO *SALVIA*

El género *Salvia* (Tribu Mentheae) es el más diverso dentro de la familia Lamiaceae, ya que contiene alrededor de 1000 especies (Walker *et al.*, 2004; Wester y Classen -Bockhoff, 2007; Cornejo-Tenorio e Ibarra-Manríquez, 2011), de las cuales aproximadamente 300 de éstas se distribuyen en México (Ramamoorthy, 1984; Walker *et al.*, 2004), en donde el 85-88% son endémicas (Ramamoorthy, 1984). De hecho, *Salvia* es el segundo género más diverso presente en México después de *Mammillaria* (Cactaceae) (Cornejo-Tenorio e Ibarra Manríquez, 2011).

Las flores de este género se caracterizan por tener tanto la corola como el cáliz bilabiados, el labio superior de la corola es erecto y cóncavo y el inferior es trilobulado con el lóbulo medio más ancho. El gineceo, se encuentra sobre un disco carnosos (del nectario), es de tipo bicarpelar, tetralocular, con un óvulo en cada división y el estilo es bífido (Ramamoorthy, 2001).

La configuración del androceo se asocia al mecanismo de polinización que presentan: consta de dos estambres con filamentos cortos insertos en la corola; los conectivos se encuentran transversalmente alargados y soldados entre sí, de modo que se forma una estructura tipo palanca(o paleta espatulada), lo que se denomina como “estambres en balancín” o “palanca estaminal” (Ramamoorthy, 2001). La palanca restringe el acceso del polinizador (generalmente colibríes o abejas) al néctar, provocando que al entrar en contacto con éste, el polen se deposite en un área específica del polinizador (Classen-Bockhoff, 2007; Walker *et al.*, 2004; Figura 1).

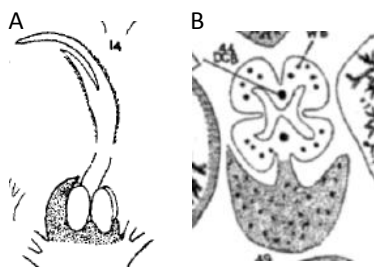


**Figura 1.** Anatomía floral del género *Salvia* (*Salvia mexicana*). **(A)** Perfil floral: **E** es el estilo, **PE** la palanca estaminal, **Ls** el labio superior (o la galea), **Li** el labio inferior, **O** el ovario y **Nd** el disco nectarial. **(B)** Configuración del androceo: **C** los conectivos que terminan por fusionarse en la palanca estaminal **PE**, y la fusión de los filamentos **Fu** a la corola. **(C)** Movimiento de las anteras cuando estas entran en contacto con el dorso de las abejas (1->2->3). Modificado de Ramamoorthy y Tenorio (1991).

#### EL NECTARIO FLORAL EN SALVIA

La polinización en las especies neotropicales del género *Salvia* (Lamiaceae) parece haber generado diversas modificaciones en las estructuras florales como consecuencia la transición de un tipo de polinizador (las abejas) a otro (los colibríes) (Western y Classen-Backoff, 2007). Ejemplos de dichas modificaciones son los cambios en el largo, color y forma de la corola, las guías nectariales, la palanca estaminal y los atributos del néctar (Wester y Classen-Backoff, 2011; Benitez-Vyera *et al.*, 2014). En particular, se ha reportado que el nectario en *Salvia* está conformado por un disco nectarial en la base del ovario, que presenta una proyección del disco tipo lengüeta y, además, exhibe un desarrollo unilateral (Figura 2). El disco nectarial está conformado por células nucleadas pequeñas con un citoplasma denso, con una alta cantidad de materiales de reserva (Kumari, 1986). Una comparación entre los diferentes discos presentes en los géneros de la familia Lamiaceae indica que la evolución de esta estructura pudo haber progresado en varias direcciones de forma independiente, siendo las más basales las de los

géneros *Scutellaria* y *Prostantheroideae*, dejando a las especies de *Salvia* en un punto intermedio dentro de la familia, y a *Ocimoideae* como el grupo más derivado (Kumari, 1986).



**Figura 2.** Diagrama del nectario del género *Salvia*. **A** El nectario se muestra en color gris, se localiza en la base de los ovarios y el estilo. **B** Forma de vascularización en la parte anterior del nectario. Tomado de Kumari (1986).

La familia Lamiaceae al igual que otras como Acanthaceae, Apocynaceae y Boraginaceae, presenta un disco prominente cercano a la base de los ovarios, el cual se considera que derivó de estaminodios, carpelodios o de un crecimiento externo del receptáculo (Rao, 1971). Para la familia Lamiaceae existe la controversia de si se debe al crecimiento del receptáculo (Fahn, 1952, 1953) o a la proliferación de las células basales del ovario (Kartashova, 1960). Se sabe que hay variación en cuanto a la forma, el tamaño y la simetría de la base del nectario (el disco nectarial) en los diferentes taxa de la familia Lamiaceae (Dafni *et al.*, 1988; Chwil, 2009); sin embargo, esta variación no se ha estudiado a fondo a nivel de género. En un estudio acerca de la variación presente en una comunidad de arbustos del Mediterráneo (entre los cuales se encontraba *Salvia*), se identificaron diferencias morfológicas entre diferentes géneros de Lamiaceae, las cuales se asociaron a factores ambientales como la temperatura y el estrés hídrico (Petanidou *et al.*, 2000).

#### MECANISMO PARA LA POLINIZACIÓN

La palanca estaminal es una estructura altamente modificada, que es considerada como un atributo diagnóstico para este género (Cornejo-Tenorio e Ibarra-Manríquez, 2011). El mecanismo para la polinización consiste en la transferencia de polen de una flor a otra por medio de abejas o colibríes, lo cual se logra cuando, al buscar la recompensa del néctar, la probóscide empuja involuntariamente la palanca estaminal (una estructura cuyo mecanismo funciona sólo en especies polinizadas por abejas) y el polen se deposita en el dorso del

polinizador (Ramamoorthy y Tenorio, 1991; Ramamoorthy, 2001) (Figura 3). En el caso de las especies polinizadas por colibríes, a pesar de presentar la fusión de las anteras, ya no tienen el movimiento de palanca mencionado, lo cual se atribuye a modificaciones generadas por la transición de polinización de abejas a colibríes (Classen-Backhoff *et al.*, 2012).

La relación entre la señal-recompensa, entendiendo *señal* como los atributos florales que atraen a los polinizadores, y *recompensa* como la cantidad y calidad del néctar que ofrecen las flores, ha evolucionado en direcciones distintas en las salvias con diferentes polinizadores; las especies polinizadas por abejas tienen una tendencia a aumentar la parte frontal de la flor (como la plataforma de aterrizaje), mientras que las polinizadas por colibríes tienden a tener corolas tubulares, aumentando el perfil floral y reduciendo la parte frontal de la flor (Benitez-Vieyra *et al.*, 2014).

#### SÍNDROMES DE POLINIZACIÓN

Un *síndrome de polinización*, es el conjunto de atributos florales que se pueden relacionar con un tipo de polinizador debido a que son los caracteres que atraen más a ciertos animales (Faegri y van der Pijl, 1979). Estos atributos pueden ser los colores que presentan, la morfología y arquitectura de las flores, su tamaño, la dureza de la corola, la presentación de sus estructuras reproductivas y el momento de apertura de la flor, entre otros (Weberling, 1989; Thomson y Wilson, 2008). De este modo, se han encontrado patrones generales que permiten inferir el tipo de polinizador a partir de los atributos florales. Las recompensas también tienen un papel relevante en los síndromes de polinización y debido a los requerimientos de cada uno, éstas van desde polen y néctar hasta los aromas (Proctor *et al.*, 1996). Algunas flores poseen mecanismos sofisticados de polinización en los que el acceso a dichas recompensas se encuentra restringido y sólo algunos animales pueden acceder, que finalmente son los que polinizan a la flor (Weberling, 1989).

Debido a lo arbitraria que podría parecer la definición de un síndrome de polinización y a que no se puede generalizar al respecto, en años recientes se han incorporado trabajos de observación, morfometría y experimentación con polinizadores, para probar los conjuntos de caracteres que atraen más a ciertos animales y que permiten que se lleve a cabo la polinización (Wester y Classen-Backoff, 2011). Los tipos de polinizadores se pueden identificar por grupos taxonómicos (órdenes y familias de animales) o por grupos funcionales (lenguas largas, tallas similares, etc.) (Fenster *et al.*, 2004, Thomson y Wilson, 2008) y se debe tomar en cuenta que

un polinizador en sentido estricto es aquél que lleva el polen de una flor al estigma de otra, los animales que sólo se alimentan del néctar de ciertas flores sin estar involucrados en la fecundación de las plantas, como es el caso de los robadores de néctar, no se consideran polinizadores.

Wester y Classen-Backhoff (2011) tomaron al grupo de las salvias y clasificaron a sus especies de acuerdo al síndrome de polinización que más se adecuaba a cada una, para lo cual se basaron en observaciones en campo, análisis morfométricos y experimentos de ajuste de los polinizadores. Los resultados permitieron determinar que las salvias polinizadas por abejas (58%) eran aquéllas que presentaban una plataforma de aterrizaje, y en general tenían corolas cortas de modo que se ajustaban al cuerpo de la abeja y permitían la toma del polen con mayor eficiencia (un ejemplo es *S. lavanduloides*). Las salvias que se consideraron como ornitófilas (20%) fueron, en principio, las que excluían por completo la entrada de insectos y tenían corolas tubulares más largas (como *S. iodantha*, que presenta una corola marcadamente tubular y que no tiene una plataforma de aterrizaje donde se apoyen los insectos). El resto se clasificaron como de caracteres intermedios, ya que permiten la entrada de más de un polinizador (como *S. mexicana*).

Si bien los el término *síndrome de polinización* tiene limitaciones, la idea permite probar supuestos en los que se presume que la evolución de un atributo ha sido mediada por los polinizadores al seleccionar ciertas características (Herrera, 2002).

El presente trabajo, se enfocó en probar si los caracteres de los nectarios (estructuras poco estudiadas y fundamentales para la polinización) presentaban una tipología que permitieran identificar si ésta se asociaba más a un polinizador que a otro, en específico a abejas o colibríes. Para ello se retomaron los estudios previos acerca de síndromes de polinización en salvias (Wester y Classen-Backhof, 2011), así como los correspondientes a la evolución de caracteres florales en especies con diferentes polinizadores siempre que existiera una filogenia (Figura 3; Benitez-Vieyra *et al.*, 2014).

## JUSTIFICACIÓN

Los nectarios florales son estructuras altamente variables entre los diversos grupos de plantas que, al no ser regulados por los genes ABC, pueden variar de posición entre especies cercanas. Además, dichas variaciones pueden estar asociadas a factores ecológicos.

La diversidad de nectarios florales de la que se ha hablado hasta ahora ha sido poco revisada entre especies de un mismo género. De hecho, a la fecha sólo existen dos estudios de este tipo. El primero con especies del género *Helleborus*, (de Vesprini *et al.*, 1999), y el segundo con especies de *Ipomoea* (de Galleto y Bernardello, 2004); ambos enfocados en las diferencias entre especies y sus formas de secreción. Los resultados de comparaciones entre órdenes y familias se han utilizado para probar que los nectarios evolucionaron varias veces de forma independiente en los distintos linajes de plantas y se pudieron haber dado modificaciones posteriormente (Bernardello, 2007), lo cual sugiere que los estudios comparativos se hagan entre grupos monofiléticos y especies cercanas, como es el caso de las salvias del subgénero *Calosphace*, para las cuales ya existe una filogenia (Benitez-Vieyra *et al.*, 2014) y los tipos de polinización han sido ampliamente estudiados (Wester y Classen-Backhoff, 2011)

Conocer si existe variación estructural entre los nectarios florales de varias especies de un mismo género que tiene representantes con diferentes polinizadores permite explorar la idea de si los nectarios se han diversificado debido a su función ecológica. Las salvias del subgénero *Calosphace* conforman un sistema adecuado para este estudio debido al vasto conocimiento que se tiene acerca de su evolución y adaptaciones en la transición de un polinizador a otro.

A su vez, la descripción del desarrollo del nectario permitirá identificar las etapas del desarrollo en las que surgen los elementos que lo conforman.

## OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El objetivo general de este trabajo es conocer la variación estructural e histoquímica de los nectarios florales de diez especies del subgénero *Calosphace* del género *Salvia* (*S. fulgens*, *S. lavanduloides*, *S. longispicata*, *S. mexicana*, *S. polystachya*, *S. purpurea*, *S. iodantha*, *S. misella*, *S. elegans* y *S. cinnabarina*), y relacionarlas con el tipo de polinizador que presentan. Los objetivos particulares, derivados del anterior, son los siguientes:

1. Describir la ontogenia del nectario floral.
2. Comparar las estructuras de los nectarios entre los clados en los que se ubican las especies.

Debido a que los requerimientos de cada polinizador difieren, se espera que existan diferencias entre los nectarios de salvias con diferentes polinizadores.



## MÉTODO

## COLECTA Y ALMACENAMIENTO

Se colectaron inflorescencias de diez especies de *Salvia*: *S. fulgens*, *S. lavanduloides*, *S. longispicata*, *S. mexicana*, *S. polystachya*, *S. purpurea*, *S. iodantha*, *S. misella*, *S. elegans* y *S. cinnabarina*. *Salvia fulgens*, *S. purpurea*, *S. iodantha*, *S. elegans* y *S. cinnabarina* son polinizadas por colibríes; *S. lavanduloides*, *S. longispicata*, *S. polystachya* y *S. misella* son polinizadas por abejas, en tanto que *S. mexicana* es polinizada tanto por abejas como por colibríes (Tabla 1).

De cada especie se tomaron tres ejemplares, los cuales se herborizaron y se llevaron al herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM, para corroborar la especie.

**Tabla 1.** Polinizadores y localidades y fechas de muestreo de cada especie de planta utilizada en este trabajo.

Especie	Polinizador (Wester y Classen-Backhof, 2011)	Localización	Fecha
<i>S. fulgens</i> Cav.	Colibríes	Parque Nacional Desierto de los Leones, D.F. (carretera México-Toluca)	oct-13
<i>S. longispicata</i> M. Martens & Galeotti	Abejas	Manantlán, Jalisco	oct-13
<i>S. lavanduloides</i> Kunth	Abejas	Coajomulco, Morelos	nov-13
<i>S. mexicana</i> L.	Abejas y colibríes	Manantlán, Jalisco	sep-12
<i>S. polystachya</i> Cav.	Abejas	Tres Marías, Morelos (carretera libre a Cuernavaca)	oct-13
<i>S. purpurea</i> Cav.	Abejas, colibríes y mariposas	Temascaltepec, Estado de México	nov-13
<i>S. iodantha</i> Fernald	Colibríes	Manantlán, Jalisco	oct-13
<i>S. misella</i> Kunth	Abejas	Ziracuaretiro, Michoacán	nov-13
<i>S. elegans</i> Vahl	Colibríes	Parque Nacional Desierto de los Leones, D.F. (carretera México-Toluca)	nov-13
<i>S. cinnabarina</i> M. Martens & Galeotti	Colibríes	Cerro Huitepec, Chiapas	oct-13

De los ejemplares colectados se tomaron flores y botones de las plantas, los cuales fueron fijados *in situ* utilizando FAA (alcohol, formaldehído ácido acético en una proporción 5:1:0.5) por 24 h; posteriormente, se lavaron bajo agua corriente (15 min), se deshidrataron de forma gradual con soluciones de alcohol etílico. Los recambios de alcohol se hicieron cada 30

min pasando por alcohol al 30 y 50%, y, finalmente se almacenaron en alcohol 70%, con base en la técnica propuesta por Vázquez-Nin y Echeverría (2000).

#### PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA LA OBSERVACIÓN EN EL MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO

Para la observación de las muestras al microscopio electrónico de barrido (MEB), se disectaron las flores a fin de obtener únicamente los nectarios, los cuales se guardaron en bolsas de papel cebolla y se deshidrataron de forma gradual en alcohol al 86 y 96%, seguido por dos cambios de alcohol al 100% por 30 min, excepto el último cambio de alcohol que se hizo por 12 h; se eliminó el etanol por medio de la técnica de desecado a punto crítico, que consiste en agregar etanol absoluto a una cámara en un desecador de punto crítico. A las muestras se les realizaron lavados con CO<sub>2</sub> líquido hasta remplazar todo el etanol por CO<sub>2</sub>, mismo que se evaporaría en el último paso (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000). Posteriormente, se montaron las muestras en portaobjetos con cinta conductiva de carbón de doble cara y se cubrieron con una capa de oro de 200nm de grosor (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000). Una vez que este proceso concluyó, fue posible observar las muestras en el MEB marca Jeol, modelo JSM-5310LVsm.

#### PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA REALIZAR CORTES SEMIFINOS Y TINCIONES HISTOLÓGICAS

Se disectaron flores para obtener los nectarios, los cuales se deshidrataron de forma gradual en recambios de alcohol al 86, 96 y 100% (30 min cada uno), con un último cambio de alcohol 100%.

Para los cortes semifinos se tomaron los nectarios previamente deshidratados en alcohol absoluto y se incluyeron en la resina RLWhite, haciendo cambios de RLWhite en diferentes proporciones: 30, 50 y 75% (1 h cada uno) y dos cambios en RLWhite al 100% (el primero por 1 h y el siguiente en un lapso mínimo de 12 h), se encapsularon los nectarios en RLWhite 100% y se dejaron durante 12 h en la estufa para que se polimerizaran correctamente. Una vez listas las cápsulas, se les quitó la cubierta y se hicieron pirámides para posteriormente cortar las muestras en el ultramicrotomo. Los cortes obtenidos fueron teñidos con Azul de Toluidina y cubiertos con resina sintética Entellan y observados por medio del microscopio óptico.

### PRUEBAS HISTOQUÍMICAS

Una vez deshidratadas las muestras se incluyeron gradualmente en parafina con xilol, en las siguientes proporciones: 2:1, 1:1 y 1:2; el proceso se siguió de forma sucesiva durante 12 h en cada una, a una temperatura de 58 °C, transcurridas las 12 h se incluyeron en Paraplast© puro a la misma temperatura, se orientaron las muestras y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, se cortaron láminas de 7-8  $\mu\text{m}$ . Para las pruebas histoquímicas se realizaron las siguientes tinciones: ácido periódico reactivo de Schiff (APS) para polisacáridos insolubles, lugol para almidón y Sudán III para aceites.

## RESULTADOS

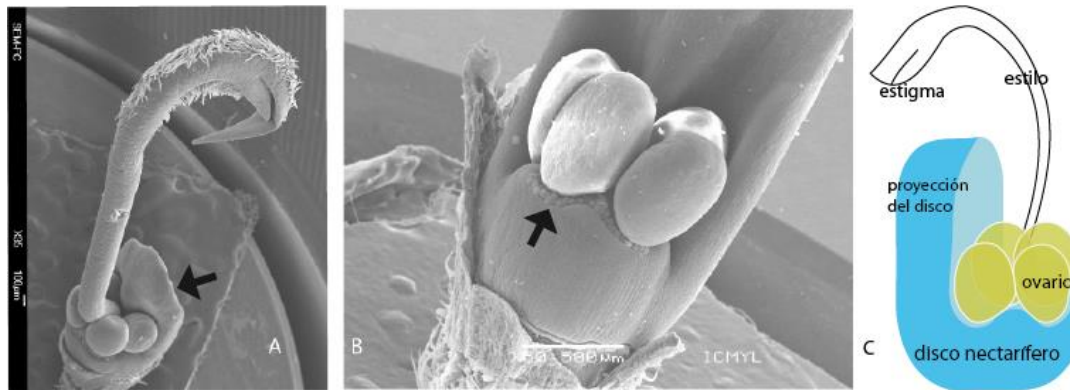
## LOCALIZACIÓN Y MORFOLOGÍA GENERAL

Las flores de *Salvia* consisten de una corola bilabiada cubierta en la base por un cáliz también bilabiado. Al disectar las flores se observó que el nectario se encuentra en la parte basal de la flor por encima del receptáculo, a la altura del cáliz. El nectario está constituido por dos partes: un disco nectarial y la proyección del mismo (Figura 3). El disco nectarial se encuentra estrechamente asociado al gineceo, característica que encuentra su explicación en el hecho de que los haces vasculares tanto del ovario como del estilo se unen en el disco.

El gineceo es bicarpelar y el ovario es sincárpico tetralobulado (Figura 3A). Asimismo, se observó que la posición del ovario es superior, y éste es tetralobulado, en tanto que el estilo es ginobásico, como en el resto de las Lamiaceae (Simpson, 2010; Figura 3).

En cuanto al nectario, se observó que se encuentra asociado al gineceo, lo que permite clasificarlo como un nectario ginobásico, hecho que concuerda con los estudios que previamente se han realizado sobre el particular (Kumari, 1986). Por otra parte, la proyección del disco nectarial (o lengüeta) provoca que la simetría sea bilateral, es decir, se trata de un nectario zigomórfico (Figuras 3A y 3B)

Por último, cabe mencionar que generalmente la proyección del disco rebasa el largo del ovario (Figura 3), aunque esta diferencia varía entre especies.

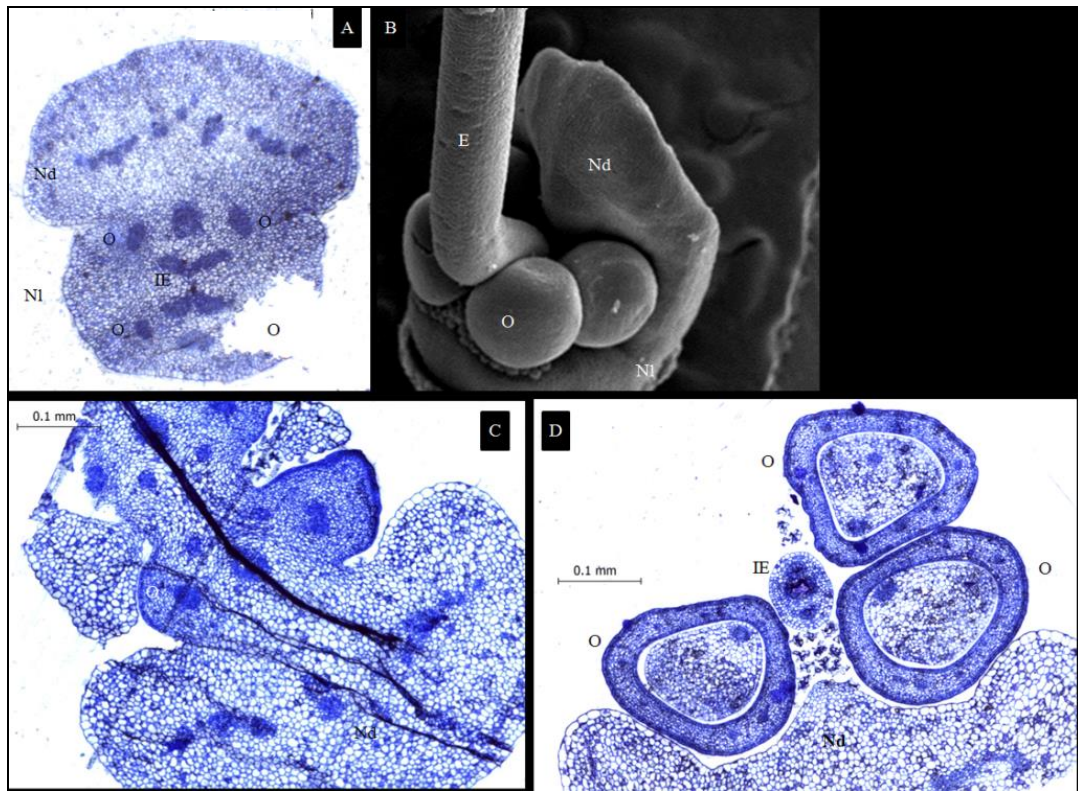


**Figura 3.** Morfología general. A y B: *Salvia mexicana*. A: el nectario y su marcada asociación con el gineceo. B: acercamiento a la zona del disco nectarial, en la cual se observan tricomas glandulares en la superficie del mismo. Las flechas en ambas figuras muestran las zonas de secreción del néctar. En A se señala la zona donde se encuentran estomas modificados y en B la posición de tricomas glandulares. C: morfología general del nectario (en azul). El nectario está constituido por un disco nectarial y una proyección del disco. Sobre el disco nectarial se insertan los carpelos del ovario (en amarillo) y el estilo.

#### ANATOMÍA DEL NECTARIO FLORAL

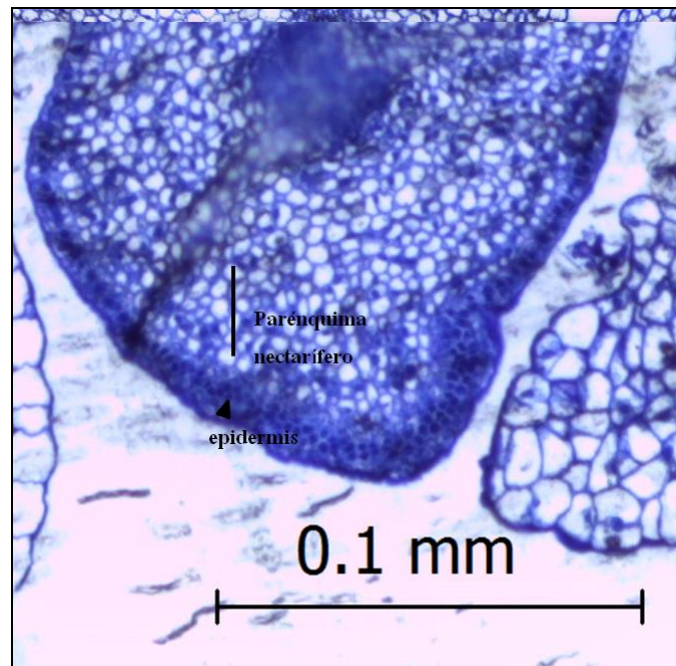
Los nectarios se reconocen anatómicamente por tener una epidermis compacta, seguida por un parénquima nectarífero con células más grandes y con mayor espacio intracelular. Los cortes de nectarios de *Salvia* muestran este arreglo (Figura 4); sin embargo, no toda la estructura del disco nectarial ni la proyección muestran esta organización celular, sino que la epidermis nectarífera únicamente se observa en la base del ovario (Figura 5). El resto puede ser considerado como tejido nectarial.

Los cortes del disco nectarial permiten identificar que la fusión de las estructuras que conforman el gineceo (*i.e.*, el estilo y los carpelos del ovario) se da en esta zona, mientras que en las partes expuestas parecerían estructuras separadas (gineceo apocárpico).



**Figura 4.** Micromorfología (B) y anatomía (A, C, D) del nectario y el gineceo. A la muestra utilizada le falta un lóculo del ovario, por lo cual las fotos muestran únicamente tres. A: haces vasculares en el disco del nectario (Nd), en donde los carpelos del ovario se insertan. A, C y D muestran que el gineceo consta de cuatro carpelos fusionados únicamente dentro del disco nectarial y que éstos se encuentran libres en el resto de la estructura.

E= estilo, IE= inserción del estilo, Nd= disco del nectario, NI=proyección anterior del nectario, O=ovario. Cada O representa un lóbulo del ovario.

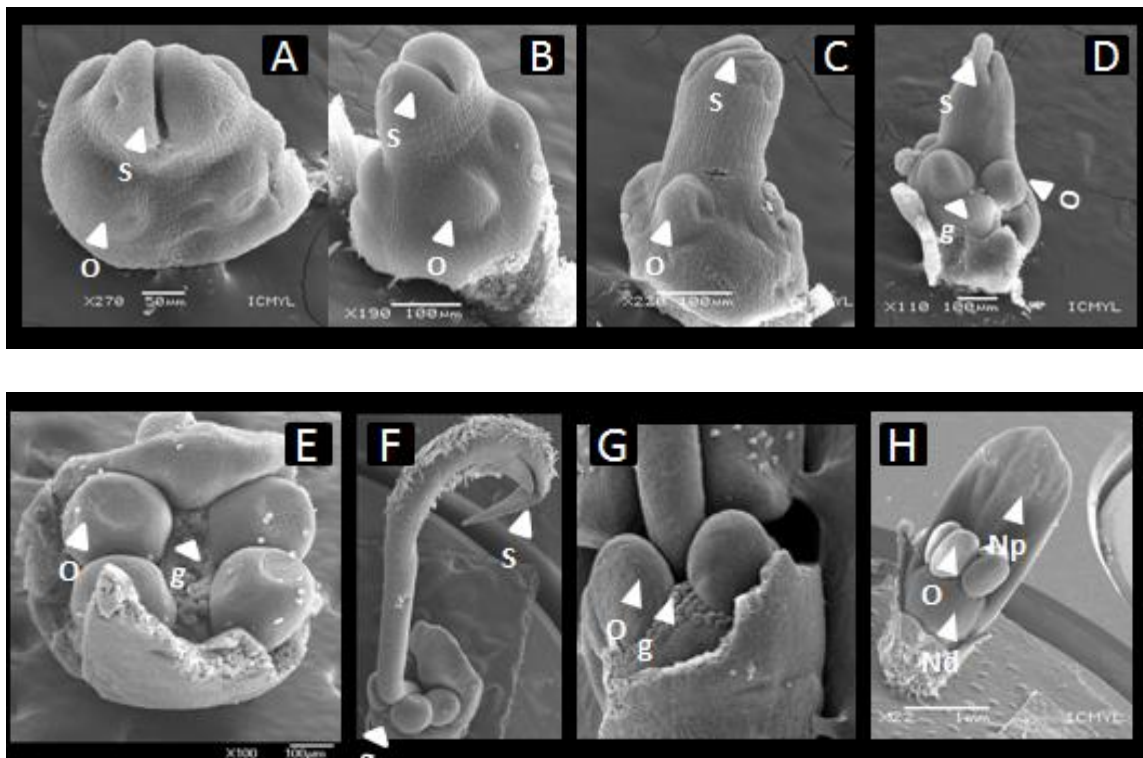


**Figura 5.** Acercamiento de las células que componen la epidermis y el parénquima nectarífero en la parte basal de los carpelos del ovario, donde estos están más cercanos al disco nectarial.



## DESARROLLO DEL NECTARIO FLORAL

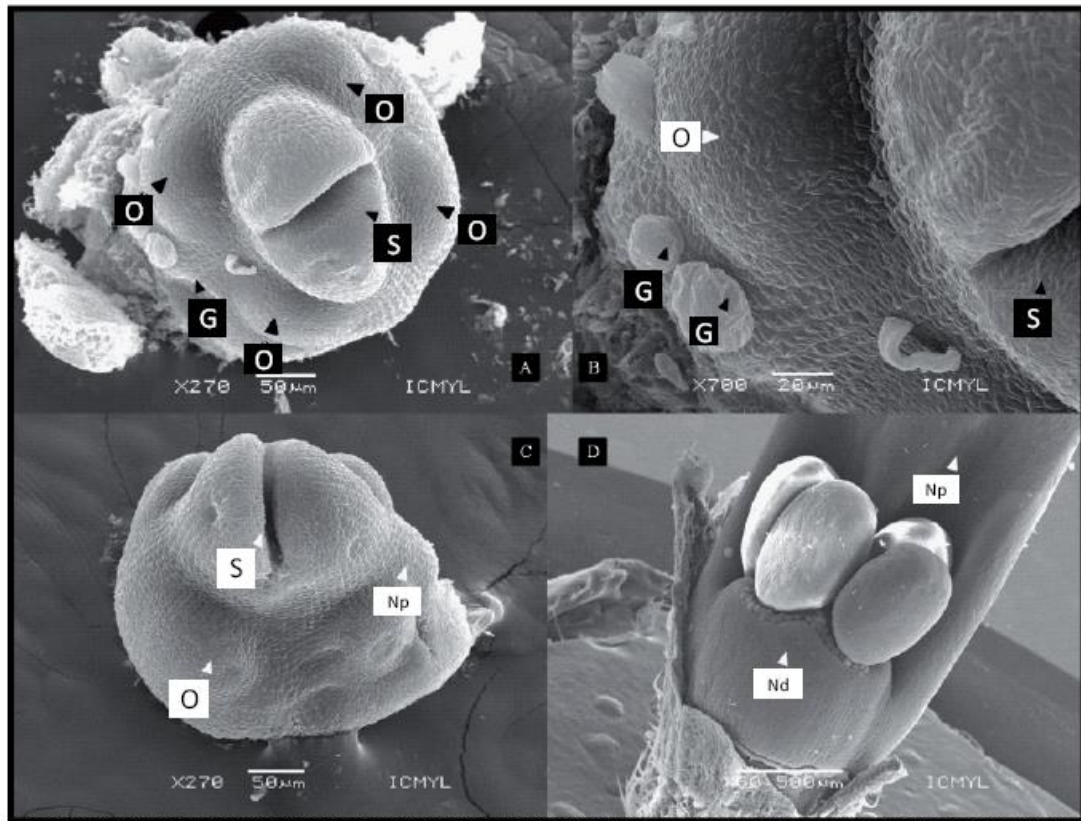
Durante la ontogenia de la estructura nectarial se observa un primordio compacto del cual comienzan a diferenciarse los cuatro carpelos y el estigma del estilo (Figura 4A). Cuando las especies presentan tricomas glandulares, éstos se observan desde etapas tempranas cercanos al disco nectarial y a los carpelos del ovario (Figuras 6D y 7). No es sino hasta etapas intermedias que se da la diferenciación del disco y el aumento de tricomas glandulares (Figuras 6E, 6F, 6G y 7). La proyección del disco nectarial no se desarrolla sino hasta estas etapas intermedias y tardías. En las etapas tempranas e intermedias, se reconoce que esta estructura emerge del receptáculo (Figura 6C).



**Figura 6.** Ontogenia del nectario en *Salvia mexicana*. A, B, C y D: etapas tempranas del desarrollo floral; E y G: etapas intermedias; F: etapa en pre-antesis; H: nectario en antesis.

O=ovario; g=tricomas glandulares capitados; S= estigma; Nd=disco nectarial; Np= proyección nectarial (lengüeta).

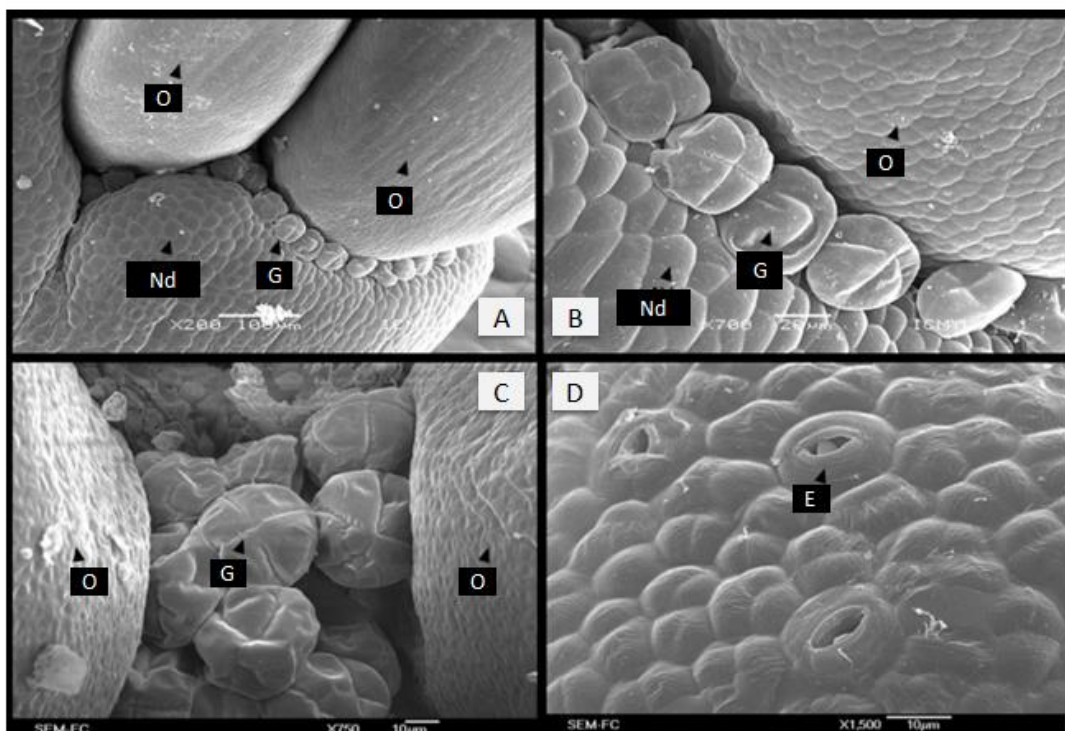




**Figura 7.** A, B y C: etapas tempranas del desarrollo de la estructura nectarífera; A y B: etapa intermedia en la cual surgen los tricomas glandulares. B un acercamiento en el cual es posible observar que los tricomas glandulares ya están desarrollados, mientras que los ovarios comienzan a diferenciarse. C: etapa temprana en la que se observa que la proyección del disco nectarífero (Np) surge del receptáculo. La proyección no se desarrolla sino hasta etapas cercanas a la antesis, cuando el resto de las estructuras se encuentran diferenciadas (D). G= tricomas glandulares; O=Ovario; S= estigma; Nd=proyección del disco nectarífero.

## ESTRUCTURAS DE SECRECIÓN

La observación de los nectarios en el microscopio electrónico de barrido permitió identificar que las estructuras por donde se libera el néctar son los estomas (en la proyección del disco nectarial) y los tricomas glandulares (en el disco nectarial) (Figura 8). Los tricomas son capitados con cuatro células en tanto que los estomas son atrófico. En estos últimos fue posible identificar, para la mayoría de las especies, la secreción de sustancias cristalinas que conforman el néctar.

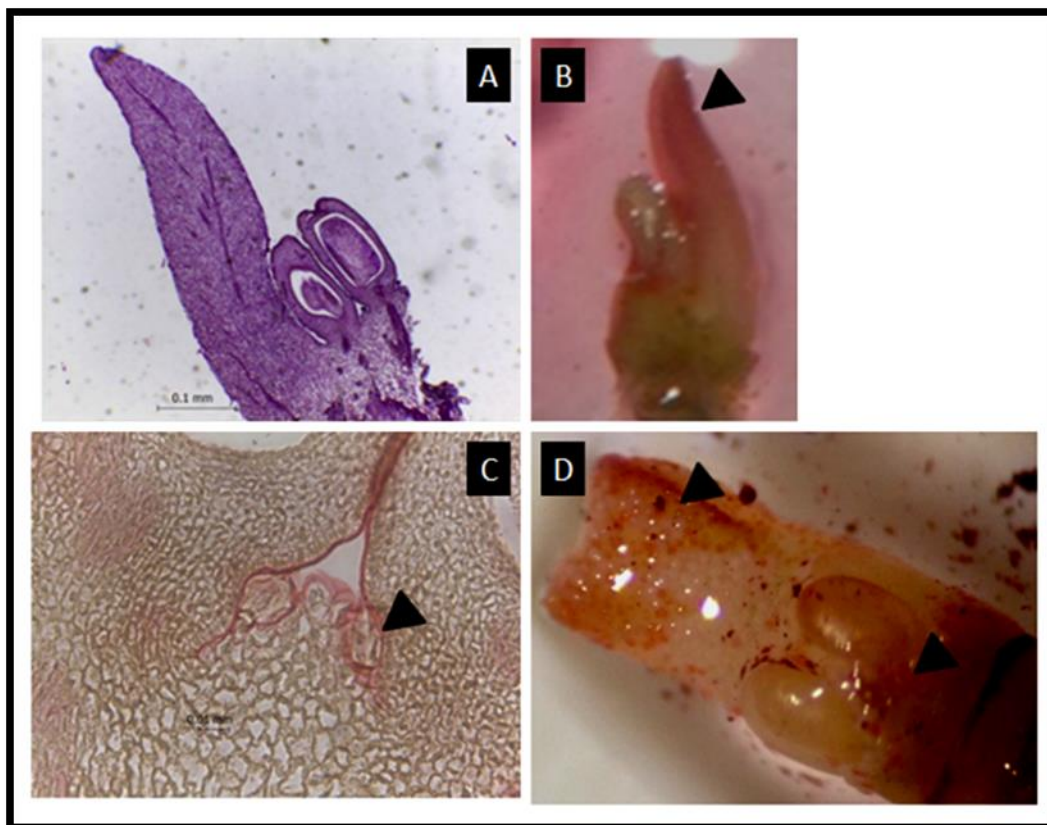


**Figura 8.** Aspecto de las estructuras relacionadas con la secreción de néctar. A, B y C: tricomas glandulares capitados. D: estomas por los cuales emerge néctar producido por el disco nectarial.

O= ovario; G= tricomas glandulares capitados; Nd= disco nectarial; E= estoma.

La Figura 9 permite identificar la producción tanto de azúcares (PAS) como de aceites (Sudán III) en los nectarios. Se observa que la lengüeta presenta una alta acumulación de azúcares en el interior, ésta es la zona en la que se distribuyen los estomas en las especies que los presentan. Por otro lado, para identificar el contenido de los tricomas glandulares se

hicieron pruebas tanto para PAS como para Sudán III, y éstos reaccionaron positivamente, lo que demuestra que el nectario no sólo secreta azúcares, sino también aceites esenciales.



**Figura 9.** Aspecto de las tinciones de nectarios en las pruebas histoquímicas. A y B: reacciones para la prueba de APS. C y D: reacciones para la prueba de Sudán III. Las flechas hacen referencia a las zonas que presentaron mayor reacción para estas pruebas.

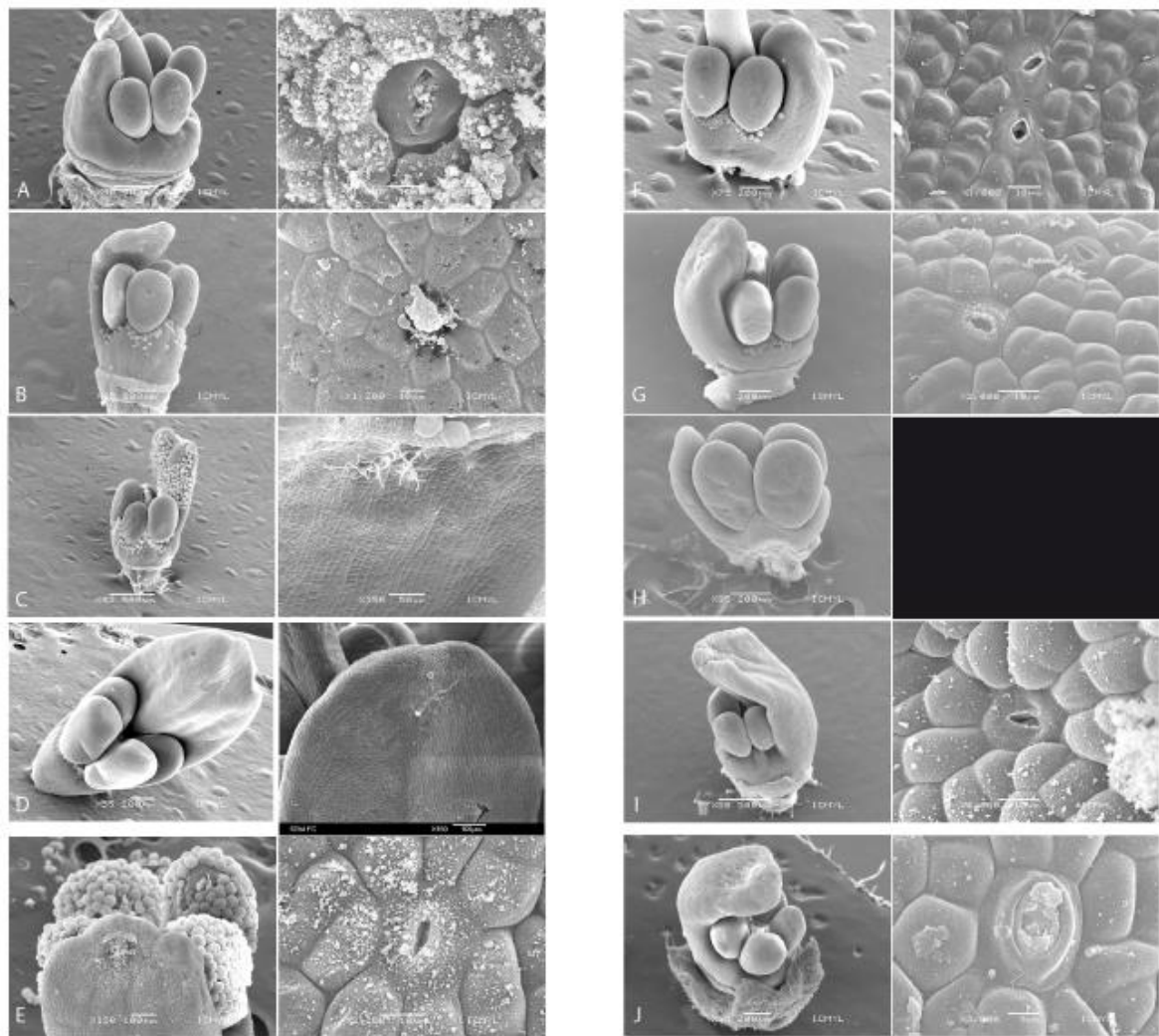
#### COMPARACIÓN ENTRE DE LAS DIFERENTES ESPECIES

Los nectarios de las diez especies observadas difieren entre sí en cuanto a las células por las que se libera el néctar. Al observar a las especies de *Salvia* estudiadas, se encontró que existen variaciones entre ellas no sólo por la presencia o ausencia de estomas y tricomas, sino por la posición de dichas estructuras, las cuales varían entre especies. En algunas especies los tricomas glandulares se encuentran en la base de los carpelos y en el interior de la lengüeta nectarial (Figuras 10B, D, F y G) y en otras, en toda la estructura del nectario (Figura 10B) y especies en donde únicamente se presentan sobre los carpelos (Figura 10E). Las especies que no presentaron tricomas glandulares fueron *S. misella*, *S. fulgens*, *S. elegans* y *S. cinnabarina*.

Los estomas atrofiados se encontraron únicamente en la parte dorsal de la lengüeta nectarial. *Salvia misella* fue la única especie en la que no se encontraron estomas en la

estructura del nectario, el resto de las especies sí los presentan aunque la cantidad es variable. *Salvia longispicata* y *S. lavanduloides* presentan entre cinco y diez estomas, otras, con cantidades intermedias son *S. elegans*, *S. purpurea* y *S. mexicana* (entre 10-15 estomas); mientras que otras especies, como *S. polystachya*, *S.iodantha*, *S. fulgens* y *S. cinabarina* presentan de 15 a 20 estomas (Figura 10). Los estomas generalmente se encuentran agrupados, de tres a cinco, y en la mayoría de los caso se pudieron identificar secreciones cristalinas saliendo por ellos. Se debe tomar en cuenta que los resultados son cualitativos y no tienen representación estadística, ya que se basan en la observación de estas estructuras en el MEB y son resultados por duplicado para algunas especies. Esto debido a lo impráctico y limitado que es observar varias muestras de la misma especie con esta herramienta, y a que el microscopio electrónico es el único medio para observar estructuras tan pequeñas.

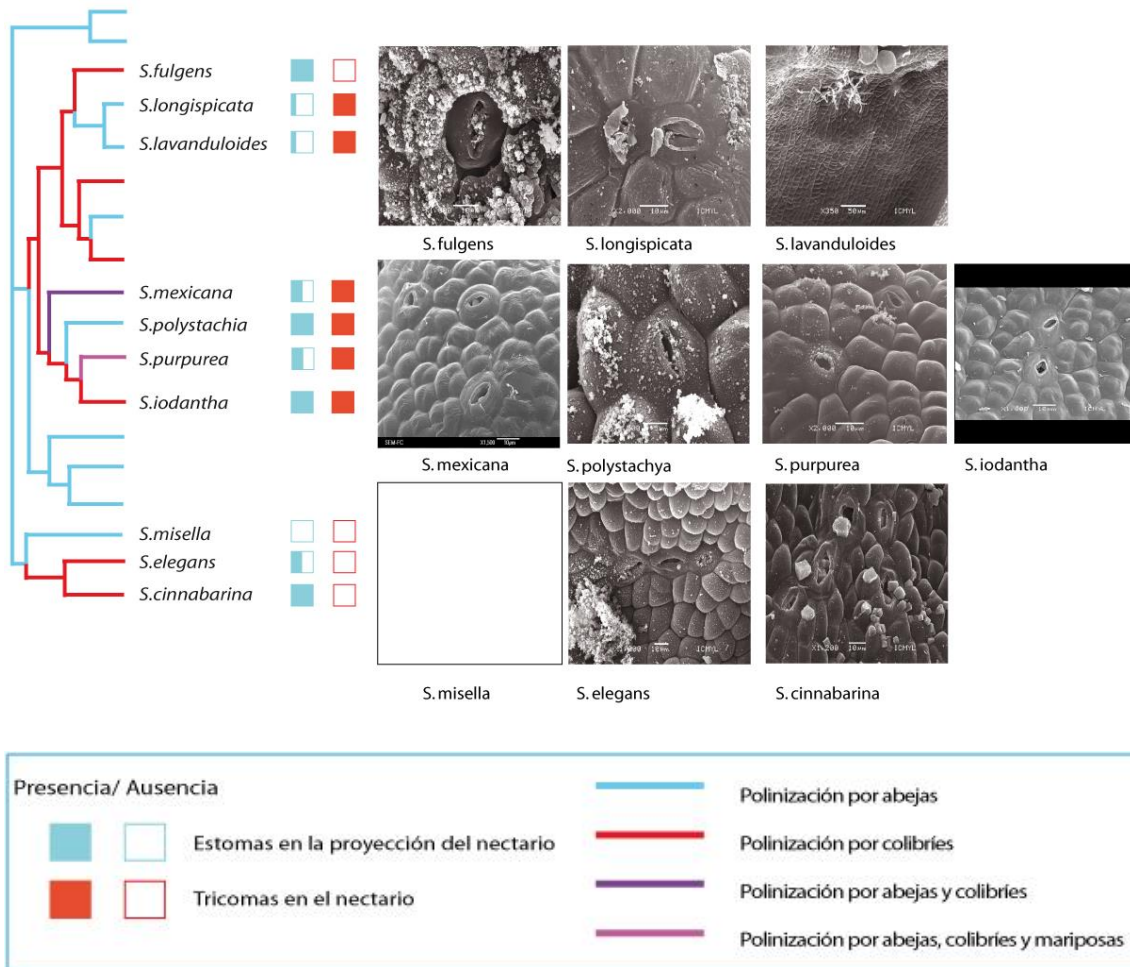
Por otro lado, el tamaño y la forma en la que la lengüeta cubre los carpelos también es variable entre especies: algunas presentan lengüetas en las que el tamaño es semejante al de los carpelos (*S. fulgens*, *S. lavanduloides*, *S. polystachya*, *S. purpurea*, *S. iodantha* y *S. misella*) y otras poseen lengüetas que sobrepasan a los carpelos (*S. longispicata*, *S. mexicana*, *S. elegans* y *S. cinnabarina*).



**Figura 10.** Diversidad de nectarios en salvias. De lado izquierdo se muestra la morfología del nectario, donde es posible apreciar la presencia y ausencia de tricomas, y de lado derecho se muestran acercamientos a los estomas. **A.** *S. fulgens*, **B.** *S. lavanduloides*, **C.** *S. longispicata*, **D.** *S. mexicana*, **E.** *S. polystachya*, **F.** *S. purpurea*, **G.** *S. iodantha*, **H.** *S. misella* (para esta especie no se muestra un acercamiento a los estomas, porque la proyección del disco no presentaba ninguno), **I.** *S. elegans*, y **J.** *S. cinnabarina*.



En la Figura 11 se observa la comparación entre los nectarios florales de las especies estudiadas y sus grados de cercanía filogenética. Existen similitudes en especies emparentadas: un ejemplo es el de *S. lavanduloides* y *S. longispicata*, en donde ambas presentan nectarios con pocos estomas y con tricomas. Lo mismo sucede con *S. elegans* y *S. cinnabarina*, que tienen nectarios similares, ambos con estomas y sin tricomas. Para estos pares de especies los polinizadores son los mismos. Por otro lado, *S. mexicana* y *S. purpurea* tienen nectarios con las mismas características y ambas son especies polinizadas tanto por abejas como por colibríes.



**Figura 11.** Filogenia modificada de la propuesta por Benitez-Vieyra *et al.*, (2014) a la cual se agregó el tipo de nectario presente en cada especie. Es posible observar que especies emparentadas con distintos polinizadores no muestran nectarios semejantes.

## DISCUSIÓN

Para las especies de *Salvias* estudiadas, la localización del nectario dentro de las flores es la misma y coincide con la descrita en trabajos previos (Kumari, 1986). Esta es la primera vez que se comparan nectarios de varias especies de salvias de las cuales se conoce su relación con las otras especies, y es la primera vez que se habla explícitamente de la variación entre los nectarios para probar si hay diversidad a un nivel inferior del de género desde un punto de vista ecológico.

Los resultados muestran que hay variación, la cual está dada por la presencia y ausencia de tricomas y estomas. Los tricomas se han identificado como estructuras de liberación de néctar en otros géneros de Lamiaceae como *Leonotis leonorus* (Ascensao *et al.*, 1995), en tanto que los estomas se han registrado en *Melissa officinalis* (Lamiaceae) (Chiwil, 2009). Esto es congruente con la idea de que estas estructuras no son únicas para el género *Salvia* dentro de esta familia; sin embargo, la posición y la forma en que se presentan difieren entre los géneros, al igual que la morfología general.

Es probable que la dinámica de secreción sea diferente entre las que sólo presentan tricomas, en comparación con las que sólo presentan estomas, ya que se sabe que ambas estructuras pueden llevar a cabo funciones diferentes. Un ejemplo es la capacidad de reabsorción del néctar por parte de los estomas (Cruden *et al.*, 1983), así como el hecho de que éstos no pierden su función una vez que el néctar es liberado. La diferencia en las funciones que puede llevar a cabo cada estructura podría afectar la dinámica de secreción del néctar y repercutir en la interacción con los polinizadores (Galletto y Bernardello, 2004).

En cuanto a los tricomas glandulares, Werker *et al.*, (1993) encontraron que éstos existen tanto en partes vegetativas como reproductivas de las Lamiaceae y que pueden llevar a cabo funciones de protección contra herbívoros y patógenos; y los que se encuentran en partes florales pueden servir como atractores para polinizadores. Un estudio con *S. officinalis* mostró que los tricomas glandulares pueden reaccionar de forma positiva para componentes hidrofílicos y lipofílicos, lo que significa que pueden tener una función dual, ya que presentan tanto azúcares como aceites (Corsi y Bottega, 1999; Baran *et al.*, 2010), y estos últimos pueden provocar que las flores despidan aromas. En este estudio encontramos que los tricomas glandulares tienen reacciones positivas para la prueba de Sudán III, que sirve para identificar



aceites esenciales, y para la prueba de APS, para identificar azúcares. Esto indica que los tricomas no producen únicamente azúcares, sino también aceites.

Los aceites, además de tener una función de defensa contra patógenos y herbívoros, pueden liberar aromas que atraen a los polinizadores. Las abejas y mariposas son más sensibles que los colibríes a dicha atracción, de modo que estos polinizadores pueden ser atraídos por las secreciones de los tricomas glandulares (González-Teuber y Heil, 2009). El comportamiento de los colibríes no se relaciona con los atractivos aromáticos, sino con la morfología y color de la corola (Baker y Baker, 1983; Bentley y Elias, 1983; Proctor, 1996).

De este modo, pareciera que las diferencias estructurales (como la presencia de tricomas y estomas) entre los nectarios de cada especie pudieran apuntar una relación con el tipo de polinizador que tienen. En este caso, las polinizadas por abejas y mariposas muestran tricomas y estomas, en tanto que las polinizadas por colibríes presentan una mayor cantidad de estomas, y de ellas sólo en una especie se registran tricomas.

#### DESARROLLO DEL NECTARIO FLORAL

Existe una polémica acerca del tejido que le da origen al nectario. Fahn (1952, 1953) propuso que el disco nectarífero provenía de un crecimiento del receptáculo; sin embargo, Kartashova (1965) menciona que esta estructura podía derivar de una proliferación de las células basales del ovario (Kumari, 1986). Los resultados que aquí se muestran permitieron identificar que el disco nectarífero surge del crecimiento del receptáculo, lo cual apoya la hipótesis de Fahn (1952, 1953).

Por otro lado, si las estructuras que se desarrollan en etapas tempranas coinciden con ser las más conservadas, los resultados respaldan las hipótesis de Kumari (1986), en la que propone que la proyección del disco nectarial es un carácter derivado para la familia Lamiaceae. Además, los estomas del nectario únicamente se presentan en dicha proyección y, por lo tanto, surgen también en etapas tardías del desarrollo. Como se mencionó anteriormente, los estomas se presentan en mayor medida en especies polinizadas por colibríes y los tricomas en especies polinizadas por abejas.

COMPARACIÓN ENTRE LOS NECTARIOS DE LAS DIFERENTES ESPECIES

Existen cuatro variaciones entre los nectarios dependiendo de la combinación entre la presencia y ausencia de tricomas glandulares y estomas (Figuras 8 y 12). Los cuatro tipos son: (1) nectarios sin estomas ni tricomas glandulares (como es el caso de *S. misella*); (2) sin estomas pero con tricomas glandulares (como en *S. lavanduloides*); (3) con estomas y sin tricomas glandulares (como *S. fulgens*); y (4) con estomas y tricomas glandulares (como en *S. elegans*) (Figura 12).

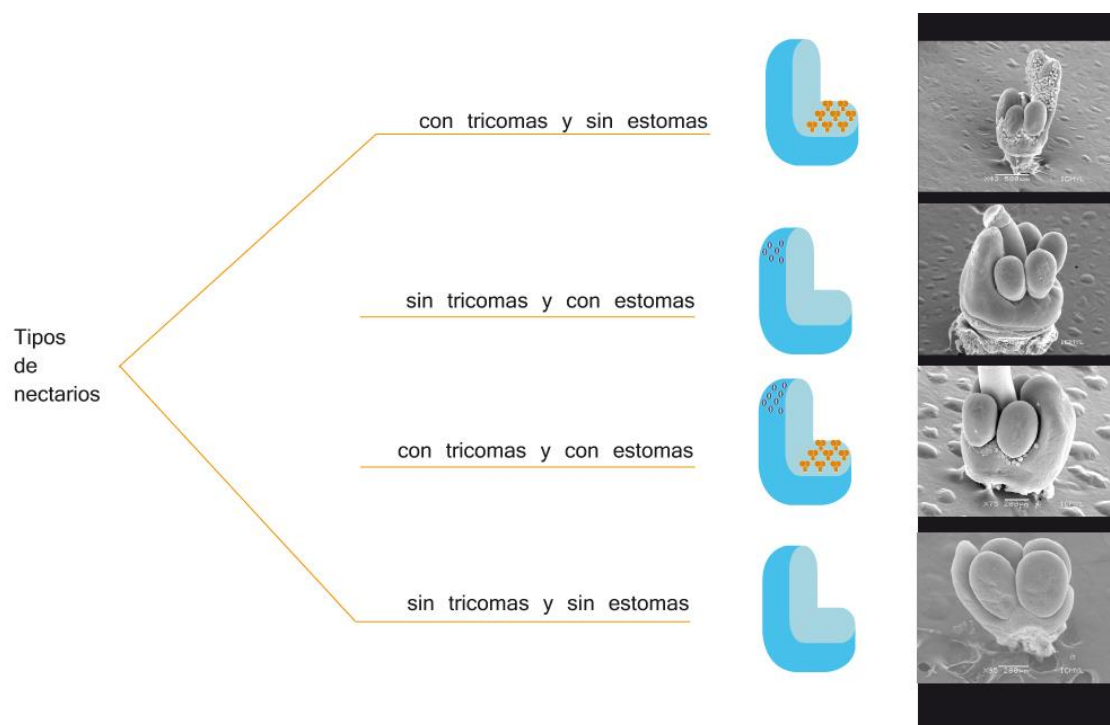


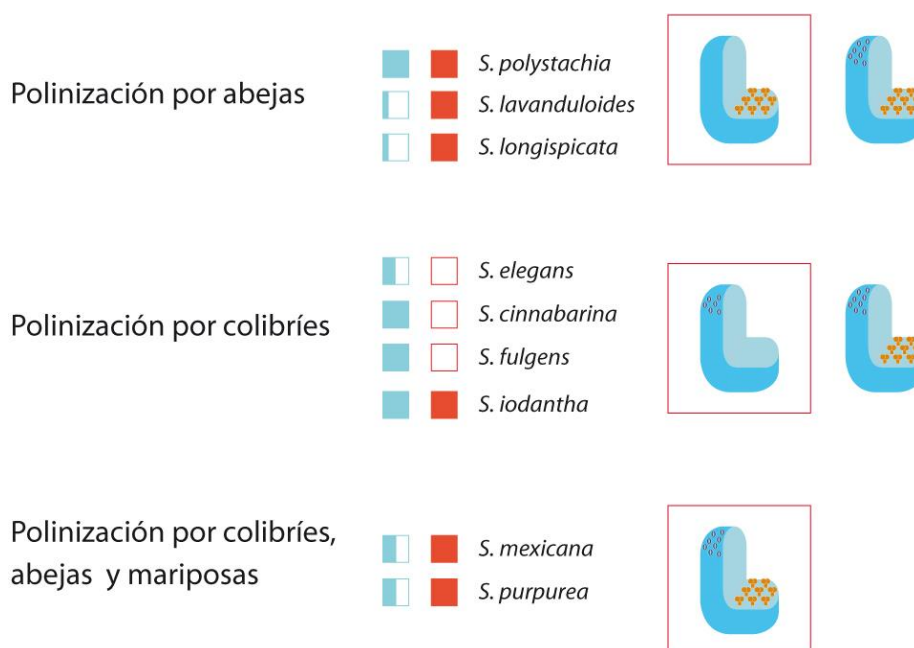
Figura 12. Tipos de nectarios florales en *Salvia* spp.

Todos los nectarios del grupo analizado presentan estomas en la proyección del disco nectarial; sin embargo, hay una especie en la que no se presentan estomas (*S. misella*) y que coincide con ser una salvia polinizada por abejas, en la cual no hubo transiciones evolutivas en la polinización. Se trata de una especie que ha mantenido el mismo tipo de polinización durante su historia evolutiva, a diferencia de las otras especies con este tipo de polinizador, las cuales tuvieron tres cambios en el tipo de polinización (de abejas a colibríes y de colibríes a abejas). Éste es el caso de *S. lavanduloides*, *S. polystachya* y *S. longispicata*. Si lo anterior lo cotejamos con la información obtenida de la relación entre la presencia de estomas con la polinización por

colibríes, es interesante que la única especie que nunca fue polinizada por este polinizador no presente estomas. Esto sugiere que probablemente los estomas son una adaptación a la polinización por colibríes en este grupo. Por otro lado, especies que tuvieron una reversión de colibríes a abejas, como *S. lavanduloides* y *S. longispicata*, no presentan estomas, lo cual sugiere que pudieron haberlos perdido. *Salvia polystachya*, que regresó a tener polinización por abejas pero no perdió la polinización por colibríes, aún mantiene ambas estructuras.

#### RELACIÓN ENTRE LOS NECTARIOS Y EL TIPO DE POLINIZADOR

La tendencia observada (Figura 13) se acota al grupo estudiado, pues en otros sistemas de la familia (Lamiaceae), como *Leonotis leonorus*, que tiene tricomas glandulares y es polinizada por colibríes, o el de *Melissa officinalis* que presenta estomatóforos y es polinizada por abejas, no se presentan las relaciones entre la estructura y el polinizador como en las salvias estudiadas.



**Figura 13.** Comparación entre los nectarios de la sección *Calosphace*, dependiendo del tipo de polinización.

Dentro de las especies estudiadas, se encuentran varias secciones del subgénero *Calosphace* representadas: *S. fulgens* (sección Fulgentes), *S. lavanduloides* (secc. Angulatae), *S. longispicata* (secc. Lavanduloideae), *S. mexicana* (secc. Briquetia), *S. polystachya*, *S. purpurea* y *S. iodantha* (secc. Polystachya), *S. misella* (secc. Microsphace), *S. elegans* y *S. cinnabarina*

(ambas secc. Incarnatae) (Epling, 1939). A pesar de que la filogenia que aquí se muestra no está completamente resuelta, es interesante notar que especies de una misma sección pueden presentar estructuras similares a especies de otras secciones; éste es el caso de *S. fulgens* (sección Fulgentes), que presenta un nectario similar al de *S. elegans* y *S. cinnabarina* (secc. Incarnatae); o la similitud entre *S. purpurea* (secc. Polystachya) y *S. mexicana* (secc. Briquetia). En este último caso *S. purpurea* es más similar a *S. mexicana* incluso que otros miembros de la secc. Polystachya. Asimismo, los nectarios de *S. lavanduloides* (secc. Angulatae) y *S. longispicata* (secc. Lavanduloideae) son similares a pesar de estar en secciones diferentes. Lo anterior muestra que los nectarios no son estructuras conservadas a este nivel taxonómico, lo cual coincide con lo registrado anteriormente por varios autores (Vesprini *et al.*, 1999; Galetto y Bernardello, 2004). Además, esta variación entre especies de la misma sección sugiere que los NE son un rasgo que depende del contexto ecológico. No obstante, es posible que la diversidad de nectarios no se deba únicamente a la relación con los polinizadores, sino también a factores genéticos y climáticos (Petanidou, 2007).

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se formulan las siguientes conclusiones:

1. Existe variación en la estructura de los nectarios florales de las salvias estudiadas, la cual es provocada por las diferencias en la presencia de estomas y tricomas entre las diferentes especies. Las salvias polinizadas por abejas tienden a tener una alta presencia de tricomas glandulares, los cuales pueden secretar tanto azúcares como aceites; mientras que las polinizadas por colibríes presentan una mayor cantidad de estomas que liberan azúcares.
2. Durante la ontogenia, el disco nectarífero y los tricomas glandulares se desarrollan desde etapas tempranas, mientras que la proyección del disco y los estomas se desarrollan en pre-antesis.
3. Kumari (1986) planteó la hipótesis de que la proyección del disco nectarífero era un carácter derivado dentro de la familia Lamiaceae debido a que las especies basales de este grupo no la presentan. El desarrollo de dicha estructura coincide con esta hipótesis.
4. La estructura que da origen a la proyección del disco nectarífero es el receptáculo, lo cual apoya la hipótesis planteada por Fahn (1952, 1953) acerca del origen de esta estructura.
5. Los resultados obtenidos apuntan a una relación entre la estructura del nectario y los polinizadores. Sin embargo, se requiere un estudio que comprenda más especies debido a que el tamaño de muestra es limitado, considerando que se estudiaron diez especies de las aproximadamente 500 que componen al subgénero *Calosphace*.

## PERSPECTIVAS DE ESTUDIO

De acuerdo con la experiencia obtenida en este estudio, se formulan las siguientes perspectivas de estudio:

1. El presente estudio permitió conocer que hay azúcares y lípidos en el néctar, por lo que el siguiente paso sería conocer cuáles son, lo que podría hacerse a partir de un análisis con cromatografía de gases o de capa fina.
2. Diversos grupos han estudiado las transiciones de un polinizador a otro, en específico de abejas a aves y se espera encontrar generalidades al respecto. Los géneros más estudiados han sido *Penstemon*, *Mimulus*, *Costus*, *Aquilegia*, *Silene*, *Ipomoea* y *Salvia*. Sin embargo, los atributos de los nectarios no se han tomado en cuenta, por lo que sería interesante buscar patrones relacionados con éstos, a fin de conocer su importancia en la interacción con polinizadores, vinculada con su capacidad de cambio evolutivo.

## LITERATURA CITADA

1. ADLER, L.S. 2000. The ecological significance of toxic nectar. *Oikos* 91: 409–420.
2. ASCENSAO, L., N. MARQUES y M.S. PAIS. 1995. Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). *Annals of Botany* 75: 619-626.
3. BAKER, H.G. e I. BAKER. 1973. Amino acids in nectar and their evolutionary significance. *Nature* 241: 543-545.
4. BAKER, H.G. e I. BAKER. 1983a. A brief historical review of the chemistry of floral nectar. En: Bentley B. y T. Elias [Eds.], *The biology of nectaries*, 126–152. Columbia University Press, Nueva York.
5. BAKER, H.G. e I. BAKER. 1983b. Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. En: Jones C.E. y R.J. Little [Eds.], *Handbook of experimental pollination biology*, 117–141. Van Nostrand Reinhold, Nueva York.
6. BAKER, H.G. e I. BAKER. 1986. The occurrence and significance of amino acids in floral nectar. *Plant Systematics and Evolution* 151: 175-186.
7. BAUM, S.F., Y. ESHED y J.L. BOWMAN. 2001. The *Arabidopsis* nectary is an ABC independent floral structure. *Development* 128: 4657–4667.
8. BENITEZ-VIEYRA, S., J. FORNONI, J. PÉREZ-ALQUICIRA, K. BOEGE y C.A. DOMÍNGUEZ. 2014. The evolution of signal–reward correlations in bee and hummingbird-pollinated species of *Salvia*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281: 20132934.
9. BENTLEY, B. y T. ELIAS. 1983. *The biology of nectaries*. Columbia University Press, Nueva York.
10. BERNARDELLO, L.M., L. GALETTO y H.R. JULIANI. 1991. Floral nectar, nectary structure and pollinators in some Argentinean Bromeliaceae. *Annals of Botany* 67: 401–411.
11. BERNARDELLO, G. 2007. A systematic survey of floral nectaries. En: Nicolson, S.W., M. Nepi, y E. Pacini [Eds.], *Nectaries and nectar*, 19–128. Springer, Dordrecht.
12. BONNIER, G. 1879. Les nectaires. Étude critique, anatomique, et physiologique. *Annales des Sciences Naturelles* 6(8): 5-212.
13. BROWN, W.H. 1938. The bearing of nectaries on the phylogeny of flowering plants.

- Proceedings of the American Philosophical Society* 79: 549-596.
14. CHWIL, M. 2009. Flowering biology and nectary structure of *Melissa officinalis* L. *Acta Agrobotanica* 62(2): 23-30.
  15. CLASSEN-BOCKHOFF, R. 2007. Floral construction and pollination biology in the Lamiaceae. *Annals of Botany* 100(2): 359–360.
  16. CLASSEN-BOCKHOFF, R., M. CRONE y E. BAIKOVA. 2012. Stamen development in *Salvia* L.: homology reinvestigated. *International Journal of Plant Sciences* 165(4): 475–498.
  17. CORBET, S.A. y E.S. DELFOSSE. 1984. Honeybees and the nectar of *Echium plantagineum* L. in South-Eastern Australia. *Australian Journal of Ecology* 9: 125–139.
  18. CORNEJO-TENORIO, G. y G. IBARRA-MANRÍQUEZ. 2011. Diversidad y distribución del género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 1279-1296.
  19. CRUDEN, R., S. HERMANN y S. PETERSON. 1983. Patterns of nectar production and plant- pollinator coevolution. En: Bentley, B. y T. Elias [Eds.], *The biology of nectaries*, 80- 125. Columbia University Press, Nueva York.
  20. DAFNI, H., Y. LENSKY y A. FAHN. 1988. Flower and nectar characteristics of nine species of Labiatae and their influence on honeybee visits. *Journal of Apicultural Research* 27 (2): 103- 114.
  21. DAVIS, A., J. PYLATUIK, J. PARADIS y N. LOW. 1998. Nectar-carbohydrate production and composition vary in relation to nectary anatomy and location within individual flowers of several species of Brassicaceae. *Planta* 205: 305-318.
  22. DE LA BARRERA, E. y P.S. NOBEL. 2004. Nectar: properties, floral aspects, and speculations on origin. *Trends in Plant Science* 9: 65-69.
  23. DELPINO, F. 1875. Rapporti tra insetti e tra nettari estranuziali in alcune piante (Firenze). *Bollettino della Societa Entomologica Italiana* 7: 69-90.
  24. EPLING, C. 1939. A revision of *Salvia* subgenus *Calosphace*. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetalis* 110:1- 383
  25. FAEGRI, K. y L. VAN DER PIJL. 1979. *The principles of pollination ecology*, tercera edición. Pergamon Press, Oxford.
  26. FAHN, A. 1952. On the structure of floral nectaries. *Botanical Gazette* 113(4): 464-470.
  27. FAHN, A. 1979. *Secretory tissues in plants*. Academic Press, Londres.
  28. FAHN, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist* 108: 229–257



29. FEINSINGER, P. 1978. Ecological interactions between plants and humming- birds in a successional tropical community. *Ecological Monographs* 6: 105–128.
30. FENSTER, C.B., W.S. ARMBRUSTER, P. WILSON, M. DUDASH y J.D. THOMSON. 2004. Pollination and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35(2004): 375–403.
31. FREEMAN, C.E, R.D. WORTHINGTON y M.S. JACKSON. 1991. Floral nectar sugar compositions of some South and Southeast Asian species. *Biotropica* 23: 568–574
32. GALETTO, L. y G. BERNARDELLO. 2004. Floral nectaries, nectar production dynamics and chemical composition in six *Ipomoea* species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. *Annals of Botany* 94(2): 269–80.
33. GONZÁLEZ-TEUBER, M. y M. HEIL. 2009. Nectar chemistry is tailored for both attraction of mutualists and protection from exploiters. *Plant Signaling and Behavior* 4(9): 809-813.
34. HEIL, M., T. KOCH, A. HILPERT, B. FIALA, W. BOLAND y K.E. LINSENMAIR. 2001. Extrafloral nectar production of the ant-associated plant, *Macaranga tanarius*, is an induced, indirect, defensive response elicited by jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 1083–1088.
35. HEIL, M. 2011. Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in Plant Science* 16 (4): 191-200.
36. HERRERA, C.M. y O. PELLMYR. 2002. Plant-animal interactions: an evolutionary approach. Blackwell Science, Oxford.
37. HOBBAHN, N., S.D. JOHNSON, B. BYTEBIER, E.C. YEUNG y L.D. HARDER. 2013. The evolution of floral nectaries in *Disa* (Orchidaceae: Disinae): recapitulation or diversifying innovation?. *Annals of Botany* 112(7): 1303-19.
38. IRWIN, R.E. y L.S. ADLER. 2008. Nectar secondary compounds affect self-pollen transfer: implications for female and male reproduction. *Ecology* 89: 2207–2217.
39. KARTASHOVA N. 1960. Some data on the morphology of the flower of the Labiatae. *Botanicheskii Zhurnal* 45: 109-114.
40. KRAM, B.W., W.W. XU y C.J. CARTER. 2009. Uncovering the *Arabidopsis thaliana* nectary transcriptome: investigation of differential gene expression in floral nectariferous tissues. *BMC Plant Biology* 9: 92.
41. KRAM, B.W. y C.J. CARTER. 2009. *Arabidopsis thaliana* as a model for functional nectary analysis. *Sexual Plant Reproduction* 22: 235–246.
42. KUMARI, S. 1986. Evolution of floral nectary in Lamiaceae. *Proceedings of the Indian*

- Academy of Science* 96(4): 281–288.
43. LEE, J.Y., S. F. BAUM, S.H. OH, C.Z. JIANG, J.C. CHEN y J.L. BOWMAN. 2005. Recruitment of CRABS CLAW to promote nectary development within the eudicot clade. *Development* 132(22): 5021–5032.
  44. LINNAEUS, C. 1735. *Systema naturae*. Lugduni Batavorum, Leyden.
  45. LORCH, J. 1978. The discovery of nectar and nectaries and its relation to views on flowers and insects. *Isis* 69: 514–533.
  46. NARBONA, E. y R. DIRZO. 2010. A reassessment of the function of floral nectar in *Croton suberosus* (Euphorbiaceae): a reward for plant defenders and pollinators. *American Journal of Botany* 97(4): 672-679.
  47. NEPI, M. Nectar structure and ultrastructure. 2007. En: Nicolson, S.W., M. Nepi y E. Pacini [Eds.]. *Nectaries and nectar*, 129-166. Springer, Dordrecht.
  48. NICOLSON, S. 1995. Direct demonstration of nectar reabsorption in the flowers of *Grevillea robusta* (Proteaceae). *Functional Ecology* 9: 584-588.
  49. NICOLSON, S., M. NEPI y E. PACINI. 2007. *Nectaries and Nectar*. Springer, Dordrecht.
  50. NOGUEIRA, A., P.J. REY y L.G. LOHMANN. 2012. Evolution of extrafloral nectaries: adaptive process and selective regime changes from forest to savanna. *Journal of Evolutionary Biology* 25(11): 2325–40.
  51. ORNELAS, J.F., M. ORDANO, A.J. DE-NOVA, M.E. QUINTERO y T. GARLAND. 2007. Phylogenetic analysis of interspecific variation in nectar of hummingbird-visited plants. *Journal of Evolutionary Biology* 20(5): 1904–1917.
  52. PACINI, E. y S.W. NICOLSON. 2007. Introduction. En: Nicolson, S.W., M. Nepi y E. Pacini [Eds.], *Nectaries and nectar*, 1-18. Springer, Dordrecht.
  53. PETANIDOU T., V. GOETHALS y E. SMETS. 2000. Nectary structure of Labiatae in relation to their secretion and characteristics in a Mediterranean shrub community: does flowering time matter?. *Plant Systematics and Evolution* 225: 103–118.
  54. PETANIDOU, T. 2007. Ecological and evolutionary aspects of floral nectars in Mediterranean habitats. En: Nicolson, S.W., M. Nepi y E. Pacini [Eds.], *Nectaries and nectar*, 343-375. Springer, Dordrecht.
  55. PROCTOR, M., P. YEO y A. LACK. 1996. *The natural history of pollination*. Harper-Collins, Londres.
  56. RADHIKA, V., C. KOST, W. BOLAND y M. HEIL. 2010. The role of jasmonates in floral nectar secretion. *PLoS ONE* 5(2): e9265.
  57. RAMAMOORTHY, T.P. 1984. Notes on *Salvia* (Labiatae) in Mexico, with three new

- species. *Journal of the Arnold Arboretum* 65: 135-143.
58. RAMAMOORTHY, T.H. y P. TENORIO. 1991. Floral visitors and their behavior to sympatric *Salvia* species (Lamiaceae) in Mexico. *Acta Botánica Mexicana* 13: 75-83.
59. RAMAMOORTHY, T.P. 2001. *Salvia* L. En: G. Calderón de Rzedowski y J. Rzedowski [Eds.], Flora fanerogámica del Valle de México, 632-644. Instituto de Ecología, Pátzcuaro.
60. RACHMILEVITZ, T. y A. FAHN. 1975. The floral nectary of *Tropeolum majus* L.—the nature of the secretory cells and the manner of nectar secretion. *Annals of Botany* 39(4): 721-728.
61. RAO, V.S. 1971. The disk and its vasculature in the flowers of some dicotyledons. *Botany Noticer* 124: 442-450.
62. SCHMID, R. 1988. Reproductive versus extra-reproductive nectaries historical perspective and terminological recommendations. *The Botanical Review* 54(2): 179-227.
63. THOMSON, J.D. y P. WILSON. 2008. Explaining evolutionary shifts between bee and hummingbird pollination: convergence, divergence, and directionality. *International Journal of Plant Sciences* 169(1): 23-38.
64. VÁZQUEZ NIN G. y O. ECHEVERRÍA. 2000. Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Fondo de Cultura Económica, Ciudad de México.
65. VILLAMIL, N., J. MÁRQUEZ-GUZMÁN y K. BOEGE. 2013. Understanding ontogenetic trajectories of indirect defence: ecological and anatomical constraints in the production of extrafloral nectaries. *Annals of botany* 112(4): 701-9.
66. VESPRINI, J.L., M. NEPI y E. PACINI. 1999. Nectary structure, nectar secretion patterns and nectar composition in two *Helleborus* species. *Plant Biology* 1: 560–568.
67. WALKER, J.B., K.J. SYTSMA, J. TREUTLEIN y M. WINK. 2004. *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. *American Journal of Botany* 91(7): 1115-25.
68. WEBERLING, F. 1989. Morphology of flowers and inflorescences. Cambridge University Press, Cambridge.
69. WESTER, P. y R. CLASSEN-BOCKHOFF. 2007. Floral diversity and pollen transfer mechanisms in bird-pollinated *Salvia* species. *Annals of Botany* 100(6): 1381–1381.
70. WESTER, P. y R. CLASSEN-BOCKHOFF. 2011. Pollination syndromes of new world

*Salvia* species with special reference to bird pollination. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 98(1): 101-155.