



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Facultad de Biología

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

Área Temática: Biología Evolutiva

**El aroma floral en especies del género *Salvia* (Lamiaceae)
y la relación con sus visitantes florales**

Tesis

Que presenta:

Biol. Leopoldo Jafet Ramírez Reyes

Como requisito para obtener el título de

Maestro en Ciencias Biológicas

Director de Tesis: Dr. Eduardo Cuevas García

Co-Director de Tesis: Dra. Yesenia Martínez Díaz

Morelia Michoacán.

Agosto de 2023



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

DRA. MARTHA ELENA PEDRAZA SANTOS
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "EL AROMA FLORAL EN ESPECIES DEL GÉNERO SALVIA (LAMIACEAE) Y LA RELACIÓN CON SUS VISITANTES FLORALES" presentado por el BIOL. Leopoldo Jafet Ramírez Reyes con Número de Matrícula 1426156F,, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestro en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E Morelia, Michoacán, a 31 de julio de 2023

COMITÉ SINODAL

Dr. Eduardo Cuevas García
Director de Tesis

Dra. Yesenia Martínez Díaz
Co directora

Dr. Francisco Espinosa García
Presidente

Dra. Clementina González Zaragoza
Vocal 1

Dr. Luis Felipe Mendoza Cuenca
Vocal 2

“De la vida no quiero mucho.

Quiero apenas saber que

intenté todo lo que quise,

tuve todo lo que pude,

amé lo que valia la pena y

perdi apenas lo que

nunca fue mio”

-Pablo Neruda

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas por el espacio y el acompañamiento brindado.

A CONACYT por el apoyo económico otorgado para el periodo 2021-2023.

Al Dr. Eduardo Cuevas García por su acompañamiento y asesoría durante estos 5 años. Su confianza en mi persona ha sido fundamental para mi desarrollo profesional.

A la Dra. Yesenia Martínez Díaz por su aceptación para ser co-asesora del presente proyecto, por su orientación y seguimiento en el mismo y también por su amistad, que hizo más ameno el trabajo en laboratorio y en campo.

A mi comité tutorial: Dra. Clementina González Zaragoza, Dr. Francisco Espinosa García, Dr. Luis Felipe Mendoza Cuenca, Dra. Yesenia Martínez Díaz y Dr. Eduardo Cuevas García. Gracias por su aceptación, por el tiempo dedicado a la revisión de este proyecto y por sus recomendaciones tan atinadas que han mejorado este proyecto.

A Yolanda García por su apoyo técnico en los análisis cromatográficos de las muestras.

A mis compañeros de laboratorio: Biol. Luis Genaro Romero Moreno, Alma Karina López Martínez, Biol. Arturo Tavera Lemus, Biol. Edgar Emilio Medina Rocha, Biol. Sandra Penélope Barrón Villanueva, Cinthya, Gilson Olvera, Kevin, Luis, Melisa. Sin su apoyo y amistad, estoy seguro que el trabajo en campo y en laboratorio no sería el mismo.

A mi familia: mis padres, hermanos, sobrinos, cuñados por su apoyo y confianza. A familiares y amigos que me han demostrado su afecto y cariño. Gracias por sus palabras de aliento que en más de una vez me motivaron a continuar.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	vii
ABSTRACT.....	viii
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 HIPÓTESIS.....	10
2.1 Objetivo General.....	10
2.2 Objetivos particulares.....	10
3 MÉTODOS.....	11
3.1 Identificación y georreferenciación de poblaciones	11
3.2 Áreas de estudio	14
3.3 Caracterización de la morfología floral	16
3.4 Identificación de los visitantes florales.....	16
3.5 Extracción y análisis de compuestos volátiles florales.....	17
3.6 Análisis estadísticos.....	20
4 RESULTADOS	22
4.1 Morfología floral	22
4.2 Visitantes florales.....	25
4.3 Compuestos volátiles florales	29
5 DISCUSIÓN.....	38
6 CONCLUSIONES	49
7 BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.....	50

RESUMEN

El género *Salvia* es uno de los más diversos de plantas a nivel mundial y el segundo más representativo en México, con una gama extensa de morfologías florales que atraen a una gran variedad de polinizadores. Existen varios trabajos que abordan las características florales relacionadas con la morfología floral en salvias, incluyendo el tamaño y el color, pero el aroma ha sido poco explorado. El aroma floral es un conjunto de compuestos orgánicos volátiles (COVs) y se ha considerado como una de las señales principales en la atracción de los polinizadores, por lo que se ha propuesto que la variación en la cantidad y composición del aroma floral se debe a la selección impuesta por los polinizadores. Evaluamos los COVs florales en 18 especies del género *Salvia* con síndrome melitófilo, ornitófilo e intermedio y la relación con sus visitantes florales. Realizamos mediciones de caracteres florales relevantes, registramos los visitantes florales de cada especie y analizamos los COVs florales por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Los rasgos morfológicos y los visitantes florales observados y registrados en la mayoría de las especies concordaron con los síndromes de polinización propuestos para las especies en la literatura. En cuanto a los COVs florales, se identificaron un total de 24 compuestos, siendo los monoterpenos más comunes en especies ornitófilas. En las especies melitófilas, los bencenoides presentaron mayor concentración y en las especies intermedias, dos compuestos (un monoterpeno y un bencenoide) presentaron las mayores concentraciones. Nuestros resultados indican que todas las especies, incluso aquellas con características ornitófilas (las cuales se asume que no producen volátiles) emiten aromas florales, muchos de estos reportados como atrayentes de visitantes florales, pero existen diferencias muy marcadas en cuanto a la concentración emitida.

Palabras clave: Salvias, síndromes de polinización, aromas florales, visitantes florales.

ABSTRACT

Salvia is one of the most diverse plant genus worldwide, and the second most representative in Mexico, with an extensive range of floral morphologies that attract a wide range of pollinators. Several studies have addressed the floral morphology in salvias, including flower size and color, but scent has been poorly explored. The floral scent is a blend of volatile organic compounds (VOCs) and has been considered as one of the main signals in the attraction to pollinators. Therefore, the variation in the volume and composition of floral scents has been proposed that is due to selection imposed by pollinators. We evaluated floral VOCs in 18 species of the genus *Salvia* with mellitophilous, ornithophilous, and intermediate syndromes, and the relationship with their floral visitors. We measured relevant floral traits, recorded the floral visitors of each species and analyzed the floral VOCs by gas chromatography coupled to mass spectrometry. Morphological traits and floral visitors recorded in most of the species were the expected according to the pollination syndromes to which the species are assigned in the literature. Regarding floral VOCs, a total of 24 compounds were identified being monoterpenes the most common in ornithophilous species. In mellitophilous species, benzenoids were presented in high concentration. In the intermediate species, two compounds (one monoterpene and one benzenoid) presented the highest concentrations. Our results indicate that all species, even those with ornithophilous characteristics (which are assumed not to emit volatiles), emitted floral scent, many reported as attracting floral visitors, but there are very marked differences in the scent concentration.

Keywords: Salvias, pollination syndromes, floral scents, floral visitors.

1 INTRODUCCIÓN

Las flores son las estructuras principales de las angiospermas y representan una asombrosa diversidad en morfología, color, recompensa y aroma incluso entre especies estrechamente relacionadas (Endress, 1996; Specht & Bartlett, 2009; Schiestl & Johnson, 2013; Sauquet *et al.*, 2017; Sauquet & Magallón, 2018; Dellinger, 2020). Desde principios del siglo XX y en trabajos recientes se ha observado que las angiospermas son visitadas por polinizadores de varios grupos taxonómicos (Darwin y Seward, 1903; Nava-Bolaños *et al.*, 2022). También se ha propuesto que la capacidad para polinizar difiere entre los visitantes florales y que, además, las interacciones entre polinizadores y plantas pueden cambiar de mutualistas a antagonistas (Robertson, 1928; Thomson, 2003; Rosas-Guerrero *et al.*, 2014). Se ha sugerido que diferentes polinizadores pueden promover la divergencia floral, así como polinizadores compartidos pueden promover la convergencia de rasgos florales (Fenster *et al.*, 2004; Rosas-Guerrero *et al.*, 2014). En este sentido, la selección de rasgos florales se ha considerado una importante fuerza selectiva cuando ésta es ejercida por polinizadores (Fenster *et al.*, 2004; Rosas-Guerrero *et al.*, 2014). Esta gran diversidad de patrones de polinización que dependen de las interacciones de las plantas con varios grupos taxonómicos de animales nos lleva a definir a los síndromes de polinización como el conjunto de características florales que influyen en la atracción y transferencia de polen (Reynolds *et al.*, 2009). Los síndromes de polinización sugieren que las flores se han adaptado al gremio de polinizadores más eficiente (eficiencia medida como la remoción de polen de las anteras de una flor y el depósito en el estigma de otra flor; Ne'eman *et al.*, 2010; Stebbins, 1970; Ashworth *et al.*, 2015; Dellinger,

2020). Los síndromes de polinización han sido utilizados para inferir a los gremios de polinizadores que visitan a las flores de una planta en ausencia de evidencia empírica de estos polinizadores (Machado & Lopes, 2004; Knapp, 2010; Rosas-Guerrero *et al.*, 2014).

Algunos autores han propuesto que los rasgos florales reflejan la selección ejercida por polinizadores que visitan las flores con mayor frecuencia y eficacia y aunque se espera que los síndromes de polinización reflejen la adaptación a los polinizadores primarios, no impiden la llegada de visitantes florales menos eficaces (Stebbins, 1970; Rosas-Guerrero *et al.*, 2014). Sin embargo, se acepta la idea de que la combinación específica de los rasgos florales tiende a atraer grupos específicos de polinizadores, como abejas, aves, murciélagos, mariposas, etc. (Vogel, 1954; Faegri & van der Pijl, 1979; Fenster, 2004; Wester *et al.*, 2020). Los rasgos florales que generalmente se han considerado para definir a los síndromes de polinización son: la antesis floral, el tamaño y forma de la flor, la posición de los órganos florales, el tipo de recompensa, el color y el aroma de la flor (Rosas-Guerrero *et al.*, 2014). En trabajos referentes a síndromes de polinización, las características más estudiadas han sido: el color, las recompensas florales y la forma o arquitectura de la flor (Dellinger, 2020). Sin duda alguna, el color de la flor es una característica clave, ya que proporciona el atractivo principal que atrae y/o engaña a los polinizadores cuando éstos se encuentran cerca de algún recurso floral (Lunau y Maier, 1995; Heuschen *et al.*, 2005; Lunau y Wester, 2017; An *et al.*, 2018; van der Kooi *et al.*, 2019; Lunau *et al.*, 2021). Para el caso de las flores que tienen ocultas o encerradas las anteras (Lamiaceae, Plantaginaceae y

Phrymaceae), las guías de néctar o guías florales son muy comunes, estas absorben los rayos UV y se piensa que reemplazan las funciones de señalización de las anteras y el polen (Osche, 1983; Lunau *et al.*, 2017; Lunau *et al.*, 2021).

El aroma floral es un rasgo que ha sido poco explorado en comparación con otras características que pueden influir en la atracción de polinizadores (Raguso, 2008; Byers, 2021), y cuando se ha considerado, en la mayoría de los casos solo se describe si el investigador detecta algún aroma, lo cual es una aproximación subjetiva. El aroma floral se conforma por un conjunto de volátiles orgánicos y se considera como la señal principal de la atracción de los polinizadores (Knudsen *et al.*, 2006), por lo que se ha propuesto que la variación en la cantidad y composición del aroma floral se debe a la selección impuesta por los polinizadores (Raguso, 2008). Los compuestos orgánicos volátiles (COVs) florales como participantes en la atracción de los polinizadores pueden jugar un papel muy importante en el origen y mantenimiento del aislamiento reproductivo entre especies hermanas de angiospermas, sobre todo en aquellas que están separadas por aislamiento reproductivo precigótico basado en polinizadores (Grant, 1949; Coyne y Orr, 2004). Los COVs florales se han dividido en 7 clases principales de acuerdo a sus estructuras químicas: alifáticos, bencenoides y fenilpropanoides, compuestos ramificados C5, terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y terpenos irregulares), compuestos nitrogenados, compuestos que contienen azufre y compuestos cíclicos varios (Knudsen *et al.*, 2006). La mayoría de las clases de COVs están presentes en las angiospermas, siendo los monoterpenos los más comunes, entre los que resaltan limoneno, β -

ocimeno, mirceno, linalol, e α -pineno y β -pineno, entre otros (Knudsen *et al.*, 2006). El registro generalizado de estos COV's florales sugiere que pueden tener otro papel en la señalización además de la atracción de polinizadores, como repeler florívoros y/o atraer enemigos naturales de éstos (Pichersky & Gershenzon, 2002; Knudsen *et al.*, 2006). También se ha mencionado que, aunque las partes vegetativas liberan una gran diversidad de COV's, especialmente después del daño por herbívoros, éstos pueden ser diferenciados de los COV's florales, los cuales presentan una diversidad significativamente mayor a la diversidad de volátiles vegetativos (Pichersky & Gershenzon, 2002; Knudsen *et al.*, 2006). En la mayoría de los estudios se ha dado por hecho que las especies polinizadas por aves (síndrome ornitófilico) tienen pocas o nulas emisiones de aromas (Knudsen *et al.*, 2004; Dudareva y Pichersky, 2006), mientras que las especies con síndrome melitófilico (polinización por abejas) emiten gran diversidad de compuestos orgánicos florales que atraen a los polinizadores (Rosas-Guerrero *et al.*, 2014; Díaz, 2020).

Existen factores que limitan el estudio de los compuestos orgánicos volátiles de las flores, como las dificultades del estudio cuantitativo de los aromas, pues requiere equipo especializado para su captura y análisis, o la falta de colaboración entre científicos de distintas disciplinas como la ecología, la evolución, la bioquímica, por mencionar algunas (Raguso, 2008, 2015; Byers, 2021). Como consecuencia, la mayoría de los estudios basados en síndromes de polinización carecen de esos datos (Byers, 2021). En este contexto, existen algunos trabajos recientes referentes al estudio de aromas florales y otros rasgos como el color y la

morfología floral en grupos taxonómicos de plantas, como en orquídeas (Ray *et al.*, 2018). Sin embargo, estudios referentes al aroma floral y a su interacción con polinizadores en otros grupos muy diversos, como las especies del género *Salvia* son muy limitados (Giuliani *et al.*, 2020).

Salvia es el género con más especies dentro de la familia Lamiaceae (Harley *et al.*, 2004), y uno de los géneros con más especies descritas (Drew, 2020), con una distribución casi cosmopolita y con varios centros de diversificación en el mundo, siendo México uno de ellos (Wester y Claßen-Bockhoff, 2006; Fragoso-Martínez *et al.*, 2018). Este género muestra una amplia variedad de formas y colores, además de una notable distribución geográfica y ecológica, encontrándose en distintos biomas y adaptándose a diferentes polinizadores (Wester y Claßen-Bockhoff, 2006, 2007, 2011; Claßen-Bockhoff, 2007; Celep *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2015; Fragoso-Martínez *et al.*, 2018). De todas las especies de *Salvia* (~1000 especies), cerca de 600 pertenecen al subgénero *Calosphace*, de las que aproximadamente 306 están presentes en México y muchas de ellas son consideradas endémicas y/o microendémicas (Martínez-Gordillo *et al.*, 2017; Zamudio y Bedolla-García, 2018). Las especies del subgénero *Calosphace* son generalmente polinizadas por aves y abejas, considerándose el síndrome ornitófilico como un carácter derivado (Wester y Claßen-Bockhoff, 2011). Las especies de este subgénero se caracterizan por la presencia de un mecanismo de palanca estaminal, que en algunas especies ya no se encuentra activo, posiblemente por la adaptación de ciertas especies a la polinización por aves (Will y Claßen-Bockhoff, 2017; Fragoso-Martínez *et al.*, 2018). De acuerdo a ciertas características florales como la

arquitectura floral, el tamaño, el color y el aroma, además de las recompensas florales, se han separado a la mayoría de las especies (90%) de este género en dos síndromes de polinización: melitofilia (polinización por abejas) y ornitofilia (polinización por aves) (Walker y Sytsma, 2007; Wester y Claßen-Bockhoff, 2011). Las especies melitófilas de flores generalmente azul-moradas, brindan una plataforma de aterrizaje con un labio inferior amplio, tienen tubos florales cortos y el polen que está oculto en el labio superior, es depositado en el cuerpo de las abejas, quienes activan el mecanismo de palanca que comúnmente es funcional en todas las especies con este síndrome. Las especies ornitófilas de flores usualmente rojas, por otra parte, presentan tubos florales largos y estrechos, con un labio inferior en la mayoría de las especies reducido y con un mecanismo de palanca inactivo en un porcentaje importante de salvias visitadas por aves (66 de 184: Zamudio y Bedolla-García, 2018), en donde las estructuras reproductivas (anteras y estigma) se encuentran exertas del labio superior (Wester & Claßen-Bockhoff, 2011). Las especies restantes comparten caracteres con especies de estos dos grupos (melitófilas y ornitófilas), permitiendo que diferentes gremios de polinizadores accedan al néctar, por lo que se les ha considerado como especies intermedias o polimórficas (Wester & Claßen-Bockhoff, 2011). En *Salvia*, el síndrome de polinización melitófilico es considerado como caracter ancestral; sin embargo, se han registrado transiciones y reversiones entre síndromes florales, lo que nos indica que la evolución de los síndromes de polinización no siempre es unidireccional (melitofilia a ornitofilia; Benitez-Vieyra *et al*, 2014,2019; Fragoso-Martínez *et al.*, 2018; Kriebel *et al.*, 2019). Algunos autores (Fragoso-Martínez *et*

al., 2018) mencionan que estas reversiones solo son posibles si las especies pasan por una etapa intermedia, y no directamente de la ornitofilia a la melitofilia.

En este sentido, se han realizado estudios referentes a las distintas características florales y a la interacción de éstas con sus visitantes florales y/o polinizadores en diversos géneros, así como en el género *Salvia*. Por ejemplo, Gervasi y Schiestl (2017), abordaron la divergencia causada por polinizadores, cuantificando la selección divergente y las respuestas evolutivas a la selección durante varias generaciones en una planta con un sistema de polinización generalista. En su estudio demostraron que los polinizadores funcionalmente diferentes imponen una selección divergente en los rasgos de la planta. Reportaron un incremento en el tamaño de las plantas además de que el aroma floral fue más perceptible en aquellas plantas polinizadas por abejorros; en contraste, las plantas visitadas por sírfidos, al ser polinizadores menos eficientes, promovían la autopolinización en las plantas que visitaban.

En relación a los visitantes florales y a la morfología floral en salvias, destaca el trabajo de Espino-Espino *et al.*, (2014); ellos registraron los visitantes florales en dos especies de *Salvia* con síndrome de polinización contrastante (ornitofilia-melitofilia). Encontraron que los visitantes florales observados fueron los esperados de acuerdo a los síndromes de polinización. Sin embargo, los autores reportaron una mayor tasa de visita de colibríes a flores melitófilas que de abejas a flores ornitófilas, lo cual puede explicarse por la limitación visual de las abejas a colores como el rojo (Chittka y Waser, 1997). En otro trabajo Wester *et al.* (2020), determinaron qué rasgo floral (i. e. color o arquitectura floral) tenía más peso al

excluir a las abejas, concluyendo que las abejas eran excluidas de las especies ornitófilas principalmente por la arquitectura floral.

En cuanto al aroma, tanto en salvias como en otras especies, este rasgo floral ha sido escasamente explorado. Algunos autores han puesto a prueba la predicción general de que las flores polinizadas por colibríes no emiten aromas florales. Knudsen y colaboradores (2004), analizaron 17 especies de plantas con síndrome ornitófilo; en nueve de ellas no registraron compuestos volátiles, mientras que en las ocho restantes identificaron bajas concentraciones de volátiles que son comúnmente emitidos por tejidos vegetativos y florales. Las especies de *Salvia* que son visitadas y/o polinizadas por aves emiten aromas florales (Ramírez-Reyes, 2020, datos no publicados), así como otras especies de angiospermas visitadas por aves (Hilpman y Busch, 2021); algunos autores sugieren que esos aromas pueden estar relacionados a polinizadores nocturnos o ser reminiscencias por arrastre filogenético de sus antiguos códigos de emisión que atraían a los que antes cumplían el papel de polinizadores (Knudsen *et al.*, 2004; Reith y Zona, 2016).

En otro trabajo reciente, Kim y colaboradores (2021), investigaron las respuestas conductuales de los colibríes silvestres y en cautiverio a las señales olfativas de los visitantes florales. Descubrieron que algunos compuestos químicos derivados de insectos como el ácido fórmico o las feromonas, alteran las visitas de los colibríes, por lo que concluyen que el uso de señales olfativas por colibríes en la selección de su alimento, puede ser más común de lo que se creía anteriormente (Kim *et al.*, 2021).

Giuliani *et al.* (2020), estudiaron dos especies del género *Salvia*, en donde registraron los visitantes florales y los compuestos volátiles florales emitidos; demostraron que el limoneno y el β -pineno (compuestos principalmente emitidos en *S. greggii*) participan en la atracción de abejorros y especies de la familia Apidae: Meliponinae, así como el 1,8-cineol (característico de *S. blepharophylla*) parece tener un papel muy importante en la atracción de diferentes especies de abejas.

El objetivo de este trabajo es entender las relaciones que existen entre los aromas florales y la morfología en especies del género *Salvia* con los visitantes florales. Este estudio propone aportar información clave y novedosa sobre la composición de los volátiles florales de las especies del género *Salvia*.

2 HIPÓTESIS

La variación en el aroma y la morfología floral de las especies del género *Salvia* se asocia con los síndromes de polinización y los visitantes florales más frecuentes.

Predicciones:

En las especies con síndrome melitófilico (corola pequeña y labio inferior amplio) esperamos que los visitantes florales más frecuentes sean las abejas y emitan mayor abundancia y diversidad de compuestos orgánicos volátiles (COVs) florales que las especies ornitófilicas. En las especies con síndrome ornitófilico (corolas grandes y labios inferiores reducidos) esperamos que los colibríes sean los visitantes florales más frecuentes y que las especies emitan una baja abundancia y diversidad de COVs florales en comparación con las melitófilicas. En las especies con características florales intermedias, esperamos que la emisión de COVs se relacione con los visitantes florales más frecuentes.

2.1 Objetivo General

Describir los compuestos orgánicos volátiles florales y evaluar la morfología en especies del género *Salvia* con síndromes de polinización por abejas, por aves y especies que no han sido clasificadas en algún síndrome y analizar la relación con sus visitantes florales.

2.2 Objetivos particulares

- Comparar el tamaño del tubo floral y ancho del labio inferior de las diferentes especies.
- Relacionar las observaciones de visitantes florales de cada una de las especies con los compuestos orgánicos volátiles florales analizados e identificados de las especies de estudio.

3 MÉTODOS

3.1 Identificación y georreferenciación de poblaciones

Se llevó a cabo una búsqueda exhaustiva de información sobre la ubicación de poblaciones de especies de *Salvia* presentes en los alrededores del municipio de Morelia y en municipios aledaños. Se hicieron consultas en bases de datos disponibles en línea (INECOL-Pátzcuaro), obteniendo una lista preliminar de especies posibles a estudiar. Se seleccionaron un total de 18 especies (**Figura 1**): ocho poseen características melitófilas, siete tienen características ornitófilas y tres, características intermedias de acuerdo con Fragoso-Martínez *et al.* (2018) (**Tabla 1**), quienes clasificaron a las especies en síndromes de polinización basándose en los tipos de polinizadores. Posteriormente se realizaron salidas a campo a los puntos o localidades donde se han reportado las poblaciones de las distintas especies, para ubicar y georreferenciar las poblaciones de dichas especies a estudiar.

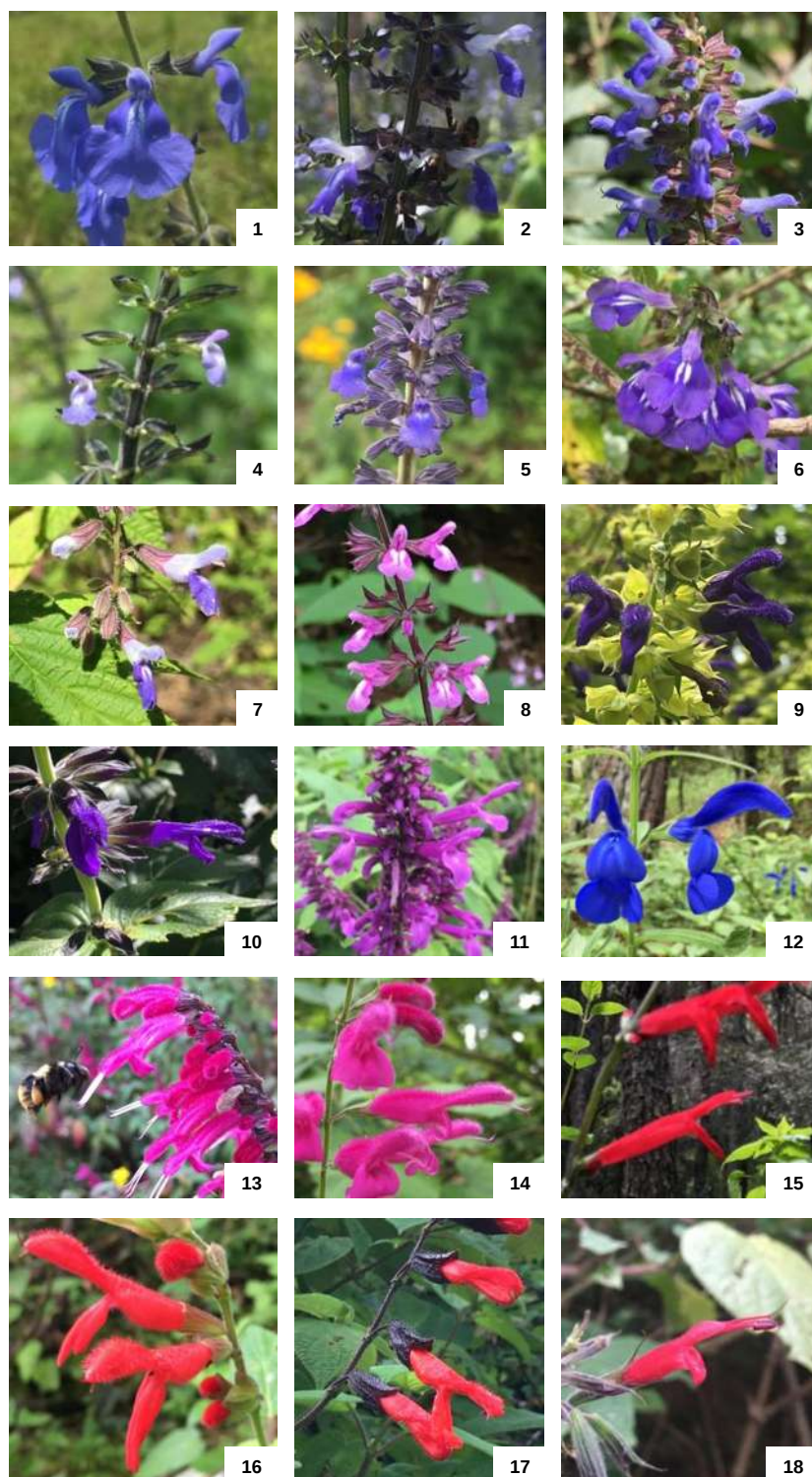


Figura 1. Especies del género *Salvia* consideradas en nuestro estudio. **1.** *S. reptans*. **2.** *S. longispicata*. **3.** *S. polystachya*. **4.** *S. tiliifolia*. **5.** *S. lavanduloides*. **6.** *S. setulosa*. **7.** *S. plurispicata*. **8.** *S. carnea*. **9.** *S. mexicana* var. *minor*. **10.** *S. mexicana* var. *mexicana*. **11.** *S. purpurea*. **12.** *S. patens*. **13.** *S. iodantha*. **14.** *S. curviflora*. **15.** *S. elegans*. **16.** *S. fulgens*. **17.** *S. gesneriiflora*. **18.** *S. longistyla*.

Tabla 1. Especies del género *Salvia* estudiadas en este trabajo.

Especie	Síndrome de polinización	Color de las flores	Guías florales presentes	Mecanismo de palanca
<i>Salvia reptans</i>	Melitófila	Azules	Si	Activo
<i>Salvia longispicata</i>	Melitófila	Azules	Si	Activo
<i>Salvia polystachya</i>	Melitófila	Azul-moradas	Si	Activo
<i>Salvia tiliifolia</i>	Melitófila	Azules	Si	Activo
<i>Salvia lavanduloides</i>	Melitófila	Moradas	Si	Activo
<i>Salvia setulosa</i>	Melitófila	Moradas	Si	Activo
<i>Salvia plurispicata</i>	Melitófila	Azules	Si	Activo
<i>Salvia carnea</i>	Melitófila	Rosas	Si	Activo
<i>Salvia mexicana</i> var. <i>minor</i>	Intermedia	Moradas	No	Activo
<i>Salvia mexicana</i> var. <i>mexicana</i>	Intermedia	Moradas	No	Activo
<i>Salvia purpurea</i>	Intermedia	Morado-púrpuras	No	Activo
<i>Salvia patens</i>	Ornitófila	Azules	Si	Activo
<i>Salvia iodantha</i>	Ornitófila	Rosas	No	Inactivo
<i>Salvia curviflora</i>	Ornitófila	Rosas	No	Activo
<i>Salvia elegans</i>	Ornitófila	Rojas	No	Inactivo
<i>Salvia fulgens</i>	Ornitófila	Rojas	No	Activo
<i>Salvia gesneriflora</i>	Ornitófila	Rojas	No	Activo
<i>Salvia longistyla</i>	Ornitófila	Rojas	No	Inactivo

3.2 Áreas de estudio

El trabajo se llevó a cabo en tres áreas de estudio, dos ubicadas en el estado de Michoacán (Microcuenca del Río Chiquito y el Parque Nacional Cerro de Garnica) y una en el estado de Guanajuato en el Área Natural Protegida Sierra de los Agustinos.

La microcuenca del Río Chiquito se localiza en la sub-cuenca del lago de Cuitzeo; forma parte de la cordillera de la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM) y está ubicada en la zona centro-norte del estado de Michoacán, al sur de la ciudad de Morelia. Está situada entre los paralelos 19° 35' y 19° 41' de latitud N y los meridianos 101° 05' y 101° 11' de longitud W., con una superficie aproximada de 74 km². En cuanto a su fisionomía, el 30% de su superficie está dominado por montañas altas, además de elevaciones medias que ocupan un 50% del área y las llanuras o terrenos con leve inclinación con cerca del 20% de la superficie. Presenta un gradiente altitudinal que va de los 2100 msnm en las llanuras, hasta los 2625 msnm en su montaña más alta (cerro pico azul). En este sitio se pueden distinguir 7 tipos de vegetación de acuerdo a las clasificaciones de Rzedowski y Huerta (1978) y Rzedowski y McVaugh (1966), además de un bosque artificial de eucalipto: bosque de pino, bosque de encino, matorral subtropical, bosque mesófilo de montaña, pastizal, vegetación acuática y subacuática y bosque de galería (Medina y Rodríguez, 1993). En esta microcuenca, se estudiaron las poblaciones de nueve especies: *Salvia mexicana* var. minor, *S. purpurea*, *S. longistyla*, *S. tiliifolia*, *S. longispicata*, *S. polystachya*, *S. lavanduloides*, *S. reptans* y *S. gesneriiflora*.

El Parque Nacional Cerro de Garnica se encuentra ubicado en la cordillera de la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM), dentro de los municipios de Hidalgo y Queréndaro, 58 km al Este de la ciudad de Morelia, sobre la carretera México-Morelia vía Mil Cumbres y a 48 km al Oeste de Hidalgo. Presenta un gradiente altitudinal que va de los 2900 a los 3,028 msnm (Romero, 1991; Espino, 2012). La vegetación está dominada por bosques de pino-encino mezclados con oyamel. En las zonas más altas, por arriba de los 3000 msnm, prevalecen los bosques de oyamel-pino (SARH, 1993; Alva, 2012). Desde hace años, el bosque ha sufrido alteraciones por deforestación (SARH, 1993), ocasionado formaciones de comunidades secundarias. En este lugar se estudiaron seis especies de *Salvia*: *Salvia plurispicata*, *S. setulosa*, *S. iodantha*, *S. fulgens*, *S. carnea* y *S. elegans*.

La Sierra de los Agustinos es un área natural protegida (ANP) que abarca tres municipios: Jerécuaro, Tarimoro y Acámbaro. Pertenece a la provincia geológica de la Faja Volcánica Transmexicana (FVTM); cuenta con una superficie de 19,246 hectáreas (Cruz *et al.*, 2012; Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2019; Vázquez-Buitrón *et al.*, 2021). El área que corresponde al municipio de Acámbaro se encuentra en la parte norte de éste, con un área total de 4,358.07 hectáreas que representa el 22.64% del total de la ANP (Cortés-Gutiérrez *et al.*, 2019). La mayor altitud es de 3,110 msnm. En el área se distinguen 5 tipos de vegetación estratificados por altitud: Bosque de pino, pino-encino, bosque de encino, vegetación subtropical y pastizales (Rzedowski y Rzedowski, 2001; Cruz *et al.*, 2012; Vázquez-Buitrón *et al.*, 2021). En este sitio se estudiaron las poblaciones de tres especies de salvias: *Salvia patens*, *S. curviflora* y *S. mexicana* var. *mexicana*.

3.3 Caracterización de la morfología floral

En cada especie se midieron las siguientes variables florales: largo del tubo floral y ancho del labio inferior. Solo se consideraron estos rasgos florales, ya que se ha mencionado que dichos caracteres (tubos florales y plataformas de aterrizaje) son los que han sufrido mayores e importantes modificaciones referentes a cambios de polinizador, ya sea de abejas a aves o de aves a abejas (Wester *et al.*, 2020). Se midieron de tres a cinco flores por individuo, con un promedio de siete plantas por especie. Las mediciones se llevaron a cabo en campo con un vernier digital (0.05mm; STAINLESS HARDENED).

3.4 Identificación de los visitantes florales

Se realizaron observaciones directas de visitantes florales en las 18 especies. En las especies melitófilas e intermedias, las observaciones se hicieron entre las diez de la mañana y las tres de la tarde. En el caso de las especies ornitófilas, las observaciones se realizaron de 7:30 a 11 am, cuando los colibríes se encuentran mayormente activos. En todas las observaciones se registró el número de flores visitadas y el nombre común del visitante. Cuando los visitantes florales fueron insectos, éstos se capturaron con una red entomológica, se conservaron en un frasco con alcohol al 70% y luego fueron depositados en el Laboratorio de Evolución de Sistemas Reproductivos en Angiospermas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en donde se tiene una colección de visitantes florales de varias especies de plantas. Posterior al montaje, fueron identificados con claves para cada grupo de insecto al nivel más específico

posible. Las observaciones se complementaron con filmaciones hechas con cámaras de video Sony Handycam (DCR-SR20), enfocando de 5 a 40 flores aproximadamente por video. Las grabaciones se revisaron detenidamente, haciendo anotaciones sobre los visitantes, como la duración de la visita y el número de flores que liba el visitante.

3.5 Extracción y análisis de compuestos volátiles florales

Se seleccionaron cuatro individuos en floración de cada especie estudiada. En algunos casos los individuos se trasplantaron en macetas y en otros casos se colectaron ramas con inflorescencias, las cuales se colocaron inmediatamente en agua. En ambos casos, el material se trasladó al laboratorio, donde se llevó a cabo la extracción de compuestos volátiles.

La extracción de compuestos volátiles ($4 \pm$ extracciones por especie) se realizó 24 horas después del corte de las ramas, de las 10:00 h a 15:00 h. En las especies ornitófilas se realizaron dos extracciones más de COVs florales por especie de 7 a 10 de la mañana, ya que es cuando los colibríes tienen el pico de visitas. Las inflorescencias se encerraron en un frasco de vidrio, cubriendo solamente las flores (8 a 15 flores abiertas) y sellando con una placa de teflón (**Figura 2A**). En uno de los extremos del frasco se insertó el cartucho para capturar volátiles (*Porapak Q*, Supelco, USA) (**Figura 2B**) y este se conectó a una bomba de vacío (N811KTP, KNF, Trenton, USA) con una manguera de silicón extrayendo el aire del interior de los frascos a un flujo de 200 mL/min durante 3 horas (**Figura 2C**). En el otro extremo del frasco se insertó un cartucho de carbón activado para

purificar el aire entrante. Como control se hicieron 4 extracciones en las mismas condiciones utilizando frascos vacíos para descartar posibles contaminantes.

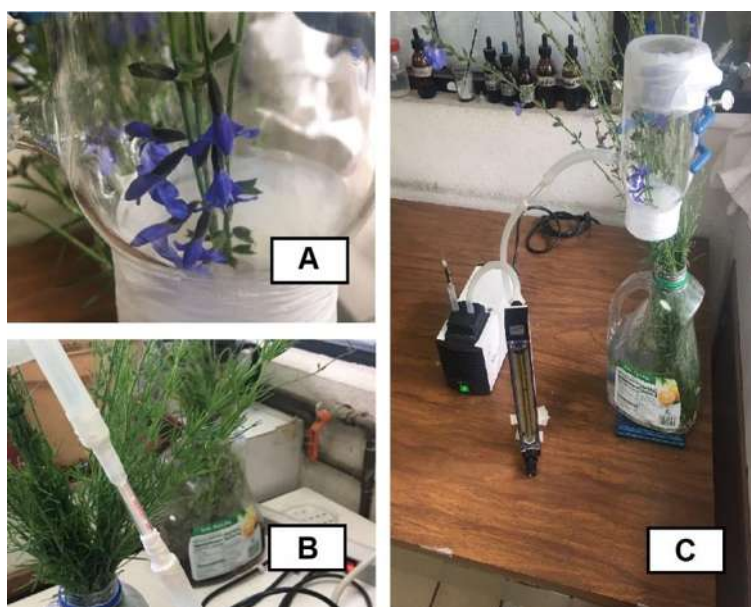


Figura 2. Extracción de aromas florales en *Salvia reptans*. **A.** Inflorescencia de *S. reptans* en frasco sellado. **B.** Inserción y sellado de trampa o cartucho para capturar volátiles florales. **C.** Exposición general de la técnica para capturar volátiles florales.

Después de la extracción, se realizó la desorción química de los cartuchos (**Figura 3A**) con 2 mL de hexano usando como estándar interno tetradecano (*Sigma Aldrich*) a una concentración de 0.062mg/mL. Cada una de las muestras se agitó en el vórtex por tres minutos, extrayendo el sobrenadante con una micropipeta y transfiriéndolo a otro vial (**Figura 3B**). Esta solución extraída de cada una de las muestras fue concentrada a un volumen final de 100 μ L bajo una corriente de nitrógeno gaseoso.

Las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de gases (*Agilent 6890*) acoplado a un detector selectivo de masas (*Agilent 5973*). Tres microlitros de

cada una de las muestras fueron inyectados en modo splitless a 240°C en una columna (HP5) usando helio como gas acarreador a un flujo de 1mL min⁻¹ (**Figura 3C**). La temperatura inicial de horno fue de 40°C durante 3 min, seguido por un gradiente de temperatura de 10°C a 250°C durante 5 min (Kantsa *et al.* 2017).

Para identificar los compuestos volátiles se usó la biblioteca espectral de masas del Instituto Nacional de Estándar y Tecnología (NIST 11), asociada al software *MSD ChemStarion*-. Para corroborar la identidad de cada uno de los compuestos volátiles se calcularon los índices de Retención Kovats inyectando una mezcla de alcanos (C₈-C₂₀, *Sigma-Aldrich*) en las mismas condiciones cromatográficas. La concentración de los compuestos se calculó por el método de estándar interno, reportando la concentración de compuestos en microgramos por gramo de peso fresco de la flor.

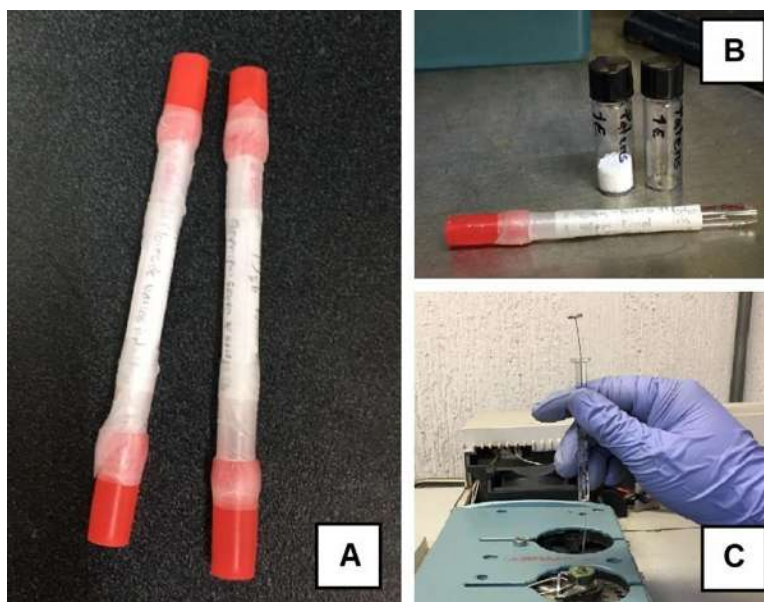


Figura 3. Análisis de compuestos volátiles florales por cromatografía de gases y espectrometría de masas. **A.** Cartuchos para la captura de volátiles florales sellados y etiquetados. **B.** Apertura de cartuchos para su análisis; viales usados para el proceso de desorción química de la muestra. **C.** Inyección de muestra concentrada en el cromatógrafo de gases.

3.6 Análisis estadísticos

Con los valores de las mediciones morfológicas agrupamos a las especies de acuerdo a su síndrome de polinización (de acuerdo a lo propuesto por Fragoso-Martínez *et al.*, 2018), aplicando un análisis de varianza (ANOVA) para cada uno de los rasgos de morfología floral medidos para determinar si existen diferencias entre síndromes de polinización, donde las variables independientes fueron los síndromes de polinización y las mediciones de los rasgos florales (largo del tubo floral y ancho del labio inferior) las variables dependientes. Se realizó una prueba de Tukey para determinar las diferencias entre especies y síndromes de polinización. Los datos que se usaron en el análisis se transformaron con el logaritmo natural para cumplir con los supuestos de normalidad. Estos análisis se realizaron en el software RStudio versión 4.0.3 (R Core Team, 2020).

Por otro lado, se realizó un análisis discriminante lineal (LDA) para determinar si los aromas florales agrupan a las especies de acuerdo al síndrome de polinización. El LDA es un método de clasificación supervisado de variables cualitativas en el que dos o más grupos son conocidos *a priori*. Para este análisis, los datos de proporciones de todos los compuestos volátiles florales obtenidos fueron sometidos al reemplazo de valores que contenían “cero” en el software Rstudio con la función `multLN` del paquete estadístico `zCompositions` (Brückner y Heethoff, 2017). El reemplazo de los ceros es obligatorio en este tipo de datos, dado que las proporciones logarítmicas no estarían definidas si hay ceros (Brückner y Heethoff, 2017). Posteriormente y de acuerdo a Aitchison (1982), estos datos se transformaron a relación-log centrada (centered log-ratio (clr)) en

Rstudio con la función `clr` del paquete estadístico `Compositions` (Brückner y Heethoff, 2017).

Para determinar si las frecuencias de visita de los visitantes florales y los aromas florales se asociaban, realizamos un análisis de correspondencia canónica (CCA) usando el software PAST 3.2.6. Las frecuencias de visita de los tres gremios principales de visitantes florales (i. e. colibríes, abejas y mariposas) y las proporciones de cada uno de los compuestos se transformaron con la función arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje, previo al análisis.

4 RESULTADOS

4.1 Morfología floral

En el análisis morfológico de acuerdo a los síndromes de polinización, tanto el tubo floral ($n=137$, $F=321.22$, $g.l.=2$, 134 , $P<0.001$; **Figura 4A**) y el ancho del labio inferior ($n=137$, $F=18.149$, $g.l.=2$, 134 , $P<0.001$; **Figura 4B**) mostraron diferencias significativas. Los tamaños del tubo floral de las especies melitófilas, ornitófilas e intermedias fueron significativamente diferentes ($P<0.001$) (**Figura 4A**). En cuanto al ancho del labio inferior, las flores melitófilas e intermedias no mostraron diferencias significativas ($P=0.66$) en las respectivas comparaciones, mientras que el ancho del labio inferior difiere significativamente entre especies melitófilas y ornitófilas, así como entre especies intermedias y ornitófilas (**Figura 4B**).

Las especies ornitófilas presentan tubos florales generalmente largos con el labio inferior reducido, mientras que las especies melitófilas presentan tubos florales cortos con labios inferiores amplios de acuerdo a su tamaño (**Tabla 2**).

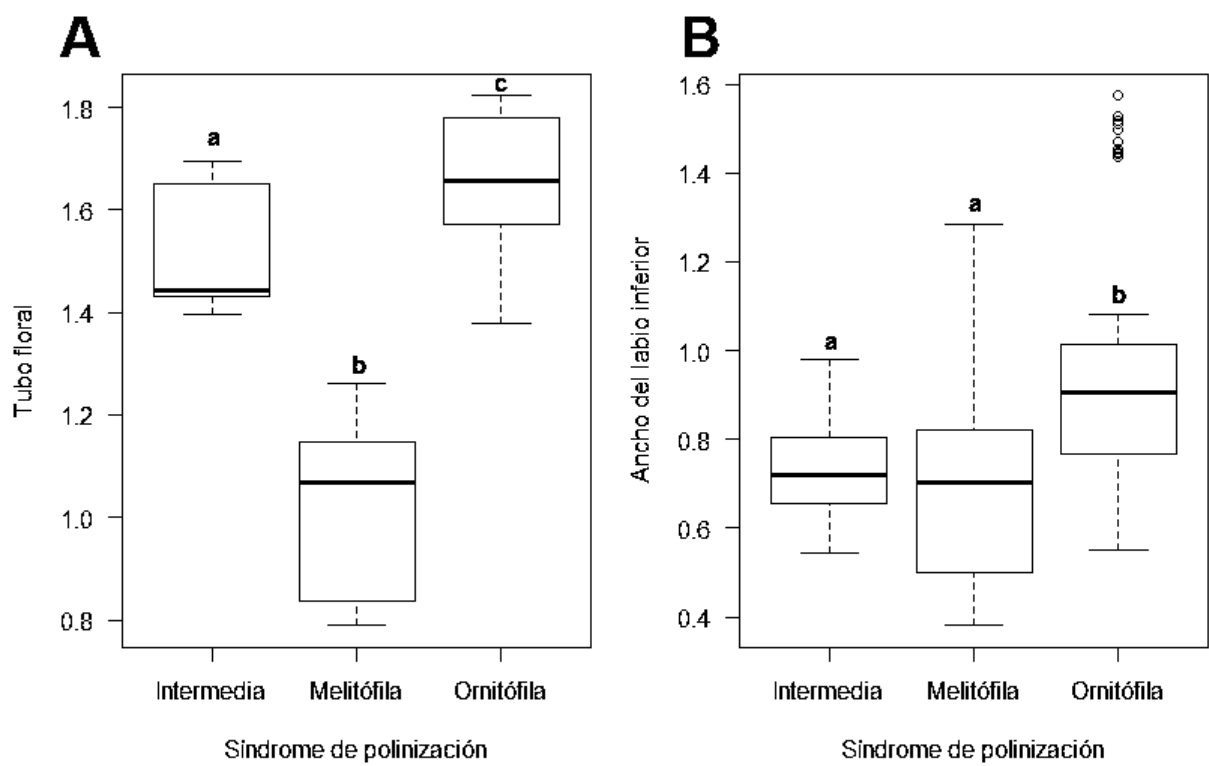


Figura 4. Comparación de las estructuras florales de las 18 especies estudiadas, agrupadas en síndromes de polinización. **A)** Tubo floral. **B)** Ancho del labio inferior. Letras diferentes indican diferencia significativa entre síndromes de polinización.

Tabla 2. Medidas del tubo floral y del ancho del labio inferior de las 18 especies de estudio. Se muestran los promedios y el error estándar, además del tamaño de muestra de cada especie (*n*).

Especie	Síndrome de polinización	Color de las flores	Tubo floral (mm)	Ancho del labio inf. (mm)	<i>n</i>
<i>Salvia reptans</i>	Melitófila	Azules	16.46 ± 0.52	17.08 ± 0.75	5
<i>Salvia longispicata</i>	Melitófila	Azules	12.61 ± 0.25	4.4 ± 0.58	6
<i>Salvia polystachya</i>	Melitófila	Azul-moradas	11.68 ± 0.24	3.36 ± 0.37	6
<i>Salvia tiliifolia</i>	Melitófila	Azules	6.61 ± 0.05	3.21 ± 0.03	6
<i>Salvia lavanduloides</i>	Melitófila	Moradas	6.67 ± 0.07	2.81 ± 0.09	10
<i>Salvia setulosa</i>	Melitófila	Moradas	15.07 ± 0.27	6.09 ± 0.33	6
<i>Salvia plurispicata</i>	Melitófila	Azules	11.11 ± 0.14	6.65 ± 0.29	10
<i>Salvia carnea</i>	Melitófila	Rosas	14.32 ± 0.22	5.55 ± 0.47	6
<i>Salvia mexicana</i> var. <i>minor</i>	Intermedia	Moradas	26.91 ± 0.5	4.42 ± 0.34	6
<i>Salvia mexicana</i> var. <i>mexicana</i>	Intermedia	Moradas	45.58 ± 0.96	7.3 ± 0.5	9
<i>Salvia purpurea</i>	Intermedia	Morado-púrpuras	27.11 ± 0.34	4.88 ± 0.14	9
<i>Salvia patens</i>	Ornitófila	Azules	62.97 ± 0.67	30.89 ± 1.05	10
<i>Salvia iodantha</i>	Ornitófila	Rosas	25.13 ± 0.49	4.71 ± 0.29	6
<i>Salvia curviflora</i>	Ornitófila	Rosas	36.86 ± 0.48	9.66 ± 0.38	7
<i>Salvia elegans</i>	Ornitófila	Rojas	37.75 ± 1.22	5.94 ± 0.21	10
<i>Salvia fulgens</i>	Ornitófila	Rojas	50.6 ± 1.19	9.46 ± 0.47	10
<i>Salvia gesneriflora</i>	Ornitófila	Rojas	61.29 ± 1.07	7.64 ± 0.39	10
<i>Salvia longistyla</i>	Ornitófila	Rojas	40.17 ± 0.83	4.29 ± 0.29	5

4.2 Visitantes florales

Los visitantes florales observados en general fueron los esperados de acuerdo a los síndromes de polinización. En las especies melitófilas, las abejas registraron una frecuencia del 92.72%; los colibríes un 2.52% del total, seguido de las moscas, las avispas y las mariposas con 2.41%, 1.28% y 1%, respectivamente (**Figura 5A**). El visitante más comúnmente registrado en especies melitófilas fue *Apis mellifera* con un 39% del total. *Bombus weisi*, *Deltoptila elefas*, *Bombus ephippiatus* y una abeja de la familia Megachilidae también figuran como los visitantes con mayores frecuencias (17.91%, 15.7%, 9.22% y 8.86%, respectivamente). Las especies de salvas que registraron una frecuencia del 100% de visitas de abejas fueron *S. carnea* y *S. tiliifolia* (*D. elefas* y *A. mellifera*, respectivamente). *Salvia polystachya* recibió el 83.17% de visitas de *A. mellifera*, 10% corresponden a las visitas de *Bombus ephippiatus*, 4.77% a *B. sonorus* y 2% a las visitas de una abeja de la familia Megachilidae. El 96.47% de las visitas en *S. longispicata* corresponden a *A. mellifera*, mientras que el porcentaje restante se divide entre *Bombus ephippiatus*, *B. sonorus*, una mosca de la familia Syrphiade y la mariposa *Thorybes dorantes*. En *S. lavanduloides*, el 49.67% de las visitas fueron de *Bombus ephippiatus*, el 29.22% corresponde a las visitas de *B. weisi*, 10.22% a las visitas de la avispa *Pygodasis ephippium*, mientras que el 9.5% restante corresponde a las visitas de una abeja de la tribu Euglossini, también llamadas abejas de las orquídeas o abejas metálicas. *S. reptans* recibió 68.95% de visitas de una abeja de la familia Megachilidae, 18.46% de *Apis mellifera*, 6.58% de *Thorybes dorantes*, 5.19% de las visitas fueron de sírfidos (Diptera:

Syrphidae) y menos del 1% corresponden a las visitas de *B. ephippiatus*. En *Salvia setulosa*, el visitante floral más frecuente fue *B. weisi* seguido de la abeja *D. elefas*, además de *A. mellifera*, un díptero y una mariposa (47.40%, 25.66%, 13.59%, 12.20% y 1.13%, respectivamente). En el caso de *Salvia plurispicata*, más del 75% de las visitas corresponden a abejas, siendo el abejorro *B. weisi* el visitante floral más frecuente (66.67%), además de *B. ephippiatus* quien registra 12.17% de estas visitas. Sin embargo, también hubo registros de colibríes como visitantes florales de esta especie, siendo *Selasphorus platycercus* quien registra la frecuencia más alta, seguido por un colibrí del género *Selasphorus* sp., además de *Archilochus colubris*, *Saucerottia beryllina* y *Basilinna leucotis*.

En las especies ornitófilas, los colibríes registraron un porcentaje total del 80% de las visitas totales, mientras que las abejas presentaron una frecuencia del 19% (**Figura 5B**). El visitante floral más común en especies ornitófilas fue *Basilinna leucotis*, seguido de *Saucerottia beryllina* y de *Eugenes fulgens* (34.6%, 15% y 15%, respectivamente). Las especies de salvias que presentaron el 100% de visitas de colibríes fueron *Salvia patens* (*B. leucotis*), *S. longistyla* (*S. beryllina*) y *S. fulgens*, quien registró visitas de tres especies de colibríes: *E. fulgens*, *Archilochus colubris* y *S. beryllina* (85.71%, 9.52% y 4.76%, respectivamente). *Salvia elegans* recibió más del 90% de visitas de colibríes; el visitante más común fue *Selasphorus platycercus* con el 50% de frecuencia de visitas, seguido d *B. leucotis* con el 27% y de *Lampornis clemenciae* con el 15%. *Salvia gesneriiflora* también recibió visitas de colibríes, como *B. leucotis* y *L. clemenciae* (42.3% y 28.31%, respectivamente). Sin embargo, también recibió un porcentaje

considerable de visitas de abejas como *Bombus ephippiatus* y *Apis mellifera* (23.19% y 6.18%, respectivamente). En *Salvia curviflora*, el visitante floral más frecuente fue el colibrí *B. leucotis* con un 60% de las visitas totales. Sin embargo, las abejas *Deltoptila elefas*, *Bombus weisi* y *Apis mellifera* también se reportaron como visitantes florales de esta especie (14.82%, 10.59% y 6.12%, respectivamente). En el caso de *Salvia iodantha*, más del 60% de las visitas fueron de especies de abejas, siendo *Deltoptila elefas* la especie más frecuente (52.79%), además del abejorro *B. weisi* y de *A. mellifera* (11.47%, 5.29%, respectivamente). *Eugenes fulgens*, *B. leucotis* y *Selasphorus rufus* fueron los colibríes registrados en *Salvia iodantha*.

En las especies intermedias, las abejas fueron los visitantes más frecuentes con el 81% del total de visitas, los colibríes con un 10.66%, las mariposas un 7% y las avispa un 1.39% (**Figura 5C**). Las abejas *Bombus weisi* y una abeja de la tribu Euglossini (abejas metálicas) registraron las frecuencias de visitas más altas (24.07% y 10.18%).

En *Salvia mexicana* var. *mexicana*, el abejorro *B. weisi* fue el visitante floral más frecuente (50%), además de la abeja *D. elefas* (12.5%). *Basilinna leucotis* y *Eugenes fulgens* registraron el 11.66% y el 11.36% de la frecuencia de visitas. Una mariposa y una avispa no identificadas también se registraron como visitantes florales en esta especie.

En *Salvia mexicana* var. *minor*, el visitante floral más frecuente fue *A. mellifera* (30.54%) seguido de *Bombus sonorus* (22.12%), además de *D. elefas* y una abeja

de la familia Megachilidae (16.67% cada una), así como el colibrí *S. beryllina* y una mariposa (9% y 5%, respectivamente).

En *Salvia purpurea* el visitante floral más frecuente fue una abeja de la tribu Meliponini con el 41.67% de las visitas, seguido por una abeja metálica de la tribu Euglossini con el 30.56% de las visitas, además del abejorro *Bombus weisi* con el 22.22% del total de visitas y una mariposa.

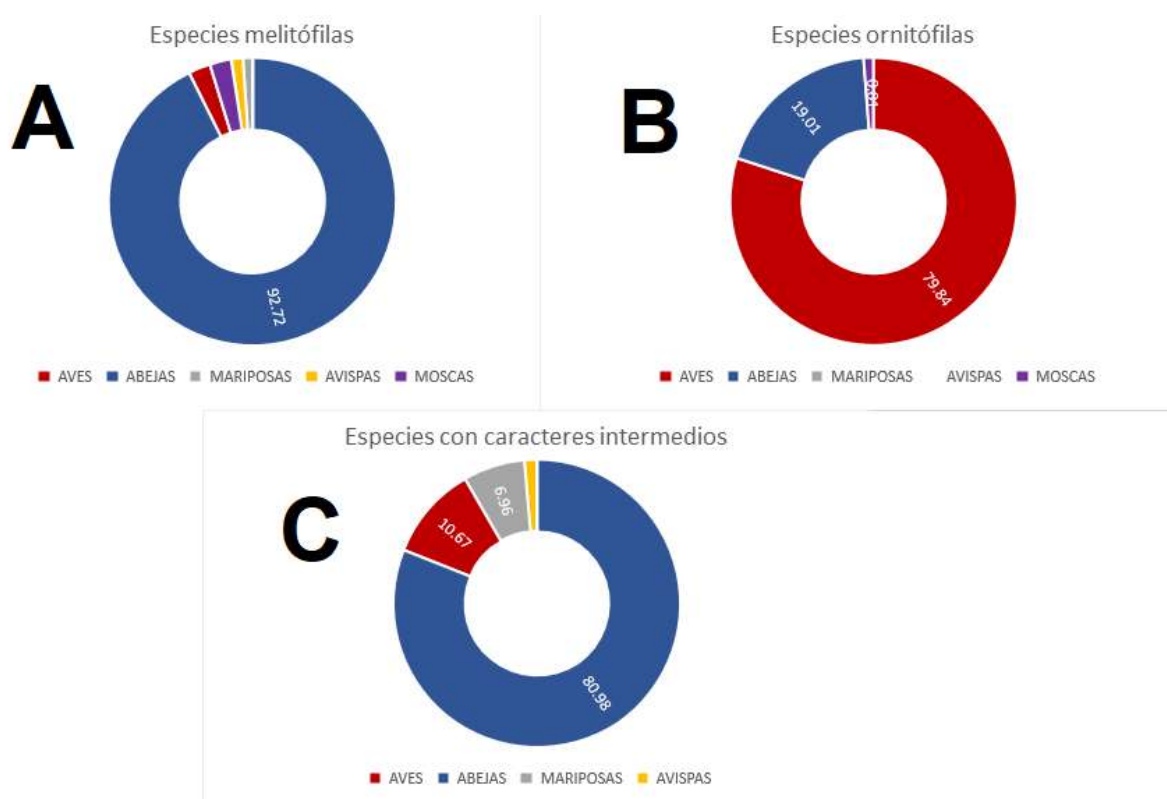


Figura 5. Frecuencia relativa (%) de gremios de visitantes florales en las especies de estudio agrupadas en síndromes de polinización. **A.** Especies ornitófilas. **B.** Especies melitófilas. **C.** Especies intermedias.

4.3 Compuestos volátiles florales

Se identificaron un total de 24 compuestos volátiles florales, de los cuales los monoterpenos son los más comunes (10), seguido de los sesquiterpenos (6), los compuestos alifáticos (4) y los bencenoides (4), respectivamente (**Tabla 3**). El compuesto 1,4-diclorobenceno estuvo presente en todas las especies, mientras que el α -pineno; el limoneno y el 1,3-dietilbenceno, fueron identificados en 15 especies. En cuanto al número de compuestos reportados por especie, las flores ornitófilas emitieron mayor número de COVs florales. *Salvia elegans* (con síndrome ornitófilo) emitió un total de 15 compuestos, *S. iodantha*, *S. setulosa* y *S. purpurea* 14, *S. polystachya* 12, mientras que *S. mexicana* var. *mexicana*, *S. lavanduloides*, y *S. reptans* 11, *S. longispicata* 10 y *S. tiliifolia* 9, respectivamente.

En las especies ornitófilas (**Figura 6A**), los compuestos con mayor abundancia fueron el 1,4-diclorobenceno y el limoneno. En cuanto al 1,4-diclorobenceno, *Salvia longistyla* y *S. curviflora* presentaron la abundancia más alta (450.28 $\mu\text{g/g}$ y 300.77 $\mu\text{g/g}$). El limoneno fue muy abundante en *Salvia gesneriiflora* y en *S. fulgens* (293.57 $\mu\text{g/g}$ y 289.16 $\mu\text{g/g}$, respectivamente). En las demás especies, los valores no superaron los 22 $\mu\text{g/g}$.

En las especies intermedias (**Figura 6B**), el 1,4-diclorobenceno fue el compuesto más abundante con 944.61 $\mu\text{g/g}$ en *Salvia mexicana* var. *mexicana*, y una abundancia de 74.28 $\mu\text{g/g}$ en *Salvia mexicana* var. *minor*, mientras que en *Salvia purpurea*, este compuesto tuvo una abundancia de 60.39 $\mu\text{g/g}$. El α -pineno fue el segundo compuesto más abundante en las especies intermedias, siendo *S. mexicana* var. *mexicana* la especie con la mayor abundancia (463.12 $\mu\text{g/g}$),

seguida de *S. mexicana* var. minor con una abundancia de 53.36 µg/g. En *Salvia purpurea*, este compuesto registró una abundancia de 43.52 µg/g.

Las especies melitófilas (**Figura 6C**) emitieron cantidades considerables del compuesto 1,4-diclorobenceno que van de los 65.07 µg/g en *S. reptans*, hasta los 669.44 µg/g en *S. longispicata*. El limoneno también fue muy abundante en especies melitófilas; el valor más bajo fue reportado en *S. reptans* (2.35 µg/g), mientras que la especie con mayor abundancia fue *S. plurispicata* (496.6 µg/g). El compuesto α-pineno también fue abundante en las especies melitófilas; el valor más bajo fue reportado en *S. reptans* (2.86 µg/g), mientras que *S. carnea* registró el valor más alto de abundancia de este compuesto (558.82 µg/g).

En general, los bencenoides son los compuestos más abundantes en las especies melitófilas (**Figura 7**), además de que estas especies (las melitófilas) producen mayores concentraciones de los compuestos. En las especies ornitófilas, los monoterpenos y los bencenoides son las clases de compuestos más comúnmente emitidos (**Figura 7**); sin embargo, tanto en las especies ornitófilas (**Figura 6A**) como en las intermedias (**Figura 6B**), solo algunos compuestos específicos son abundantes. En las especies ornitófilas se identificaron 3 compuestos exclusivos: trans β-ocimeno, γ-terpineno y allo-ocimeno, mientras que en las especies melitófilas solo hubo un compuesto exclusivo, el cis-β-terpineol.

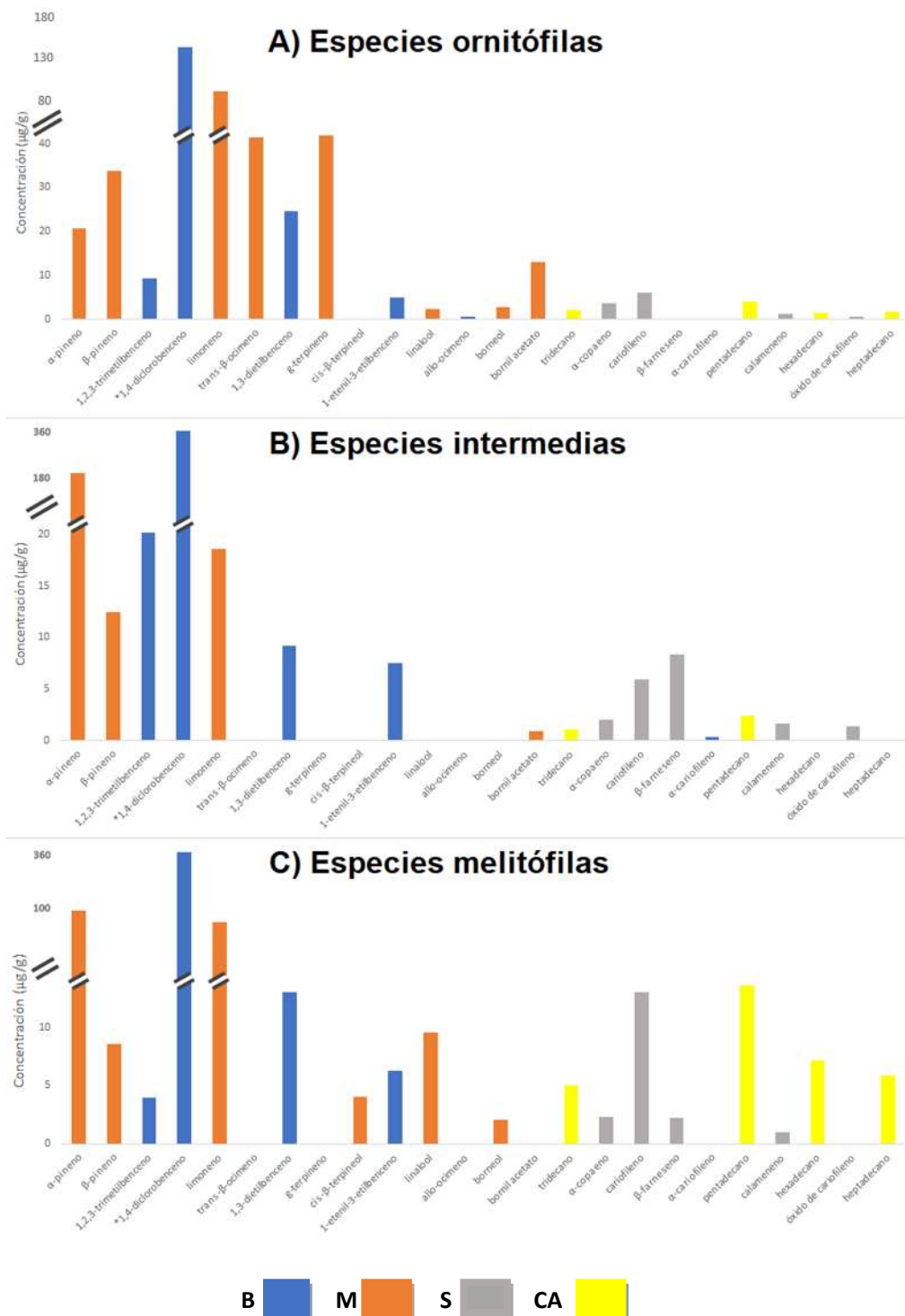


Figura 5. Concentración de COVs florales emitidos en las 18 especies. **A**, especies ornitófilas. **B**, especies intermedias. **C**, especies melitófilas. En el eje X se encuentran los 24 compuestos identificados. En el eje Y se muestra la concentración en microgramos por peso por flor de cada compuesto.

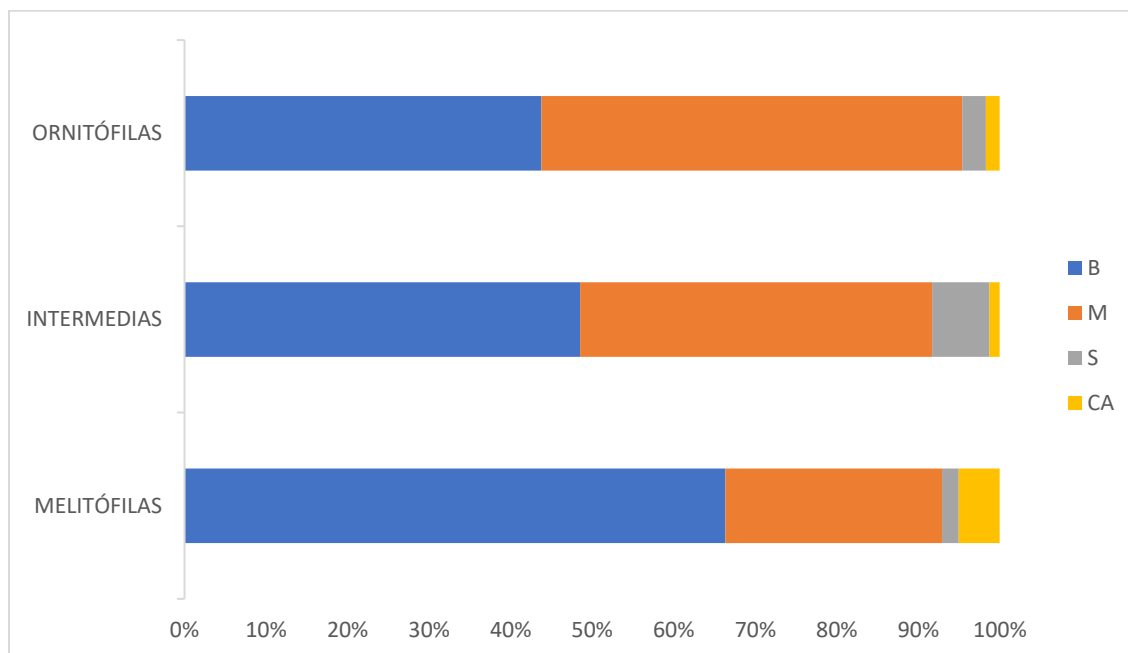


Figura 7. Abundancia relativa (%) por clase de compuesto de las 18 especies del género *Salvia* agrupadas en síndrome de polinización. **B**=bencenoides, **M**=monoterpenos, **S**=sesquiterpenos, **CA**=compuestos alifáticos.

En el análisis discriminante lineal (LDA) realizado con los compuestos orgánicos volátiles florales de las 18 especies de estudio, se observa una separación significativa de acuerdo a los síndromes de polinización (Lambda de Wilks (λ)= 0.2189, valor de P asociado= 0.0001*; **Figura 8**). En las especies ornitófilas, el bornil-acetato y el 1-etenil-3-etilbenceno tienen mayor carga, mientras que, en las especies intermedias, el α -pineno y el 1,4-diclorobenceno son los compuestos con mayores cargas. En las especies melitófilas, los compuestos hexadecano, cis- β -terpineol y el linalol tienen las cargas mayores (**Figura 8**).

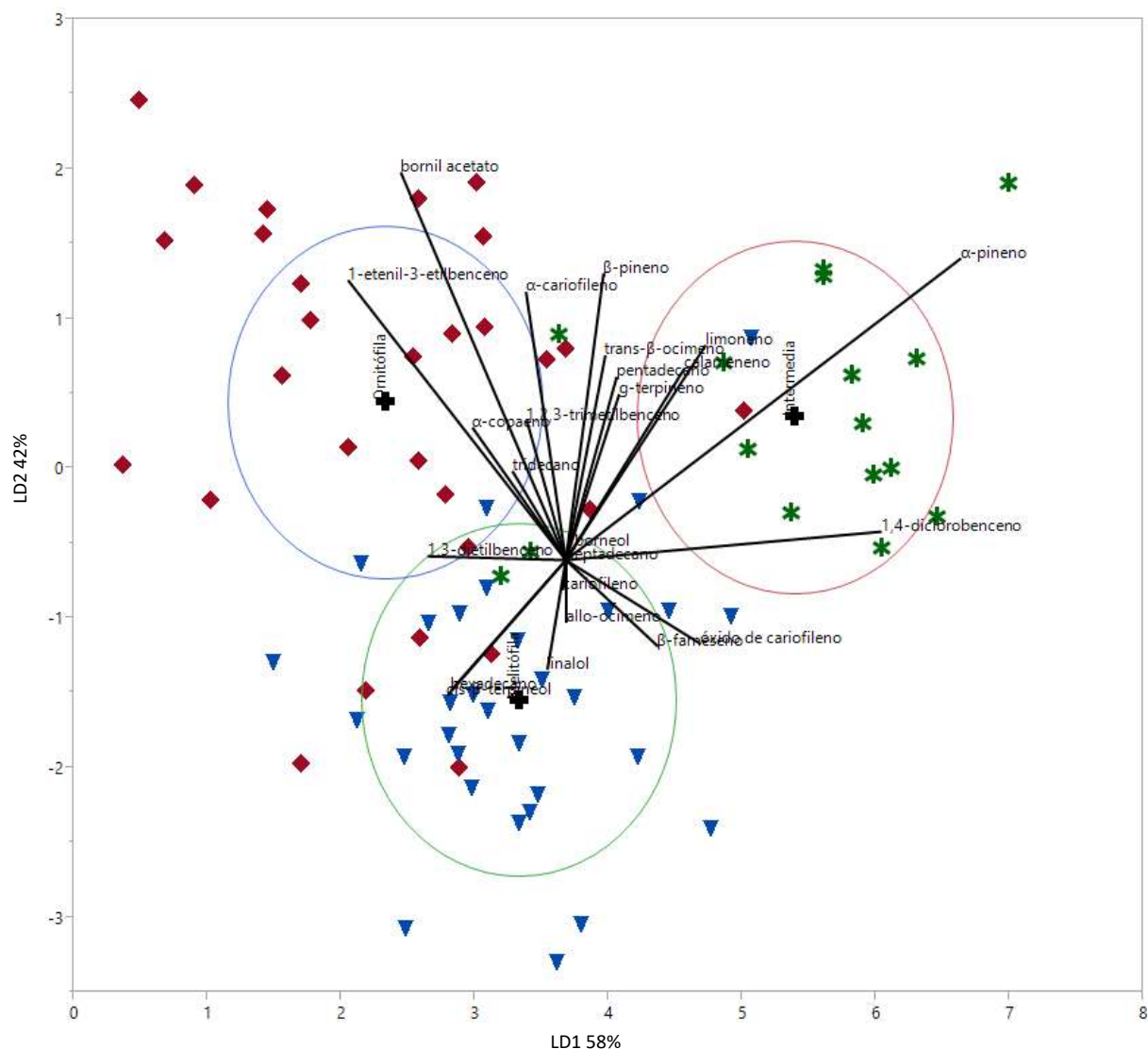


Figura 8. Análisis discriminante lineal (LDA) de los compuestos orgánicos volátiles florales de las 18 especies de estudio. En rombos rojos, se muestran los compuestos volátiles de las especies ornitófilas; en asteriscos verdes, los compuestos volátiles de las especies intermedias y en triángulos azules los de las especies melitófilas. (Funciones discriminantes canónicas= 1.-autovalor=1.3272, % de varianza=57.9711, % acumulado=57.9711, Corr. canónica=0.7551. 2.- autovalor=0.9622, % de varianza=42.0289, % acumulado=100.00, Corr. canónica=0.7002).

Por otro lado, el análisis de correspondencia canónica (CCA) formó 3 grupos principales de compuestos orgánicos volátiles florales y sus visitantes florales. El poder explicativo del análisis fue significativo (traza=0.1548, $P=0.008$) y podemos

observar que ciertos compuestos están relacionados con grupos de visitantes florales. Por ejemplo, el γ -terpineno, el trans- β -ocimeno y el allo-ocimeno, entre otros (11 en total), se relacionan con las visitas por colibríes; el hexadecano y el heptadecano, el cis- β -terpineol entre otros (7 en total) con las especies más frecuentemente visitadas por abejas, así como el β -farneseno, el calameneno, α -copaeno, óxido de cariofileno y α -pineno con las especies visitadas por mariposas. (Figura 9).

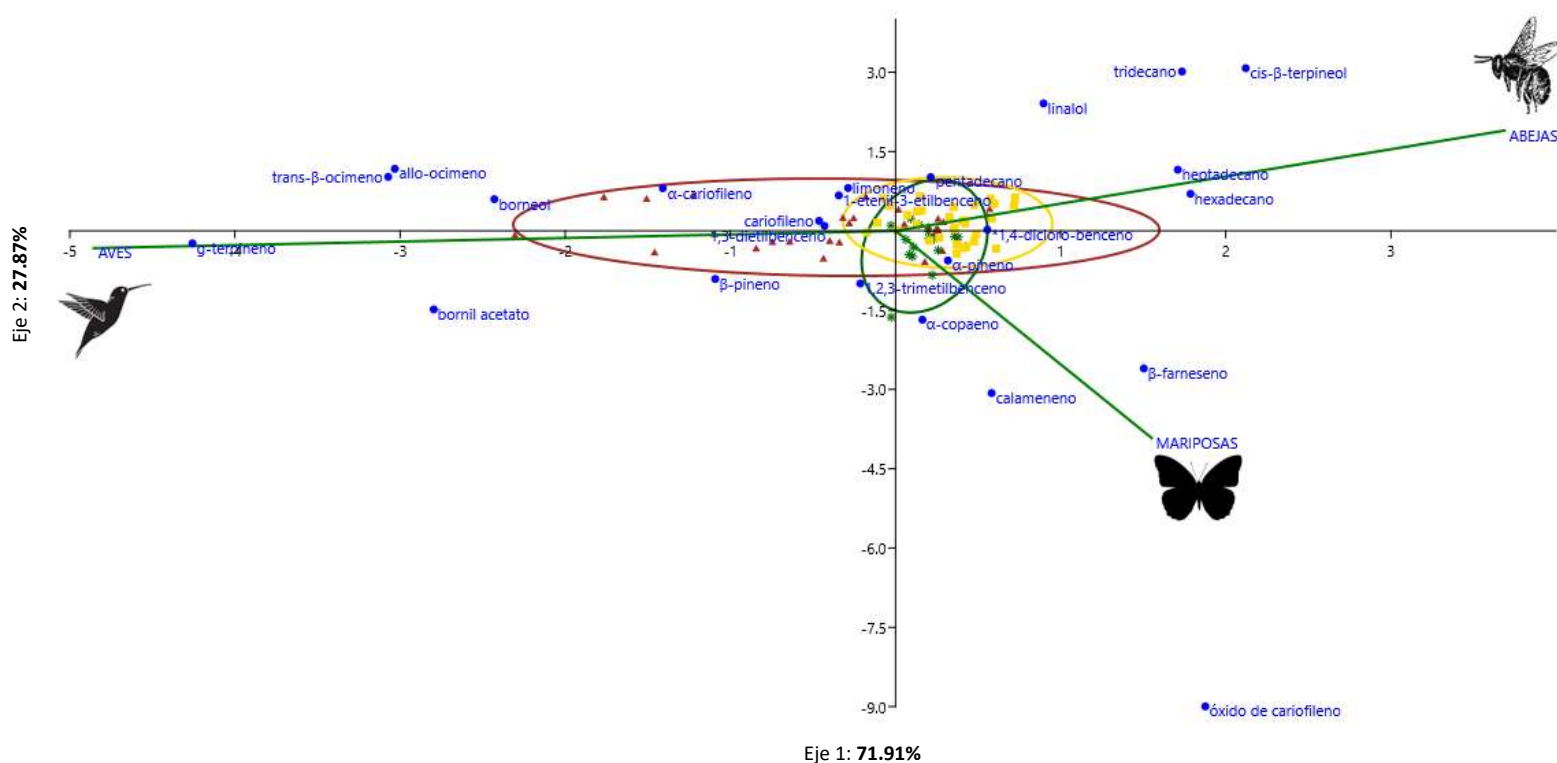


Figura 9. Análisis de correspondencia canónica (CCA) de los COVs florales y las frecuencias de visita de los principales gremios de visitantes florales. En triángulos rojos se muestran las especies ornitófilas; en asteriscos verdes, las especies intermedias y en cuadros amarillos, las especies melitófilas.

Tabla 3. Composición de volátiles florales emitidos en 18 especies del género *Salvia* con diferentes síndromes de polinización. Se muestran los valores promedio en microgramos por peso de la flor y el error estándar de las muestras (4 a 6), así como el nombre del compuesto, la clase a la que pertenece de acuerdo a Knudsen *et al.*, (2006) y los índices Kovats calculados y reportados en la literatura.

NOMBRE DEL COMPUESTO	ÍNDICES KOVATS		Clase de comp.	PROMEDIO DEL COMPUESTO POR ESPECIE (µg/g). (S = <i>Salvia</i>).					
	ÍNDICE CAL.	KA LIT.		<i>S. curviflora</i>	<i>S. elegans</i>	<i>S. fulgens</i>	<i>S. gesneriiflora</i>	<i>S. iodantha</i>	<i>S. longistyla</i>
α-pineno	935	936	M	13.3 ± 5.6	29.8 ± 8.3	27.4 ± 17.7	6.1 ± 3.4	21.2 ± 4.4	27.4 ± 19.9
β-pineno	977	978	M	-	8.7 ± 5	42.2 ± 17.7	-	18.9 ± 10.5	-
1,2,3-trimetilbenceno	995	985	B	-	7.82	-	-	-	57.6 ± 33.3
*1,4-dicloro-benceno	1014	1015	B	300.8 ± 178.7	90.4 ± 70.7	25.5 ± 6.7	3.2 ± 2.1	159.4 ± 118.3	450.3 ± 307.7
limoneno	1031	1031	M	6.3 ± 4.6	21.7 ± 11.7	289.2 ± 104.8	293.6 ± 138.7	12.2 ± 6.3	-
trans-β-ocimeno	1039	1097	M	-	-	-	187.7 ± 91.2	-	-
1,3-dietilbenceno	1051	1055	B	6.4 ± 3.6	17.9 ± 4.7	19 ± 6.6	12.2 ± 7.4	15.2 ± 2.4	-
γ-terpineno	1061	1062	M	-	-	-	15.5 ± 9.2	-	-
cis-β-terpineol	1071	1144	M	-	-	-	-	-	-
1-etenil-3-etilbenceno	1087	1064	B	9 ± 5.6	2.9 ± 1	-	-	6.7 ± 1.8	13.9 ± 5.4
linalol	1101	1101	M	-	16.79	-	-	-	-
allo-ocimeno	1130	1129	M	-	-	-	3.4 ± 2.3	-	-
borneol	1172	1165	M	-	18.6 ± 8.2	-	-	-	-
bornil acetato	1293	1302	M	-	87.3 ± 36.3	-	-	3.20	-
tridecano	1299	1299	CA	-	-	-	-	14.38	-
α-copaeno	1388	1376	S	-	-	-	-	-	25.5 ± 14.9
cariofileno	1434	1428	S	-	29.8 ± 11.1	2.7 ± 1.7	-	4.4 ± 2.7	5.84
β-farneseno	1458	1458	S	-	0.56	-	-	-	-
α-cariofileno	1468	1454	S	-	-	-	-	0.58	-
pentadecano	1495	1500	CA	5.1 ± 3.5	2.3 ± 1.4	11.5 ± 4.1	-	9.75	-
calameneno	1533	1523	S	-	2.2 ± 1.4	-	-	3.36	3.54
hexadecano	1594	1600	CA	3.44	-	-	-	6.67	-
óxido de cariofileno	1599	1581	S	-	4.20	-	-	-	-
heptadecano	1695	1700	CA	4.52	-	-	-	6.43	-

Continuación.

NOMBRE DEL COMPUESTO	ÍNDICES KOVATS		Clase de comp.	PROMEDIO DEL COMPUESTO POR ESPECIE (µg/g). (S = <i>Salvia</i>).					
	ÍNDICE CAL.	KA LIT.		<i>S. patens</i>	<i>S. mexicana mex</i>	<i>S. mexicana minor</i>	<i>S. purpurea</i>	<i>S. lavanduloides</i>	<i>S. longispicata</i>
α-pineno	935	936	M	19.7 ± 5.6	463.1 ± 283.7	53.4 ± 24	43.5 ± 17.2	39.3 ± 16.7	12.5 ± 7.3
β-pineno	977	978	M	166.9 ± 93.7	23.8 ± 15.6	8.71	5 ± 3.7	6.97	-
1,2,3-trimetilbenceno	995	985	B	-	60.7 ± 41.1	-	-	-	7.13
*1,4-dicloro-benceno	1014	1015	B	4.1 ± 2.1	944.6 ± 563.5	74.3 ± 38.3	60.4 ± 25	320.6 ± 154.3	669.4 ± 311.7
limoneno	1031	1031	M	-	23.3 ± 12.7	11 ± 10	21.6 ± 9.7	30 ± 18.4	20.5 ± 12.2
trans-β-ocimeno	1039	1097	M	102.58	-	-	-	-	-
1,3-dietilbenceno	1051	1055	B	101.5 ± 57.8	19.8 ± 11.7	-	7.7 ± 3.7	22.2 ± 4.3	15 ± 7.1
γ-terpineno	1061	1062	M	278 ± 221.4	-	-	-	-	-
cis-β-terpineol	1071	1144	M	-	-	-	-	-	-
1-etnil-3-etilbenceno	1087	1064	B	1.62	-	-	22.5 ± 17.9	2.76	0.71
linalol	1101	1101	M	-	-	-	-	-	-
allo-ocimeno	1130	1129	M	-	-	-	-	-	-
borneol	1172	1165	M	-	-	-	-	-	-
bornil acetato	1293	1302	M	-	-	-	2.54	-	-
tridecano	1299	1299	CA	-	3.33	-	-	28.2 ± 16.3	-
α-copaeno	1388	1376	S	-	1.06	-	5.1 ± 3.2	-	-
cariofileno	1434	1428	S	-	2.14	-	15.5 ± 9.2	-	-
β-farneseno	1458	1458	S	-	1.70	-	23.28	-	1.48
α-cariofileno	1468	1454	S	-	-	-	0.96	-	-
pentadecano	1495	1500	CA	-	7.19	-	0.05	17 ± 9.8	9 ± 5.4
calameneno	1533	1523	S	-	-	-	4.9 ± 3.2	3.19	-
hexadecano	1594	1600	CA	-	-	-	-	19 ± 11.1	7.8 ± 4.7
óxido de cariofileno	1599	1581	S	-	-	-	3.93	-	-
heptadecano	1695	1700	CA	-	-	-	-	26.6 ± 9.6	3.18

Continuación.

NOMBRE DEL COMPUESTO	ÍNDICES KOVATS		Clase de comp.	PROMEDIO DEL COMPUESTO POR ESPECIE (µg/g). (S = <i>Salvia</i>).					
	ÍNDICE CAL.	KA LIT.		<i>S. plurispicata</i>	<i>S. polystachya</i>	<i>S. reptans</i>	<i>S. setulosa</i>	<i>S. tiliifolia</i>	<i>S. carnea</i>
α-pineno	935	936	M	14.5 ± 6.8	66 ± 18.5	2.9 ± 0.9	24 ± 12.5	48.5 ± 34.3	558.8 ± 190.3
β-pineno	977	978	M	-	2.63	-	6.34	52.90	-
1,2,3-trimetilbenceno	995	985	B	-	-	2.40	22.3 ± 13.9	-	-
*1,4-dicloro-benceno	1014	1015	B	137.6 ± 83.8	438.7 ± 200.4	65.1 ± 21.1	423.8 ± 181.2	643.2 ± 361.9	122.9 ± 62.3
limoneno	1031	1031	M	496.6 ± 53	37.8 ± 21	2.4 ± 1.8	28.8 ± 11.2	120.56	-
trans-β-ocimeno	1039	1097	M	-	-	-	-	-	-
1,3-dietilbenceno	1051	1055	B	6.14	27.3 ± 2.3	2.9 ± 0.5	27.1 ± 6.5	-	3.23
γ-terpineno	1061	1062	M	-	-	-	-	-	-
cis-β-terpineol	1071	1144	M	-	-	-	-	-	32.7 ± 19.5
1-etenil-3-etilbenceno	1087	1064	B	-	8.2 ± 3	1.1 ± 0.4	11 ± 5.8	26.03	-
linalol	1101	1101	M	4.41	-	-	2.22	9.91	59.9 ± 34.8
allo-ocimeno	1130	1129	M	-	-	-	-	-	-
borneol	1172	1165	M	-	-	-	-	16.42 ± 9.93	-
bornil acetato	1293	1302	M	-	-	-	-	-	-
tridecano	1299	1299	CA	-	7.14	-	4.81	-	-
α-copaeno	1388	1376	S	-	-	-	-	7.66	10.70
cariofileno	1434	1428	S	-	16.3 ± 10.2	-	7 ± 4.4	80.72	-
β-farneseno	1458	1458	S	-	13.5 ± 8.8	2.9 ± 0.5	-	-	-
α-cariofileno	1468	1454	S	-	-	-	-	-	-
pentadecano	1495	1500	CA	-	5.9 ± 4.1	0.97	19.1 ± 14.6	-	56.9 ± 52.3
calameneno	1533	1523	S	-	-	0.32	4.23	-	-
hexadecano	1594	1600	CA	-	17.2 ± 12.3	0.86	12.3 ± 8.9	-	-
óxido de cariofileno	1599	1581	S	-	-	-	-	-	-
heptadecano	1695	1700	CA	-	5.75	0.37	10.7 ± 8.2	-	-

Donde ÍNDICE CAL., son los índices de retención calculados y KA LIT. son los índices de retención reportados en la literatura (Adams, 2007). Además, se clasifica a los compuestos de acuerdo a su naturaleza; **B**=Bencenoides, **M**=Monoterpenos, **S**=Sesquiterpenos y **CA**=Compuestos alifáticos. Se marcan en anaranjado a las especies ornitófilas, en verde, las especies intermedias y en azul las especies melitófilas.

*Compuesto con mayor concentración.

5 DISCUSIÓN

Este estudio es uno de los primeros trabajos que analiza de manera extensiva la relación entre los compuestos volátiles florales, que generalmente no se incluyen en los estudios de síndromes florales, con las características morfológicas y los visitantes florales de las especies.

Realizamos mediciones del tubo floral y del ancho del labio inferior en 18 especies del género *Salvia*, encontrando diferencias significativas entre especies agrupadas por síndrome de polinización. Encontramos tubos florales más largos y una reducción del labio inferior en especies ornitófilas (excepto en *S. patens*) y resultados similares en especies intermedias, mientras que en especies melitófilas, los tubos florales fueron cortos y el ancho del labio inferior fue amplio. Registramos a los visitantes florales en todas las especies, coincidiendo nuestros resultados con las predicciones realizadas; los colibríes visitando especies ornitófilas (con algunas excepciones), abejas en especies melitófilas y más de un gremio de visitantes florales en especies intermedias, aunque las abejas fueron más frecuentes.

Además, identificamos un total de 24 compuestos orgánicos volátiles florales entre las 18 especies, siendo las especies melitófilas las que, como se esperaba, emitieron mayor concentración de COVs florales, mientras que las ornitófilas emitieron mayor número de compuestos, pero en baja concentración y en las especies intermedias, solo dos compuestos fueron los que generalmente tuvieron mayor concentración. De los 24 compuestos reportados en nuestro estudio, todos

se han identificado como compuestos de aromas florales en al menos una especie de angiosperma (Knudsen *et al.*, 2006). Trece de los COVs identificados en nuestro estudio han sido reportados anteriormente en especies del género *Salvia* y solo 5 de éstos 13 son reportados como aromas florales (α y β pineno, limoneno, γ -terpineno y α -copaeno), mientras que los 8 compuestos restantes (trans- β -ocimeno, linalol, borneol, tridecano, β -farneseno, pentadecano, hexadecano y heptadecano) se han identificado únicamente en estructuras foliares de especies de salvas (Giuliani *et al.*, 2020).

En las especies con síndrome de polinización por colibríes (ornitofilia) nuestras predicciones sobre la morfología floral se cumplieron. En general encontramos que los tubos florales fueron relativamente largos (más de 2 cm), incluso en algunas especies los tubos florales fueron mayores a 4 cm, como en *Salvia patens* o en *S. gesneriiflora* y *S. longistyla*. El ancho del labio inferior fue muy estrecho en casi todas las especies, coincidiendo con las propuestas sobre la morfología floral de las especies ornitófilas, que incluyen la presencia de tubos florales largos y estrechos, además de la exposición del estigma, que aumentan la distancia entre el néctar y el polen, así como plataformas de aterrizaje reducidas, lo que dificulta la visita legítima de abejas (Westerkamp, 1990; Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2005; Wester & Claßen-Bockhoff, 2006a, b; Wilson *et al.*, 2006; Whittall y Hodges, 2007; Wester, 2013, 2014; Clark *et al.*, 2015; Zung *et al.*, 2015; Wester *et al.*, 2020; Giuliani *et al.*, 2020). Una clara excepción a lo anterior fue *S. patens*, que presentó un labio inferior muy amplio, con guías de néctar, un mecanismo de palanca estaminal activo y corola azul, características típicas de especies melitófilas, lo

que podría indicar que puede ser visitada por otros gremios de polinizadores como abejas (Faegri y van der Pijl, 1979), aunque en nuestras observaciones y en observaciones de otros autores (Wester y Claßen-Bockhoff, 2011) solo se hayan registrado colibríes como visitantes florales. El color de las flores también resalta en las especies ornitófilas, ya que la mayoría de ellas son rojas (4), una azul y dos son rosas, además, el mecanismo de palanca estaminal está inactivo en 3 de las 7 especies (*S. elegans*, *S. iodantha* y *S. longistyla*). Las especies de flores rojas fueron visitadas en su mayoría por colibríes, aunque *S. elegans* y *S. gesneriiflora* recibieron visitas de otros gremios; la primera carece del mecanismo de palanca y fue visitada en más del 90% por colibríes, pero también se registraron sírfidos, mientras que la segunda, con mecanismo de palanca activo, recibió visitas de colibríes principalmente, pero también de abejas, todas reportadas como robadoras de néctar. Aunque no medimos el color de las flores, se ha propuesto que las flores rojas no suelen ser percibidas en muchos casos por las abejas (Camargo *et al.*, 2019; Gualiani *et al.*, 2020), por lo que pensamos que las visitas de abejas están mediadas por los compuestos volátiles florales emitidos. Además, las especies de flores rosas presentaron una importante frecuencia de visitas de abejas, 40% en *S. curviflora* (con mecanismo de palanca activo) y 60% en *S. iodantha* (sin mecanismo de palanca), subrayando que la mayoría de estas visitas eran legítimas. Algunos estudios han demostrado que la pérdida del mecanismo de palanca se debe a modificaciones de la forma de la flor y es el resultado de la adaptación a la polinización por colibríes (Wester y Claßen-Bockhoff, 2006, 2007, 2011; Kriebel *et al.*, 2019, 2023), por lo que habría que probar si estos visitantes florales, que son relativamente frecuentes, cumplen el papel de polinizadores.

En las especies con síndrome de polinización por abejas (melitofilia) las predicciones sobre la morfología floral también se cumplieron. En todas las especies, los tubos florales fueron cortos (menores a 2 cm) y el ancho del labio inferior fue amplio en comparación con el tubo floral, además de que, en todas las especies, el mecanismo de palanca está activo. Estas características, así como el color de las flores que en todas las especies fue azul o morado (y solo una especie con flores rosas), lo que, aunado a las guías de néctar presentes también en todas las especies, representan características de especies adaptadas a la polinización por abejas (Fragoso-Martínez *et al.*, 2018). Algunos autores han mencionado que, en las angiospermas en general, las abejas son por mucho el grupo más importante de polinizadores (Danforth, 2007; Wester, *et al.*, 2020). En el género *Salvia* no es la excepción, ya que las abejas visitan aproximadamente el 66% del total de las especies (Wester *et al.*, 2020). Este grupo de polinizadores tiende a posarse sobre las flores para libar el néctar y coleccionar polen, por lo que las flores que visitan han desarrollado una plataforma de aterrizaje, traducéndose en un labio inferior amplio con guías de néctar (Vogel, 1954; Faegri & van der Pijl, 1979; Fenster *et al.*, 2004; Wester *et al.*, 2020), además de que los tubos florales son reducidos; estas características permiten que las abejas tengan acceso al néctar más rápido y con mayor facilidad (Waser & Price, 1985; Leonard & Papaj, 2011).

En cuanto a los visitantes florales, en 7 de las 8 especies, las abejas registraron las frecuencias más altas con más del 90% del total de las visitas, incluso en cuatro de estas especies las abejas fueron los únicos visitantes florales reportados

(*S. carnea*, *S. tiliifolia*, *S. polystachya* y *S. longispicata*). En las tres especies restantes hubo visitas tanto de abejas como de mariposas, así como de dípteros y avispa (*S. lavanduloides*, *S. setulosa* y *S. reptans*). Solo *S. plurispicata* recibió visitas considerables de colibríes, registrando el 40% del total de visitas, lo cual concuerda con trabajos anteriores en esta especie (Espino-Espino *et al.*, 2014).

En cuanto a las especies intermedias, hubo variación entre ellas en la longitud del tubo floral; mientras que las flores de *S. mexicana* var. *minor* y *S. purpurea* presentaron tubos florales medianos (2.7 cm $\pm$), las flores de *S. mexicana* var. *mexicana* medían más de 4 cm de largo. Esto es particularmente interesante en las variedades de *S. mexicana*, ya que las diferencias tan marcadas evidencian la adaptación al polinizador más efectivo, que, si bien en ambos casos pueden ser colibríes, es claro que éstos se pueden diferenciar por el largo del pico, teniendo en general un ensamblaje bien ajustado con las flores que visitan. Los labios inferiores fueron muy estrechos en las tres especies y los colores de las flores iban de azul-moradas en las dos variedades de *S. mexicana* a púrpura en *S. purpurea*.

Por otro lado, existen estudios en varias especies del género *Salvia* tanto del viejo como del nuevo mundo que abordan el tema de caracterización y/o composición de los aceites esenciales, así como la actividad antimicrobiana, antifúngica, larvívica o los mecanismos de acción de éstos (Martino *et al.*, 2010; Pereira, *et al.*, 2018; Mathew y Thoppil, 2011; Calderón-Oropeza *et al.*, 2021; Semenchenko *et al.*, 2013; Bisio *et al.*, 1998; Velasco-Lezama *et al.*, 2021). Sin embargo, pocos trabajos hacen referencia a los compuestos orgánicos volátiles florales en

especies del género *Salvia* y a su función como atrayentes de polinizadores (Giuliani *et al.*, 2018, 2020).

En este estudio, identificamos los COVs florales de 18 especies del género *Salvia*, 7 de ellas registradas en la literatura como especies ornitófilas, 8 melitófilas y 3 con caracteres intermedios. En las especies ornitófilas, la clase de compuestos que predominó fueron los monoterpenos, siendo el α pineno, el β pineno y el limoneno los compuestos más frecuentemente reportados. En *S. longistyla*, *S. curviflora*, *S. iodantha* y *S. elegans*, el compuesto dominante fue el 1,4-diclorobenceno, un compuesto que ha sido reportado en flores de la familia Cucurbitaceae polinizadas principalmente por abejas (Fernando y Grün, 2001; Knudsen *et al.*, 2006; Sarkar *et al.*, 2017), así como en otras especies de angiospermas (Kays *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010; Pang *et al.*, 2013; Tóth *et al.*, 2016) y en semillas de *Salvia sclarea* (Yalcin *et al.*, 2011). Además, en *S. elegans* se registró otro compuesto con concentraciones similares al compuesto dominante (bornil acetato). En esta especie el 90% de las visitas fueron de colibríes, pero también se registraron visitas de sírfidos. Se ha probado que el bornil acetato estimula respuestas de comportamiento en especies de dípteros (*Drosophila suzukii*; Kirkpatrick *et al.*, 2018), por lo que podría como atrayente de éstos sírfidos, mientras que no hay reportes en la literatura sobre respuestas conductuales de colibríes a este compuesto en particular.

En *S. curviflora* y *S. iodantha* donde el compuesto 1,4-diclorobenceno fue dominante, registramos visitas de abejas como *Deltoptila elephas*, *Bombus weisi* y *Apis mellifera*, donde la mayoría de las visitas fueron legítimas, por lo que

pensamos que éste compuesto está relacionado a la atracción de estas especies, además de que en nuestro análisis de correspondencia canónica (CCA) se muestra que este compuesto está muy relacionado con las visitas de abejas. Se ha reportado que el 1,4-diclorobenceno es emitido en el tallo del maíz y estimula respuestas en machos del barrenador *Chilo partellus* Swinhoe (Guleria *et al.*, 2021). Desde luego que las relaciones entre lepidópteros e himenópteros no es tan cercana, pero con este trabajo (Guleria *et al.*, 2021) se logra saber que provoca respuestas en insectos. En *Salvia longistyla*, este compuesto también fue dominante, pero no registramos visitas de abejas solo de colibríes, quizá porque las observaciones de visitantes florales se realizaron solo por la mañana de 7:30 a 10 am, siendo después de las 10 de la mañana cuando las abejas generalistas registran mayor frecuencia de visitas.

En *S. fulgens* (donde solo se registraron visitas de colibríes) y *S. gesneriiflora*, el limoneno registró mayor concentración que otros compuestos, pero en *S. gesneriiflora* también se registró otro compuesto el trans- β -ocimeno con altas concentraciones. Este compuesto en particular se ha propuesto como un atrayente de polinizadores generalistas (Filella *et al.*, 2013) y se ha mencionado que puede atraer eficazmente a abejas y abejorros (Pecetti *et al.*, 2002; Granero *et al.*, 2005; Farré-Armengol *et al.*, 2017; Giuliani *et al.*, 2020), por lo que las visitas de abejorros como *Bombus ephippiatus* pueden estar relacionadas con este compuesto, que además puede ser una reminiscencia de los antiguos códigos de emisión que siguen atrayendo abejas, aunque sus visitas no sean legítimas. En *S. patens*, el compuesto con la mayor concentración fue el γ -terpineno, además, el

compuesto β pineno también fue abundante y los visitantes florales registrados solo fueron colibríes. Se ha reportado que estos dos compuestos provocan respuestas significativas en abejorros (Blight *et al.*, 1997; Aronne *et al.*, 2014; Byers *et al.*, 2014; Giuliani *et al.*, 2020), por lo que es probable que esta especie sea visitada durante el día por abejas, aunque en nuestras observaciones no las hayamos registrado.

En relación a los COVs florales en especies melitófilas, la clase predominante fueron los bencenoides, siendo el 1,4-diclorobenceno el compuesto mayormente reportado en casi todas las especies melitófilas (6 de las 8) con más del 50% de abundancia relativa, con excepción de *S. plurispicata*, donde el compuesto con la mayor concentración fue el limoneno y en *S. carnea*, donde el compuesto dominante fue el α pineno. Se ha inferido que los códigos de aromas florales con emisiones relativamente altas de bencenoides podrían deberse a la adaptación de las especies vegetales a polinizadores generalistas (Andersson *et al.*, 2002; Theis, 2006; Giuliani *et al.*, 2020). En nuestros resultados, así como en nuestros análisis (CCA particularmente), encontramos una fuerte asociación del compuesto 1,4-diclorobenceno con la atracción de abejas, específicamente con *A. mellifera*, una especie considerada generalista. En la mayoría de especies melitófilas, este compuesto fue el más abundante en *S. longispicata*, *S. tiliifolia*, *S. polystachya*, (con concentraciones de 669 $\mu\text{g/g}$, 643 $\mu\text{g/g}$ y 438 $\mu\text{g/g}$, por flor, respectivamente), siendo *A. mellifera* el visitante floral con las frecuencias más altas, con el 96% en *S. longispicata*, 100% en *S. tiliifolia* y 83% en *S. polystachya*. Se ha mencionado que, cuando el código de aromas florales está dominado por un único COV en

porcentajes muy altos, las flores son polinizadas por abejas (Borg-Karlson *et al.*, 1996; Giuliani *et al.*, 2020). En *S. setulosa*, la concentración del 1,4-diclorobenceno fue de 423 µg/g y el visitante floral más frecuente fue el abejorro *Bombus weisi*, seguido de la abeja *Deltoptila elefas*, aunque también se registraron visitas de *A. mellifera*. En *S. lavanduloides*, este compuesto también fue el mayoritario con una concentración de 320 µg/g y los visitantes florales más frecuentes fueron los abejorros *B. ephippiatus* y *B. weisi* y no se registraron visitas de *A. mellifera*. En *S. reptans*, el compuesto mayoritario también fue el 1,4-diclorobenceno con una concentración promedio de 65 µg/g, pero el visitante más frecuente fue una abeja de la familia Megachilidae, aunque también hubo visitas de *A. mellifera*. En *S. carnea* donde dominó el compuesto α pineno, el único visitante floral reportado fue la abeja *Deltoptila elefas*. En *S. plurispicata* en donde el compuesto mayoritario fue el limoneno, los visitantes florales más frecuentes fueron los abejorros *Bombus weisi* y *B. ephippiatus*, aunque también se registraron visitas de colibríes. Quizá este compuesto (limoneno) puede ser percibido por colibríes, ya que se sabe que también pueden percibir COVs (Kim *et al.*, 2021), o quizá sea un compuesto reminiscente que anteriormente formó parte de los códigos de emisión de COVs florales de especies ahora ornitófilas cuando éstas eran polinizadas por abejas, dado que fue reportado con las mayores concentraciones en especies ornitófilas y, cuando se emitió en grandes cantidades en especies melitófilas, éstas recibieron visitas frecuentes de colibríes. Aunque estas hipótesis requieren demostraciones experimentales.

La clase de compuestos más comúnmente emitidos en las especies intermedias fueron los bencenoides seguido de los terpenos. El perfil de compuestos volátiles florales fue similar en las tres especies (solo diferenciado por las concentraciones en cada especie) y estuvo dominado por dos compuestos con las mayores concentraciones: 1,4-diclorobenceno y α -pineno. Los visitantes florales más frecuentes en las tres especies fueron las abejas. En *S. mexicana* var. *mexicana*, el visitante floral más frecuente fue el abejorro *Bombus weisi*, además de la abeja *Deltoptila elefas*, pero también se registraron visitas de colibríes y de mariposas. En *S. mexicana* var. *minor*, el visitante floral más frecuente fue la abeja *Apis mellifera*, además del abejorro *Bombus sonorus* y de la abeja *D. elefas*, aunque también se registraron visitas de mariposas y muy pocas de colibríes. Se ha reportado que el compuesto α -pineno genera respuestas en abejas, sobre todo de *A. mellifera* y abejas de la tribu Euglossini (Borg-Karlson *et al.*, 1997; Valterová *et al.*, 2007; Giuliani *et al.*, 2020). En *S. purpurea*, los visitantes más frecuentes fueron abejas de la tribu Meliponnini y de la tribu Euglossini, además del abejorro *Bombus weisi*, aunque también hubo visitas de mariposas y no se registraron visitas de colibríes, posiblemente por las horas en que se llevaron a cabo las observaciones. En esta especie, las visitas de abejas metálicas pueden explicarse por la presencia del compuesto α -pineno, pero también por la presencia de β -farneseno, ya que se ha registrado este compuesto en los códigos de aromas florales de diferentes especies polinizadas por abejas euglósinas (Williams y Whitten, 1983; Gerlach y Schill, 1991; Dudareva y Pichersky, 2006). En el análisis de correspondencias canónicas (CCA), el α -pineno y el β -farneseno están estrechamente relacionados a las visitas de mariposas, por lo que estos

compuestos pueden estar atrayendo a estos dos grupos de visitantes florales, mariposas y abejas. Cabe mencionar que, en las tres especies, la mayoría de las visitas de las abejas no fueron legítimas. Solo algunas abejas robadoras de polen lograban tener contacto con las anteras y el estigma, así como las visitas de las mariposas que, aunque eran legítimas, no accionaban el mecanismo de palanca activo en las tres especies.

6 CONCLUSIONES

Encontramos que las 18 especies de *Salvia* analizadas presentan COVs florales y algunos de estos compuestos se comparten en todas las especies, mientras que se encontraron diferencias de compuestos entre los síndromes de polinización, con concentraciones mayores en especies melitófilas. Las diferencias morfológicas del tubo floral y del ancho del labio inferior fueron las esperadas; es decir, las especies melitófilas, con tubos florales cortos y plataformas de aterrizaje bien desarrolladas, emiten concentraciones abundantes de compuestos relacionados a la atracción de abejas en general, mientras que las especies ornitófilas con tubos florales largos y estrechos, además de plataformas de aterrizaje reducidas, emiten COVs florales en menores concentraciones y son visitadas en su mayoría por colibríes. Las especies intermedias son visitadas por más de un gremio de visitantes florales, siendo las abejas más frecuentes, quizá por la emisión particular de dos compuestos.

Este trabajo aporta información novedosa que esperamos sea la base de estudios más detallados y motive a continuar con la investigación de volátiles florales en otras especies, lo que permitirá un entendimiento integral sobre el papel de estos COVs en la atracción de polinizadores.

7 BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

- Alva, G. U. (2012). Evolución de la morfometría floral: la relación entre el síndrome de polinización y la presencia o ausencia del mecanismo de palanca en tres especies de *Salvia*. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH.
- Aitchison, J. (1982). The statistical analysis of compositional data. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 44(2), 139-160.
- An, L., Neimann, A., Eberling, E., Algora, H., Brings, S., & Lunau, K. (2018). The yellow specialist: Dronefly *Eristalis tenax* prefers different yellow colours for landing and proboscis extension. *Journal of Experimental Biology*, 221(22), jeb184788.
- Andersson, S., Nilsson, L. A., Groth, I., & Bergström, G. (2002). Floral scents in butterfly-pollinated plants: possible convergence in chemical composition. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 140(2), 129-153.
- Aronne, G., Giovanetti, M., Sacchi, R., & De Micco, V. (2014). From flower to honey bouquet: possible markers for the botanical origin of Robinia honey. *The Scientific World Journal*, 2014.
- 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: P Pontarotti, ed. *Evolutionary biology: biodiversification from genotype to phenotype*. Cham, Suiza: Springer, 203-224.
- Bedolla García, B. (2012). Filogenia de *Salvia* sec. Polistachyae (Lamiaceae). Tesis de doctorado. Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas. UMSNH.
- 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.

- Benitez-Vieyra, S., Pérez-Alquicira, J., Sazatornil, F. D., Domínguez, C. A., Boege, K., Pérez-Ishiwara, R., & Fornoni, J. (2019). Evolutionary transition between bee pollination and hummingbird pollination in *Salvia*: Comparing means, variances and covariances of corolla traits. *Journal of evolutionary biology*, 32(8), 783-793.
- Bisio, A., Ciarallo, G., Romussi, G., Fontana, N., Mascolo, N., Capasso, R., & Biscardi, D. (1998). Chemical composition of essential oils from some *Salvia* species. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 12(S1), S117-S120.
- Blight, M. M., Métayer, M. L., Delègue, M. H. P., Pickett, J. A., Marion-Poll, F., & Wadhams, L. J. (1997). Identification of floral volatiles involved in recognition of oilseed rape flowers, *Brassica napus* by honeybees, *Apis mellifera*. *Journal of Chemical Ecology*, 23, 1715-1727.
- Borg-Karlson, A.K.; Unelius, C.R.; Valterova, I.; Nilsson, A. (1996). Floral fragrance chemistry in the early flowering shrub *Daphne mezereum*. *Phytochemistry*, 41(6), 1477–1483.
- Brückner, A., & Heethoff, M. (2017). A chemo-ecologists' practical guide to compositional data analysis. *Chemoecology*, 27, 33-46.
- Byers, K. J. (2021). "As if they discovered it by the scent": improving our understanding of the chemical ecology, evolution, and genetics of floral scent and its role in pollination. *American Journal of Botany*.
- Byers, K. J., Bradshaw Jr, H. D., & Riffell, J. A. (2014). Three floral volatiles contribute to differential pollinator attraction in monkeyflowers (*Mimulus*). *Journal of Experimental Biology*, 217(4), 614-623.
- Calderón-Oropeza, M. A., Ramírez-Briones, E., Rodríguez-García, G., Salvador-Hernández, J. L., Bedolla-García, B. Y., Zamudio, S., ... & Gómez-Hurtado, M. A. (2021). Metabolic Correlations of *Salvia dugesii* Fernald and *Salvia gesneriiflora* Lindl. & Paxton with Native *Salvia* Plants from Four Continents Using Essential Oils Compositions. *Records of Natural Products*, 15(4), 323.

- Camargo, M. G. G., Lunau, K., Batalha, M. A., Brings, S., de Brito, V. L. G., & Morellato, L. P. C. (2019). How flower colour signals allure bees and hummingbirds: a community-level test of the bee avoidance hypothesis. *New Phytologist*, 222(2), 1112-1122.
- Celep, F., Atalay, Z., Dikmen, F., Doğan, M., & Classen-Bockhoff, R. (2014). Flies as pollinators of melittophilous *Salvia* species (Lamiaceae). *American journal of botany*, 101(12), 2148-2159.
- Chittka, L., & Waser, N. M. (1997). Why red flowers are not invisible to bees. *Israel Journal of Plant Sciences*, 45(2-3), 169-183.
- Clark, J. L., Clavijo, L., & Muchhala, N. (2015). Convergence of anti-bee pollination mechanisms in the Neotropical plant genus *Drymonia* (Gesneriaceae). *Evolutionary Ecology*, 29, 355-377.
- Claßen-Bockhoff, R. (2007). Floral Construction and Pollination Biology in the Lamiaceae. *Annals of Botany*, 100(2), 359.
- Cortés-Gutiérrez, M. A., Álvarez, T. A. A., & Sarabia, M. S. (2019). Mamíferos silvestres del bosque de encino en la Sierra de los Agustinos en el Municipio de Acámbaro, Guanajuato, México. *Revista de Zoología*, (30), 20-31.
- Coyne, J. A., & Orr, H. A. (2004). Speciation Sinauer Associates. *Sunderland, MA*, 276, 281.
- Cruz, A., Becerril, R., & Báez, O. (2012). La Biodiversidad en Guanajuato: Estudio de Estado. *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Instituto de Ecología del Estado de Guanajuato. (IEE)*, 1.
- Danforth, B. (2007). Bees. *Current biology*, 17(5), R156-R161.
- Darwin, F., & Seward, A. C. (1903). More Letters of Charles Darwin, 2 vols. *New York: D. Appleton and co.*
- Dellinger, A. S. (2020). Pollination syndromes in the 21st century: where do we stand and where may we go? *New Phytologist*, 228(4), 1193-1213.

- Drew, B. T. (2020). Evolution, Pollination Biology, and Species Richness of *Salvia* (Lamiaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 181(8), 767-769.
- Díaz Bedolla, C. (2020). Manejo sustentable de *Prosthechea karwinskii* (Mart.) JMH Shaw a través de su caracterización ecológica, la identificación de las fragancias florales y su propagación in vitro. Tesis de maestría. UMSNH.
- Dudareva, N., & Pichersky, E. (Eds.). (2006). *Biology of floral scent*. CRC press.
- Endress PK. (1996). Diversity and evolutionary biology of tropical flowers. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Epling, C. (1939). A revision of *Salvia*, subgenus *Calosphace*. *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis, Beihefte*, 110.
- Espino-Espino, J., Rosas, F., & Cuevas-García, E. (2014). Variación temporal de visitantes florales en dos especies simpátricas de *Salvia* con floración simultánea y síndrome de polinización contrastante. *Revista mexicana de biodiversidad*, 85(1), 161-166.
- Espino Vierte, J. (2012). Evaluación de barreras reproductivas y mecanismo de palanca en tres especies simpátricas del género *Salvia* (Lamiaceae). Tesis de maestría. Facultad de Biología. UMSNH.
- Faegri, K. & van der Pijl, L. (1979). Principles of Pollination Ecology. Pergamon Press, Oxford.
- Farré-Armengol, G., Filella, I., Llusà, J., & Peñuelas, J. (2017). β -Ocimene, a key floral and foliar volatile involved in multiple interactions between plants and other organisms. *Molecules*, 22(7), 1148.
- 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.

- Fernando, L. N., & Grün, I. U. (2001). Headspace–SPME analysis of volatiles of the ridge gourd (*Luffa acutangula*) and bitter gourd (*Momordica charantia*) flowers. *Flavour and fragrance journal*, 16(4), 289-293.
- Filella, I., Primante, C., Llusia, J., Martín González, A. M., Seco, R., Farré-Armengol, G., ... & Penuelas, J. (2013). Floral advertisement scent in a changing plant-pollinators market. *Scientific reports*, 3(1), 1-6.
- 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.
- Gerlach, G., & Schill, R. (1991). Composition of orchid scents attracting euglossine bees. *Botanica Acta*, 104(5), 379-384.
- Gervasi, D. D., & Schiestl, F. P. (2017). Real-time divergent evolution in plants driven by pollinators. *Nature Communications*, 8(1), 1-8.
- Giuliani, C., Ascrizzi, R., Lupi, D., Tassera, G., Santagostini, L., Giovanetti, M., ... & Fico, G. (2018). *Salvia verticillata*: Vinculación de tricomas glandulares, volátiles y polinizadores. *Fitoquímica*, 155, 53-60.
- Giuliani, C., Giovanetti, M., Lupi, D., Mesiano, M. P., Barilli, R., Ascrizzi, R., ... & Fico, G. (2020). Tools to tie: Flower characteristics, voc emission profile, and glandular trichomes of two mexican salvia species to attract bees. *Plants*, 9(12), 1645.
- Granero, A. M., Sanz, J. M. G., González, F. J. E., Vidal, J. L. M., Dornhaus, A., Ghani, J., ... & Chittka, L. (2005). Chemical compounds of the foraging recruitment pheromone in bumblebees. *Naturwissenschaften*, 92, 371-374.
- Grant, V. (1949). Pollination systems as isolating mechanisms in angiosperms. *Evolution*, 82-97.
- Guleria, N., Nebapure, S. M., Jayanthi, P. K., Suby, S. B., & Kumar, P. S. (2021). Identification of male-specific active host plant volatiles for maize stem borer, *Chilo partellus* Swinhoe. *CURRENT SCIENCE*, 121(4), 578.

- Harley, R. M., Atkins, S., Budantsev, A. L., Cantino, P. D., Conn, B. J., Grayer, R. J., ... & Ryding, P. O. (2004). Labiatae pages 167275. *Joachim W. Kadereit, (volume ed.), The Families and Genera of Vascular Plants*, 7, 2275-2283.
- Heuschen, B., Gumbert, A., & Lunau, K. (2005). A generalised mimicry system involving angiosperm flower colour, pollen and bumblebees' innate colour preferences. *Plant Systematics and Evolution*, 252(3), 121-137.
- Hilpmann, E. T., & Busch, J. W. (2021). Floral traits differentiate pollination syndromes and species but fail to predict the identity of floral visitors to *Castilleja*. *American Journal of Botany*, 108(11), 2150-2161.
- Kantsa, A., Raguso, R. A., Dyer, A. G., Sgardelis, S. P., Olesen, J. M., & Petanidou, T. (2017). Community-wide integration of floral colour and scent in a Mediterranean scrubland. *Nature Ecology & Evolution*, 1(10), 1502-1510.
- Kays, S. J., Hatch, J., & Yang, D. S. (2005). Volatile floral chemistry of *Heliotropium arborescens* L.'Marine'. *HortScience*, 40(5), 1237-1238.
- Kim, A. Y., Rankin, D. T., & Rankin, E. E. W. (2021). What is that smell? Hummingbirds avoid foraging on resources with defensive insect compounds. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 75(9), 1-9.
- Kirkpatrick, D. M., Leach, H. L., Xu, P., Dong, K., Isaacs, R., & Gut, L. J. (2018). Comparative antennal and behavioral responses of summer and winter morph *Drosophila suzukii* (Diptera: Drosophilidae) to ecologically relevant volatiles. *Environmental Entomology*, 47(3), 700-706.
- Knapp, S. (2010). On 'various contrivances': pollination, phylogeny and flower form in the Solanaceae. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B: Biol. Sci.*, 365, 449– 460.
- Knudsen, J. T., Eriksson, R., Gershenzon, J., & Ståhl, B. (2006). Diversity and distribution of floral scent. *The botanical review*, 72(1), 1-120.
- Knudsen, J. T., Tollsten, L., Groth, I., Bergström, G., & Raguso, R. A. (2004). Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in

hummingbird-pollinated taxa. *Botanical journal of the Linnean Society*, 146(2), 191-199.

Kriebel, R., Drew, B. T., Claßen-Bockhoff, R., & Sytsma, K. J. (2023). Evolution of anther connective teeth in sages (*Salvia*, Lamiaceae) under bee and hummingbird pollination. *Flora*, 298, 152199.

Kriebel, R., Drew, B. T., Drummond, C. P., González-Gallegos, J. G., Celep, F., Mahdjoub, M. M., ... & Sytsma, K. J. (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*, 106(4), 573-597.

Lee, J., Sugawara, E., Yokoi, S., & Takahata, Y. (2010). Genotypic variation of volatile compounds from flowers of gentians. *Breeding Science*, 60(1), 9-17.

Leonard, A. S., & Papaj, D. R. (2011). 'X'marks the spot: The possible benefits of nectar guides to bees and plants. *Functional ecology*, 25(6), 1293-1301.

Lunau, K., & Maier, E. J. (1995). Innate colour preferences of flower visitors. *Journal of Comparative Physiology A*, 177(1), 1-19.

Lunau, K., & Wester, P. (2017). Mimicry and deception in pollination. *Advances in Botanical Research* (Vol. 22, pp. 259-279). Academic Press.

Lunau, K., Konzmann, S., Winter, L., Kamphausen, V., & Ren, Z. X. (2017). Pollen and stamen mimicry: the alpine flora as a case study. *Arthropod-Plant Interactions*, 11, 427-447.

Lunau, K., Papiorek, S., Eltz, T., & Sazima, M. (2011). Avoidance of achromatic colours by bees provides a private niche for hummingbirds. *Journal of Experimental Biology*, 214(9), 1607-1612.

Lunau, K., Scaccabarozzi, D., Willing, L., & Dixon, K. (2021). A bee's eye view of remarkable floral colour patterns in the south-west Australian biodiversity hotspot revealed by false colour photography. *Annals of botany*, 128(7), 821-824.

- Machado, I.C. & Lopes, A.V. (2004). Floral traits and pollination systems in the Caatinga, a brazilian tropical dry forest. *Annals of Botany*, 94(3), 365– 376.
- Martínez-Gordillo, M., Bedolla-García, B., Cornejo-Tenorio, G., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. D. R., González-Gallegos, J. G. & Zamudio, S. (2017). Lamiaceae de México. *Botanical Sciences*, 95(4), 780-806.
- Martino, L. D., Roscigno, G., Mancini, E., Falco, E. D., & Feo, V. D. (2010). Chemical composition and antigerminative activity of the essential oils from five *Salvia* species. *Molecules*, 15(2), 735-746.
- Mathew, J., & Thoppil, J. E. (2011). Chemical composition and mosquito larvicidal activities of *Salvia* essential oils. *Pharmaceutical Biology*, 49(5), 456-463.
- Medina García, C., & Rodríguez Jiménez, S. (1993). Estudio florístico de la cuenca del río Chiquito de Morelia, Michoacán, México. Fascículo Complementario IV; INECOL.
- Nava-Bolaños, A., Osorio-Olvera, L., & Soberón, J. (2022). Estado del arte del conocimiento de biodiversidad de los polinizadores en México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 93.
- Ne'eman, G., Jürgens, A., Newstrom-Lloyd, L., Potts, S.G. & Dafni, A. (2010). A framework for comparing pollinator performance: effectiveness and efficiency. *Biol. Rev.*, 85, 435– 451.
- Osche, G. (1983). Optische signale in der coevolution von Pflanze und tier. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft*, 96(1), 1-27.
- Pang, C. C., Scharaschkin, T., Su, Y. C., & Saunders, R. M. (2013). Functional monoecy due to delayed anther dehiscence: a novel mechanism in *Pseuduvaria mulgraveana* (Annonaceae). *PLoS One*, 8(3), e59951.
- Pecetti, L., Tava, A., Felicioli, A., Pinzauti, M., & Piano, E. (2002). Effect of three volatile compounds from lucerne flowers on their attractiveness towards pollinators. *Bulletin of Insectology*, 55, 21-28.

- Pereira, O. R., Catarino, M. D., Afonso, A. F., Silva, A. M., & Cardoso, S. M. (2018). *Salvia elegans*, *Salvia greggii* and *Salvia officinalis* decoctions: Antioxidant activities and inhibition of carbohydrate and lipid metabolic enzymes. *Molecules*, 23(12), 3169.
- Pichersky, E., & Gershenzon, J. (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current opinion in plant biology*, 5(3), 237-243.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Raguso, R. A. (2008). Wake up and smell the roses: the ecology and evolution of floral scent. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 39, 549-569.
- Ramírez-Reyes, L. J. (2020). Biología floral y reproductiva de dos especies del género *Salvia* (Lamiaceae) de corola blanca. Tesis de licenciatura. Facultad de biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Ray, H. A., Stuhl, C. J., & Gillett-Kaufman, J. L. (2018). Floral fragrance analysis of *Prosthechea cochleata* (Orchidaceae), an endangered native, epiphytic orchid, in Florida. *Plant signaling & behavior*, 13(1), e1422461.
- Reith, M., & Zona, S. (2016). Nocturnal flowering and pollination of a rare Caribbean sage, *Salvia arborescens* (Lamiaceae). *Neotropical Biodiversity*, 2(1), 115-123.
- Reynolds, R.J., Westbrook, M.J., Rohde, A.S., Cridland, J.M., Fenster, C.B. & Dudash, M.R. (2009). Pollinator specialization and pollination syndromes of three related North American *Silene*. *Ecology*, 90, 2077– 2087.
- Robertson, C. (1928). Flowers and Insects: Lists of Visitors to Four Hundred and Fifty-Three Flowers. Robertson, C., Carlinville, Illinois.
- Romero, A. A. (1991). Contribución al conocimiento de los macromicetos del Parque Nacional “Cerro de Garnica”, Queréndaro-Cd. Hidalgo, Michoacán, México. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. UMSNH.

- Rosas-Guerrero V, Aguilar R, Martén-Rodríguez S, Ashworth L, Lopezaraiza-Mikel M, Bastida JM, Quesada M. 2014. A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators? *Ecology Letters* 17: 388– 400.
- Rzedowski Rotter, J., & McVaugh, R. (1966). *La vegetación de Nueva galicia* (No. 581.9723 R9).
- Rzedowski, G. C. D., & Rzedowski, J. (2001). *Flora fanerogámica del Valle de México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Rzedowski, G. C. D., & Rzedowski, J. (2005). *Flora Fanerogámica del Valle de México*. 1 a reimp. Instituto de Ecología, AC y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. 1406 pp.
- Rzedowski, J., & Huerta, L. (1978). *Vegetación de México*. Editorial limusa. México, DF.
- SARH (1993). Diagnóstico del Parque Nacional Cerro de Garnica, Michoacán. Subsecretaría Forestal y de Fauna Silvestre. PAUSA. Noviembre. 26 páginas.
- Sarkar, N., Mitra, S., & Barik, A. (2017). *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) floral volatiles causing attraction of *Epilachna dodecastigma* (Coleoptera: Coccinellidae). *International Journal of Pest Management*, 63(2), 138-145.
- Sauquet H, Magallón S. (2018). Key questions and challenges in angiosperm macroevolution. *New Phytologist* 219: 1170– 1187.
- Sauquet H, von Balthazar M, Magallón S, Doyle JA, Endress PK, Bailes EJ, Barroso de Morais E, Bull-Hereñu K, Carrive L, Chartier M et al. (2017). The ancestral flower of angiosperms and its early diversification. *Nature Communications* 8: 16047.
- Schiestl FP, Johnson SD. 2013. Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in Ecology and Evolution* 28: 307– 315.
- Schmidt-Lebuhn, A. N., Kessler, M., & Müller, J. (2005). Evolution of *Suessenguthia* (Acanthaceae) inferred from morphology, AFLP data, and ITS rDNA sequences. *Organisms Diversity & Evolution*, 5(1), 1-13.

- Semenchenko, O. M., Tsurkan, O. O., Korableva, O. A., & Burmaka, O. V. (2013). Determination of volatile compounds of essential oils of different species of genus of *Salvia* by chromatography-mass spectrometric method. *Farmatsevtychnyi zhurnal*, (1), 62-65.
- Serrano-Serrano ML, Rolland J, Clark JL, Salamin N, Perret M. (2017). Hummingbird pollination and the diversification of angiosperms: an old and successful association in Gesneriaceae. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284: 20162816.
- Specht CD, Bartlett ME. 2009. Flower evolution: the origin and subsequent diversification of the Angiosperm flower. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40: 217– 243.
- Stebbins, G.L. (1970). Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I: pollination mechanisms. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 1, 307– 326.
- Theis, N. (2006). Fragrance of Canada thistle (*Cirsium arvense*) attracts both floral herbivores and pollinators. *Journal of chemical ecology*, 32, 917-927.
- Thomson, J.D. (2003). When is it mutualism? *Am. Nat.*, 162, S1– S9.
- Tóth, P., Undas, A. K., Verstappen, F., & Bouwmeester, H. (2016). Floral volatiles in parasitic plants of the Orobanchaceae. Ecological and taxonomic implications. *Frontiers in Plant Science*, 7, 312.
- Tripp, E. A., & Manos, P. S. (2008). Is floral specialization an evolutionary dead-end? Pollination system transitions in *Ruellia* (Acanthaceae). *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 62(7), 1712-1737.
- Valterová, I., Kunze, J., Gumbert, A., Luxová, A., Liblíkas, I., Kalinová, B., & Borg-Karlson, A. K. (2007). Male bumble bee pheromonal components in the scent of deceit pollinated orchids; unrecognized pollinator cues?. *Arthropod-Plant Interactions*, 1, 137-145.

- van der Kooi, C. J., Dyer, A. G., Kevan, P. G., & Lunau, K. (2019). Functional significance of the optical properties of flowers for visual signalling. *Annals of Botany*, 123(2), 263-276.
- Vázquez-Buitrón, MA, Salinas-Melgoza, MA, Salinas-Melgoza, V., & Salinas-Melgoza, A. (2021). La abundancia de colibríes está relacionada con la disponibilidad de recursos alimentarios en un bosque templado del centro de México. *bioRxiv*.
- Velasco-Lezama, R., Quintero-Reyes, M., & Tapia-Aguilar, R. (2021). Evaluación de la actividad antibacteriana de *Salvia purpurea* cav. *Evaluación*, 3, 413-420.
- Vogel S. (1954). Blütenbiologische Typen als Elemente der Sippengliederung, dargestellt anhand der Flora Südafrikas. *Botanische Studien* 1: 1– 338.
- Walker, J. B., Drew, B. T., & Sytsma, K. J. (2015). Unravelling species relationships and diversification within the iconic California Floristic Province sages (*Salvia* subgenus *Audibertia*, Lamiaceae). *Systematic Botany*, 40(3), 826-844.
- Walker, J. B., & Sytsma, K. J. (2007). Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever. *Annals of Botany*, 100(2), 375-391.
- Waser, N. M., & Price, M. V. (1985). The effect of nectar guides on pollinator preference: experimental studies with a montane herb. *Oecologia*, 67, 121-126.
- Wester, P. & Claßen-Bockhoff R. (2007). Floral diversity and pollen transfer mechanisms in bird-pollinated *Salvia* species. *Annals of Botany* 100:1–21.
- Wester, P. (2013). Sunbirds hover at flowers of *Salvia* and *Lycium*. *Ostrich*, 84(1), 27-32.
- Wester, P. (2014). Feeding on the wing: Hovering in nectar-drinking Old World birds—More common than expected. *Emu-Austral Ornithology*, 114(2), 171-183.
- Wester, P., & Claßen-Bockhoff, R. (2006). Bird pollination in South African *Salvia* species. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 201(5), 396-406. b.

- Wester, P., & Claßen-Bockhoff, R. (2006). Hummingbird pollination in *Salvia haenkei* (Lamiaceae) lacking the typical lever mechanism. *Plant Systematics and Evolution*, 257(3-4), 133-146. a.
- Wester, P., & Claßen-Bockhoff, R. (2011). Pollination Syndromes of New World *Salvia* Species with Special Reference to Bird Pollination. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 98(1): 101-156.
- Wester, P., Cairampoma, L., Haag, S., Schramme, J., Neumeyer, C., & Claßen-Bockhoff, R. (2020). Bee exclusion in bird-pollinated *Salvia* flowers: the role of flower color versus flower construction. *International Journal of Plant Sciences*, 181(8), 770-786.
- Westerkamp, C. (1990). Bird-flowers: hovering versus perching exploitation. *Botanica Acta*, 103(4), 366-371.
- Whittall, J. B., & Hodges, S. A. (2007). Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature*, 447(7145), 706-709.
- Will, M., & Claßen-Bockhoff, R. (2017). Time to split *Salvia* sl (Lamiaceae)—new insights from Old World *Salvia* phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 109, 33-58.
- Williams, N. H., & Whitten, W. M. (1983). Orchid floral fragrances and male euglossine bees: methods and advances in the last sesquidecade. *The Biological Bulletin*, 164(3), 355-395.
- Williams, S. K., & Dyer, A. G. (2007). A photographic simulation of insect vision. *The Journal of Ophthalmic Photography*, 29(1), 10-14.
- Wilson, P., Castellanos, M. C., Wolfe, A. D., & Thomson, J. D. (2006). Shifts between bee and bird pollination in Penstemons. *Plant–pollinator interactions: from specialization to generalization*, 47-68.
- Yalcin, H., Ozturk, I., Tulukcu, E., & Sagdic, O. (2011). Effect of γ -irradiation on bioactivity, fatty acid compositions and volatile compounds of clary sage seed (*Salvia sclarea* L.). *Journal of Food Science*, 76(7), C1056-C1061.

- Zamudio, S., & Bedolla-García, B. Y. (2018). *Salvia madrigalii* (Lamiaceae), una especie nueva de Michoacán, México. *Brittonia*, 70(1), 76-83.
- Zung, J. L., Forrest, J. R., Castellanos, M. C., & Thomson, J. D. (2015). Bee-to bird-pollination shifts in *Penstemon*: effects of floral-lip removal and corolla constriction on the preferences of free-foraging bumble bees. *Evolutionary Ecology*, 29, 341-354.