



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**VARIACIÓN EN LA ANATOMÍA DE ESTRUCTURAS
SECRETORAS DE NÉCTAR EN SALVIA Y SU
RELACIÓN CON LOS SÍNDROMES DE
POLINIZACIÓN**

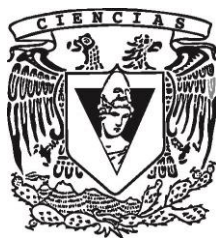
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA :

ESMERALDA SANDOVAL BENÍTEZ



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. JUAN ENRIQUE FORNONI AGNELLI**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX
2019**

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.



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.

1. Datos del alumno:

Sandoval
Benítez
Esmeralda
55 36 71 80 61
Universidad Nacional Autónoma de
México
Facultad de Ciencias
Biología
310225128

2. Datos del tutor:

Dr.
Juan Enrique
Fornoni
Agnelli

3. Datos del sinodal 1:

Dra.
Guadalupe Judith
Márquez
Guzmán

4. Datos del sinodal 2:

Dra.
Martha Juana
Martínez
Gordillo

5. Datos del sinodal 3:

M. en C.
Itzi
Fragoso
Martínez

6. Datos del sinodal 4:

Dra.
María del Coro
Arizmendi
Arriaga

7. Datos del trabajo escrito:

Variación en la anatomía de
estructuras secretoras de néctar en
Salvia y su relación con los síndromes
de polinización.
pp. 43
2019

Y así, si usted quiere formular la pregunta de todos los tiempos (¿por qué existen los seres humanos?), una parte principal de la respuesta [...] debe ser: «Porque Pikaia sobrevivió a la diezmación de Burgess Shale». Esta respuesta no menciona ni una sola ley de la naturaleza; no incorpora afirmación alguna sobre rutas evolutivas previsibles, ningún cálculo de probabilidades basado en reglas generales de anatomía o de ecología. La supervivencia de Pikaia fue una contingencia de la «simple historia». No creo que se pueda dar una respuesta «superior», y no puedo imaginar que ninguna resolución pueda ser más fascinante. Somos la prole de la historia, y debemos establecer nuestros propios caminos en el más diverso e interesante de los universos concebibles: un universo indiferente a nuestro sufrimiento y que, por lo tanto, nos ofrece la máxima libertad para prosperar, o para fracasar, de la manera que nosotros mismos elijamos.

Wonderful Life by Stephen Jay Gould.

*Para Reyna Benítez, que nunca me ha dejado creer en imposibles.
Para Consuelo Escobar, quien me enseñó la belleza de las flores.*

Agradecimientos

A mis extraordinarios y admirables tutores, sin los que este proyecto no podría existir. Al Dr. Juan Fornoni por enseñarme con amabilidad y rigor los requerimientos de la investigación científica. Por su apoyo, paciencia y accesibilidad para ayudarme a introducir en el proyecto una herramienta novedosa y poco utilizada como lo es el modelado 3D; mi artista interior está feliz con el resultado. A la Dra. Judith Márquez, sin usted no estoy segura de qué estaría haciendo en este momento, me alentó y guio cuando más lo necesitaba; sus palabras, consejos y la alegría con la que realiza su labor siempre perdurarán en mí.

A todos mis compañeros en el Laboratorio de Interacciones Planta-Animal: "Holi" con H. Ustedes son de las personas más dinámicas, creativas, alegres y perseverantes que he tenido la dicha de conocer. Los admiro mucho y les guardo cariño. Gracias a Lupita, Marina y Michelle por aconsejarme cuando lo he necesitado, levantarme el ánimo cuando ha caído y compartirme sus experiencias de vida; valoro mucho su confianza. A Matías, Aimé y Paco por siempre amenizar los días y hacerme reír.

A la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias por su apoyo con la toma de fotografías en el MEB, sus siempre divertidas charlas sobre cine y todos los consejos de vida que compartimos en cada una de las sesiones. A la Dra. Rocío Santos Gally por su carisma y eterna buena vibra, por su ayuda con la aplicación estadística, por enseñarme con paciencia lo necesario para obtener los resultados aquí presentes. Por cuidaravecillas perdidas. A M. en C. Rubén Pérez Ishiwara por el apoyo logístico y acompañarme en mi primer colecta de salvas, porque en el laboratorio nunca faltan los bocadillos.

A los miembros que conforman mi jurado; Dra. Martha Martínez, M. en C. Itzi Fragoso y Dra. María del Coro Arizmendi por sus valiosos comentarios y sugerencias sobre el presente trabajo.

A Martha Martínez por acercarme a la botánica en mis primeros semestres en la Facultad de Ciencias, por sus clases amenas, didácticas, estrictas y muy enriquecedoras.

Agradezco enormemente a Sergio García por su enseñanza, paciencia y gran ayuda fuera del aula con los softwares para modelar en 3D.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT - CB-2009/123404), al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Universidad Nacional Autónoma de México (PAIT IN-211314, Folio 009518) y al "Programa Sistema Nacional de Investigadores" por los recursos otorgados (CONACyT - 16711).

A Reyna Benítez por ser todo lo que he necesitado en mi vida; una excelente amiga, heroína, abogada y madre. Por ayudarme a enfrentar cada miedo y cumplir cada meta. Por nunca rendirse pese a las complicaciones y, enseñarme así, que la vida se enfrenta con paciencia, constancia y dando lo mejor de sí. Gracias por guiarme, motivarme e impulsarme a ser la mejor versión de mí misma. A mi abuelita, Consuelo Escobar, por ser mi segunda madre, por cuidarme y siempre protegerme. Porque es, para mí, la más grande figura de amor y respeto existente. Porque con sus jardines y sus conocimientos empíricos de botánica comenzó mi apreciación por la naturaleza.

A mis tíos: Melania, Nicolás y Leticia por el apoyo y cariño constante. A mis primos: Cinthya, Aldo y Alejandro por crecer juntos y ser, para mí, como hermanos.

A Guillermo Alexis Castro por hacerme ver la importancia de la resiliencia y de los abrazos. Por el apoyo constante que no ha mermado en ningún momento desde que nuestras vidas se enlazaron. Por el cariño, los jitomates y las gelatinas. Gracias por ser y por estar. *Vamos por más, compañero.*

A mis amigos. A Adriana Rodríguez por estar en mi vida desde el primer día en la Facultad, porque, pese a nuestras personalidades diferentes y contrastantes, siempre hemos cultivado la amistad, la comprensión y el apoyo. A Sofía Mendoza por el sin fin de risas que alegran cualquier momento, por todo lo vivido que siempre será un buen recuerdo. A Amílcar Amaya por las tazas de café, películas y buenas historias. A Lourdes Martín porque juntas siempre somos más valientes. A Sandy, Alan, Zoe, Lugo, Julio, Óscar y todos mis amigos de la Facultad de Ciencias con los que pasé una de las mejores etapas de mi vida. A Ethel, Karla, Arely y Pao por apoyarme cuando todo parecía más difícil, por cuidarme y alentarme. Porque nunca falten motivos para celebrar.

A las increíbles personas que conocí en UNIVERSUM, ustedes mejoraron todo. A Jojo, Ethan, César, Mario, Patsy y Fabiola por las risas y buenos momentos. A Milo por su amabilidad, consejos, tiempo, ánimo y cariño.

A mis amigas ñoñas: Mariana, Italia, Mónica, Itzel, Aria, Liliana, Chris, Mit y Alexa. Sin importar las distancias o los tiempos, ustedes son un motor apacible en mi vida.

Durante el desarrollo de este proyecto sané, reí, aprendí, crecí. Siempre estaré agradecida con cada una de las personas que me han acompañado a lo largo de esta etapa personal y académica.

Tabla de contenido

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
MATERIAL Y MÉTODO	17
Sistema de estudio	17
Descripción anatómica del nectario	19
Obtención, fijación y preservación del material vegetal	20
Micromorfología del nectario	22
Procesamiento de muestras y observación en el MEB.....	22
Reconstrucción de Modelos 3D	22
Filogenia empleada	23
Reconstrucción de estados ancestrales	24
Análisis comparado	24
Correlaciones filogenéticas	25
RESULTADOS	26
Micromorfología del nectario	26
Reconstrucción de estados ancestrales	29
Análisis comparado	30
Correlaciones filogenéticas	31
DISCUSIÓN	33
LITERATURA CITADA	36

Resumen

La presencia de diferentes síndromes de polinización en plantas, refleja la evolución convergente de rasgos florales mediada por las presiones de selección impuestas por los vectores de polen. El tamaño de las flores, su forma, junto con el color, la emisión de fragancias, la composición de azúcares y la producción de néctar son de los rasgos que muestran patrones convergentes de evolución durante las transiciones entre síndromes de polinización. Dichos cambios suponen ajustes funcionales entre especies cercanas filogenéticamente. La frecuente transición evolutiva de la melitofilia a la ornitofilia se asocia con un aumento en el tamaño de la corola, una forma más tubular, patrones de coloración rojizos y una mayor producción de néctar más diluido que sus ancestros melitófilos. Dado que un incremento en el tamaño de la flor podría generar un aumento en el tamaño del nectario, la mayor producción de néctar podría deberse a un efecto correlativo. En este estudio se puso a prueba esta hipótesis utilizando un grupo monofilético del género *Salvia*, subgénero *Calosphace* (de aquí en adelante "Calosphace"), que presenta repetidas transiciones evolutivas de la melitofilia a la ornitofilia. Si la evolución de la ornitofilia a partir de ancestros melitófilos involucró un incremento en la producción de néctar, se espera observar un aumento en la superficie del área de secreción de azúcares, en la flor, independiente de la variación en el tamaño de la corola o un incremento alométrico del tamaño de los nectarios asociado a los cambios en el tamaño floral.

Calosphace es un grupo monofilético dentro del género *Salvia*, y cuenta con un marco filogenético robusto a nivel molecular. En este estudio se utilizaron 10-15 pares de especies con transiciones entre la melitofilia y la ornitofilia (27 especies de Argentina, Bolivia y México), y se evaluó si dicha transición se asoció con modificaciones estructurales/anatómicas en el nectario para determinar si ocurrieron cambios cualitativos/cuantitativos durante la especiación. En primera instancia se caracterizaron las estructuras secretoras de néctar con imágenes de microscopio electrónico de barrido para conocer la distribución y variación estructural de los nectarios florales, así como sus estructuras de secreción. En segundo lugar se realizaron reconstrucciones en 3D de los nectarios florales para estimar el volumen del área de las zonas de secreción y se aplicó el método filogenético comparado para poner a prueba la hipótesis propuesta.

Los resultados revelaron una gran variación, entre especies, en la ubicación y densidad de estructuras secretoras. Las principales diferencias entre las especies se observaron en la superficie de los nectarios y en la presencia/ausencia de tricomas glandulares y estomas modificados para la secreción de néctar. El análisis comparado reveló una correlación significativa entre la superficie del nectario y el síndrome de polinización, independiente de los cambios observados en el tamaño de la corola. Aun cuando el tamaño de la flor se incrementó durante la transición hacia la ornitofilia, los cambios en los nectarios parecen haber ocurrido primero. Esto apoya una de las explicaciones propuestas, confirmando que la transición a la ornitofilia involucró un aumento en la producción de néctar asociado con un incremento en el tamaño de los nectarios.

Introducción

La "convergencia evolutiva" es un fenómeno que se ha observado en todos los niveles de organización biológica, desde la regulación transcripcional en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* (Conant *et al.*, 2003), hasta la forma del cuerpo de tiburones y atunes (Donley *et al.*, 2004). Cuando dos o más especies derivadas de diferentes ancestros se parecen fenotípicamente y su parecido se relaciona con un escenario ecológico similar, se considera que dichas especies han evolucionado de manera convergente (Mayr, 1997; Shubin *et al.*, 1997; Gould, 2002). Bajo esta definición, se supone que las semejanzas han sido resultado de presiones de selección similares impuestas por los mismos agentes, mientras que sus diferencias reflejan los efectos históricos a los que ha estado sujeto cada linaje (Conant *et al.*, 2003). La ocurrencia repetida de transiciones evolutivas durante la evolución, que resulta en patrones de convergencia ante un mismo escenario ecológico han permitido identificar las fuerzas selectivas que han moldeado al fenotipo durante la evolución (Barrett, 2008; Stern, 2013). La historia evolutiva de la interacción entre las plantas y sus polinizadores ilustra claramente la convergencia que se observa entre ciertos rasgos del diseño de las flores (morfología y función) y los diferentes grupos funcionales de polinizadores (Sanmartin-Gajardo y Sazima, 2005).

La hipótesis de *Síndromes de Polinización* propuesta por Delpino (1867), Faegri, Van der Pijl (1979) y Proctor *et al.* (1996) formaliza la observación recurrente de convergencia simultánea de varios rasgos reproductivos, en plantas, como resultado de las presiones de selección impuestas por los vectores bióticos de polen. En la Tabla 1 se sintetizan las

características convergentes de las flores polinizadas por un mismo grupo funcional (i.e., abejas, aves, murciélagos, mariposas nocturnas, etc.), y los rasgos de los polinizadores que actúan como presión de selección (Brown y Kudric-Brown, 1979; Espino *et al.*, 2014). Dicha hipótesis predice que, a nivel macroevolutivo, las especies pertenecientes a diferentes linajes deberían presentar similitudes (convergencia) en los rasgos fenotípicos de las flores si comparten las mismas presiones de selección que ejercen sus polinizadores. Por lo tanto, el grupo de polinizadores más eficiente en la transferencia de polen, entre plantas, debería constituir la presión de selección dominante sobre el fenotipo floral (Stebbins, 1970; Fenster *et al.*, 2004), lo que no necesariamente implica la exclusión de otros polinizadores (Rosas-Guerrero *et al.*, 2014).

Tabla 1. Principales características de los síndromes de polinización biótica.

Sintetizado de Faegri y van der Pijl, (1979, capítulo 11); Proctor *et al.*, (1996) y Ollerton *et al.*, (2009).

Síndrome de polinización	Características del grupo funcional de polinizadores.	Características de las flores.
Cantarofilia (Escarabajos)	Vida mayormente diurna. Boca adaptada para recoger polen. No son insectos muy cooperativos en la polinización, ya que su estructura corporal es dura y su comportamiento torpe. Vuelo poco eficiente. Consumen principalmente polen. Sentido del olfato desarrollado.	Antesis diurna y nocturna. Unidades de polinización con pocas atracciones visuales, no especiales, sin forma definida, sin efecto de profundidad, sin guía de néctar, generalmente grandes, planas, cilíndricas o en forma de cuenco, a veces cerrado. Suelen incluir trampas. Órganos sexuales expuestos. Colores opacos, con frecuencia verdosos o blanquecinos. Polen abundante. Néctar escaso y de fácil acceso. Fuerte fragancia afrutada o aminoide.
Miofilia (Moscas)	Vida diurna. Animales pequeños que no cargan mucho polen. Probóscide larga o corta. Preferencia sobre coloraciones amarillas y marrón-purpúreas (si se asocian con una fragancia proteica). Bajos requerimientos energéticos.	Antesis diurna. Flor regular, simple, sin efecto de la profundidad, colores generalmente claros, pero opacos. Guías de néctar presentes. Olor imperceptible. Néctar accesible y escaso. Órganos sexuales expuestos.
Himenópteros (Avispas)	Vida diurna. Aparato bucal tipo masticador, frecuentemente adaptado para lamer el néctar de las flores. Presentan lenguas cortas y planas. Dieta mixta.	Antesis diurna. Flores de apariencia variada, algunas utilizan técnicas de engaño (orquídeas). Nectarios extraflorales de fácil acceso. Colores opacos; marrones. Brillo del labelo (en orquídeas).
Melitofilia (Abejas)	Vida diurna. Su estructura social y diferencias psicológicas hacen que recolecte más alimento del necesario para su metabolismo. Presentan pelos. Buen sentido del olfato y de la vista, aunque presentan ceguera al color rojo. Probóscide generalmente larga.	Antesis diurna. Flores zigomorfas, menos diseccionadas, semicerradas o abiertas, con gran efecto de profundidad y rampa de aterrizaje. Órganos sexuales ocultos. Guías de néctar presentes. Pocos estambres, muchos óvulos. Olores frescos y sutiles. Colores vivos, variando entre tonos de azul, blanco y amarillo.

		Néctar concentrado, escondido a poca profundidad y en cantidades moderadas.
Psicofilia (mariposas)	Vida diurna. Sentido olfativo débil. Suelen posarse en el margen de las flores para alimentarse. Tienen quimiorreceptores en las patas, el polen se adhiere a ellas. Probóscide larga. Se alimentan por succión. Bajos requerimientos energéticos. Sentido visual bien desarrollado, incluye el rojo. Preferencia por las marcas de guía.	Antesis diurna, no cierra en la noche. Fragancias débiles, generalmente frescas. Flor erecta, radial, en forma de trompeta, borde generalmente plano, pero a menudo estrecho (rampa de aterrizaje); anteras fijas. Tubo estrecho y largo en donde se esconde el néctar. Su gama de colores incluye tonos de rojo y azules. Poco fragantes. Guías de néctar simples.
Esfingofilia (polillas)	Vida crepuscular o nocturna. Alta tasa metabólica. Suelen flotar mientras consumen néctar. Sensible a los colores de noche. Buen sentido del olfato. Probóscide larga. El polen se adhiere a su cabeza y a la probóscide.	Antesis nocturna. Néctar abundante y oculto. Labelo ausente o doblado hacia atrás. Coloraciones tenues, como el blanco. Fragancias abrumadoras. Forma tubular y estrecha. Anteras versátiles (no fijas).
Ornitofilia (aves)	Vida diurna. En el caso de los colibríes: Ojos ciegos a la gama de colores uv, sistema visual sensible para tonalidades de rojos. Muy grandes para posarse en la flor. Pico duro, grande y largo. Olfato nulo. Grandes consumidores.	Antesis diurna. Colores vívidos, frecuentemente escarlata. Forma tubular, zigomórfica, colgante, labio/margen ausente o curvado hacia atrás. Flores resistentes, ovario protegido, tubo o espolón profundo. Sin fragancia. Néctar abundante y almacenado.
Quiropterofilia (murciélagos)	Vida nocturna. Ojos grandes con buena visión para objetos cercanos, daltónicos. Buen sentido del olfato para orientarse a la lejanía. Glándulas que reaccionan con olores rancios. Mamíferos con pulgares y garras. Metabolismo eficiente. El polen es su única fuente de proteína. Sonar poco eficiente en zonas con aglomeración de obstáculos.	Antesis nocturna. Flores grandes, robustas, en forma de garganta. Colores blanquecinos o cremosos, como gris, verde, púrpura, rosa. Fuerte olor añejo (similar a la fermentación). Flores grandes y resistentes o inflorescencias (en forma de pincel) de flores pequeñas. Néctar muy abundante. Grandes cantidades de polen. Posiciones elevadas, lejos del follaje.

La sincronía entre flores y polinizadores es particularmente visible en flores visitadas por abejas (melitófilas), las primeras presentan una estructura abierta y un plano zigomorfo, coloraciones que fluctúan desde el amarillo hasta el azul (pasando por el blanco), guías de néctar ultravioletas y poseen una proporción mayor de sacarosa o hexosas en la composición del néctar, el cual se encuentra muy concentrado y almacenado en cantidades pequeñas (Torres y Galetto, 1998; Dieringer *et al.*, 1991; Roy *et al.*, 2017). Por otro lado, las flores polinizadas por aves (ornitófilas) son más grandes, presentan corolas tubulares de colores rojizos, no tienen fragancias perceptibles, y producen grandes cantidades de néctar diluido, con abundante proporción de sacarosa (Torres y Galetto, 1998; Nicolson *et al.*, 2007; Dieringer *et al.*, 1991; Roy *et al.*, 2017). La consistencia de estos patrones con el tipo de polinizador, depende del nivel de especialización del sistema de polinización, por lo que las especies de plantas generalistas (i.e., visitadas por diferentes tipos de polinizadores) presentan combinaciones de rasgos que no se ajustan a los síndromes descritos anteriormente (Ollerton *et al.*, 2009). La transición evolutiva más

común entre los síndromes de polinización ha sido de melitofilia a ornitofilia (43 transiciones registradas en 12 géneros: *Mimulus*, *Calceolaria*, *Antirrhineae*, *Costus*, *Lotus*, *Schizanthus*, *Ruellia*, *Nasa*, *Aquilegia*, *Penstemon*, *Ipomoea* y *Schoenocephalum*), lo que en varias ocasiones corresponde con el origen y diversificación de las abejas durante el Cretácico y, posteriormente, de las aves que se alimentan de néctar en el Oligoceno (Rosas-Guerrero *et al.*, 2014). En algunos casos se han observado reversiones de la ornitofilia a la melitofilia (Ashworth *et al.*, 2015; Castellanos *et al.*, 2004; Fragoso-Martínez *et al.*, 2018), sugiriendo que los cambios evolutivos entre estos síndromes son reversibles.

Varias décadas después de la aparición de la hipótesis de los síndromes de polinización, la acumulación de filogenias ampliamente muestreadas en varios linajes de plantas y el desarrollo de las herramientas del método comparado en biología evolutiva, han permitido probar estadísticamente las predicciones de dicha hipótesis (Rosas-Guerrero *et al.*, 2014; Ibáñez *et al.*, 2019). Whittall y Hodges (2007) reportan que el género *Aquilegia* (Ranunculaceae) ha tenido una radiación reciente y rápida, dando lugar a cambios puntuados en la longitud de los espolones que contienen néctar y cuya longitud está asociada con la morfología del pico y la lengua de los polinizadores con los que interactúan las diferentes especies. Además, encontraron dos transiciones evolutivas de abejorro a colibrí y cinco de colibrí a polilla, sin reversiones, obteniendo una alta coincidencia en la evolución de la longitud del espolón con los cambios de polinizador. Por otro lado, Smith *et al.* (2008) reportan un patrón en la abertura de las flores y el volumen de néctar contenido en flores de especies del género *Lochroma* (Solanaceae), de acuerdo con el polinizador que más visita cada especie; las flores con apertura grande del tubo y una vasta recompensa de néctar son las que tienen más probabilidad de ser visitadas por colibríes. Sin embargo, los rasgos de longitud de la corola y el color de la flor, no se ajustan a lo esperado para cada grupo funcional de polinizadores. Rosas-Guerrero *et al.* (2014) realizaron la primera revisión sistemática que sintetiza la evidencia empírica obtenida de investigaciones acumuladas a lo largo del tiempo, demostrando cuantitativamente que la evolución floral es impulsada por la adaptación convergente al grupo de polinizadores más eficientes, sobre todo en especies de plantas dependientes de polinización biótica y de regiones tropicales (posiblemente debido a que los nichos ecológicos son más estrechos).

Los estudios poblacionales han aportado evidencia sobre los rasgos que son seleccionados por los diferentes polinizadores y que explicarían las diferencias entre

especies con diferentes tipos de polinizador. Campbell *et al.*, (1989 y 1996) reportan una preferencia de los colibríes sobre las flores de *Ipomopsis aggregata* (resultando en una mayor tasa de visita), ya que su producción de néctar es mayor (y satisface su demanda energética) en contraste con *Ipomopsis tenuituba*. Además, encontraron que el comportamiento del colibrí ejerce selección direccional, favoreciendo una intensa coloración roja y tubos de corola anchos, lo que le permite al cuerpo del ave acceder a la recompensa de manera más eficiente. En *Salvia digitaloides* (subgénero *Glutinaria*), una planta polinizada por tres especies de abejorros, se comprobó que el tamaño y la forma de la entrada de la corola manipulan la dirección y postura de los abejorros que entran en la flor, condicionando el área de la parte posterior de los polinizadores que se pone en contacto con las anteras y el estigma (Zhang y Li, 2014). Por lo tanto, la longitud del tubo de la corola, el tamaño de la entrada de la corola y el largo del estigma, afectan directamente la transferencia y deposición de polen (Zhang y Li, 2014).

Debido a que los diferentes grupos funcionales de polinizadores difieren fuertemente en su fisiología y requerimientos nutritivos, varios autores han propuesto que la composición y concentración del néctar serían uno de los rasgos que definen el síndrome de polinización (Percival, 1961; Freeman *et al.*, 1984 y 1984b; Baker y Baker, 1986 y 1990; Baker *et al.*, 1998; Galetto y Bernardello, 1998; Dupont *et al.*, 2004; Petanidou *et al.*, 2006; Krömer *et al.*, 2008; González-Teuber *et al.*, 2009; Cavalcante *et al.*, 2018). Por ejemplo, colibríes, mariposas, polillas y abejas, de lengua larga, prefieren néctares ricos en sacarosa (Baker y Baker, 1990; Torres y Galetto, 1998; Galetto y Bernardello, 2003; Cavalcante *et al.*, 2018), mientras que las abejas y moscas de lengua corta prefieren el néctar rico en hexosas (glucosa y fructosa) (Baker y Baker, 1990; Roy *et al.*, 2017). Aunque la secreción de exudados azucarados (néctar), puede ocurrir en prácticamente todas las partes de la flor (Bernardello, 2007), existen restricciones filogenéticas que limitan la composición del néctar. Por ejemplo, la familia Ranunculaceae tiene una tendencia inherente a presentar mayor riqueza de sacarosa que de otros azúcares (Percival, 1961). A su vez, Galetto y Bernardello (2003) relacionaron la composición de azúcares del néctar, en especies que comparten grupos de polinizadores en dos regiones biogeográficas, encontrando que en Asteraceae, Fabaceae, Solanaceae y Verbenaceae predominan néctares ricos en hexosa, mientras que los néctares ricos en sacarosa prevalecen en Bromeliaceae y Onagraceae. Por lo que la composición del néctar parece ser un rasgo más conservado que la morfología de las flores, lo que restringe el rango de posibles polinizadores (Herrera *et al.*, 2006).

Las estructuras de secreción de azúcares pueden dividirse en dos grandes grupos: las que se encuentran entre los verticilos florales, que se conocen como nectarios florales (NF) y las que se encuentran fuera de la flor: nectarios extraflorales (NEF). Independientemente de su ubicación, los nectarios están en la superficie de los tejidos, pueden formar una protrusión o estar profundamente embebidos (Fahn, 1988; Galetto 1995; Santos, 2006; Zhang *et al.*, 2014b). Los nectarios florales están formados por tejido nectarífero, que consiste en una epidermis nectarífera y tejido glandular especializado (el parénquima nectarífero y el parénquima subnectarial). La epidermis nectarífera es el tejido con las células más pequeñas, poliédricas, con orientación anticlinal y acumulación de almidón en plástidos cuando la producción de néctar es alta (Nepi, 2007; Flores, 2014). El parénquima nectarífero son las capas celulares que se encuentran debajo de la epidermis y separan el tejido secretor del haz vascular. El parénquima subnectarial está compuesto por células más grandes y compactas que las del parénquima nectarífero; generalmente no está directamente relacionado con la producción y almacenamiento de néctar (Nepi, 2007; Flores, 2016). Las células asociadas a la secreción de néctar (la epidermis y el parénquima nectarífero) presentan un núcleo grande con alta cantidad de ribosomas y mitocondrias en el citoplasma (Fahn, 1979; Galetto y Bernardello, 2004). La secreción puede darse más comúnmente por estomas atróficos (también llamados "nectarostomas") y, de no ser así, es la epidermis la que se involucra por medio de tricomas o células especializadas (Petanidou *et al.*, 2000). La presencia de nectarostomas y tricomas secretores no es mutuamente excluyente (Nepi *et al.*, 2001), y se ubican en una diversidad de posiciones y estructuras (Proctor *et al.*, 1996; Galetto y Bernardello, 2004; Zhang *et al.*, 2014b). Se considera que los nectarios han surgido varias veces de forma independiente después de la radiación de las angiospermas (Bernardello, 2007).

El grado de exposición de la secreción del nectario condiciona la colecta por parte de los polinizadores, así como su concentración. Como consecuencia de la exposición, la concentración de néctar puede verse afectada directamente: cuando el néctar es secretado en la parte inferior del tubo de la corola en flores con corola tubular, su evaporación es menor que en flores no tubulares, permitiendo la acumulación de néctar con mayor contenido de agua (Bernardello, 2007). Sin embargo, la concentración de azúcares está determinada también por la actividad de la invertasa (β -fructofuranosidasa), la cual desdobla la sacarosa en dos monosacáridos glucosa y fructosa generando néctar menos concentrado (Santos, 2006).

Las células de los nectarios requieren energía para realizar sus funciones, producir y secretar néctar que comúnmente obtienen de la sacarosa que viaja desde los tejidos fuente, a través de los tubos cribosos y hasta los tejidos demanda, ya sea vía plasmodesmos o vía apoplasto, en donde puede ser liberada como disacárido o bien transformarse en hexosas a partir de la actividad de la invertasa de dicho tejido (Heil, 2011; Santos, 2006; Gaffal *et al.*, 2007). Así mismo, la hidrólisis de la sacarosa produce una solución rica en hexosas, con una osmolaridad casi del doble de la original, lo que provoca que se adicione agua al néctar (fenómeno osmótico) resultando en soluciones más acuosas y menos concentradas (Jackson y Nicolson, 2002; Lotz y Nicolson, 2002; Santos, 2006; Nicolson *et al.*, 2007).

Diversos estudios demuestran la existencia de un patrón en varios sistemas, entre los polinizadores y la composición del néctar; asociando una concentración mayor de sacarosa a flores de tubo largo, mientras que las flores abiertas (de néctar desprotegido) presentan una mayor concentración de hexosas (Percival, 1961; Freeman *et al.*, 1984; Baker y Baker, 1990; Baker *et al.*, 1998; Galetto y Bernardello, 1998;). Se ha considerado, junto con el tamaño de la flor o de la inflorescencia, que ambas características son un buen predictor del tipo de polinizador asociado a cada especie (Baker y Baker, 1990). Sin embargo, esto no parece ser un patrón generalizado (Dupont *et al.*, 2004; Cavalcante *et al.*, 2018). Galetto y Bernardello (2004) reportan nectarios discoidales que rodean la base del ovario, con numerosos estomas, abiertos sobre la epidermis y con una distribución específica para seis especies del género *Ipomoea* en Argentina. Este estudio detectó que el néctar presenta dominancia de sacarosa, y una correlación entre el tamaño de los nectarios, la longitud de la flor y el volumen total de néctar secretado, lo que sugiere que existen restricciones estructurales limitantes en la determinación de los rasgos del néctar en estas especies. Pese a estar asociadas a vectores de polen diferentes (colibríes e himenópteros), la composición química, dinámica de producción y efectos de eliminación del néctar no presentaron relación con el gremio de polinizadores. En contraste, Krömer y colaboradores (2008) revisaron la composición y concentración del néctar en 111 especies de Bromeliaceae, demostrando que esta característica se determina predominantemente por las preferencias de los polinizadores y no por las relaciones filogenéticas.

El mayor volumen de néctar en las especies polinizadas por aves y murciélagos, sugiere que, asociado con la evolución de la ornitofilia y la quiropterofilia, ocurrió un incremento en la producción de néctar (Freeman *et al.*, 1984b; Rosas-Guerrero *et al.*, 2014). En particular, la transición de la melitofilia y la ornitofilia se asocia con un aumento en la producción de néctar más diluido (Torres y Galetto, 1998; Nicolson *et al.*, 2007; Dieringer *et al.*, 1991). El incremento en el volumen de néctar podría ser resultado de varios ajustes no excluyentes: (1) un incremento en el tamaño de los nectarios (i.e., incremento en la superficie de secreción), (2) un incremento en la actividad de la invertasa (β -fructofuranosidasa), (3) un incremento general en el tamaño de flores tubulares, que reducirían la evapotranspiración, favoreciendo la acumulación de néctar más diluido; este escenario supone que el aumento en el tamaño de la flor incrementó de manera proporcional el tamaño de los nectarios. Aunque se ha observado un incremento en el tamaño de las flores polinizadas por aves, no se ha examinado si dichos cambios explican el mayor volumen de néctar. Si el mayor volumen de néctar en las especies ornitófilas, respecto a las melitófilas se debe a un incremento en el tamaño del nectario, independientemente de los cambios en el tamaño de la flor, *se espera encontrar una correlación entre el tamaño del nectario y la evolución de la ornitofilia, independiente de la variación en el tamaño de la corola* (Figura 1). Por otra parte, si el mayor volumen de néctar se debe a la actividad de la invertasa, *no se esperaría encontrar una correlación entre la evolución de la ornitofilia con el tamaño del nectario* (Figura 1). Por último, si el aumento en el volumen de néctar de las especies ornitófilas, fue resultado de un incremento en el tamaño de la flor para reducir la evapotranspiración, *se espera encontrar una correlación más fuerte entre el tamaño de la flor y el tamaño del nectario que entre éstos y los síndromes de polinización* (Figura 1). El propósito de este trabajo fue emplear un marco filogenético para examinar cuáles de estas explicaciones se ajustan mejor al incremento del volumen de néctar, el largo de la corola, la superficie del nectario y el síndrome de polinización. El estudio se llevó a cabo utilizando varios pares de transiciones evolutivas de la melitofilia hacia la ornitofilia, observadas en el subgénero monofilético *Calosphace* del género *Salvia* (Fragoso-Martínez *et al.*, 2017).

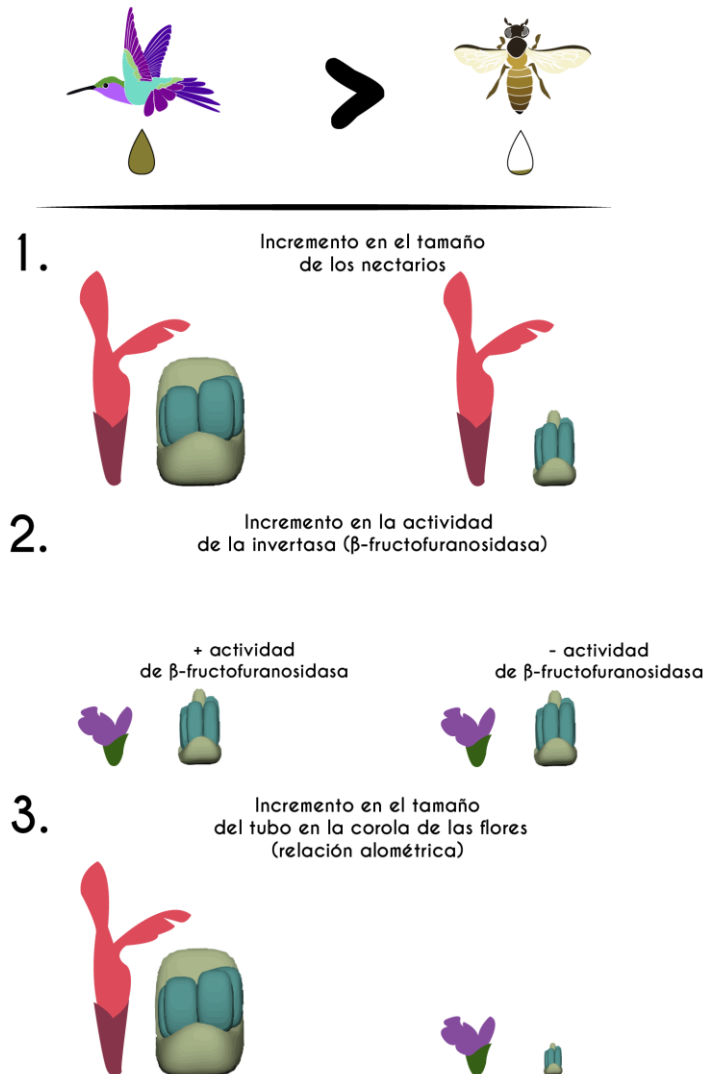


Figura 1. Hipótesis que explican un mayor volumen de néctar en la transición de melitofilia a ornitofilia en *Calosphaece*. La gota representa la cantidad de néctar secretado en cada caso.

Material y método

Sistema de estudio

El género *Salvia* (Lamiaceae) es casi cosmopolita, con al menos tres centros de diversidad (Mediterráneo, Neotrópico y Sudamérica) además del suroeste de Asia, en donde comenzó su diversificación a mediados del Oligoceno (Kriebel *et al.*, 2019). Cuenta con aproximadamente 1,000 especies, de las cuales 600 están en el continente americano y aproximadamente 300 se distribuyen en México (Cornejo-Tenorio & Ibarra-Manríquez, 2011). El 58% de las especies que se encuentran en América, se han clasificado como

melitófilas (polinizadas por abejas), el 31% como ornitófilas (polinizadas por aves) y el 11% restante son visitadas por más de un grupo funcional de polinizadores (Espino *et al.*, 2014; Wester & Claßen-Backoff, 2011). Las flores de *Salvia* se conforman por el cáliz y una corola bilabiada, con el labio superior de la corola erecto y cóncavo, el inferior trilobulado con el lóbulo medio más ancho (Figura 2A). El gineceo es bicarpelar, tetralocular, con un óvulo en cada lóculo; se encuentra sobre un disco carnoso asociado con la producción de néctar, y cuenta con un estilo bifido (Ramamoorthy, 2001; Zhang *et al.*, 2014b) (Figura 2B).

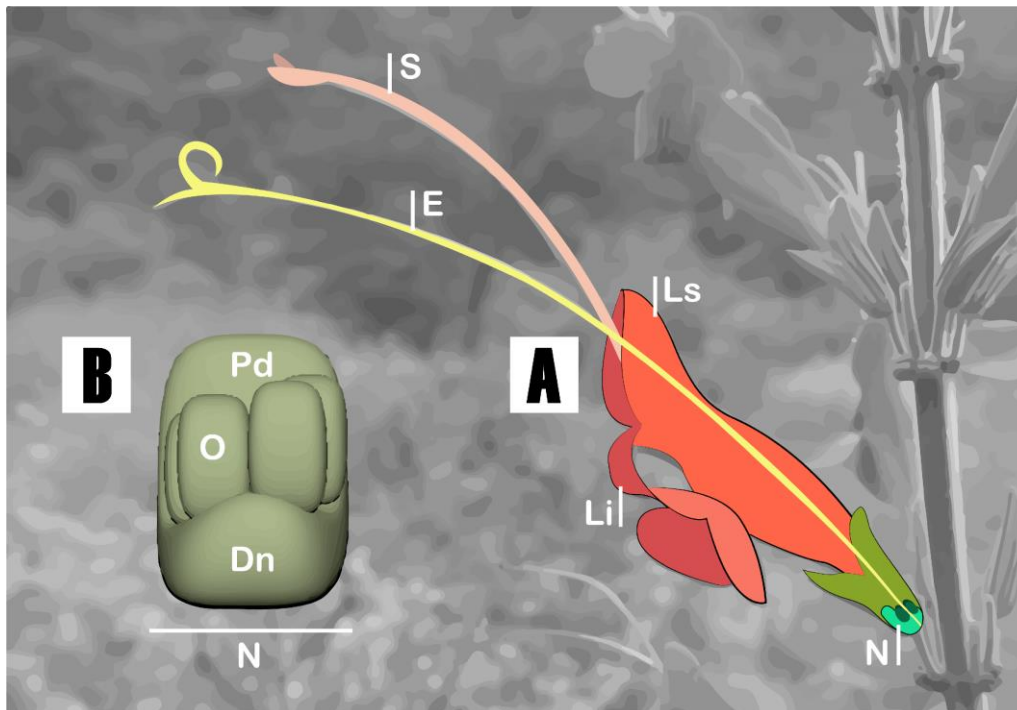


Figura 2. Morfología floral del género *Salvia* (*Salvia exserta* Griseb) y del nectario floral (*Salvia fulgens* Cav). (A) Perfil floral: E es el estilo, S el androceo (antera-tejido conectivo-filamento), Ls el labio superior (o la galea), Li el labio inferior, N el nectario bajo el ovario. (B) Nectario floral: Soporta los cuatro lóculos que conforman el ovario (O), consiste de un disco nectarial (Dn) y la proyección del disco o lengüeta (Pd).

Salvia presenta variaciones en la morfología de la flor, como el tamaño, forma y color de la corola, que desempeñan un papel muy importante en la biología de la polinización (Espino *et al.*, 2014; Cornejo-Tenorio & Ibarra-Manríquez, 2011). Según Dieringer *et al.* (1991), las especies de *Salvia* con flores azules, moradas o blancas son visitadas y polinizadas por abejas, mientras que en las especies con flores rojas, la polinización es frecuentemente realizada por aves. Sin embargo, Wester y Claßen-Bockhoff (2007), mencionan que el color no es el único atributo para definir el síndrome de polinización, ya

que hay especies con flores tubulares, azules o moradas, que son polinizadas por colibríes. Con base en lo anterior se ha descrito que varias especies de salvias pueden ser polinizadas tanto por aves como por insectos.

Calosphace fue descrito originalmente por Bentham (1832). Fragoso-Martínez *et al.*, (2018), sugieren un origen mexicano/centroamericano e identifican al menos doce migraciones independientes para América del Sur. Estudios moleculares recientes han confirmado su condición monofilética con varias transiciones evolutivas de la melitofilia a la ornitofilia, por lo que representa un sistema idóneo para examinar los cambios en las estructuras de secreción de néctar asociadas con el tipo de polinizador (Fragoso-Martínez *et al.*, 2018).

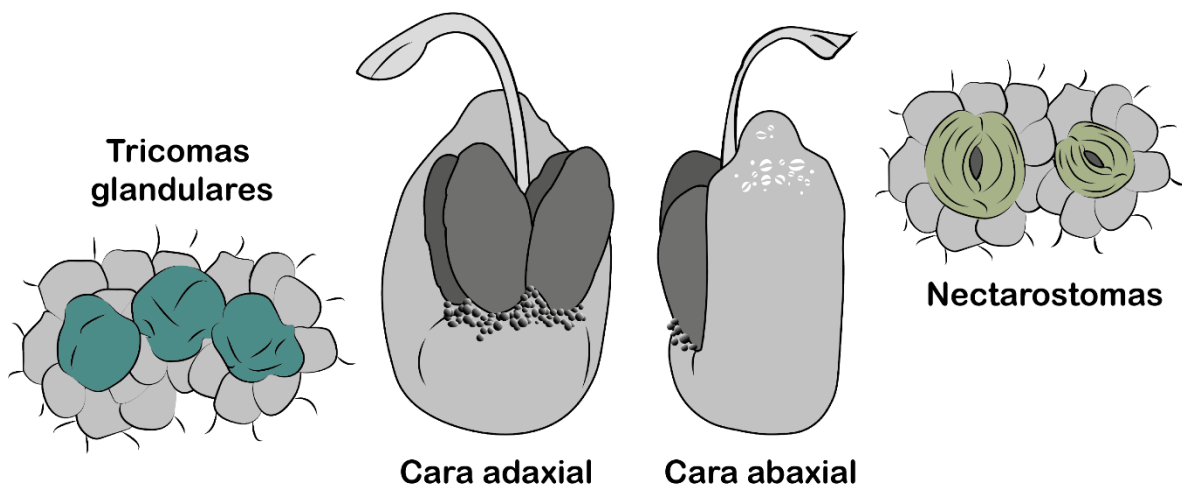


Figura 3. Micromorfología general del nectario floral en *Salvia* (*Salvia haenkei* Benth). En la cara adaxial del nectario, sobre el disco nectarial, se encuentran los tricomas glandulares peltados, mientras que en el tercer tercio de la cara abaxial de la proyección del disco (o lengüeta) se encuentran los estomas modificados para la secreción del néctar (nectarostomas).

Descripción anatómica del nectario

Estudios preliminares caracterizaron la estructura del nectario en especies de *Calosphace* asociadas a diferentes polinizadores (Kumari, 1986; Zhang *et al.*, 2014b; Flores, 2014). En ellos se reveló que los nectarios de *Salvia* presentan una morfología muy similar, conformada por un disco nectarial y la proyección del disco (lengüeta); mientras que el néctar es liberado por células estomáticas modificadas para la salida de azúcares (Figura 3). En algunas especies se presentan tricomas glandulares que producen aceites en un medio acuoso en lugar de aportar líquido al néctar (Zhang *et al.*, 2014b).

Se sabe que el disco nectarial y los tricomas glandulares surgen en etapas tempranas del desarrollo de las flores de *Calosphace*, mientras que la proyección del disco y los nectarostomas, surgen en etapas cercanas a la antesis (Flores, 2014). Este patrón ha llevado a proponer que son estructuras evolutivas derivadas en este grupo. Las principales diferencias entre especies están asociadas con la presencia/ausencia de tricomas y estomas, así como con la localización de dichas estructuras (Zhang *et al.*, 2014b).

En las dicotiledóneas, los estomas se encuentran comúnmente en la epidermis de los nectarios y son la forma más frecuente de exudado de néctar (Bernardello 2007), así como la ruptura de la cutícula. La presencia de estomas se describió y se confirmó la exudación de néctar en la epidermis nectarial para varias especies de Cactaceae (Daumann, 1930; Zandonella, 1977; Agüero *et al.*, 2018). Así mismo, el nectario floral en *Salvia farinacea* posee estomas modificados para la exudación de néctar en la epidermis abaxial de la proyección del disco, intercalados con tricomas peltados entre los lóbulos ováricos y sobre la superficie adaxial de la proyección (Zhang *et al.*, 2014b). Los tricomas peltados son abundantes, mientras que los tricomas capitados son raros o ausentes en asociación con los nectarios florales (Ascensão *et al.*, 1995). Se ha reportado que los tricomas glandulares peltados en el nectario floral de *Salvia farinacea* (especie melitofila) generan aceites volátiles en cantidades reducidas, los cuales pueden desempeñarse como atrayentes que mejoran el aprendizaje de los vectores de polen a través del olfato, o bien servir en la defensa ante patógenos o herbívoros durante la floración (Zhang *et al.*, 2014b). Estas estructuras también están presentes en el nectario de otras especies de la familia Lamiaceae: *Leonotis leonurus* (Ascensão *et al.*, 1995) y *Marrubium parviflorum* (Naghiloo *et al.*, 2013).

Obtención, fijación y preservación del material vegetal.

Se colectaron flores en antesis de 27 especies de *Calosphace* en México, Bolivia, Perú y Argentina (tabla 2). Estos ejemplares fueron fijados utilizando FAA (etanol, formaldehído, ácido acético y agua destilada; en una proporción 5:1:0.5:3.5). Posteriormente se deshidrataron de forma gradual con soluciones de alcohol etílico; los recambios de alcohol se hicieron en un lapso aproximado de 45 min entre cada uno, pasando por alcohol al 30%, 50%, 70%, 85%, 96% y, finalmente, en alcohol al 100% para su procesamiento.

La longitud del labio superior, del labio inferior, del tubo y la longitud total de la corola (longitud del tubo más la longitud del labio superior) fueron medidas en 10 individuos por especie (*S. stachydifolia*, *S. polistachya* y *S. purpurea*). Para obtener los datos del resto de las especies se construyó una base a partir de trabajos en *Salvia* hechos por Wester y Claßen-Bockhoff (2011) sobre síndromes florales en *Calosphace*, y la monografía de Epling (1939) para el subgénero. En algunos casos se utilizó el rango de variación (valor mínimo y máximo) del rasgo y se promedió.

Tabla 2. Especies de las flores del género *Salvia*, subgénero *Calosphace*, que fueron empleadas en este estudio y el país (localidad) del que se colectaron.

Especie (<i>Salvia</i>)	País/localidad de colecta
<i>S. amplifrons</i> Briq.	Bolivia
<i>S. raymondii</i> J. R. I. Wood	Bolivia
<i>S. personata</i> Epling	Argentina (Jujuy)
<i>S. haenkei</i> Benth.	Bolivia
<i>S. sophrona</i> Briq.	Bolivia
<i>S. rypara platystoma</i> Epling	Bolivia
<i>S. alba</i> J. R. I. Wood	Bolivia
<i>S. orbignaei</i> Benth.	Bolivia (Pojo)
<i>S. graciliramulosa</i> Epling & Játiva	Bolivia (Aikile)
<i>S. exserta</i> Griseb.	Bolivia
<i>S. brevipes</i> Benth.	Argentina (Snt Tomé)
<i>S. sucrensis</i> J. R. I. Wood	Bolivia
<i>S. stachydifolia</i> Benth.	Argentina (Tikimon)
<i>S. dombeyi</i> Epling	Perú (Phiry)
<i>S. coerulea</i> Benth.	Argentina
<i>S. procurrens</i> Benth.	Argentina (El palmar)
<i>S. calolophos</i> Epling	Argentina (Jujuy)
<i>S. cuspidata gilliesii</i> Benth.	Argentina (Tucumán)
<i>S. retinervia</i> Briq.	Bolivia (Samaipata)
<i>S. cuspidata rosea</i> J. R. I. Wood	Bolivia (Tarabuco)
<i>S. fulgens</i> Cav.	Mex (Desierto de los Leones)
<i>S. mexicana</i> L.	Mex (Manatlán, Jalisco)
<i>S. polystachya</i> Cav.	Mex (Tres Marías, Morelos)
<i>S. purpurea</i> Cav.	Mx (Temascaltepec, Edo. Mex)
<i>S. iodantha</i> Fernald	Mex (Manantlán, Jalisco)
<i>S. elegans</i> Vahl	Mex (Desierto de los Leones)
<i>S. cinnabarina</i> M. Martens & Galeotti	Mex (Cerro Huitepec, Chiapas)

Micromorfología del nectario

Procesamiento de muestras y observación en el MEB

Para realizar la observación de las muestras en el microscopio electrónico de barrido (MEB) se disectaron de 4 a 6 flores de cada especie, con el fin de obtener exclusivamente los nectarios florales. Éstos fueron guardados en pequeñas rejillas y desecados a punto crítico. Este procedimiento aprovecha el hecho de que en dicho punto un fluido pasa imperceptiblemente de líquido a gas sin límites visibles y sin fuerzas de distorsión, lo que permite obtener una imagen fiel. En particular, el fluido de una muestra orgánica hidratada o biológicamente deshidratada es desplazado con el fin de mantener la microestructura inicial del estado hidratado (Prin *et al.*, 2012). Las muestras fueron lavadas con CO₂ líquido hasta reemplazar todo el etanol, mismo que se evaporó en el último paso (Vázquez-Nin y Echeverría, 2000). Se montaron las muestras en portaobjetos con cinta conductiva de carbón de doble cara y se cubrieron con una capa de oro de 200 nm de grosor para su posterior observación y toma de fotografías en un microscopio electrónico de barrido marca HITACHI SU1510.

Reconstrucción de Modelos 3D

El modelado tridimensional (3D) tiene un número creciente de aplicaciones en diferentes campos, ya que facilita la comprensión y mejora la representación de estructuras y objetos 3D complejos (Murakawa *et al.*, 2006; Qing *et al.*, 2015). Dado que la producción y almacenamiento de carbohidratos suele ocurrir en los tejidos periféricos del nectario floral, se realizaron reconstrucciones en tres dimensiones para estimar el área de secreción de azúcares utilizando modelos virtuales 3D, en el software Maya 2018 (Autodesk). Debido a la ausencia de escala y espacio, las fotografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido no son suficientes para obtener valores cuantificables en un objeto 3D preciso y confiable. Por esta razón se empleó una escala gráfica de 1,000,000 μm^3 , para que las dimensiones de los elementos sean comparables entre imágenes (Rojas-Sola *et al.*, 2018). Maya 2018 se manejó en "modeling". Para cada especie se modeló un solo individuo elegido al azar; por cada nectario a reconstruir se importaron tres fotografías previamente tomadas en el MEB (cara adaxial, plano transversal y sagital) con la herramienta "image plane" localizada en el menú "view" de la barra superior (figura 4). En algunos casos las fotografías tuvieron que escalarse para coincidir en unidades. El modelado de cada estructura fue similar, partiendo de un cubo poligonal con dos subdivisiones centralizadas (una vertical y otra horizontal), en cada cara y posteriormente se insertaron las líneas de corte necesarias. Se creó un cubo con caras de 10,000 μm^2 (reales) a modo de guía, el cual se escaló en conjunto con el modelo para conservar los valores.

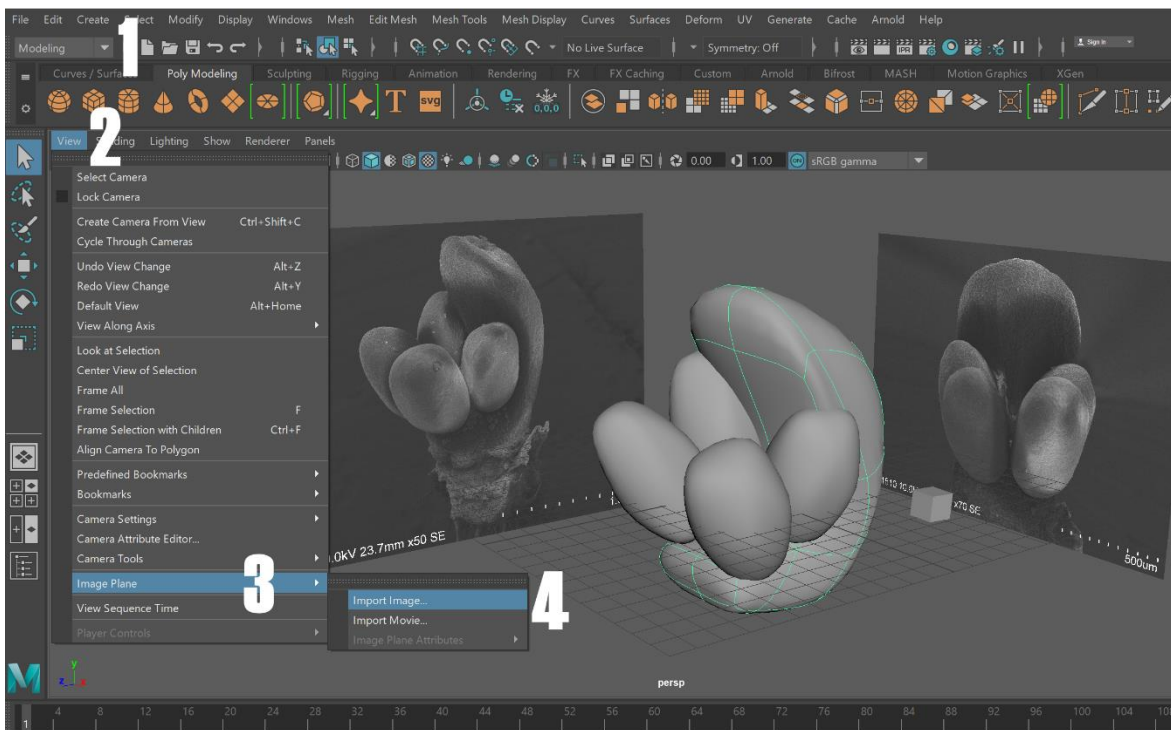


Figura 4. Captura de pantalla de la interface del software Maya 2018 (Autodesk) para modelado 3D. En esta se muestran cuatro pasos para el uso de la herramienta "image plane".

Cada nectario (con los cuatro óvulos del gineceo) fue modelado en archivos separados y finalmente se incluyeron todos en el mismo documento para igualar la escala. El archivo final se exportó en formato ".obj" cuidando que las propiedades de la malla fueran en quads, y limpiando el historial junto con el "freeze", para evitar deformaciones en el software 3DS MAX 2019 (Autodesk), donde se adaptó la escala 10,000 μm^2 (reales) a 0.68 mm^2 (digitales). Las unidades de medida se ajustaron con la función "customize \rightarrow unit setup" en la barra superior de herramientas y en la ventana lateral "utilities \rightarrow measure" se obtuvo el área superficial y el volumen de cada estructura.

Filogenia empleada

En este estudio se utilizó la filogenia de *Salvia*, de Fragoso-Martínez y colaboradores (2017), reconstruida bajo el criterio de máxima verosimilitud a partir de secuencias nucleares (nrITS) y plastidiales (espaciador intergénico trnH-psbA IGS y la región trnL-trnF). La filogenia está representada por 265 especies, de las cuales 247 pertenecen al subgénero *Calospatha*, seis especies del subgénero *Audibertia*, ocho especies al clado I y II de Walker *et al.*, (2004), cinco especies a tres géneros hermanos de *Salvia* (*Dorystaechas*,

Lepechinia y *Perovskia*) y el grupo externo compuesto por *Melissa officinalis* (Fragoso-Martínez *et al.*, 2018).

Para los análisis la filogenia fue podada, de modo que se removieron las especies para las que no se tenía información o el carácter no estaba disponible. El grupo externo a las especies de estudio fue conformado por *Salvia munzii*, *Salvia clevelandii* y *Salvia mellifera* (subgénero *Audibertia*).

Reconstrucción de estados ancestrales

Para reconstruir el estado ancestral de los síndromes de polinización en *Salvia*, se utilizó la aproximación de máxima verosimilitud, implementada en R (R Development Core Team, 2015). El estado ancestral se estimó para cada uno de los nodos internos del árbol, usando el método "re-rooting" de Yang y colaboradores (1995) que se encuentra en el paquete "phytools" (Revell, 2012). El método calcula las probabilidades condicionales desde la raíz del árbol y consecutivamente mueve la raíz para cada uno de los nodos del árbol. Para el análisis se consideraron los siguientes modelos de evolución de caracteres: tasas iguales (equal-rates o ER) y tasas diferentes (all-rates-different o ARD). Para seleccionar cual modelo explica mejor la distribución de datos se utilizó la función *1-pchisq* en APE (Paradis *et al.*, 2004).

Se calculó el valor de "D" para saber la estructura filogenética de la variable "síndrome de polinización" (Fritz y Purvis, 2010). Si el valor de "D" es 1 la distribución del rasgo binario es aleatoria con respecto a la filogenia, y si es mayor que 1 significa que la distribución del rasgo está más sobredispersa que la expectativa aleatoria. Cuando "D" es 0 quiere decir que el rasgo binario se distribuye como se espera, bajo un modelo de evolución del movimiento browniano, de ser menor que 0; el rasgo binario está más conservado filogenéticamente que la expectativa browniana.

Análisis comparado

Con el fin de obtener una visión general de los patrones de expresión de los rasgos de interés se realizaron tres boxplots exploratorios con el promedio del volumen de néctar, en 12 de las 27 especies, considerando sólo las que presentan datos publicados sobre el volumen de néctar producido en flores vírgenes a lo largo de un día. Para la superficie de los nectarios y el largo total de la corola, se incluyeron los datos de las 27 especies. En los tres casos se consideró el síndrome de polinización.

Correlaciones filogenéticas

Para determinar la existencia de una asociación entre el tamaño de la flor, la superficie del nectario y el volumen de néctar producido, se utilizó el método de mínimos cuadrados filogenéticos generalizados (por sus siglas en inglés; PGLS) (Martins y Hansen, 1997), con el paquete CAPER (Orme *et al.*, 2013) en R (R Core Team, 2018). Este enfoque se considera como una forma de ajustar el nivel de dependencia estadística entre los valores de los rasgos debido a la filogenia (Smith & Kriebel, 2018). De esta manera se corrigió la independencia filogenética de las especies estudiadas, dados los múltiples procesos evolutivos que pueden dar lugar a patrones similares de estructura filogenética en los datos (Revell *et al.*, 2008).

Se realizaron cuatro PGLS; para los primeros tres se utilizó un grupo de 12 especies de *Calosphace*, y se buscó la relación entre: (1) el volumen de néctar y la superficie del nectario, (2) el volumen de néctar y la longitud de la corola por síndrome de polinización; posteriormente, (3) entre la superficie del nectario y la longitud de la corola por síndrome de polinización. Finalmente se tomaron las 27 especies para probar la existencia de la correlación entre la superficie de los nectarios y la longitud de la corola, de acuerdo con los síndromes ornitofilia y melitofilia (Tabla 3).

Tabla 3. Mínimos cuadrados filogenéticos generalizados

PGLS	I	II	III	IV
N	12 especies	12 especies	12 especies	27 especies
	Volumen de néctar y superficie del nectario.	Volumen de néctar y longitud de la corola, tomando en cuenta el síndrome de polinización.	Superficie del nectario y longitud de la corola, tomando en cuenta el síndrome de polinización.	Superficie del nectario y longitud de la corola, tomando en cuenta el síndrome de polinización.

*Los datos de la superficie del nectario se transformaron a raíz cuadrada para linealizar la relación con la longitud de la corola. El volumen de néctar se obtuvo de Benítez-Vieyra *et al.* (2014) y se trabajó con logaritmo base 10 para evitar la heterocedasticidad. El síndrome de polinización se caracterizó de acuerdo con lo establecido en la tabla 1, y se sustenta por estudios anteriores sobre *Salvias* de Wood (2007), Wester (2007), Wester y Claßen-Bockhoff (2006, 2007 y 2011), Pérez *et al.* (2014), Novoa *et al.* (2005), Orfila *et al.* (1996), Claßen-Bockhoff (2003), De Marzi (2006), Benítez-Vieyra *et al.* (2014), O'Leary y Moroni (2016).*

Resultados

Micromorfología del nectario

Para las especies revisadas, el nectario se encuentra en la parte basal de la flor, por encima del receptáculo, a la altura del cáliz. Su coloración varía entre tonos de verde. Están constituidos por dos partes: un disco nectarial y la proyección del mismo (lengüeta) (figura 2 y 3). El disco nectarial está estrechamente asociado al gineceo, característica que encuentra su explicación en el hecho de que los haces vasculares de los cuatro lóculos del ovario se unen en el anillo receptacular junto con el haz vascular del estilo. Por otra parte, la proyección del disco nectarial provoca que la simetría sea bilateral, es decir, se trata de un nectario zigomórfico. Se identificó que poseen dos estructuras secretoras principales: los nectarostomas (figura 5) y los tricomas glandulares (Figura 6).

Los nectarostomas con modificaciones para secreción, se observaron en todas las especies revisadas en este trabajo. Se encuentran sobre el tercer tercio apical de la epidermis abaxial de la proyección del disco. Sin embargo, existe variación en cuanto a la cantidad y ubicación exacta; pueden encontrarse en solitario (Figura 5A, 5B, 5C) o formando grupos de dos (Figura 5G) a 12 (Figura 5D, 5F, 5H, 5I). Para la mayoría de las especies se observaron poros estomáticos ocluidos por sustancias cristalinas, que pueden corroborar la exudación de néctar (Figura 5).

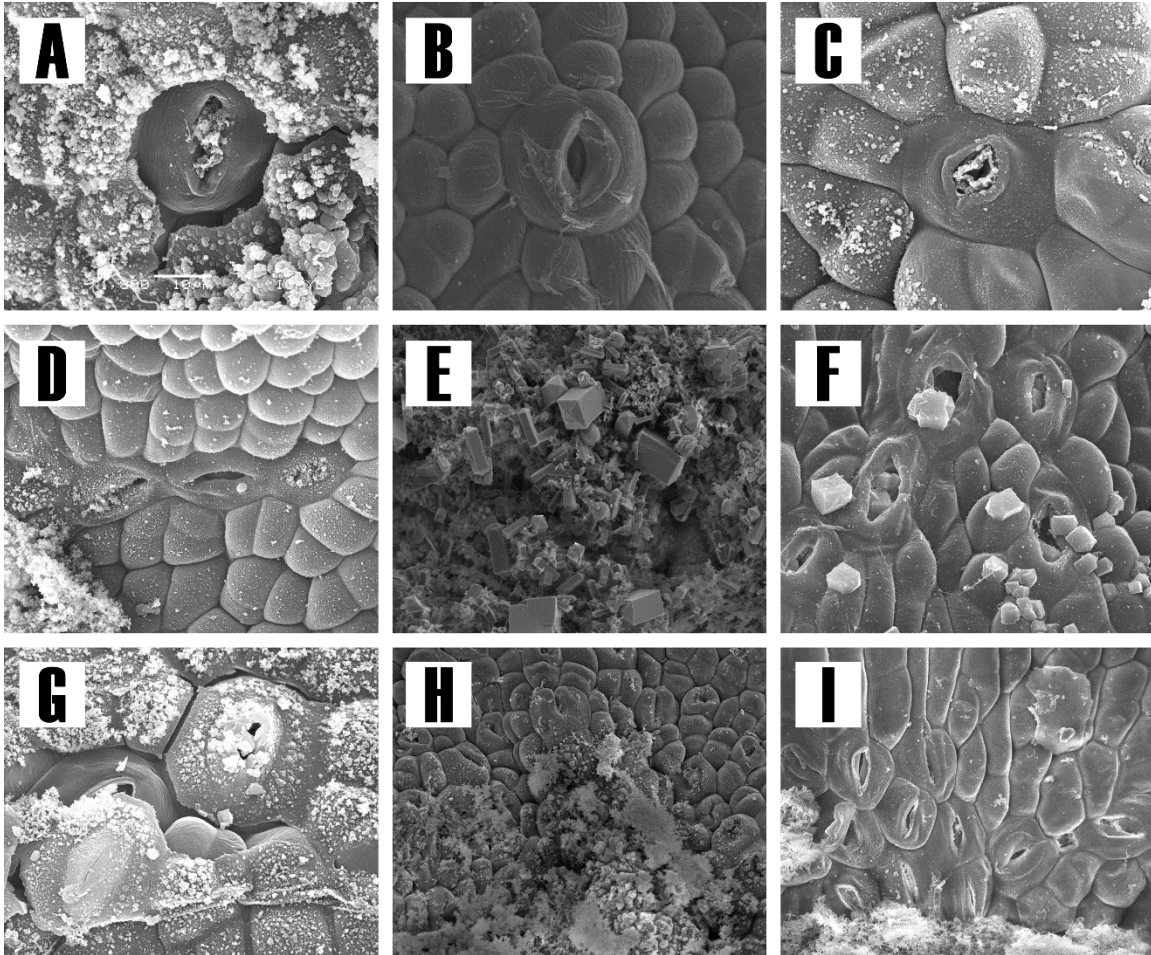


Figura 5. Estomas modificados para la secreción de néctar (nectarostomas). Nectarostomas solitarios (A: *Salvia fulgens*, B: *Salvia calolophos*, C: *Salvia polystachya*) y en grupo (D: *Salvia elegans*, F: *Salvia cinnabarina*, G: *Salvia fulgens* H: *Salvia sophrona*, I: *Salvia sucrensis*) sobre el tercer tercio apical de la epidermis abaxial de la proyección del disco nectarial. E: Ampliación de la sustancia cristalina que ocluye los estomas atróficos (*Salvia orbignaei*).

Por otro lado, los tricomas glandulares son de dos tipos. Tipo 1: peltados con 4-9 células, cubiertos por una delgada cutícula lisa (Figura 6A y 6B), Tipo 2: capitados compuestos por una cabeza globular unicelular o bicelular y un tallo de uno a cuatro células (Figura 6C). El tipo 1 es el más abundante, presente en 14 especies: *Salvia alba*, *Salvia amplifrons*, *Salvia brevipes*, *Salvia dombeyi*, *Salvia haenkei*, *Salvia iodantha*, *Salvia mexicana*, *Salvia personata*, *Salvia polystachya*, *Salvia purpurea*, *Salvia raymondii*, *Salvia retinervia*, *Salvia rypara platystoma*, *Salvia stachydifolia* (Figura 6), el tipo 2 sólo se observó en *Salvia calolophos* y *Salvia rypara platystoma*. Estas estructuras se localizan sobre la epidermis adaxial del disco nectarial, formando un cinturón o aglomeración que rodea los carpelos o sobre los óvulos (Figura 6).

La primera descripción micromorfológica de los nectarios florales de 27 especies de *Calosphace* muestra diferencias interespecíficas en la presencia de nectarostomas o tricomas, en la cantidad de estas estructuras, así como la localización de las mismas (figuras 5 y 6).

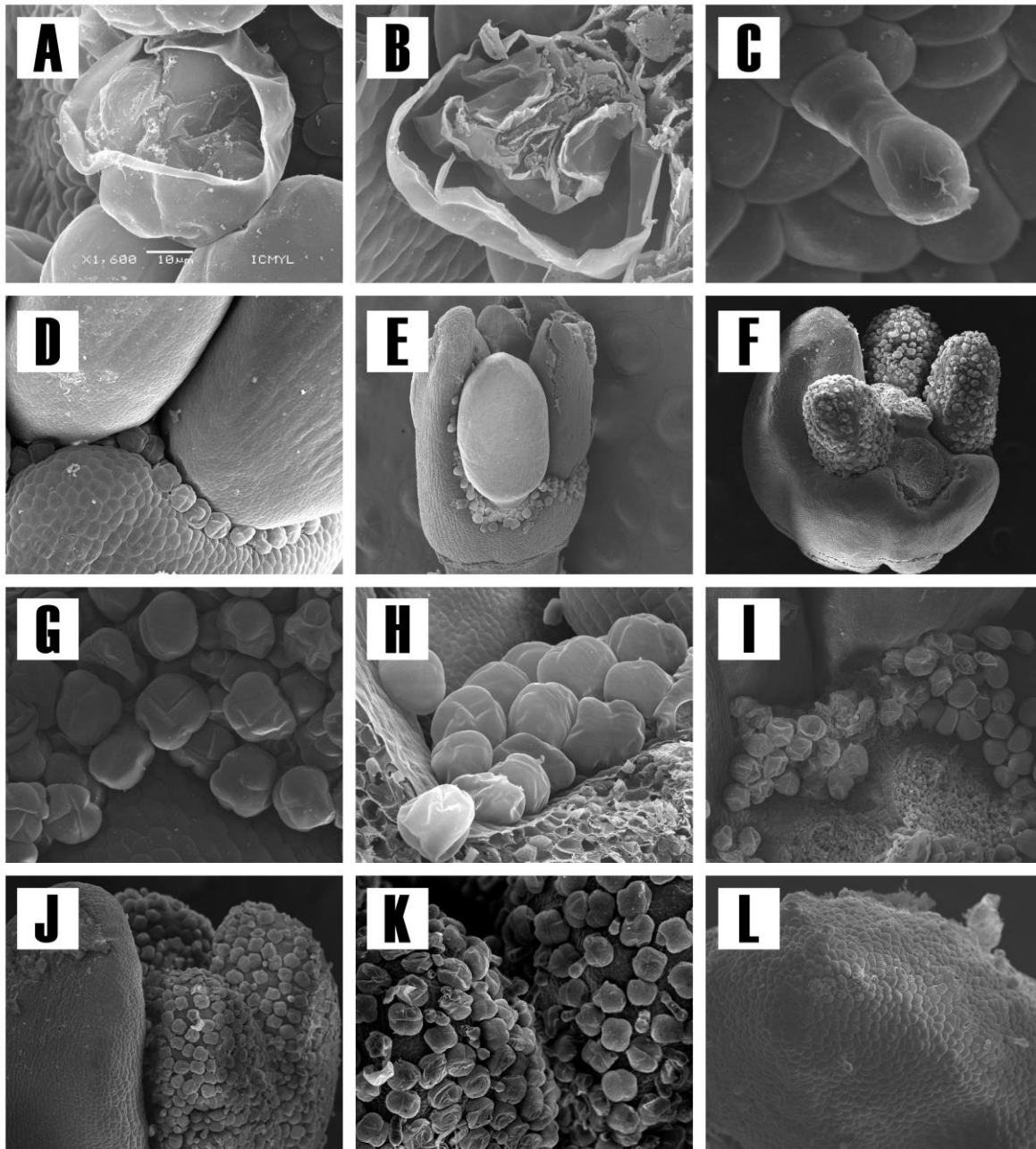


Figura 6. Tricomas glandulares asociados al nectario en *Calosphace*. A: Tricoma glandular tipo 1 (peltado con 4-9 células, cubierto por una delgada cutícula lisa) en *Salvia polystachya*. B: corte transversal en *Salvia mexicana*. Estos tricomas pueden encontrarse formando un anillo alrededor de los capelos (D: *Salvia mexicana*), en la cara adaxial de la lengüeta y rodeando los óvulos sobre el disco del nectario (E: *Salvia personata*, G: *Salvia dombeyi*, H: *Salvia mexicana*, I: *Salvia personata*) o sobre los carpelos (F: *Salvia retinervia*, J: *Salvia rypara platystoma* y K: *Salvia personata*).

acercamiento de I). C: Tricoma glandular tipo 2 (capitado compuesto por una cabeza globular unicelular o bicelular y un tallo de uno a cuatro células) en *Salvia calolophos* (L). Estos tricomas también se presentan en *Salvia rypara platystoma* (J y K).

El tamaño del nectario (disco con lengüeta) presenta variación en los valores de la superficie en cada especie; que van de *Salvia brevipes* con el nectario más pequeño (0.326 mm²), a *Salvia purpurea* con el valor más alto (2.038 mm²) (figuras 7A y 9). Estas diferencias pueden ser importantes en el aumento o disminución de producción y secreción de néctar, ya que se observa un patrón de tamaño que varía de acuerdo al grupo de polinizadores (figuras 7A y 9); las especies ornitófilas tienen los nectarios de superficie mayor, mientras que las especies que son polinizadas por abejas se encuentran entre los de menor superficie (figuras 7A y 9).

Reconstrucción de estados ancestrales

La reconstrucción de estados ancestrales empleando máxima verosimilitud, indica que no hay inercia filogenética en los datos, comprobando los hallazgos previos con una muestra más grande de especies para el clado *Calosphace*. El valor de "D": 1.260181 corrobora que existe sobredispersión en el rasgo "síndrome de polinización", más de la esperada por azar.

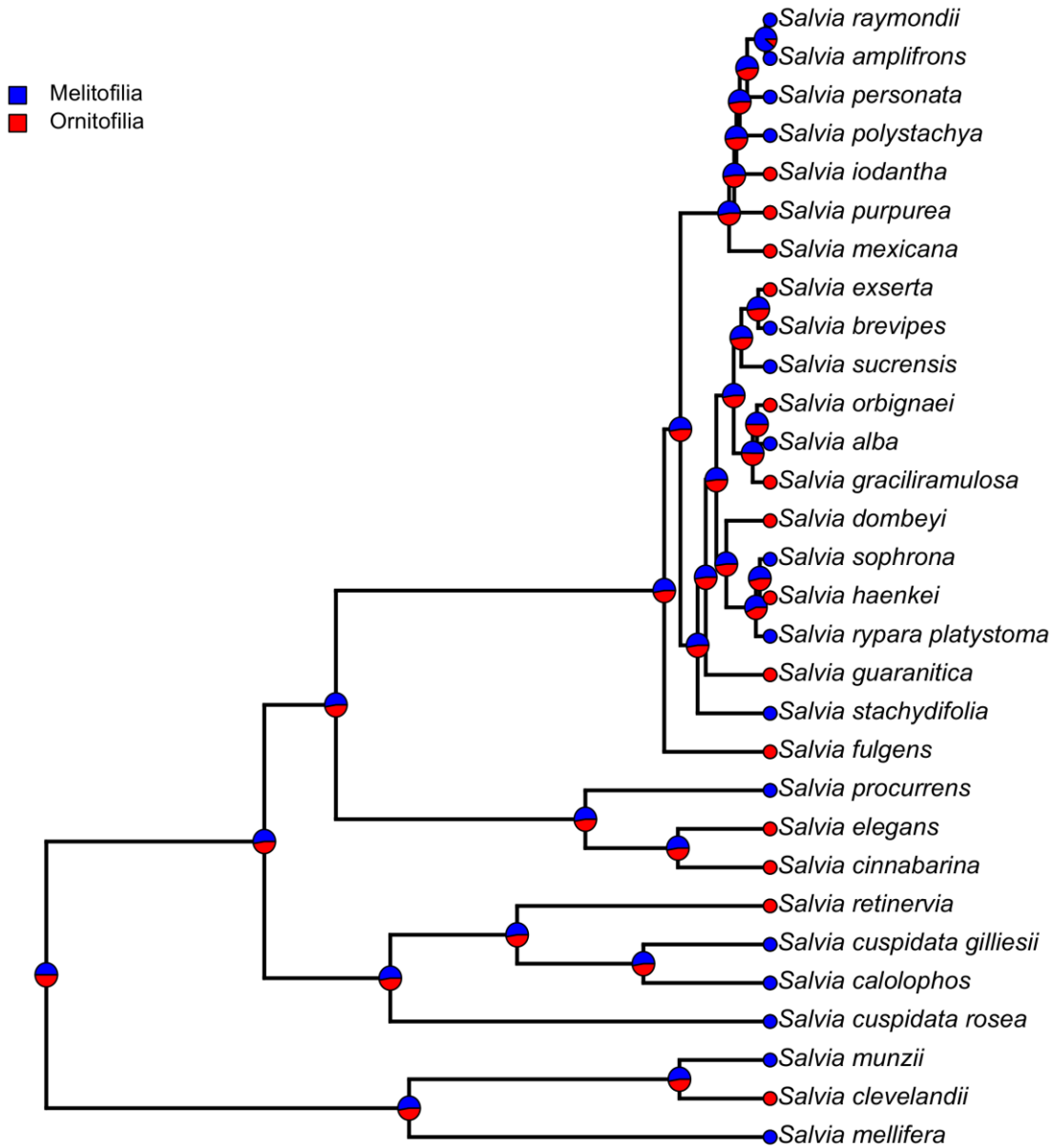


Figura 8. Reconstrucción ancestral del síndrome de polinización en Calosphace.

Análisis comparado

La Figura 7 indica los valores promedio para la superficie del nectario, el volumen de néctar y la longitud de la corola para los dos síndromes de polinización estudiados. En los tres rasgos se observa el mismo patrón: las especies ornitófilas tienen flores más largas, con mayor volumen de néctar y mayor superficie del nectario.

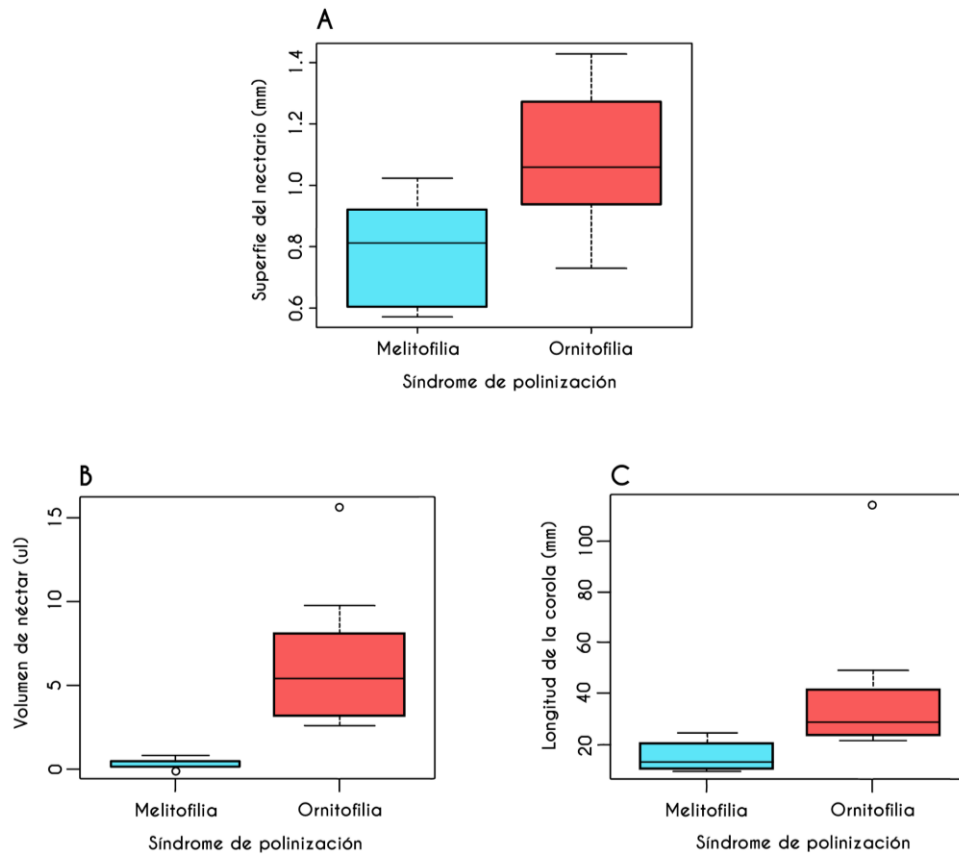


Figura 7. Diagramas de caja de la superficie del nectario, el volumen de néctar y la longitud de la corola de acuerdo al síndrome de polinización. Los valores atípicos en el panel B corresponden a *Salvia personata* y *Salvia fulgens* respectivamente. El valor atípico en el panel C corresponde a *Salvia dombeyi*.

Correlaciones filogenéticas

Los análisis de mínimos cuadrados filogenéticos generalizados (PGLS) indicaron que tanto el volumen de néctar como la superficie del nectario se correlacionan filogenéticamente con el síndrome de polinización (Tabla 4, Figura 9). Durante la transición hacia la ornitofilia, tanto el volumen de néctar como el área que representa la superficie de secreción de azúcar en el nectario muestran un efecto significativo (Tabla 4). Este efecto es independiente de la relación entre el tamaño de la flor y la producción de néctar (Tabla 4, Figura 9).

Tabla 4. Modelos de mínimos cuadrados filogenéticos generalizados (PGLs) entre el volumen de néctar o la superficie del nectario con el síndrome de polinización y el tamaño de la corola.

Se incluye la longitud de la corola como covariable (excepto en el Modelo I). Los modelos I, II y III incluyen sólo a las especies para las cuales se cuenta con datos de volumen de néctar. El modelo IV se realizó con las especies para las cuales se cuenta con datos del área de la superficie del nectario. Los modelos III y IV corroboran el patrón encontrado para la superficie del nectario en ambas muestras de especies.

Modelo I (N = 12)	Estimado ± E.E	t	P
Volumen de néctar			
Superficie del nectario	1.589 ± 0.462	3.43	0.0063

R² ajustada: 0.4962, F_{1,10} = 11.83, P = 0.0061.

Modelo II (N = 12)	Estimado ± E.E	t	P
Volumen de néctar			
Síndrome de polinización	0.947 ± 0.303	3.12	0.0122
Longitud de la corola	0.016 ± 0.013	0.01	0.2613

R² ajustada: 0.7473, F_{2,9} = 17.26, P = 0.0008.

Modelo III (N = 12)	Estimado ± E.E	t	P
Superficie del nectario			
Síndrome de polinización	0.755 ± 0.096	7.84	<0.0001
Longitud de la corola	-0.007 ± 0.006	-1.15	0.2784

R² ajustada: 0.9038, F_{2,9} = 52.67, P = 0.00001.

Modelo IV (N = 27)	Estimado ± E.E	t	P
Superficie del nectario			
Síndrome de polinización	0.402 ± 0.088	4.56	0.0001
Longitud de la corola	-0.002 ± 0.002	-1.30	0.2048

R² ajustada: 0.4475, F_{2,24} = 11.53, P = 0.0003.

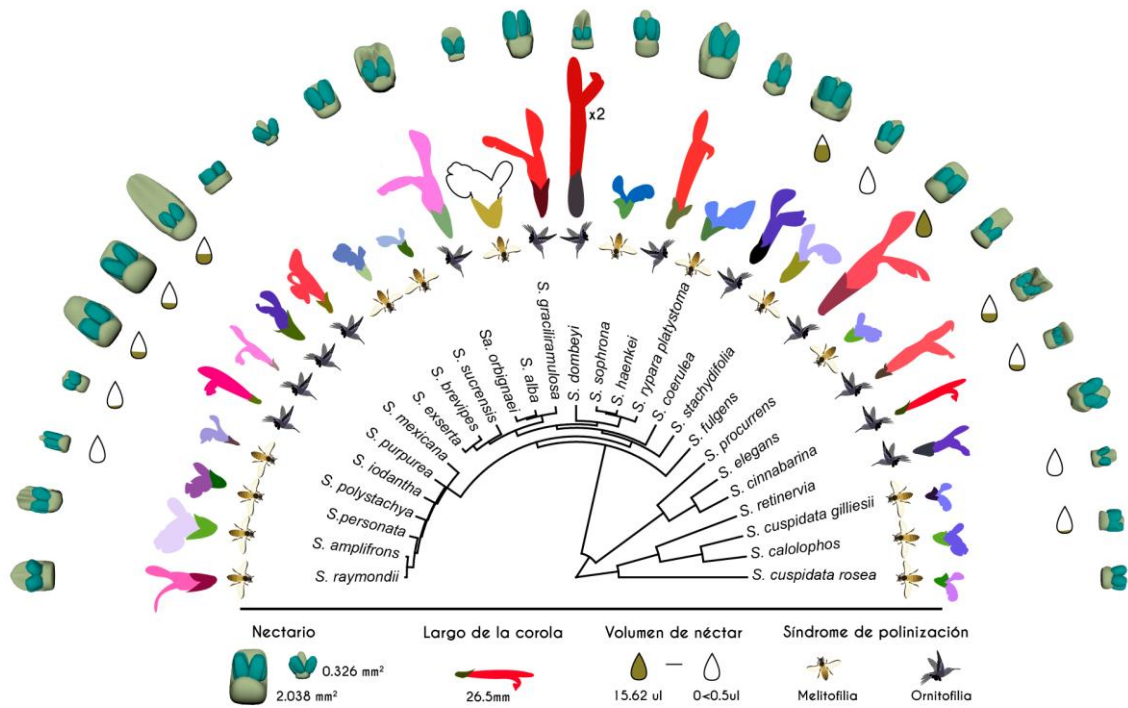


Figura 9. Filogenia de las especies de *Calosphace*, seleccionadas construida a partir de la de Frago-Martínez et al., 2018. La figura indica el síndrome de polinización (melitofilia u ornitofilia), el tamaño de la corola de manera proporcional y su color, el volumen de néctar y la superficie de los nectarios (verde) y los óvulos (azul). Las flores se presentan a escala, exceptuando a *Salvia dombeyi* que fue reducida al doble.

Discusión

La descripción anatómica de los nectarios, en la muestra de especies del subgénero *Calosphace*, confirmó que éstos presentan, en su anatomía, una estructura general muy conservada (Kumari, 1986). Sin embargo, se encontraron diferencias entre las especies en la presencia, distribución y cantidad de distintos tipos de estructuras secretoras (tricomatos y nectarostomas), así como en su tamaño. Aun cuando se detectó una correlación evolutiva entre el tamaño de la corola y el síndrome de polinización, el mayor volumen de néctar en las especies ornitófilas fue explicado, en mayor medida, por un incremento en la superficie de los nectarios. Es decir, que la transición de la melitofilia a la ornitofilia promovió un aumento en la superficie de los nectarios, independiente del tamaño de la corola. Este resultado apoya la explicación de Nicolson y colaboradores (2007), de que la evolución del néctar jugó un papel más importante que los cambios morfológicos en la

flor en el género *Salvia*, y que la transición evolutiva posiblemente alteró la relación alométrica entre el tamaño de la corola y el de los nectarios.

Las flores de *Salvia* presentan nectarios ginobásicos, con una morfología general conformada por un disco nectarial que concuerda con lo descrito para otros miembros de Lamiaceae (Kumari, 1986; Petanidou *et al.*, 2000; Naghiloo *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014b). Este anillo receptacular se extiende unilateralmente para formar una glándula asimétrica (lengüeta), que varía drásticamente de talla entre especies (Kumari, 1986; Zhang *et al.*, 2014b), y cuya variación contribuye a que el tamaño total sea la diferencia más notable entre los nectarios. El análisis cuantitativo en 3D de las estructuras, permitió contabilizar dicha variación y evaluar su relación con el tamaño de las flores y el volumen de néctar, encontrando que las *Salvias* polinizadas por colibríes tienen nectarios con una superficie mayor, un mayor volumen de néctar y flores más largas (figura 7 y 9). Por el contrario, las especies melitófilas presentan nectarios de superficie menor, así como corolas cortas y bajos volúmenes de néctar (figura 7 y 9). Los datos del tamaño de la flor y el volumen de néctar concuerdan con la hipótesis del síndrome de polinización para ornitofilia y melitofilia (Delpino, 1867, Faegri Van der Pijl, 1979 y Proctor *et al.*, 1996), así como con trabajos previos (Campbell *et al.*, 1989 y 1996; Galetto, 1995; Torres y Galetto, 1998; Petanidou *et al.*, 2000; Nicolson *et al.*, 2007; Dieringer *et al.*, 1991; Roy *et al.*, 2017). Aunque los nectarios florales han sido poco estudiados y los datos que se tienen son escasos, se sabe que las flores largas contienen nectarios más voluminosos (Galetto, 1995) y que el volumen de néctar está relacionado positivamente con el tamaño del nectario (Petanidou *et al.*, 2000; Dafni *et al.*, 1988). Los análisis del método comparado (tabla 4) detectaron, en primera instancia, una relación entre el volumen de néctar y la superficie de los nectarios; lo que indica que nectarios de mayor tamaño producen más néctar. En segunda instancia, una relación entre el volumen de néctar y el síndrome de polinización, sin efecto en la longitud de la corola. Por último, la existencia de diferencias significativas en la superficie de secreción de néctar entre síndromes de polinización, aun cuando se controla por la variación de la longitud de la corola (tabla 4); esto sugiere que, independientemente de las relaciones alométricas que puedan existir entre las estructuras de la flor, la evolución de los síndromes de polinización (melitofilia y ornitofilia) se asocia con cambios en el tamaño de los nectarios, lo que se apega a la primera hipótesis (figura 1). Por lo tanto, se descarta la segunda hipótesis que plantea un incremento en la actividad de la invertasa (β -fructofuranosidasa), pues en esta no se considera la variación

del tamaño de las corolas y los nectarios. La tercera hipótesis también se desecha, ya que implica una relación alométrica entre el tamaño de los nectarios y el de la corola.

Para la flora norteamericana se ha considerado que la polinización ornitófila se deriva de la polinización por insectos (Stebbins, 1989; Grant, 1994; Wilson *et al.*, 2007; Fragoso-Martínez *et al.*, 2018), aunque la transición a la polinización por aves pudo darse en etapas tempranas; como en el caso de *Calosphace* (Kriebel *et al.*, 2019). Estas transiciones involucran modificaciones que incluyen la morfología de la flor y el néctar; en el caso particular del género *Salvia*, partiendo de un origen melitófilo (Fragoso-Martínez *et al.*, 2018; Kriebel *et al.*, 2019), se sabe que agregar agua resulta en un néctar diluido asociado con la ornitofilia (Wester y Claßen-Bockhoff, 2006b). El volumen y la concentración de néctar son rasgos que poseen mayor plasticidad, en contraste con la composición química del mismo, que es una característica más conservada (Goldblatt *et al.*, 2001; Mitchell, 2004; Herrera *et al.*, 2006). Dado que los polinizadores perciben y evalúan las recompensas florales, las plantas han estado expuestas a dicha presión de selección, lo que ha favorecido estrategias de atracción y recompensa para maximizar el beneficio de la polinización (Shafir *et al.*, 2003). Los resultados de este estudio apoyan la expectativa de que los cambios en el néctar ocurrieron posiblemente antes que otros ajustes, como aquellos en la morfología floral. Estos últimos, posiblemente se deriven de presiones para maximizar el ajuste con el polinizador, una vez asegurado su fidelidad a las flores (Wilson *et al.*, 2007; Wester y Claßen-Bockhoff, 2006; Claßen-Bockhoff *et al.*, 2004). Para el género *Gladiolus* se sugiere que aumentar la proporción de agua en el néctar y un mayor tamaño floral, pueden ser suficiente para convertir una especie a la ornitofilia (Goldblatt *et al.*, 2001). Esto indica que la planta invierte la misma cantidad de azúcares, acompañados por diferentes proporciones de agua, lo que mantiene estable el nivel energético, produciendo néctares más abundantes y diluidos (Thompson *et al.*, 2000). Los resultados aquí obtenidos apoyan la hipótesis de que durante la transición de la melitofilia a la ornitofilia, hay un aumento en la superficie de los nectarios que se relaciona directamente con un volumen mayor de néctar producido y no con el tamaño de la corola, esta es una explicación más simple que la existencia de un cambio estructural en los nectarios para producir diferentes volúmenes de néctar. Dicho patrón apoya la evidencia empírica de que las especies melitófilas producen menos néctar que las ornitófilas. La transición de *S. stachydifolia* (melitófila con 0.42ul de volumen de néctar y una superficie de nectario = 0.58 mm²) a *S. coerulea* (ornitófila con 9.76ul de volumen de néctar y 1.49 mm² de superficie del nectario) ilustran el patrón observado en la muestra de

especies evaluadas. Otro ejemplo independiente de una reversión apoya el patrón observado. La transición de *S. iodantha* (ornitófila con 3.36ul de néctar y una superficie de 1.92 mm²) a las especies melitófilas *S. polystachya* (0.59ul de volumen de néctar y 0.47 mm² de superficie del nectario) y *S. personata* (0.05ul de volumen de néctar y 0.36 mm² de superficie del nectario) indica que tanto las transiciones como las reversiones apoyan la hipótesis de que el ajuste en el tamaño de los nectario jugó un papel más relevante que el tamaño de la flor durante la evolución de los síndromes de ornitofilia y melitofilia (figura 9). Esta relación no descarta la posibilidad de un incremento en el tamaño de la corola durante la transición de la melitofilia a la ornitofilia, pero tampoco debe considerarse que el tamaño de la corola es una restricción para la evolución del nectario, al menos durante la transición evolutiva de la polinización de abejas a colibríes en el género *Salvia* (Benítez *et al.*, 2019). Es decir que la evolución de un mayor tamaño floral en las especies ornitófilas no parece ser una condición necesaria para alcanzar un nuevo óptimo adaptativo.

A modo de conclusión, los nectarios florales en *Salvia* son estructuras de gran importancia en los síndromes de polinización, por lo que deberían incluirse en dichas descripciones, ya que de ellos depende la producción de néctar y, a su vez, la oferta para cada polinizador. De tal manera que la cantidad de néctar producido se relaciona con el tamaño del nectario; los nectarios con superficies mayores producen más néctar y se asocian con la ornitofilia, mientras que los nectarios de menor superficie producen un volumen de néctar menor y son relacionados a la melitofilia. Comprender este patrón de convergencia puede ayudar a esclarecer las consecuencias de la interacción planta-polinizador en la evolución de la diversificación en el fenotipo floral.

Literatura citada

1. AGÜERO, J. I., GALATI, B. G., & TORRETTA, J. P. (2018). Structure and ultrastructure of floral nectaries of two *Opuntia* species (Cactaceae) in relation to their floral visitors. *Plant systematics and evolution*, 304(8), 1057-1067.
2. ASCENSÃO, L., MARQUES, N., & PAIS, M. S. (1995). Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). *Annals of Botany*, 75(6), 619-626.
3. ASHWORTH, L., AGUILAR, R., MARTÉN-RODRÍGUEZ, S., LOPEZARAIZA-MIKEL, M., AVILA-SAKAR, G., ROSAS-GUERRERO, V., & QUESADA, M. (2015). Pollination syndromes: a global pattern of

- convergent evolution driven by the most effective pollinator. In *Evolutionary biology: Biodiversification from genotype to phenotype* (pp. 203-224). Springer, Cham.
4. BARRETT, S. C. (2008). Major evolutionary transitions in flowering plant reproduction: an overview.
 5. BAKER, H. G., & BAKER, I. (1986). The occurrence and significance of amino acids in floral nectar. *Plant systematics and evolution*, 151(3-4), 175-186.
 6. BAKER, H. G., & BAKER, I. (1990). The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator types. *Israel Journal of Botany*, 39(1-2), 157-166.
 7. BAKER, H. G., BAKER, I., & HODGES, S. A. (1998). Sugar Composition of Nectars and Fruits Consumed by Birds and Bats in the Tropics and Subtropics 1. *Biotropica*, 30(4), 559-586.
 8. BENITEZ-VIEYRA, S., FORNONI, J., PÉREZ-ALQUICIRA, J., BOEGE, K., & DOMINGUEZ, C. A. (2014). The evolution of signal–reward correlations in bee-and hummingbird-pollinated species of *Salvia*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1782), 20132934.
 9. BENITEZ-VIEYRA, S., PÉREZ-ALQUICIRA, J., SAZATORNIL, F. D., DOMÍNGUEZ, C. A., BOEGE, K., PÉREZ-ISHIWARA, R., & FORNONI, J. (2019). Evolutionary transition between bee-and hummingbird-pollination in *Salvia*: comparing means, variances and covariances of corolla traits. *Journal of evolutionary biology*.
 10. BERNARDELLO, G. (2007). A systematic survey of floral nectaries. In nectaries and nectar (pp. 19-128). Springer Netherlands.
 11. BROWN, J. H., & KODRIC-BROWN, A. (1979). Convergence, competition, and mimicry in a temperate community of hummingbird-pollinated flowers. *Ecology*, 60(5), 1022-1035.
 12. CAMPBELL D. R. (1989). Measurements of selection in a hermaphroditic plant: variation in male and female pollination success. *Evolution* 43:318–34.
 13. CAMPBELL, D. R., WASER, N. M., & PRICE, M. V. (1996). Mechanisms of hummingbird-mediated selection for flower width in *Ipomopsis aggregata*. *Ecology*, 77(5), 1463-1472.
 14. 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(4), 876-885.
 15. CAVALCANTE, M. C., GALETTO, L., MAUÉS, M. M., PACHECO FILHO, A. J. S., BOMFIM, I. G. A., & FREITAS, B. M. (2018). Nectar production dynamics and daily pattern of pollinator visits in brazil nut (*bertholletia excelsa* Bonpl.) Plantations in central amazon: implications for fruit production. *Apidologie*, 1-12.
 16. CONANT, G. C., & WAGNER, A. (2003). Convergent evolution of gene circuits. *Nature genetics*, 34(3), 264.
 17. CORNEJO-TENORIO, G., & IBARRA-MANRÍQUEZ, G. (2011). Diversidad y distribución del género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82(4), 1279-1296.
 18. CLABEN-BOCKHOFF (2003). The new book of salvias: sages for every garden (Vol. 881925608). Portland, Or.: Timber Press 344p.-illus., col. illus.. ISBN.

19. CLABEN-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.
20. DAFNI, H., LENSKY, Y., & FAHN, A. (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. DE MARZI, V. (2006). 100 Plantas Argentinas. O'Reilly Media, Inc..
22. DIERINGER, G., RAMAMOORTHY, T. P., & LEZAMA, P. T. (1991). Floral visitors and their behavior to sympatric *Salvia* species (Lamiaceae) in Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, (13), 75-83.
23. DONLEY, J. M., SEPULVEDA, C. A., KONSTANTINIDIS, P., GEMBALLA, S., & SHADWICK, R. E. (2004). Convergent evolution in mechanical design of lamnid sharks and tunas. *Nature*, 429(6987), 61.
24. DUPONT, Y. L., HANSEN, D. M., RASMUSSEN, J. T., & OLESEN, J. M. (2004). Evolutionary changes in nectar sugar composition associated with switches between bird and insect pollination: The Canarian bird-flower element revisited. *Functional Ecology*, 18(5), 670-676.
25. EPLING, C. (1939). A revision of *Salvia* subgenus *Calosphace*. Feddes Repertrorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis 110: 1-38.
26. ESPINO-ESPINO, J., ROSAS, F., & CUEVAS-GARCIA, E. (2014). Temporal variation of floral visitors in two sympatric co-flowering *Salvia* species with contrasting pollination syndromes. *REVISTA MEXICANA DE BIODIVERSIDAD*, 85(1), 161-166.
27. FAHN, A. (1979). Secretory tissues in plants. Academic Press, Londres.
28. FAHN, A. (1988). Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist*, 108, 229-258.
29. FAEGRI, K., & PIJL, V. D. L. (1979). The principles of pollination ecology. Oxford; New York: Pergamon Press.
30. FENSTER, C. B., ARMBRUSTER, W. S., WILSON, P., DUDASH, M. R., & THOMSON, J. D. (2004). Pollination syndromes and floral specialization. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 35, 375-403.
31. FLORES GUTIÉRREZ, A. (2014). *Variaciones en la estructura de los nectarios florales de salvias (Lamiaceae) sección Calosphace, en relación con sus diferentes polinizadores*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
32. FRAGOSO-MARTÍNEZ, I., MARTÍNEZ-GORDILLO, M., SALAZAR, G. A., SAZATORNIL, F., JENKS, A. A., PEÑA, M. D. R. 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.
33. FREEMAN, C. E., REID, W. H., BECVAR, J. E., & SCOGIN, R. (1984). Similarity and apparent convergence in the nectar-sugar composition of some hummingbird-pollinated flowers. *Botanical Gazette*, 145(1), 132-135.
34. FREEMAN, C. E., REID, W. H., BECVAR, J. E., & SCOGIN, R. (1984b). Similarity and apparent convergence in the nectar-sugar composition of some hummingbird-pollinated flowers. *Botanical Gazette*, 145(1), 132-135.

35. FRITZ, S. A., & PURVIS, A. (2010). Selectivity in mammalian extinction risk and threat types: a new measure of phylogenetic signal strength in binary traits. *Conservation Biology*, 24(4), 1042-1051.
36. GAFFAL, K. P., FRIEDRICH, G. J., & EL-GAMMAL, S. (2007). Ultrastructural evidence for a dual function of the phloem and programmed cell death in the floral nectary of *Digitalis purpurea*. *Annals of Botany*, 99(4), 593-607.
37. GALETTO, L. (1995). Nectary structure and nectar characteristics in some Bignoniaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 196(1-2), 99-121.
38. GALETTO, L., BERNARDELLO, G., & SOSA, C. A. (1998). The relationship between floral nectar composition and visitors in *Lycium* (Solanaceae) from Argentina and Chile: what does it reflect?. *Flora*, 193(3), 303-314.
39. GALETTO, L., & BERNARDELLO, G. (2003). Nectar sugar composition in angiosperms from Chaco and Patagonia (Argentina): an animal visitor's matter?. *Plant Systematics and Evolution*, 238(1-4), 69-86.
40. GALETTO, L., & BERNARDELLO, G. (2004). Floral nectaries, nectar production dynamics and chemical composition in six *Ipomoea* species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. *Annals of botany*, 94(2), 269-280.
41. GONZÁLEZ-TEUBER, M., & HEIL, M. (2009). Nectar chemistry is tailored for both attraction of mutualists and protection from exploiters. *Plant signaling & behavior*, 4(9), 809-813.
42. GOLDBLATT, P., MANNING, J. C., & BERNHARDT, P. (2001). Radiation of pollination systems in *Gladiolus* (Iridaceae: Crocoideae) in southern Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 713-734.
43. GOULD, STEPHEN J. (2002). The Structure Of Evolutionary Theory. 1433 págs. Harvard University Press. ISBN 0-674-00613-5.
44. GRANT, V. (1994). Historical development of ornithophily in the western North American flora. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(22), 10407-10411.
45. HEIL, M. (2011). Nectar: generation, regulation and ecological functions. *Trends in plant science*, 16(4), 191-200.
46. HERRERA, C. M., PÉREZ, R., & ALONSO, C. (2006). Extreme intraplant variation in nectar sugar composition in an insect-pollinated perennial herb. *American Journal of Botany*, 93(4), 575-581.
47. IBAÑEZ, A. C., MORÉ, M., SALAZAR, G., LEIVA, S., BARBOZA, G. E., & COCUCCI, A. A. (2019). Crescendo, diminuendo and subito of the trumpets: winds of change in the concerted evolution between flowers and pollinators in *Salpichroa* (Solanaceae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 132, 90-99.
48. JACKSON, S., & NICOLSON, S. W. (2002). Xylose as a nectar sugar: from biochemistry to ecology. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 131(4), 613-620.

49. KRIEBEL, R., DREW, B. T., DRUMMOND, C. P., GONZÁLEZ-GALLEGOS, J. G., CELEP, F., MAHDJOUB, M. M., ... & LEMMON, E. M. (2019). Tracking temporal shifts in area, biomes, and pollinators in the radiation of *Salvia* (sages) across continents: leveraging anchored hybrid enrichment and targeted sequence data. *American journal of botany*. PMID 30986330 DOI: 10.1002/ajb2.1268.
50. KRÖMER, T., KESSLER, M., LOHAUS, G., & SCHMIDT-LEBUHN, A. N. (2008). Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae. *Plant Biology*, 10(4), 502-511.
51. KUMARI, D. S. (1986). Evolution of floral nectary in Lamiaceae. *Proceedings: Plant Sciences*, 96(4), 281-288.
52. LOTZ, C. N., & NICOLSON, S. W. (2002). Nectar dilution increases metabolic rate in the lesser double-collared sunbird. *The Condor*, 104(3), 672-675.
53. MARTINS, E. P., AND T. F. HANSEN. (1997). Phylogenies and the comparative method: a general approach to incorporating phylogenetic information into the analysis of interspecific data. *Am. Nat.* 149:646-667.
54. MAYR, E. (1997). *This is biology: the science of the living world*. Universities Press.
55. MITCHELL, R. J. (2004). Heritability of nectar traits: why do we know so little?. *Ecology*, 85(6), 1527-1533.
56. MURAKAWA, J., YOON, I., HONG, T. L., & LANK, E. (2006). Parts, Image, and Sketch based 3D Modeling Method. In *SBM* (pp. 67-74).
57. NAGHILOO, S., KHODAVERDI, M., SIAHKOLAEI, S. N., & DADPOUR, M. R. (2014). Comparative floral development in Lamioideae (Lamiaceae): *Marrubium*, *Phlomis*, and *Stachys*. *Plant systematics and evolution*, 300(6), 1269-1283.
58. NEPI, M. (2007). Nectar structure and ultrastructure. En: Nicolson, S.W., M. Nepi y E. Pacini [Eds.]. *Nectaries and nectar*, 129-166. Springer, Dordrecht.
59. NEPI, M., FRANCHI, G. G., & PADNI, E. (2001). Pollen hydration status at dispersal: cytophysiological features and strategies. *Protoplasma*, 216(3-4), 171.
60. NICOLSON, S. W., NEPI, M., & PACINI, E. (EDS.). (2007). *Nectaries and nectar* (Vol. 4). Dordrecht: Springer.
61. NOVOA, M. C., MONTI, C., & VIZCAÍNO, C. E. (2005). Anatomía y etnobotánica de cuatro especies de Labiatae de la provincia biogeográfica pampeana, usadas en la medicina popular. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 24(4), 512.
62. O'LEARY, N., & MORONI, P. (2016). Las especies de *Salvia* (Lamiaceae) para Argentina. *Darwiniana, nueva serie*, 4(1), 91-131.
63. OLLERTON, J., ALARCÓN, R., WASER, N. M., PRICE, M. V., WATTS, S., CRANMER, L., ... & ROTENBERRY, J. (2009). A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of botany*, 103(9), 1471-1480.
64. ORFILA, E. N., FARINA, E. L., & NOVARA, L. (1996). Lamiaceae. *Aportes Botánicos de Salta-Serie Flora*, 4(2), 1-77.

65. ORME, D., & FRECKLETON, R. (2013). The caper package: comparative analysis of phylogenetics and evolution in R. *R package version*, 5(2), 1-36.
66. PARADIS, E., CLAUDE, J., & STRIMMER, K. (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20(2), 289-290.
67. PERCIVAL, M. S. (1961). Types of nectar in angiosperms. *New Phytologist*, 60(3), 235-281.
68. PÉREZ-BARRALES, R., SIMÓN-PORCAR, V. I., SANTOS-GALLY, R., & ARROYO, J. (2014). Phenotypic integration in style dimorphic daffodils (*Narcissus*, Amaryllidaceae) with different pollinators. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1649), 20130258.
69. PETANIDOU, T., GOETHALS, V., & SMETS, E. (2000). Nectary structure of Labiatae in relation to their nectar secretion and characteristics in a Mediterranean shrub community: does flowering time matter? *Plant Systematics and Evolution*, 225, 103-118.
70. PETANIDOU, T., VAN LAERE, A., N. ELLIS, W., & SMETS, E. (2006). What shapes amino acid and sugar composition in Mediterranean floral nectars?. *Oikos*, 115(1), 155-169.
71. PRIN, J. L., GONZÁLEZ, N., VILLARROEL, H., RAMÍREZ, M., & DE GÁSCUE, B. R. (2012). El Secado de Punto Crítico (SPC) como técnica aplicada en la preparación de geles de POLI (acrilamida-co-ácido acrílico) por Microscopía Electrónica de Barrido. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, (1), 20-23.
72. PROCTOR, M., P. YEO y A. LACK. (1996). *The natural history of pollination*. Harper Collins, Londres.
73. QING, X., SÁNCHEZ-MONGE, A., & BERT, W. (2015). Three-dimensional modelling and printing as tools to enhance education and research in Nematology. *Nematology*, 17(10), 1245-1248.
74. R CORE TEAM (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
75. RAMAMOORTHY, T. P. (2001). *Salvia* L. In *Flora fanerogámica del Valle de México*, G. Calderón de Rzed de la Biodiversidad/ Instituto de Ecología, Pátzcuaro, Michoacán. p. 632-644.
76. REVELL, L. J. (2012). phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, 3(2), 217-223.
77. REVELL, L. J., HARMON, L. J., & COLLAR, D. C. (2008). Phylogenetic signal, evolutionary process, and rate. *Systematic Biology*, 57(4), 591-601.
78. ROJAS-SOLA, J., GALÁN-MORAL, B., & LA MORENA-DE LA FUENTE, D. (2018). Agustín de Betancourt's Double-Acting Steam Engine: Geometric Modeling and Virtual Reconstruction. *Symmetry*, 10(8), 351.
79. ROSAS-GUERRERO, V., AGUILAR, R., MARTÉN-RODRÍGUEZ, S., ASHWORTH, L., LOPEZARAIZA-MIKEL, M., BASTIDA, J. M., & QUESADA, M. (2014). A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators?. *Ecology Letters*, 17(3), 388-400.

80. ROY, R., SCHMITT, A. J., THOMAS, J. B., & CARTER, C. J. (2017). Nectar biology: from molecules to ecosystems. *Plant Science*, 262, 148-164.
81. SANMARTIN-GAJARDO, I., & SAZIMA, M. (2005). Chiropterophily in Sinningieae (Gesneriaceae): *Sinningia brasiliensis* and *Paliavana prasinata* are bat-pollinated, but *P. sericiflora* is not. Not yet?. *Annals of Botany*, 95(7), 1097-1103.
82. SANTOS, R. (2006). Composición del néctar y actividad de la invertasa en Pachycereae (Cactaceae) y su relación con los sistemas de polinización. Tesis de Maestría. Instituto de Ecología. UNAM, México.
83. STERN, D. L. (2013). The genetic causes of convergent evolution. *Nature Reviews Genetics*, 14(11), 751.
84. SHAFIR, S., BECHAR, A., & WEBER, E. U. (2003). Cognition-mediated coevolution–context-dependent evaluations and sensitivity of pollinators to variability in nectar rewards. *Plant Systematics and Evolution*, 238(1-4), 195-209.
85. SHUBIN, N., TABIN, C., & CARROLL, S. (1997). Fossils, genes and the evolution of animal limbs. *Nature*, 388(6643), 639.
86. SMITH, S. D., ANÉ, C., & BAUM, D. A. (2008). The role of pollinator shifts in the floral diversification of *Lochroma* (Solanaceae). *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 62(4), 793-806.
87. SMITH, S. D., & KRIEBEL, R. (2018). Convergent evolution of floral shape tied to pollinator shifts in *Lochrominae* (Solanaceae). *Evolution*, 72(3), 688-697.
88. STEBBINS, G. L. (1970). Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1(1), 307-326.
89. STEBBINS GL (1989) Adaptive shifts towards hummingbird pollination. In: Bock JH, Linhart YB (eds) *The evolutionary ecology of plants*. Westview Press, Boulder, pp 39–60.
90. THOMSON, J. D., WILSON, P., VALENZUELA, M., & MALZONE, M. (2000). Pollen presentation and pollination syndromes, with special reference to *Penstemon*. *Plant Species Biology*, 15(1), 11-29.
91. TORRES, C., & GALETTO, L. (1998). Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects and standing crop in *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 127(3), 207-223.
92. VÁZQUEZ NIN G. y O. ECHEVERRÍA. (2000). Introducción a la microscopía electrónica aplicada a las ciencias biológicas. Fondo de Cultura Económica, Ciudad de México.
93. WALKER, J. B., SYTSMA, K. J., TREUTLEIN, J., & WINK, M. (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), 1115-1125.
94. WESTER, P. (2007). *Ornithophily in the genus Salvia L. (Lamiaceae)* (Doctoral dissertation, PhD Thesis, Johannes Gutenberg University of Mainz).

95. WESTER, P., & CLAßEN-BOCKHOFF, R. (2006). Hummingbird pollination in *Salvia haenkei* (Lamiaceae) lacking the typical lever mechanism. *Plant Systematics and Evolution*, 257(3), 133-146.
96. WESTER, P., & CLAßEN-BOCKHOFF, R. (2006b). Bird pollination in South African *Salvia* species. *Flora*, 201, 396–406.
97. WESTER, P. & R. CLAßEN-BOCKHOFF. (2007). Floral diversity and pollen transfer mechanisms in bird-pollinated *Salvia* species. *Annals of Botany* 100:1-2.
98. WESTER, P. & 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.
99. WHITTALL, J. B., & HODGES, S. A. (2007). Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature*, 447(7145), 706.
100. WILSON, P., WOLFE, A. D., ARMBRUSTER, W. S., & THOMSON, J. D. (2007). Constrained lability in floral evolution: counting convergent origins of hummingbird pollination in *Penstemon* and *Keckiella*. *New Phytologist*, 176(4), 883-890.
101. WOOD, J. R. I. (2007). "The *Salvias* (Lamiaceae) of Bolivia". *Kew Bulletin*. Springer. 62 (2): 177–207. JSTOR 20443346.
102. YANG, Z., KUMAR, S. & NEI, M. (1995). A new method of inference of ancestral nucleotide and amino acid sequences. *Genetics* 141: 1641–1650.
103. ZHANG, B., & LI, Q. J. (2014). Phenotypic selection on the staminal lever mechanism in *Salvia digitaloides* (Labiaceae). *Evolutionary Ecology*, 28(2), 373-386.
104. ZHANG, X., SAWHNEY, V. K., & DAVIS, A. R. (2014b). Annular floral nectary with oil-producing trichomes in *Salvia farinacea* (Lamiaceae): Anatomy, histochemistry, ultrastructure, and significance. *American Journal of Botany*, 101(11), 1849-1867.