



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO**

FCULTAD DE BIOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

**EVALUACIÓN DE BARRERAS REPRODUCTIVAS Y MECANISMO DE PALANCA EN
TRES ESPECIES SIMPATRICAS DEL GENERO *Salvia* (LAMIACEAE)**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLOGICAS

Presenta:

Judith Espino Espino

Director de tesis:

Dr. Eduardo Cuevas García

Morelia, Michoacán. Agosto. 2012.



AGRADECIMIENTOS

A CONACyT, por el apoyo económico que recibí puntualmente durante dos años.

A mi asesor, Eduardo Cuevas García, por apoyarme incondicionalmente a lo largo de estos más de dos años. Por guiarme en la construcción de cada apartado de mi tesis, estar al pendiente de todo lo que se necesitaba en las salidas al campo, revisar mi tesis, pero sobretodo por confiar en mí, tenerme paciencia y darme la oportunidad de conocerlo como amigo más que como asesor, mil gracias.

A mis sinodales: Dr. Luis Felipe Mendoza Cuenca, Dr. Mauricio Quesada Avendaño, Dr. Omar Chassin Noria y Dr. Antonio González, por sus comentarios, sugerencias y correcciones a este proyecto de tesis.

A mi familia, porque no hay en este mundo mejores padres, hermanas, cuñado y más hermoso sobrino con los que Dios me pudo bendecir. Gracias por haber vivido a mi lado la experiencia de hacer esta maestría, y por haberme acompañado a campo en vacaciones.

Gracias a mis compañeros de maestría, Oliverio, Tano, Juan Pablo, Carlox, Ericka y Eduardo Mendoza, por compartir lindos momentos conmigo.

A mis grandes amigos de la carrera, Teté, Christian, Rosita, Gaby, Vivi, Rocy, Alejandra, Vania, Paola, Chio y Miguel, por estar conmigo cuando los necesité.

Y un muy muy muy profundo agradecimiento a mis amigos, casi hermanos, Delia, Josiani, Marco, Julio, Uriel y Anai por sacrificar sus domingos y jamás dejarme sola cuando tuve que ir a campo.

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN GENERAL | 1 |
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 4 |
| CAPITULO I. EVALUACIÓN DEL AISLAMIENTO REPRODUCTIVO EN TRES ESPECIES SIMPATRICAS DEL GÉNERO <i>Salvia</i> (LAMIACEAE) | 6 |
| RESUMEN..... | 6 |
| INTRODUCCIÓN | 7 |
| DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO..... | 12 |
| DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO | 12 |
| OBJETIVOS..... | 14 |
| Objetivo general. | 14 |
| Objetivos particulares..... | 14 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 15 |
| RESULTADOS..... | 19 |
| Barreras precigóticas. | 19 |
| Barreras postcigóticas. | 27 |
| DISCUSIÓN | 41 |
| Aislamiento precigótico | 41 |
| Aislamiento postcigótico..... | 44 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 47 |
| CAPITULO II. DEPOSITO DE POLEN EN EL ESTIGMA Y TIEMPO DE VIDA DE LA FLOR DE TRES ESPECIES DE <i>Salvia</i> CON DIFERENTES SÍNDROMES DE POLINIZACIÓN..... | 51 |
| RESUMEN..... | 51 |
| INTRODUCCIÓN | 52 |
| OBJETIVOS..... | 55 |
| Objetivo General | 55 |
| Objetivos Particulares | 55 |
| MATERIALES Y METODOS..... | 56 |
| RESULTADOS..... | 57 |
| Visitantes florales..... | 57 |
| Producción de frutos y semillas | 61 |
| DISCUSIÓN | 65 |

| | |
|-----------------------------------|-----------|
| BIBLIOGRAFÍA..... | 68 |
| DISCUSIÓN GENERAL..... | 71 |
| BIBLIOGRAFIA GENERAL | 73 |

RESUMEN GENERAL

El concepto biológico de especie propuesto por Mayr (1963) enfatiza el papel del aislamiento reproductivo en la delimitación de las especies y en este contexto, la especiación puede considerarse como la evolución del aislamiento reproductivo entre poblaciones. Un elemento central en el aislamiento reproductivo de las plantas lo constituyen los polinizadores. Los mecanismos de atracción y manipulación que las plantas han desarrollado les da la ventaja de tener una mayor cantidad y calidad de visitas florales, así como un transporte más específico y eficiente de los granos de polen, lo que se traduce en un aumento del éxito reproductivo de las plantas. En este estudio se evaluaron factores intrínsecos y extrínsecos que pueden contribuir al aislamiento reproductivo de tres especies de *Salvia*: *S. fulgens*, *S. elegans* y *S. plurispicata*. Se evaluaron tanto barreras precigóticas (geográficas, a nivel de microhábitat, fenológicas y fidelidad de polinizadores) como barreras postcigóticas (producción de frutos, semillas y germinación de semillas híbridas). Además, se estimó la cantidad de polen depositado en los estigmas de las tres especies a lo largo de la vida de las flores y se relacionó con la activación o inactivación del mecanismo de palanca, los polinizadores y la producción de frutos de cada especie. Dichas especies pertenecen al mismo subgénero (*Calosphace*), además de coexistir en simpatría lo que posibilita las interacciones entre ellas.

En *S. fulgens*, las barreras precigóticas fueron débiles, y es probable que permitan cierto flujo génico entre las especies como lo sugiere la presencia de híbridos putativos naturales. Sin embargo, las barreras postcigóticas mostraron más efectividad al disminuir las posibilidades de producción de frutos y la cantidad de semillas producto de cruza interespecíficas. Contrario a la mayoría de los estudios, estos resultados sugieren que las barreras postcigóticas pueden ser más efectivas en reducir la formación de híbridos. En cambio en *S. elegans* y *S. plurispicata* las barreras postcigóticas fueron débiles, mientras que las barreras precigóticas en conjunto disminuyeron la probabilidad de producción de híbridos.

Por otra parte, *S. elegans*, con mecanismo inactivo de palanca y visitada por colibríes, fue la especie que recibió más granos de polen en el estigma, seguida de *S. fulgens* con mecanismo de palanca activo y visitada principalmente por el colibrí *Eugenes fulgens*, y

finalmente *S. plurispicata*, con un mecanismo activo y visitada por tres especies de abejas (*Bombus ephippiatus*, *Deltoptila sp.* y *Tetraloniella sp.*) y tres especies de colibríes fue la especie que recibió menos granos de polen. Sin embargo, esta última presentó los valores más altos de producción de frutos y de fruit-set. Estos resultados sugieren que la inactivación del mecanismo de palanca, confiere un aumento en la cantidad de polen recibido en el estigma en especies polinizadas por colibríes. Por otro lado, *S. plurispicata*, la especie que recibió la menor cantidad de granos de polen, compensa esta desventaja con la mayor producción de frutos y el fruit-set más alto de las tres especies.

ABSTRACT

The biological species concept proposed by Mayr (1963) emphasizes the role of reproductive isolation in the delimitation of species. In this context, speciation can be considered as the evolution of reproductive isolation among populations. A central element of reproductive isolation in plants are pollinators. Plants had developed attraction mechanisms which increases both the quantity and quality of floral visits, which results in an increase of reproductive success of plants. In this study, we evaluated intrinsic and extrinsic factors that may contribute to reproductive isolation of three *Salvia* species: *S. fulgens*, *S. elegans* and *S. plurispicata* were evaluated. Precigotic barriers include reproductive isolation at (geographic, microhabitat level, phenological and pollinator fidelity) and postzygotic barriers were estimated as (fruit and seed production, and hybrid seed germination compared to the parental species). In addition, we estimated the amount of pollen deposition on stigmas of the three species over flowers life and the relation with activation or inactivation of the lever mechanism, pollinators and fruit production of each species. These species belong to the same subgenus (Calospatha) coexist in sympatry making it possible interactions between them. In *S. fulgens*, precigotic barriers were weak, and possibly allow some gene flow between species as suggested by the presence of putative natural hybrids. However, postzygotic barriers were more effective decreasing the chances of fruit production and the amount of hybrid seeds. Contrary to most of the studies, these results suggest that in *S. fulgens* postzygotic barriers may be more effective in reducing hybrids formation. In contrast, in *S. elegans* and *S. plurispicata* postzygotic barriers were weak, while precigotic barriers decreased the probability of hybrids. Moreover, *S. elegans*, with an inactive lever mechanism and visited by hummingbirds, received more grains, followed by *S. fulgens* (active mechanism and mainly visited by the hummingbird *Eugenes fulgens*, and finally *S. plurispicata* (with an active mechanism and visited by three bees (*Bombus ephippiatus*, *Deltotila* sp. and *Tetraloniella* sp.) and three hummingbirds species. However, *S. plurispicata* showed the highest values of fruit production and fruit-set. These results suggest that inactivation of the lever mechanism confers an increase in the amount of pollen on the stigma received in species pollinated by hummingbirds. On the other hand, *S. plurispicata*, the species that received the lowest number of pollen grains, compensates this disadvantage with the highest fruit production and fruit-set of the three species.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La especiación es sin lugar a dudas un tema central de la biología evolutiva. Sin embargo, en la actualidad no existe un consenso acerca de los criterios necesarios para delimitar a una especie (Ramsey *et al* 2003). De tal forma que se han propuesto distintos conceptos de especie que difieren en el enfoque que utilizan y las condiciones requeridas para delimitarlas. Por ejemplo, el concepto filogenético considera a una especie como un “un grupo diagnosticable de individuos dentro de los cuales existe un patrón parental de ancestría descendencia” (Hausdorf 2011). Por otro lado, el concepto taxonómico se basa en el reconocimiento de una unidad morfológica (Mishler y De Luna 1997).

El concepto biológico propuesto por Mayr (1963) describe a una especie como: “Grupos de poblaciones naturales que actualmente o potencialmente son entrecruzables, las cuales están reproductivamente aisladas de otros grupos”. Este concepto enfatiza el papel del aislamiento reproductivo (AR) en la delimitación de las especies y en este contexto, la especiación puede considerarse como la evolución del aislamiento reproductivo entre poblaciones potencialmente entrecruzables (Coyne y Orr 2004).

El AR facilita la acumulación de diferencias genéticas entre grupos de poblaciones, y por lo tanto crea una delimitación entre ellos, así como de los rasgos adaptativos que les permiten una adecuación óptima, y que en conjunto pueden dar lugar finalmente a nuevas especies.

En el caso de las plantas con flores, y su interacción con los polinizadores, se propone que esta relación ha sido en ocasiones la responsable de la radiación adaptativa de varios grupos de plantas. La mayoría de las especies de angiospermas han modificado sus estructuras florales lo que ha promovido el desarrollo de mecanismos especializados de polinización (Galen 1999). La adquisición de nuevos caracteres no solo promueve la atracción de los polinizadores más efectivos, sino que también excluye a aquellos visitantes florales que no depositen polen en el estigma (Mayfield *et al.* 2001).

Los mecanismos de atracción y manipulación que las plantas han desarrollado van desde restringir la cantidad de recompensa, su esencia, el color de la corola y la forma floral, hasta la modificación del tiempo de despliegue floral (Kay y Sargent 2009). Esto les da la ventaja de tener una mayor cantidad y calidad de visitas florales por parte de los polinizadores, así como un transporte más eficiente de los granos de polen, lo que se

traduce en un aumento del éxito reproductivo de las plantas (Kay y Sargent 2009; Mitchell *et al.* 2009). De manera que, aquellas que cuenten con un proceso de polinización eficiente serán más exitosas y se verán favorecidas por selección natural (Richards 1985).

El aumento de la probabilidad de llegada de los granos de polen a un estigma receptivo de su misma especie, depende de la estrategia desarrollada por cada especie para liberar el polen cuando este ha madurado. Evitar el desperdicio de polen es otra característica que las plantas con flor, sobre todo en aquellas en las que sus polinizadores lo consumen y por lo tanto la pérdida de polen puede ser desventajosa (Vallejo-Marín *et al.* 2010).

En este estudio se evaluaron factores intrínsecos y extrínsecos que pueden contribuir al aislamiento reproductivo de *Salvia fulgens*, *S. elegans* y *S. plurispicata*, así como la relación entre la presencia o ausencia del mecanismo de palanca y la cantidad de polen depositado en los estigmas durante la vida de las flores. Dichas especies pertenecen al mismo subgénero (*Calosphace*), además de coexistir en simpatria lo que posibilita las interacciones entre ellas como lo demuestra la presencia de individuos híbridos putativos en la población estudiada.

CAPITULO I. EVALUACIÓN DEL AISLAMIENTO REPRODUCTIVO EN TRES ESPECIES SIMPÁTRICAS DEL GÉNERO *Salvia* (LAMIACEAE)

RESUMEN

La detección de híbridos putativos del género *Salvia* en una población en donde coexisten tres especies de dicho género: *Salvia elegans*, *S. fulgens* y *S. plurispicata* motivó la estimación del factor o factores que pueden estar permitiendo el flujo de genes entre dichas especies. Por tal motivo, se evaluaron distintas barreras precigóticas y postcigóticas del aislamiento reproductivo. Las barreras precigóticas analizadas incluyen el aislamiento geográfico, a nivel de microhábitat, fenología floral, fidelidad de polinizadores y aislamiento mecánico. Las barreras postcigóticas se estimaron comparando la producción de frutos, semillas y su viabilidad producidas en cruza intraespecíficas con la de cruza interespecíficas. El hallazgo de híbridos putativos en campo permitió la realización de cruza entre ellos y las posibles especies parentales. Se encontró fuerte aislamiento geográfico principalmente entre *S. plurispicata* con *S. fulgens* y *S. elegans*, es decir, *S. plurispicata* se encuentra más alejada geográficamente de las otras de especies. No se encontró evidencia de aislamiento a nivel de microhábitat ni en la fenología floral, ya que las tres especies coexisten espacialmente y traslapan su floración durante un periodo considerable del año. El aislamiento por polinizadores se consideró débil, debido a que algunos visitantes forrajean en más de una especie, siendo el colibrí *Selasphorus platycercus* la única vía potencial de transporte de polen interespecífico entre las tres especies. Sin embargo, de acuerdo al ensamblaje artificial de los colibríes (ejemplares de la colección ornitológica) con las flores de cada especie, el sitio de colocación de polen en los visitantes que comparten las especies fue diferente, lo cual se interpretó como evidencia de aislamiento mecánico. Las cruza realizadas en flores híbridas y con polen híbrido mostraron que únicamente el polen de *S. fulges* en flores híbridas genera frutos. En conjunto, las barreras precigóticas fueron débiles, y es probable que permitan cierto flujo génico entre especies. Sin embargo, las barreras postcigóticas mostraron más efectividad al disminuir la producción de frutos y la cantidad de semillas producto de cruza interespecíficas. Contrario a la mayoría de los estudios estos resultados sugieren que las barreras postcigóticas pueden ser más efectivas en reducir la formación de híbridos, lo que concuerda con la baja densidad de híbridos detectada en campo.

INTRODUCCIÓN

El estudio de las barreras que reducen el flujo genético ha sido visto como una extensión del concepto biológico de especie (Lexer y Widmer 2008). Basados en este concepto podemos decir que, las barreras de aislamiento reproductivo operan en conjunto para mantener diferenciadas a las especies. Si este proceso se logra entender, se podría definir la etapa en la que se encuentra una especie en formación y conocer bajo qué condiciones se inicia este proceso (Kay 2006; Wu 2001). Aun no es claro si la especiación puede ser directamente equiparable a la evolución del aislamiento reproductivo. Sin embargo, hay un acuerdo general que el tiempo y el modo de especiación se verá fuertemente influenciado por la naturaleza de las barreras de aislamiento (Coyne y Orr 2004).

Tradicionalmente suele dividirse a las barreras en precigóticas (aquellas que actúan antes de la formación del cigoto) y las postcigóticas (las cuales actúan después de que se ha formado el cigoto). En el caso de las plantas, las barreras precigóticas más comúnmente estudiadas son: la fenología floral, el tipo de polinizadores, y sus diferencias en el comportamiento (aislamiento etológico), así como las diferencias morfológicas florales (aislamiento mecánico) que pueden impedir o minimizar las cruza heteroespecíficas (cruza entre especies distintas). En cuanto a las barreras postcigóticas se incluyen mecanismos de incompatibilidad genética que pueden evitar la germinación de los granos de polen o el crecimiento y fecundación de óvulos heteroespecíficos, además de la inviabilidad de los híbridos, y la reducción en su fertilidad en comparación con las especies parentales (Ramsey *et al.* 2003, Kay 2006, Costa *et al.* 2007, Martin y Willis 2007, Lowry *et al.* 2008).

Uno de los elementos que se considera ha contribuido de manera relevante en el proceso de especiación de las plantas son los polinizadores (Campbell 2008). Aunque, algunos autores consideran que la especialización de los polinizadores no está directamente relacionada con el aislamiento reproductivo, sino que el aislamiento es un subproducto de la evolución adaptativa (Maad y Nilsson 2004, Johnson 2006). Kay y Sargent (2009) sugieren que la fuerza del aislamiento floral no es por sí sola suficiente para mantener diferenciadas a las especies, considerando que es necesario que actúen en conjunto con más barreras para producir un aislamiento completo.

Sin embargo, la formación de híbridos naturales es común en ciertos grupos de plantas con flor (Ellstrand *et al.* 1996) y cuando se combina con la multiplicación del genoma (poliploidia), este proceso es reconocido como uno de los más importantes mecanismos de especiación en plantas (Grant 1981).

El número y la naturaleza de los cambios genéticos que intervienen en el aislamiento no son iguales en las barreras precigóticas que en las postcigóticas. Además, ambos tipos de barreras difieren en la magnitud en la que impiden la formación de un cigoto híbrido (Cozzolino y Scopece 2008).

Generalmente los estudios de las barreras reproductivas se realizan entre pares de especies simpátricas, cercanas filogenéticamente, ya que entre especies alejadas estas barreras pudieron haber evolucionado después de ocurrida la especiación (Lowry *et al.* 2008). Los estudios más recientes entre pares de especies de plantas coinciden en que las barreras precigóticas son más efectivas para aislar especies cercanas, que las barreras postcigóticas (Ramsey *et al.* 2003; Kay 2006; Martin y Willis 2007). No obstante en algunos pares de especies hermanas las barreras postcigóticas pueden a veces ser más efectivas en el cese del flujo genético (Costa *et al.* 2007; Widmer *et al.* 2009).

La presencia de posibles híbridos de *Salvia* en una población natural, motivó la realización de este estudio en donde se evaluaron distintas barreras reproductivas entre tres especies simpátricas de este género, dos de ellas con características florales que sugieren la visita de colibríes (*S. elegans* y *S. fulgens*) y *S. plurispicata* con características que sugieren la visita de abejas.

El género *Salvia* (tribu Mentheae, Lamiaceae) representa un enorme grupo cosmopolita de cerca de 1,000 especies con un rango extraordinario de variación. Se han registrado especies distribuidas principalmente en tres regiones del mundo: Asia central/Mediterráneo (250 especies), este de Asia (90 especies) y en el centro y sur de América (500 especies) (Walker y Sytsma 2007). En México, la gran disponibilidad de polinizadores, la compleja historia geológica y la evolución de desiertos y montañas ha dado lugar a una gran diversidad consistente en 312 especies, siendo 270 (86%) endémicas del país (Ramamoorthy y Elliot 1998).

Salvia se distingue de los otros 72 géneros en la tribu Mentheae por tener dos estambres funcionales y dos posteriores abortados, que junto con el tejido conectivo resultan en la formación denominada “mecanismo de palanca” (Walker y Sytsma 2007).

El mecanismo de palanca funciona de la siguiente manera: al ser visitada una flor por un insecto o ave en busca de néctar, presiona la barrera trasera, es decir, el brazo conectivo inferior, haciendo que el brazo en el que se encuentran las anteras salga del labio superior impregnando de polen al visitante en la parte dorsal de los insectos o en la cabeza de las aves. Cuando el visitante se retira los estambres vuelven a su lugar (Reith *et al.* 2007) (Fig. 1).

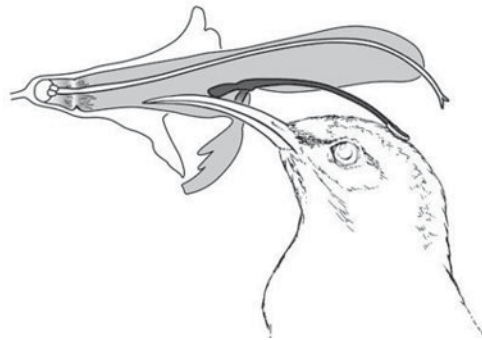


Figura 1. *Nectarinia chalybea* activando el mecanismo de palan en *Salvia laceolata*. Su pico empuja los brazos posteriores del conectivo y las tecas descenden y colocan el polen en el ave. Tomado de Wester y Claben-Bockhoff (2007).

A pesar de la gran diversidad de especies en el género *Salvia*, únicamente se ha observado síndromes de melitofilia (abejas) y ornitofilia (aves). El síndrome de melitofilia está presente tanto en especies del viejo como del nuevo mundo a diferencia de las especies ornitofilicas que están presentes únicamente en especies del nuevo mundo, posiblemente en respuesta a los colibríes neotropicales.

Walker y colaboradores (2004) realizaron un estudio preliminar en el que examinaron la monofilia de *Salvia* y la manera en que se desarrolló el mecanismo de palanca en este género. Mediante el análisis de regiones del cloroplasto *rbcL* y *trnL-trnF* demostraron que *Salvia* no es monofilético, y la evolución del estambre hacia una palanca ha ocurrido de manera paralela de dos maneras posibles. Concluyen que, aquellas especies que modificaron el tejido estaminal a una palanca son especies con una gran radiación adaptativa, a diferencia de las especies que no emplean este mecanismo.

En 2007 Walker y Sytsma estudiaron la variación en la morfología estaminal y la evolución del mecanismo en el género *Salvia*. Con sus resultados reafirmaron la polifilia encontrada en el estudio preliminar. Encontraron que las diferentes morfologías estaminales evolucionaron de manera independiente en tres ocasiones dentro del género.

Se ha propuesto que la enorme diversificación del género *Salvia* se debe a la presencia del mecanismo de palanca, su movimiento reversible y la organización de las estructuras florales restantes que, le confieren beneficios en términos de un aumento en su adecuación. Se ha argumentado que el mecanismo de palanca contribuye a una mayor precisión en la colocación del polen y por lo tanto disminuye la posibilidad de que un polinizador transporte polen de especies diferentes (Claben-bockhoff *et al* 2004; Westerkamp y Claben-Bockhoff 2007). La precisión con la que es colocado el polen en el polinizador tiene una implicación importante en el éxito reproductivo y en particular en el aislamiento mecánico en especies simpátricas (Paw 2006). Otra ventaja que se le atribuye a dicho mecanismo es que promueve la fertilidad de la parte masculina reduciendo la pérdida de gametos, restringiendo el acceso al polen a visitantes no efectivos. El éxito de la función masculina depende del número de granos de polen que se exporten y de los que lleguen al estigma receptivo (Wester y Claben-Bockhoff 2006).

Esta propuesta se ve afianzada cuando se hace notar la gran diversidad de este género y la presencia de una única estructura esencial para la reproducción. Por lo tanto, el mecanismo de palanca representa una “innovación clave” que promueve la radiación adaptativa de *Salvia* (Claben-Bockhoff *et al* 2004).

Sin embargo, no todos los integrantes del género *Salvia* tienen activo el mecanismo de palanca. En al menos 50 de las 200 especies polinizadas por aves el mecanismo de palanca se encuentra inactivo o la palanca se ha reducido. Por ejemplo, *Salvia haenkei* tiene bien desarrollado el mecanismo de palanca pero no puede ser activado, debido a que la parte inferior está muy cercana al labio superior, inhabilitándose su movimiento (Wester y Claben-Bockhoff 2006).

Algunos autores sugieren que el mecanismo de palanca ya no representa una ventaja cuando la polinización es por aves (Wester y Claben-Bockhoff 2006) quienes son una vía excelente para el transporte de polen (Castellanos *et al.* 2003).

Este estudio se propone evaluar barreras de aislamiento reproductivo, tanto precigóticas como postcigóticas, en tres especies de *Salvia*: *S. fulgens*, *S. elegans* y *S. plurispicata*. Dichas especies pertenecen al mismo subgénero (Calosphace), además de coexistir en simpatría lo que posibilita las interacciones entre ellas.

S. plurispicata presenta mecanismo de palanca con caracteres morfológicos típicos de melitofilia, color azul-morado, labio inferior amplio, que sirve de plataforma de aterrizaje y con aproximadamente 1 cm de largo del tubo floral. *S. elegans* tiene inactivo el mecanismo de palanca y presenta características típicas de un síndrome de polinización por aves (ornitofilia), flores rojas, angostas y tubulares de aproximadamente 3.5 cm de largo y anteras expuestas. Por último, *S. fulgens* presenta mecanismo de palanca activo combinado con características de ornitofilia, corola tubular, roja-naranja, aunque no muy angosta, de aproximadamente 5 cm de largo.

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en el Parque Nacional “Cerro Garnica”, dentro de los municipios de Hidalgo y Queréndaro, a 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 de los 2,900 a los 3,028 msnm. Está comprendido entre los 19° 38' 44" - 19° 41' 30" de latitud norte y los 100° 48' 17" - 100° 50' 26" de longitud oeste (Romero 1991).

DESCRIPCIÓN DE LAS ESPECIES DE ESTUDIO

Las tres especies de estudio son integrantes de la familia Lamiaceae, tribu Mentheae, del género *Salvia* y subgénero *Calosphace*. Las tres son plantas arbustivas perennes, y pierden tallos y hojas anualmente en primavera produciendo nuevos brotes en otoño.




***Salvia fulgens* Cav.** Arbusto de 1 a 4 m de alto, a menudo trepador; tallos tomentosos a pilosos, los pelos por lo general glandulosos, pegajosos; peciolas de 0.5 a 7 cm de largo, por lo común pilosos, a menudo con glándulas sésiles, láminas foliares ovadas, de 3 a 14 cm de largo, de 1.5 a 7 cm de ancho, agudas en el ápice, cordadas a truncadas, en ocasiones redondeadas en la base, pilosa en el haz; brácteas lanceolado-ovadas de 1.5 a 4 cm de largo, de 0.4 a 2 cm de ancho, acuminadas, verdes a rojas, pilosas, deciduas, pedicelos de 2 a 6 mm del largo, erectos; cáliz de 1.2 a 1.8 cm de largo, de 4 a 7 mm de ancho, verde a frecuentemente rojo, por lo general glanduloso, sus lóbulos agudos; corola roja o rara vez blanca, de 4 a 6 cm (tubo de 2.5 a 3.6 cm) de largo, de 0.8 a 1 cm de ancho, pilosa por fuera y con un par de papilas cerca de la base por dentro, labio superior de 1.6 a 1.8 cm de largo, el inferior de 1.6 a 1.75 cm de largo y de 1.2 a 1.4 cm de ancho; lóculos de las anteras de 4 a 5 mm de largo de \pm 1 mm de grueso; estilo de 4 a 6 cm de largo, barbado. Relativamente frecuente en bosques de coníferas, de *Quercus* y mesófilo de montaña (Rzedowski y Rzedowski 2005; Cuadro 1).

***Salvia elegans* Vahl.** Es una planta herbácea perenne o arbustiva de 0.8 a 2 m de alto; tallo exfoliante, densamente piloso y glanduloso-viloso, en particular en las partes más jóvenes; peciolas de 0.3 a 2 cm. de largo, por lo común glanduloso-vilosos, láminas

foliares ovadas, de 0.8 a 6 cm. de largo, de 0.6 a 3.5 cm. de ancho, cáliz de 4 a 8 mm. de largo, de 1.5 a 3 mm de ancho. Corola roja, de 2.2 a 4cm. (tubo de 1.5 a 2.1cm.) de largo. Estambres ligeramente excertos, anteras de 1.2 mm de largo. Ampliamente distribuida en las partes montañosas húmedas del valle de México. Alt. 2550-3100m (Rzedowski y Rzedowski 2005; Cuadro 1).

***Salvia plurispicata* Epling.** Hierba perenne, ramas escasamente pubescente y poco glandulosas, lamina angosta ovada de 4 a 8 cm de longitud, acuminada en la parte media y superior y ápice muy agudo, base redondeada, márgenes agudos aserrados, glabra por ambos lados, venas escasamente puberulentas, pecíolos delgados de 1-3 cm de largo; flores 1 a 3 en brácteas caducas en disposición axilar, dispuestas en racimos delgados glandulosos-puberulentos de 5 a 10 cm de largo, cáliz de 5 a 5.5 mm de longitud, glanduloso puberulento, tubo de la corola de 6 a 7.5 mm de longitud, labio superior circinado 4 mm más alto(Epling 1939; Cuadro 1).

Cuadro 1. Fotos y descripción de aspectos básico de las especies de *Salvia* estudiadas.

| FOTO | ESPECIE | SÍNDROME DE POLINIZACIÓN | MECANISMO DE PALANCA |
|---|------------------------|--------------------------|----------------------|
|  | <i>S. fulgens</i> | Ornitofílica | Activo |
|  | <i>S. elegans</i> | Ornitofílica | Inactivo |
|  | <i>S. plurispicata</i> | Melitofílica | Activo |

OBJETIVOS

Objetivo general.

Evaluar los distintos tipos de barreras precigóticas y postcigóticas que contribuyen al aislamiento reproductivo entre *Salvia fulgens*, *S. elegans* y *S. plurispicata*.

Objetivos particulares.

- Estimar el aislamiento geográfico de las tres especies en México.
- Caracterizar la fenología floral y evaluar la eficiencia del aislamiento a nivel de microhábitat.
- Identificar los diferentes visitantes florales de cada especie, y estimar su grado de fidelidad.
- Comparar el éxito reproductivo de cruza intra e interespecíficas.
- Estimar la sobrevivencia y éxito reproductivo de los híbridos respecto a las especies parentales.
- Conocer la compatibilidad de polen de *S. elegans* y de *S. fulgens* con híbridos putativos encontrados en campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Barreras precigóticas

A pesar de que el aislamiento geográfico puede contribuir significativamente al aislamiento reproductivo, no ha sido considerado en la mayoría de los trabajos entre especies cercanas. Sobel y colaboradores (2009) enfatizan que esta barrera tiene un rol importante para separar especies que potencialmente pueden hibridar. Por lo cual, en este estudio se tomó en cuenta la contribución de esta barrera en el AR total entre las tres especies.

Aislamiento geográfico. En este apartado se examinaron ejemplares de las tres especies en los siguientes herbarios: IEB (Instituto de Ecología del Bajío), MEXU (Herbario Nacional de México) y del ENCB (Herbario del Instituto Politécnico Nacional). De cada ejemplar se obtuvieron los datos de colecta como son: altitud, latitud, longitud, localidad, municipio y Estado. En los casos en los que los ejemplares no presentaban coordenadas geográficas y/o altitud, estas se obtuvieron con ayuda del programa google earth (versión 4.3.7284.3916) mediante la ubicación del Estado, municipio y localidad contenidas en las etiquetas. Solo se tomó en cuenta un ejemplar por localidad. Posteriormente, las coordenadas se transformaron a ejes *X* y *Y* para ser representados con ayuda del programa ArcGIS en un mapa de México. Sobre este mapa se trazaron cuadrantes virtuales en todo el país. La elección del tamaño de cuadrante (500 m), se tomó considerando la distancia promedio a la que se desplazan los polinizadores (~ 400 m; Schulke y Waser 2001). El cálculo del aislamiento se basa en la posibilidad de que un cuadrante presente ejemplares de una o más especies, por lo tanto el valor final es sensible al tamaño de cuadrante. Por lo cual se podría asegurar que las poblaciones que estén dentro de los cuadrantes artificiales, son poblaciones simpátricas, y que el flujo de polen, en la mayoría de los casos, no supera la distancia artificialmente establecida de los cuadrantes. Por lo tanto este tamaño de cuadrante fue el utilizado para el cálculo final de AR entre las especies.

El trabajo de campo que se describe a continuación se realizó a lo largo de 2 temporadas de floración, comprendiendo las temporadas del 2008-2009 y 2010-2011. Con excepción de la fenología floral que se realizó durante tres temporadas (2008-2009, 2009-2010 y 2010-2011).

Aislamiento a nivel microhábitat. Con la finalidad de examinar si existe preferencia por algún tipo de microhábitat por parte de cada una de las tres especies, se realizaron tres cuadrantes de 20 x 10 m dentro de los cuales se contabilizó el número total de plantas de cada especie además de tomar la distancia a la que se encuentran plantas de la misma y de distinta especie.

Fenología floral. Para la evaluación del solapamiento de la floración de las tres especies se marcaron 30 individuos por especie. Posteriormente, se registró quincenalmente la producción de flores de cada individuo durante toda la época de floración. Este conteo se llevó a cabo durante tres temporadas en el mismo sitio de estudio. Las temporadas comprenden de octubre de 2008 a marzo de 2009, septiembre 2009 a enero de 2010 y de octubre de 2010 a abril de 2011. El índice de traslape así como las diferencias significativas de cada valor se determinaron con ayuda del programa EcoSim700 que trabaja con el índice de Pianka (1973) y un modelo de hipótesis nula. Se realizaron 1000 simulaciones con todas las combinaciones posibles entre pares de especies.

Fidelidad de visitantes florales. Con la finalidad de conocer los visitantes de cada especie de planta y en qué medida estos son compartidos por las especies estudiadas, se realizaron observaciones directas, así como video grabaciones en cada especie. Las observaciones se realizaron de las 9:00 a las 14:00 hrs, periodo en que hay más actividad de polinizadores (observaciones personales). Para la determinación taxonómica de las especies de himenópteros observados visitando a alguna especie, se colectaron algunos individuos y posteriormente se identificaron con ayuda de la guía dicotómica “The Bee Genera of North and Central America (Hymenoptera: Apoidea)” (Sheffield 1994). La identificación de los colibríes se realizó con la ayuda de guías de campo (Peterson y Chalif 1998, Howell y Webb 2010), videograbaciones y binoculares en campo. De esta manera se obtuvieron los siguientes datos: especie de visitante y número de flores visitadas. Las observaciones de visitantes se realizaron en días completamente despejados.

Aislamiento mecánico. Para determinar el sitio de colocación del polen en los colibríes que visitan a cada una de las especies se utilizaron ejemplares de la colección ornitológica de la facultad de biología de la U.M.S.N.H. Con ayuda de los ejemplares se simulaban visitas en cada especie, evaluando su posible función como polinizador.

Barreras postcigóticas

Entrecruzamientos intraespecíficos: Con el fin de comparar la producción de frutos y semillas de cruza de la misma especie con las realizadas entre especies, se realizaron cruza manuales con polen de una planta de la misma especie, alejada al menos por 10m, con la finalidad de reducir la probabilidad de parentesco entre ellas (30 plantas de cada especie y 6 flores/planta, en flores previamente embolsadas desde botones).

Entrecruzamientos interespecíficos: Se siguió el mismo procedimiento que las cruza intraespecíficas, con la diferencia de que se realizaron cruza recíprocas entre las tres especies, de igual manera se marcaron y se registró la producción de frutos y el número de semillas por fruto.

Tratamiento control. Se marcaron flores de varias plantas de cada una de las tres especies las cuales se dejaron expuestas a los polinizadores. Posteriormente se registró la producción de frutos y semillas.

Formulas.

La estimación del AR para cada barrera se hizo utilizando las siguientes formulas tomadas de Ramsey *et al.* (2003) y Kay (2006).

(1) AR geográfico = $1 - (\# \text{ cuadrantes heteroespecíficos} / (\# \text{ cuad. heter} + \# \text{ cuad. conesp.}))$

(2) AR microhábitat = $1 - (\# \text{ cuadrantes heteroespecíficos} / (\# \text{ cuad. heter} + \# \text{ cuad. conesp.}))$

(3) AR polinizadores = $1 - \text{la proporción de visitas de especies compartidas.}$

Para la producción de semillas. Cantidad de semillas por futo, peso de semillas, germinación, viabilidad y cantidad de polen se utilizó la siguiente fórmula para cada una de ellas.

(4) Aislamiento postcigótico = $1 - (\text{cruza interespecíficas} / \text{cruza intraespecíficas})$

El aislamiento total se calculó con la fórmula:

(5)
$$T = \sum_{i=1}^m AC_i.$$

Donde:

AC = contribución absoluta de cada componente del AR.

Dado que se encontraron en campo dos híbridos putativos que probablemente sean resultado de la cruce de *S. elegans* y *S. fulgens*, se realizaron cruces manuales para saber si existe compatibilidad entre las posibles especies parentales y estos híbridos. Las cuales consistieron en tomar polen de *S. elegans* y *S. fulgens* y colocarlo en el estigma de 6 y 7 flores híbridas, respectivamente. Además, se realizaron 12 cruces con polen de flores híbridas colocado en estigmas de *S. fulgens*. Desafortunadamente, no fue posible realizar cruces colocando polen de flores híbridas en estigmas de *S. elegans*, ya que la fecha en la cual se realizaron las cruces no había plantas de *S. elegans* en flor.

RESULTADOS

Barreras precigóticas.

Aislamiento geográfico. Después de la depuración de datos obtenidos en los herbarios que consistió en eliminar ejemplares repetidos de una misma localidad o con datos insuficientes para ser geo-referenciados, se obtuvieron un total de 401 registros para las tres especies. De los cuales, 256 fueron de *S. elegans*, 102 de *S. fulgens* y 43 corresponden *S. plurispicata*. Al representar los puntos de los registros en un mapa con cuadrantes de 3.7', (aproximadamente 500 m; Fig. 2), se encontró un total de 346 cuadros que contenían al menos un registro, de estos el 10.98 % tenían registro de dos especies, y únicamente se encontró un cuadro que contenía registro de las tres especies.

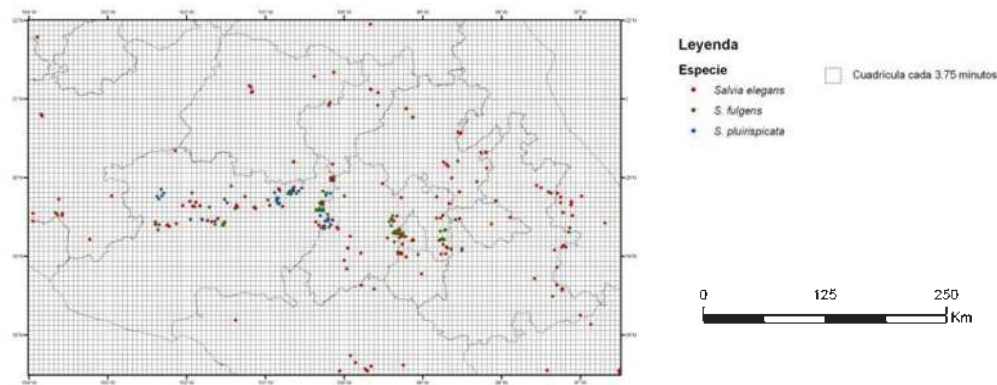


Figura 2. Distribución de las tres especies de *Salvia* estudiadas en el centro del país con base a los registros de los herbarios empleando una retícula de 3.75 minutos que equivalen aproximadamente a 500 m.

En 208 cuadrantes solamente estuvo *S. elegans*, en 64 únicamente *S. fulgens* y en 34 cuadrantes *S. plurispicata* se registró de manera individual. De acuerdo a los datos de altitud obtenidos de los ejemplares de herbario se encontró que *S. elegans*, se distribuye a menores altitudes que *S. fulgens* y *S. plurispicata* ($P < 0.0001$; $F = 14.65$; g. l. = 2; Fig. 3).

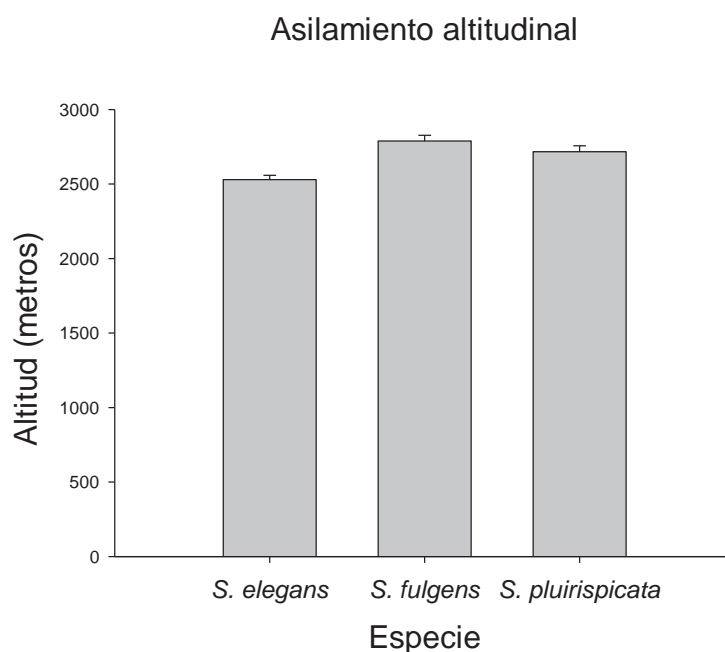


Figura 3. Promedio de distribución altitudinal de las tres especies de acuerdo a los datos obtenidos en los herbarios. Las líneas sobre las barras representan el error estándar.

A continuación se presentan los valores de aislamiento geográfico obtenidos utilizando tres tamaños de cuadrantes en donde se observa lo sensible que es el análisis al tamaño de cuadro. De manera general, al reducir el tamaño del cuadro aumenta el aislamiento reproductivo pues disminuyen las probabilidades de encontrar más de una especie por cuadro (Cuadro 2).

Cuadro 2. Valores de aislamiento geográfico con cuadrantes de 500 m. En donde 1 es igual a aislamiento total.

| Combinación de especies | Cuadrante 500 m |
|--|-----------------|
| <i>S. elegans</i> con <i>S. fulgens</i> | 0.8631 |
| <i>S. elegans</i> con <i>S. plurispicata</i> | 0.9765 |
| <i>S. fulgens</i> con <i>S. elegans</i> | 0.6598 |
| <i>S. fulgens</i> con <i>S. plurispicata</i> | 0.9697 |
| <i>S. plurispicata</i> con <i>S. elegans</i> | 0.8718 |
| <i>S. plurispicata</i> con <i>S. fulgens</i> | 0.9445 |

Con un tamaño de cuadro de 500 m los valores el valor mínimo de aislamiento geográfico es de 0.6598 y el mayor de 0.9765, donde los valores cercanos a 1 significan

AR total. Se encontró que *S. fulgens* fue la especie menos aislada con respecto a *S. elegans* y que *S. elegans* y *S. fulgens* estuvieron más aisladas de *S. plurispicata*.

Aislamiento a nivel microhábitat. La especie que mostró mayor abundancia dentro del área de estudio fue *S. plurispicata*, mientras, *S. fulgens* fue la menos abundante. Las distancias encontradas entre plantas de diferente especie y plantas congéneres no mostraron diferencias significativas (*S. fulgens* P= 0.388, F= 0.97; *S. plurispicata* P= 0.104, F= 2.30; *S. elegans* P= 0.208, F= 1.58), es decir no se encontraron preferencias a nivel de microhábitat dentro del sitio de estudio (Cuadro 3).

Cuadro 3. Densidad de individuos por m² y distancia promedio entre plantas congéneres y heteroespecíficas (cm) durante el periodo 2008-2009.

| Especies | <i>S. elegans</i> | <i>S. fulgens</i> | <i>S. plurispicata</i> |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|------------------------|
| Densidad (m ²) | 0.18 | 0.04 | 0.54 |
| <i>S. elegans</i> (cm) | 141.2±28.91 | 99.28±34.08 | 78.6±13.3 |
| <i>S. fulgens</i> (cm) | | 250.77±125.62 | 85.79±25.28 |
| <i>S. plurispicata</i> (cm) | | | 188.12±50.34 |

Al igual que en el aislamiento geográfico los valores de aislamiento de microhábitat son sensibles al tamaño de cuadro, por lo que se decidió realizar los cálculos de aislamiento a nivel microhábitat con dos tamaño de cuadro. Uno de 20 x 10 m y otro del mismo tamaño pero que fue dividido en cuadros de 1m, que fue considerado un tamaño máximo de traslape de individuos a nivel microhábitat. En el primero se registraron 68 cuadrantes de 1 x 1 m con la presencia de al menos una de las tres especies y 70 en el segundo (Cuadro 4).

Cuadro 4. Número de cuadros con registros conespecíficos y heteroespecíficos de 1 x 1 m en cada cuadrante de 10 x 20 m para las tres especies.

| Especie | Cuadrante 1 | Cuadrante 2 | Valor de AR |
|--|-------------|-------------|-------------|
| <i>S. elegans</i> | 2 | 4 | --- |
| <i>S. fulgens</i> | 34 | 40 | --- |
| <i>S. plurispicata</i> | 14 | 7 | --- |
| <i>S. elegans</i> y <i>S. fulgens</i> | 4 | 1 | 0.546 |
| <i>S. fulgens</i> y <i>S. elegans</i> | | | 0.808 |
| <i>S. elegans</i> y <i>S. plurispicata</i> | 8 | 5 | 0.316 |
| <i>S. plurispicata</i> y <i>S. elegans</i> | | | 0.851 |

| | | | |
|--|----|----|-------|
| <i>S. fulgens</i> y <i>S. plurispicata</i> | 6 | 13 | 0.525 |
| <i>S. plurispicata</i> y <i>S. fulgens</i> | | | 0.796 |
| Total | 68 | 70 | --- |

Con la finalidad de poder aplicar la fórmula de AR a nivel microhábitat, se obtuvo un promedio de los cuadrantes heteroespecíficos y conespecíficos para cada especie (cuadros de 1 x 1 m). Se encontró un aislamiento a nivel microhábitat entre 0.316 y 0.851 (1 es igual a aislamiento total; Cuadro 3). En el caso de los cuadros de tamaño 10 x 20 m los valores de todas las posibles combinaciones de pares de especies dieron como resultado 0, es decir, no existe aislamiento a nivel microhábitat entre estas especies.

Fenología floral. Durante las dos temporadas estudiadas la fenología se comportó de manera distinta. En el periodo de 2008-2009 *S. plurispicata* mostró dos picos de floración, uno en el mes de noviembre y un segundo que coincide con el pico de floración de *S. elegans* en enero, mientras que *S. fulgens* presentó su máxima floración en el mes de diciembre (Fig. 4-A). En esta temporada no se encontraron diferencias significativas entre la floración de las tres especies (*S. elegans* vs *S. plurispicata* $P = 0.872$; *S. elegans* vs *S. fulgens* $P = 0.072$; *S. fulgens* vs *S. plurispicata* $P = 0.685$).

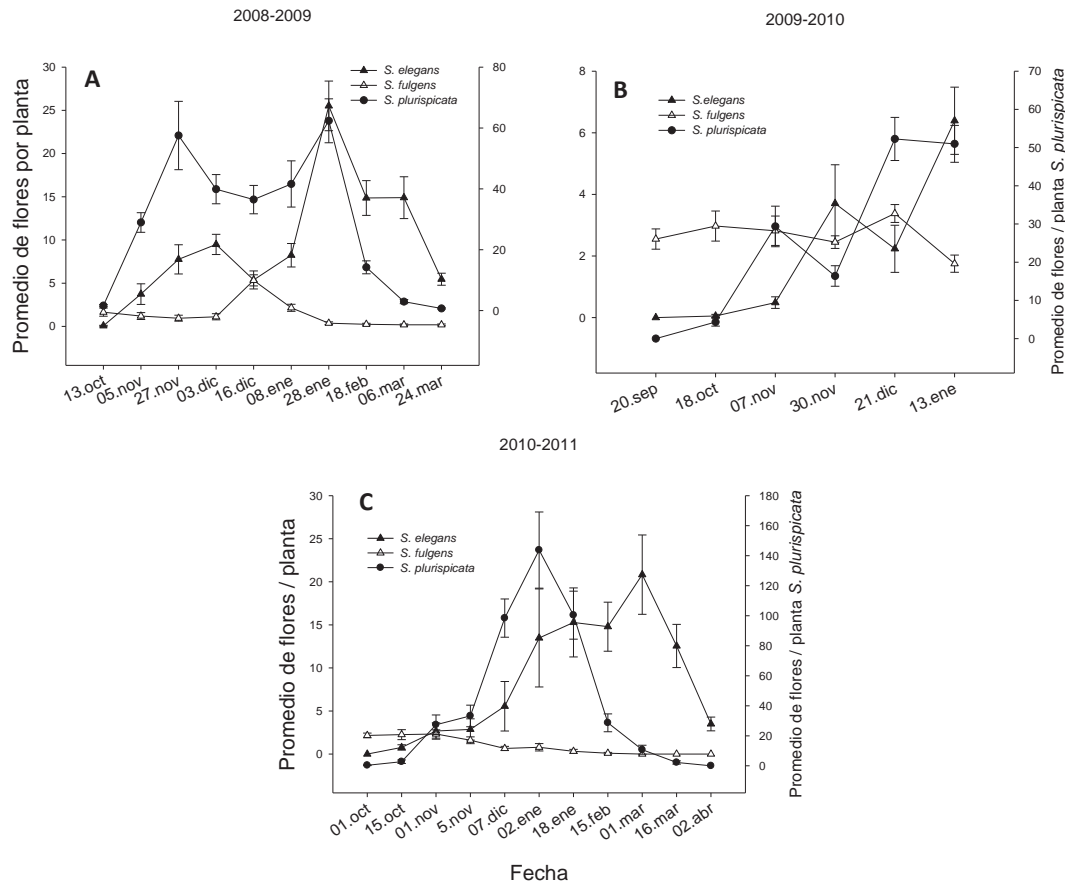


Figura 4. Fenología floral de las tres especies durante la temporada 2008-2009 (A), 2009-2010 (B) Y 2010-2011 (C). El eje “Y” izquierdo representa a *S. elegans* y *S. fulgens* y el derecho corresponde a *S. plurispicata*.

Durante la temporada 2009-2010 se presentó una helada a finales del mes de enero que desafortunadamente interrumpió la floración de las tres especies. Sin embargo, podemos distinguir el pico de floración de *S. fulgens* en el mes de diciembre. Mientras que, *S. elegans* y *S. plurispicata* estaban alcanzando su pico máximo de floración en el mes de enero (Fig. 4-B). De manera similar al año anterior, se encontró, que las tres especies traslapan su periodo de floración (*S. elegans* vs *S. plurispicata* $P = 0.937$; *S. elegans* vs *S. fulgens* $P = 0.318$; *S. fulgens* vs *S. plurispicata* $P = 0.187$).

Los picos de floración de la temporada 2010-2011 mostraron un mayor desfase entre las especies, *S. plurispicata* presentó su máxima floración en enero, *S. elegans* en marzo y para *S. fulgens* no es muy claro, pudiendo haber ocurrido en octubre o en meses anteriores (Fig. 4-C). Durante 2010-2011 solo hubo diferencia entre el periodo de floración de *S. elegans* y *S. fulgens* ($P < 0.0001$), mientras que *S. plurispicata* traslapó

su periodo de floración con las otras dos especies (*S. plurispicata* vs *S. elegans* $P = 0.763$; *S. plurispicata* vs *S. fulgens* $P = 0.231$).

Fidelidad de polinizadores y asilamiento mecánico. En 2008-2009 y 2010-2011 se registraron las mismas especies de visitantes florales. Durante 2008-2009 se encontró un traslape de visitantes florales en las tres especies. El colibrí *Selasphorus platycercus* visitó a las tres especies aunque con una tasa de vista diferente en cada una. *Eugenes fulges* visitó a *S. fulgens* y *S. elegans* no obstante el número de visitas en *S. elegans* fue mucho menor que en *S. fulgens*. La abeja *Apis mellifera* visitó a *S. elegans* y *S. plurispicata* sin embargo, el papel que desempeña durante la visita a *S. elegans* es incierta hasta el momento ya que, al momento de colectar el polen de las anteras la abeja en ocasiones toca el estigma pero es difícil identificar si deposita polen en él (Fig. 5-A). Utilizando la formula correspondiente se obtuvieron los valores de AR correspondientes a fidelidad de polinizadores, donde 1 corresponde a aislamiento total (Cuadro 4).

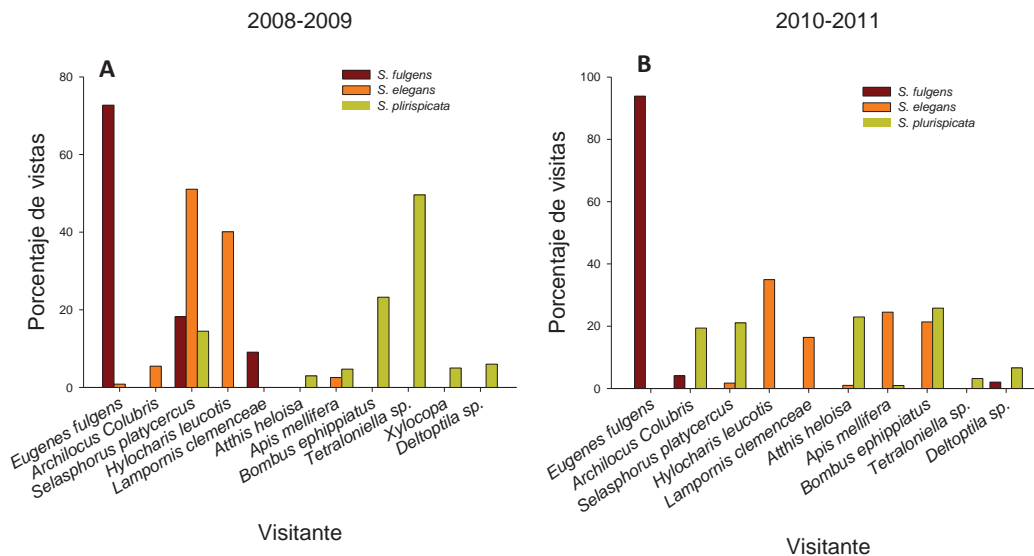


Figura 5. Porcentaje de visitas para cada especie durante la temporada 2008-2009 (A) y 2010-2011 (B).

Durante el 2010-2011 también se encontró traslape de visitantes. *Selasphorus platycercus* solo se registró visitando a *S. elegans* y a *S. plurispicata*. Sin embargo, la tasa de vistas para esta última fue menor que para *S. elegans*. El colibrí *Archilocus colubris* visitó a *S. fulgens* y a *S. plurispicata*. También el colibrí *Atthis heloisa* visitó a *S. plurispicata* y a *S. elegans*, esta última con menor número de vistas. Se observó al abejorro *Bombus ephippiatus* y a la abeja *Apis mellifera* visitando a *S. elegans* y a *S.*

plurispicata sin embargo, ambos fueron hurtadores de polen para *S. elegans* y posiblemente polinizadores efectivos para *S. plurispicata*. Algo similar sucede con la abeja *Deltoptila sp.* la cual visitó en ocasiones a *S. fulgens* y *S. plurispicata*, actuando posiblemente como polinizador solo en *S. plurispicata* (Fig. 5-B). Este tipo de conducta disminuye las posibilidades de transporte efectivo de polen entre estos pares de especies.

En el caso de los colibríes, de acuerdo a lo observado durante la simulación de las visitas con ayuda de los ejemplares de la colección ornitológica, el sitio de colocación de polen de cada una de las especies es diferente y en *S. plurispicata* debido a su menor tamaño, el polen es depositado en el pico en comparación con *S. fulgens* y *S. elegans*. En el caso de *S. fulgens* y *S. elegans* los únicos visitantes que compartieron fueron *Selasphorus platycercus* y *Eugenes fulgens*, aquí el aislamiento mecánico es nulo para ambos colibríes, aunque por la baja cantidad de visitas que realizó *Eugenes fulgens* a *S. elegans* el movimiento de polen interespecífico es poco probable por esta vía. Por lo tanto, *Selasphorus platycercus* es probablemente la única vía de transporte de polen interespecífico entre *S. elegans* y *S. fulgens*. Los valores de AR por fidelidad de polinizadores para la temporada 2010-2011 se presentan en el cuadro 5.

Cuadro 5. Valores de AR correspondientes a fidelidad de polinizadores para las dos temporadas de estudio.

| Especies | Valor de AR para 2008-2009 | Valor de AR para 2010-2011 |
|--|----------------------------|----------------------------|
| <i>S. fulgens</i> y <i>S. elegans</i> | 0.091 | 1 |
| <i>S. fulgens</i> y <i>S. plurispicata</i> | 0.818 | 0.939 |
| <i>S. elegans</i> y <i>S. fulgens</i> | 0.481 | 1 |
| <i>S. elegans</i> y <i>S. plurispicata</i> | 0.464 | 0.514 |
| <i>S. plurispicata</i> y <i>S. fulgens</i> | 0.855 | 0.74 |
| <i>S. plurispicata</i> y <i>S. elegans</i> | 0.808 | 0.292 |

Al relacionar la fenología floral con el comportamiento de forrajeo de los visitantes florales en las tres especies, durante los picos floración de cada especie, pudimos observar que las visitas de los visitantes florales dependen de la abundancia de flores en cada especie, es decir, independientemente del tipo de síndrome de polinización que presenten las flores, tanto colibríes como abejas visitan a la especie que en el momento, presente más flores abiertas de donde puedan extraer néctar o polen (Figs. 6 y 7).

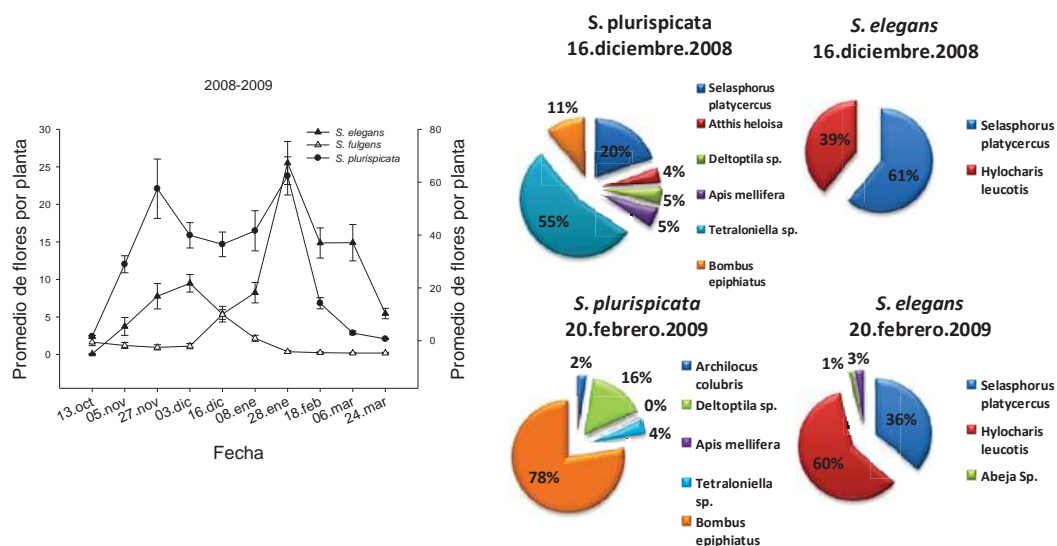


Figura 6. Elección de los visitantes florales de acuerdo a la disponibilidad de flores. En la gráfica de fenología el eje Y derecho corresponde a la producción de flores de *S. plurispicata* y el Y izquierdo corresponde a la producción de flores de *S. elegans* y *S. fulgens*. La fecha 16 de diciembre de 2008 presenta mayor disponibilidad de flores de *S. plurispicata* (40 flores por planta) y pocas flores disponibles de *S. elegans* (5 flores por planta). Para el 20 de febrero la cantidad de flores por planta es aproximadamente la misma para ambas especies (15 flores por planta).

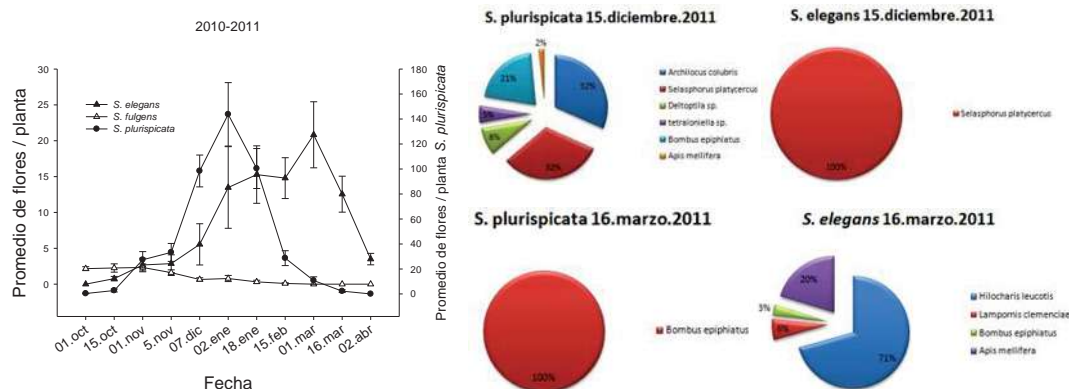


Figura 7. Elección de los visitantes florales de acuerdo con la disponibilidad de flores. En la gráfica de fenología el eje Y derecho corresponde a la producción de flores de *S. plurispicata* y el Y izquierdo corresponde a la producción de flores de *S. elegans* y *S. fulgens*. La fecha 15 de diciembre de 2010 presenta mayor disponibilidad de flores en *S. plurispicata* (120 flores por planta) y pocas flores de *S. elegans* (10 flores por planta). Para el 16 de marzo la cantidad de flores por planta para *S. plurispicata* es menor (5 flores por planta) que la de *S. elegans* (15 flores por planta).

En *S. plurispicata* es probable que los colibríes actúen como hurtadores de néctar, ya que estos no presentan la morfología adecuada para la colocación y transporte de polen exitoso. Su tasa de visitas fue menor significativamente comparada con la de

los abejorros y abejas (Fig.8). El forrajeo de polen por parte de las abejas se presentó solamente en *S. elegans*, ya que tiene expuestas las anteras a diferencia de *S. plurispicata* y *S. fulgens*. Este comportamiento en *S. elegans* se presenta con mayor incidencia en el periodo en el que *S. plurispicata* está terminando su floración y *S. elegans* empieza a descender del pico de floración.

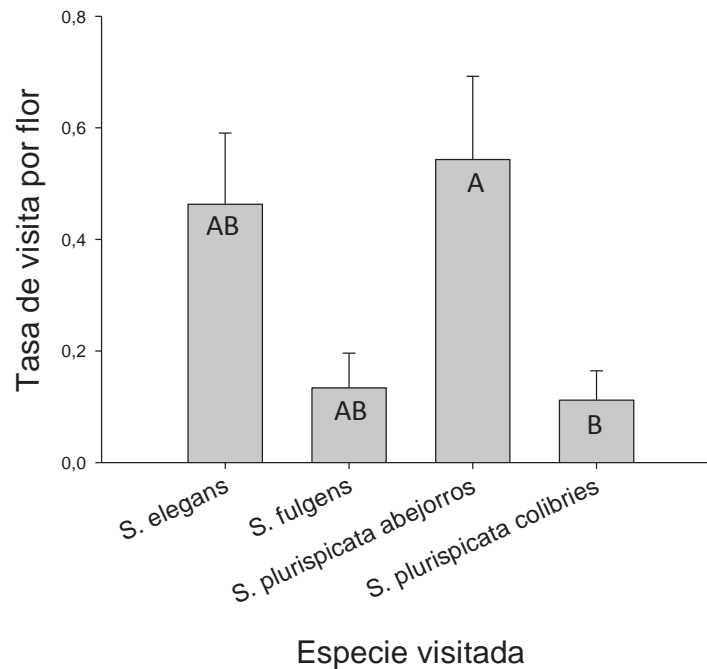


Figura 8. Tasa de visita flor/hr en las tres especies con datos de las dos temporadas (2008-2009 y 2010-2011). Para *S. plurispicata* se tomaron en cuenta las visitas de colibríes ya que presentan parte importante del porcentaje del total de las visitas.

Barreras postcigóticas.

Producción de frutos y semillas en cruza intra e interespecíficas.

Se obtuvieron datos de la producción de frutos y semillas para cada tratamiento durante las dos temporadas. Se decidió agrupar los datos de las cruza de ambos años que no difirieron, para *S. fulgens* se encontraron los siguientes valores: controles $P = 0.6233$; entrecruzas $P = 0.3269$; con *S. plurispicata* $P = 0.0666$ y con *S. elegans* $P = 0.4882$. Para *S. elegans* solo los controles presentaron diferencias entre años (controles $P = 0.0021$; entrecruzas $P = 0.2246$; *S. plurispicata* $P = 0.6553$; *S. fulgens* $P = 0.6657$). Para *S. plurispicata* los tratamientos interespecíficos tuvieron diferencias significativas entre temporadas por lo cual no pudieron ser agrupados (tratamiento con *S. elegans* $P =$

0.025; tratamiento con *S. fulgens* $P = 0.0081$; control $P = 0.3685$, entrecruzas $P = 0.1481$).

***S. fulgens* como receptora de polen.** De manera general, el número de frutos obtenidos difieren significativamente entre tratamientos ($P = 0.0010$, $F = 5.77$, g. l. = 3). Los controles produjeron significativamente más frutos (0.69 ± 0.16) que los tratamientos interespecíficos (0.03 ± 0.03 , *S. elegans*; 0.15 ± 0.07 , *S. plurispicata*) (control con *S. elegans* $P = 0.001$ y control con *S. plurispicata* $P = 0.0341$) y no muestran diferencia con los frutos producidos en el tratamiento de entrecruza (0.36 ± 0.12) (controles con entrecruza $P = 0.6982$). Mientras que, las entrecruzas no produjeron significativamente más frutos que las cruas interespecíficas (entrecruzas con *S. elegans* $P = 0.1511$ y entrecruzas con *S. plurispicata* $P = 0.5453$) (Fig. 9-A).

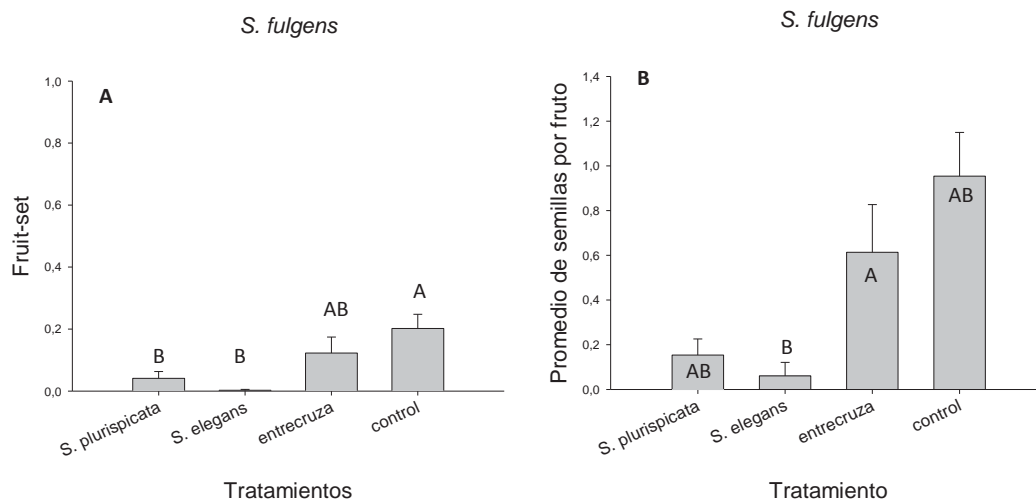


Figura 9. Porcentaje de frutos (A) y promedio de semillas por fruto (B) producidos en cada tratamiento de *S. fulgens*. Los tratamientos llamados *S. plurispicata* y *S. elegans* significan que esa es la especie que donó polen para *S. fulgens*.

El número de semillas producidas por fruto también fue significativamente diferente entre tratamientos ($P = 0.003$, $F = 6.01$, g. l. = 3). Se observó una mayor producción de semillas en frutos control con respecto al tratamiento interespecífico cuando *S. plurispicata* fue donadora de polen ($P = 0.0025$), mientras que, las entrecruzas y el tratamiento interespecífico con *S. elegans* no mostraron diferencias significativas con respecto a los controles (controles con entrecruzas $P = 0.1349$, controles con *S. elegans* $P = 0.811$) (Fig. 9-B).

Las semillas producidas por los tratamientos interespecíficos presentaron menor peso con respecto a los controles y entrecruzas ($P = 0.0001$, $F = 17.45$, g. l. = 3) (controles con *S. elegans* $P = 0.0011$, control con *S. plurispicata* $P < 0.0001$, entrecruzas con *S. elegans* $P = 0.0018$ y entrecruzas con *S. plurispicata* $P < 0.0001$). Los tratamientos interespecíficos no mostraron diferencias significativas entre ellos al igual que las entrecruzas y el tratamiento control (*S. plurispicata* con *S. elegans* $P = 0.9978$ y control con entrecruza $P = 0.9967$) (Fig. 10-A). La disminución en el peso de las semillas se vio reflejado en la nula germinación de las semillas de los tratamientos interespecíficos en comparación con los controles y entrecruzas (Fig. 10-B). Por su parte, el tratamiento control y el de entrecruza no mostraron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de germinación ($P = 0.0851$, $X^2 = 6.618$, g. l. = 1). Los valores de AR obtenidos a partir de las formulas correspondientes se muestran en el cuadro 6.

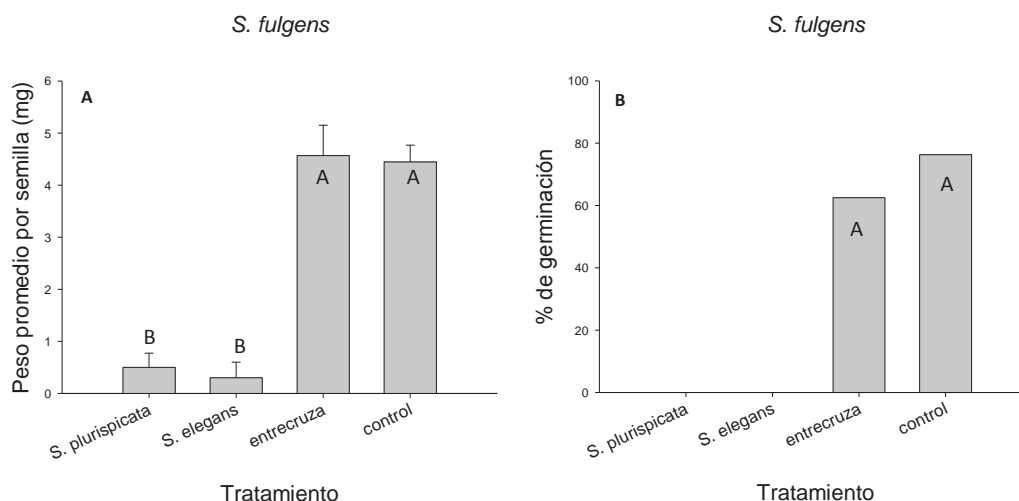


Figura 10. Peso (mg) promedio por semilla (A) y porcentaje de germinación (B) de cada tratamiento realizado en *S. fulgens*. Las letras junto a cada media indican significancia, letras iguales indican que no hay diferencia, mientras que letras diferentes indican diferencia significativa.

***S. elegans* como especie receptora de polen.** Hubo diferencia significativa entre tratamientos con respecto al número de frutos producidos ($P < 0.0001$, $F = 23.2356$, g. l. = 4). El número promedio de frutos producidos por los controles en la temporada 2008-2009 fue significativamente más alto que el resto de los tratamientos, incluso mayor que los controles 2010-2011 (Fig. 11-A).

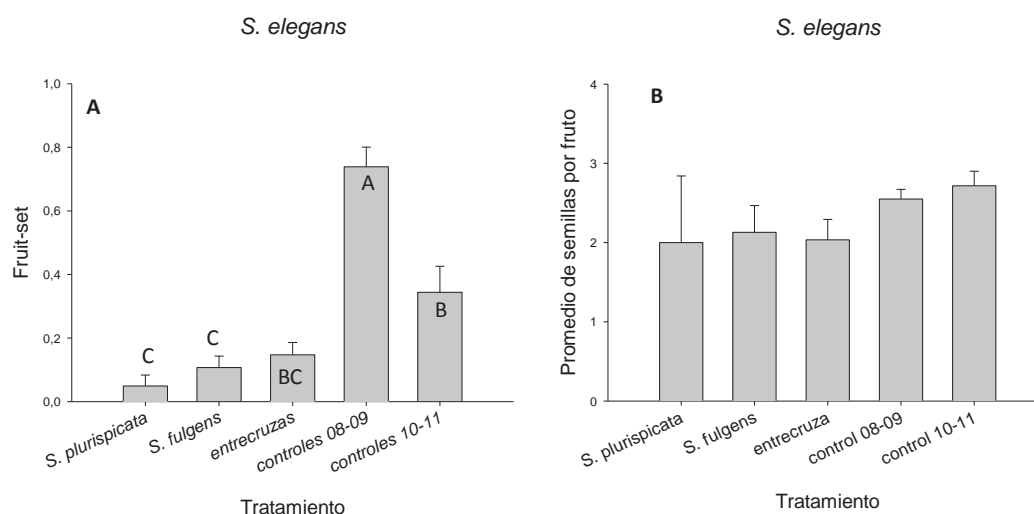


Figura 11. Producción de frutos (A) y promedio de semillas por fruto (B) producidos en cada tratamiento para *S. elegans*. Los tratamientos llamados *S. plurispicata* y *S. fulgens* significan que esa es la especie que donó polen para *S. elegans*. Los números en el tratamiento control hacen referencia a la temporada 2008-2009 y 2010-2011. Las letras junto a cada media indican significancia, letras iguales indican que no hay diferencia, mientras que letras diferentes indican diferencia significativa. La letra A muestra valores de $P < 0.0001$, la letra B muestra valores de $P = 0.001$.

En el caso de la producción de semillas por fruto, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P = 0.268$, $F = 1.3486$, g. l. = 4) (Fig. 11-B).

El peso promedio de las semillas de los tratamientos realizados en *S. elegans* no mostraron diferencias ($P = 0.1889$, $F = 1.6148$, g. l. = 4) (Fig. 12-A). Mientras que el porcentaje de germinación difirió significativamente entre tratamientos ($P < 0.01$, $X^2 = 11.74$, g.l. = 4). Cabe mencionar que las cruza realizadas en la temporada 2010-2011 tuvieron significativamente mayor éxito de germinación que las entrecruzas de 2008-2009. Las semillas producidas cuando *S. plurispicata* fue donadora de polen tuvieron un menor porcentaje de germinación en comparación con el tratamiento de entrecruza de 2010-2011, con las semillas producidas con polen de *S. fulgens* y con el tratamiento control (Fig.12-B). Los valores de AR obtenidos a partir de las formulas correspondientes se muestran en el cuadro 6.

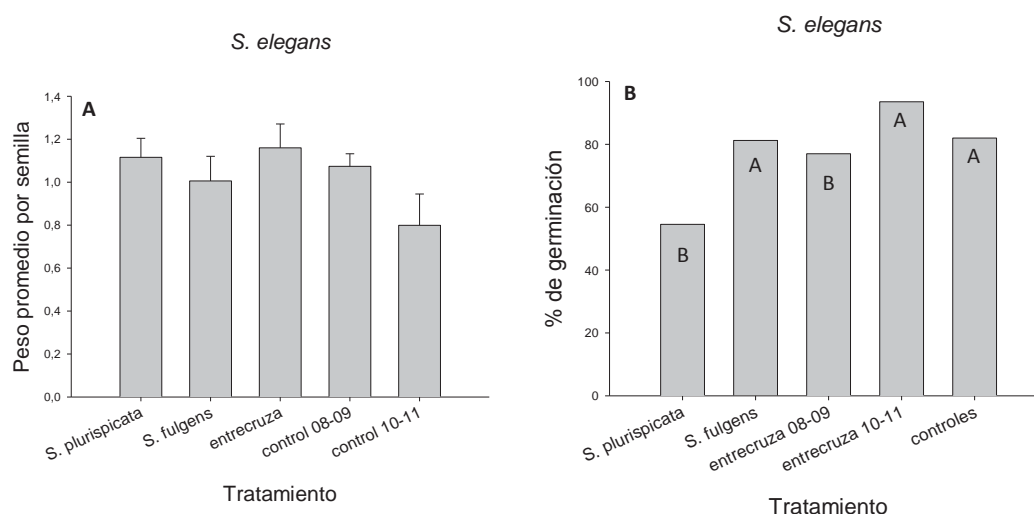


Figura 12. Peso promedio por semilla (A) y porcentaje de germinación (B) de cada tratamiento realizado en *S. elegans*. Los números en el tratamiento control hacen referencia a la temporada 2008-2009 y 2010-2011.

***S. plurispicata* como especie receptora de polen.** Al comparar la producción de frutos entre tratamientos se encontraron diferencias significativas ($P < 0.0001$, $F = 16.446$, g. l. = 5). Los controles produjeron significativamente más frutos ($P < 0.0001$ en todos los casos). El tratamiento de entrecruza produjo más frutos que los tratamientos interespecíficos de la temporada 2010-2011 ($P = 0.0173$ en ambos casos). No se encontraron diferencias en la producción de frutos entre los tratamientos interespecíficos de un mismo año ni entre temporadas (Fig. 13-A). Con respecto a la cantidad de semillas por fruto no hubo diferencias significativas entre los tratamientos ($P = 0.8493$, $F = 0.2664$, g. l. = 3; Fig. 13-B).

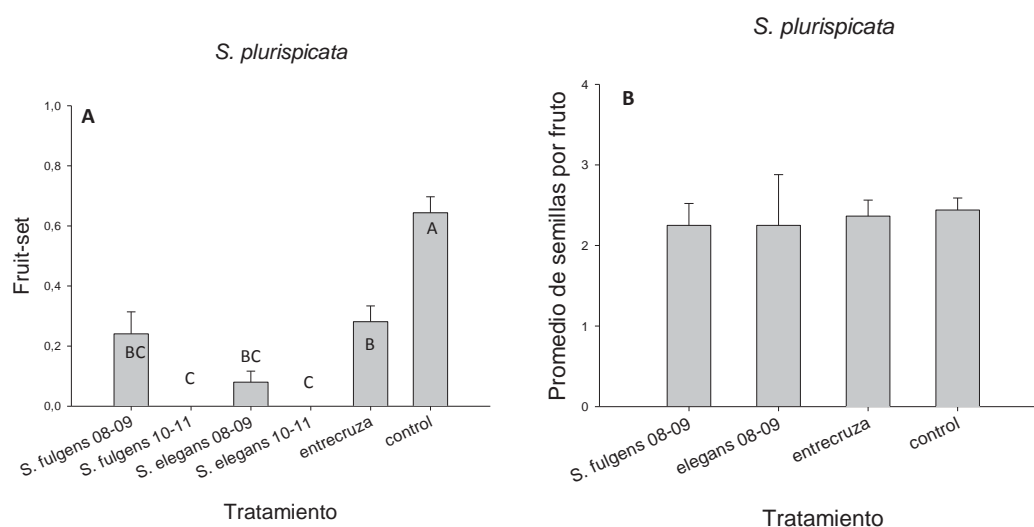


Figura 13. Producción de frutos (A) y promedio de semillas por fruto (B) producidos en cada tratamiento para *S. plurispicata*. Los tratamientos llamados *S. fulgens* y *S. plurispicata* significan que esa es la especie que donó polen para *S. elegans*. Los números en los tratamientos hacen referencia a la temporada 2008-2009 y 2010-2011.

El peso de las semillas entre tratamiento de *S. plurispicata*, no difiere significativamente ($P = 0.1347$, $F = 1.939$, g.l. = 3) (Fig. 14-A). Sin embargo, la germinación de las semillas producidas con polen de *S. fulgens* mostraron un menor porcentaje de germinación en comparación con los demás tratamientos ($P < 0.01$, $X^2 = 13.602$, g. l. = 3) (Fig. 14-B). Los valores de AR obtenidos a partir de las formulas correspondientes se muestran en el cuadro 6.

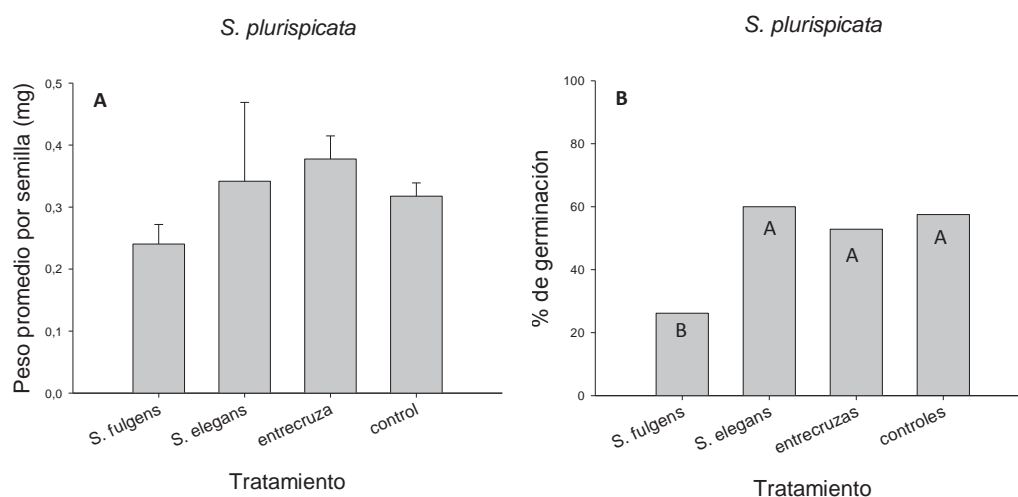


Figura 14. Peso promedio por semilla (A) y porcentaje de germinación (B) de cada tratamiento realizado en *S. plurispicata*. Los tratamientos interespecíficos corresponden a la temporada 2008-2009.

Cuadro 6. Valores de AR obtenidos a partir de la aplicación de las formulas correspondientes. Los valores negativos indican que las cruas interespecíficas tuvieron mayor éxito en comparación con las control.

| Combinación de especies | Valor de AR | | | |
|--|----------------------|--------------------|------------------|-------------|
| | Producción de frutos | Semillas por fruto | Peso de semillas | germinación |
| <i>S. elegans</i> con <i>S. fulgens</i> | 0.7524 | 0.177 | - 0.258 | - 0.0125 |
| <i>S. elegans</i> con <i>S. plurispicata</i> | 0.91 | 0.022 | - 0.396 | 0.325 |
| <i>S. fulgens</i> con <i>S. elegans</i> | 0.956 | 0.259 | 0.932 | 1 |
| <i>S. fulgens</i> con <i>S. plurispicata</i> | 0.62 | 0.63 | 0.887 | 1 |
| <i>S. plurispicata</i> con <i>S. elegans</i> | 0.942 | 0.539 | - 0.0762 | 0.0434 |
| <i>S. plurispicata</i> con <i>S. fulgens</i> | 0.812 | 0.539 | 0.2428 | 0.544 |

Aislamiento total:

El valor de AR total de acuerdo a la formula 5 (Cuadro 7), incluyendo o no el AR geográfico (Cuadro 7), no se ve modificado para *S. fulgens* (Figs. 15 y 16). Mientras que para *S. elegans* si se elimina el AR geográfico se muestra una disminución del valor (Figs. 17 y 18). Para *S. plurispicata* se encontró algo similar no obstante la disminución es más ligera (Figs. 19 y 20).

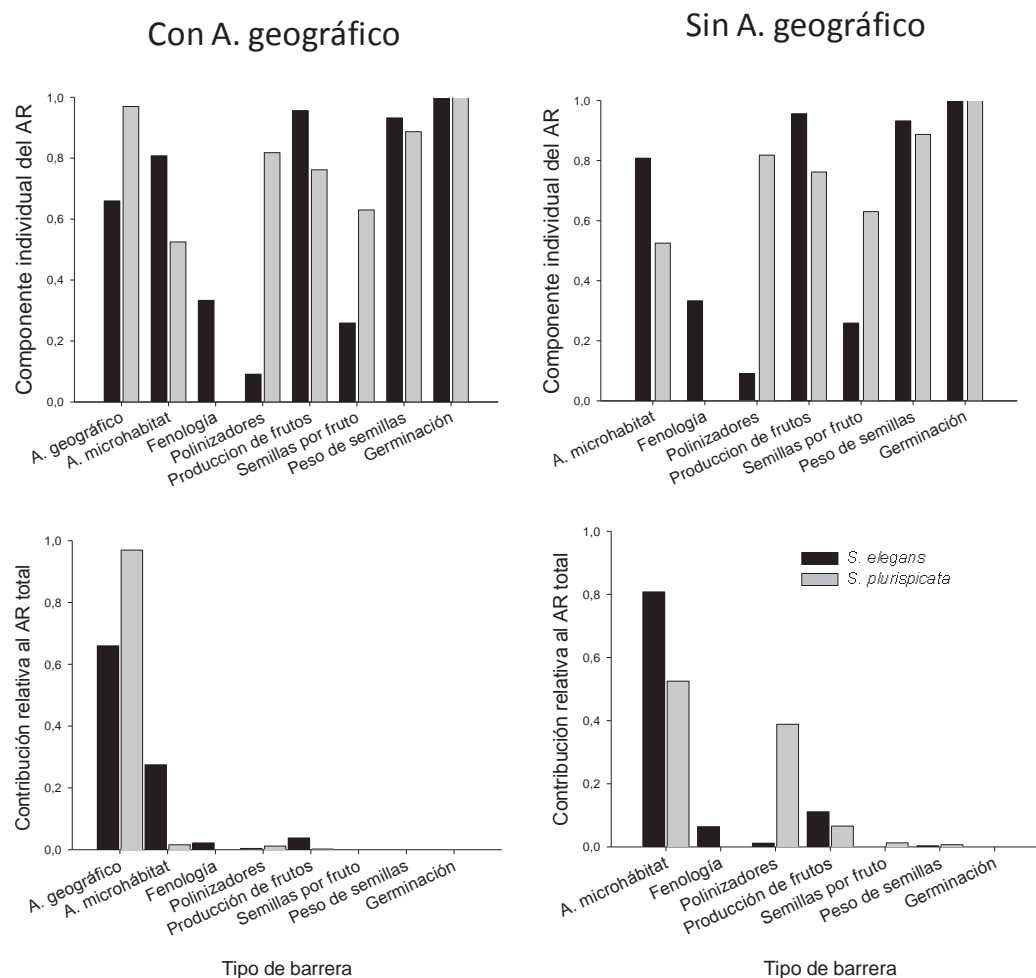


Figura 15. Contribución individual y relativa de cada barrera reproductiva en el aislamiento total en simpatria con y sin aislamiento geográfico para *S. fulgens*.



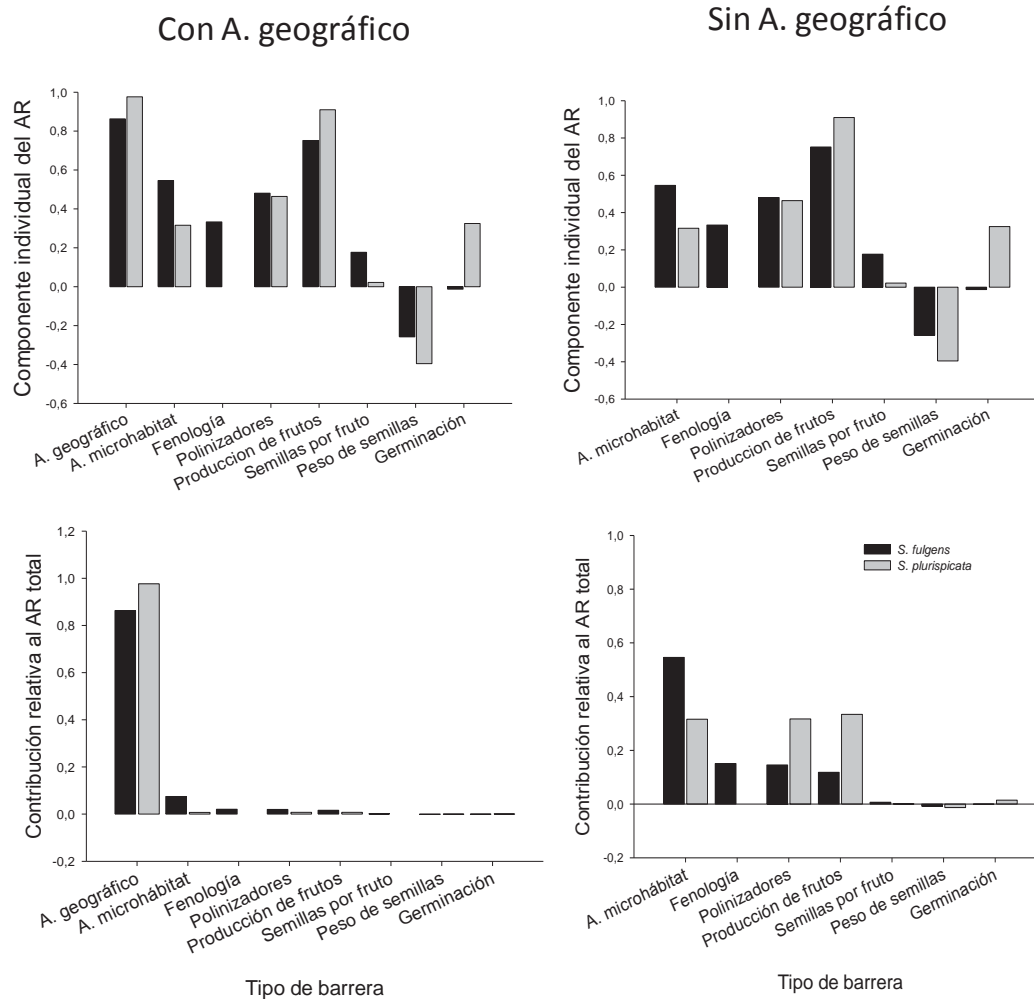


Figura 17. Contribución individual y relativa de cada barrera al aislamiento total en simpatria con y sin aislamiento geográfico para *S. elegans*.



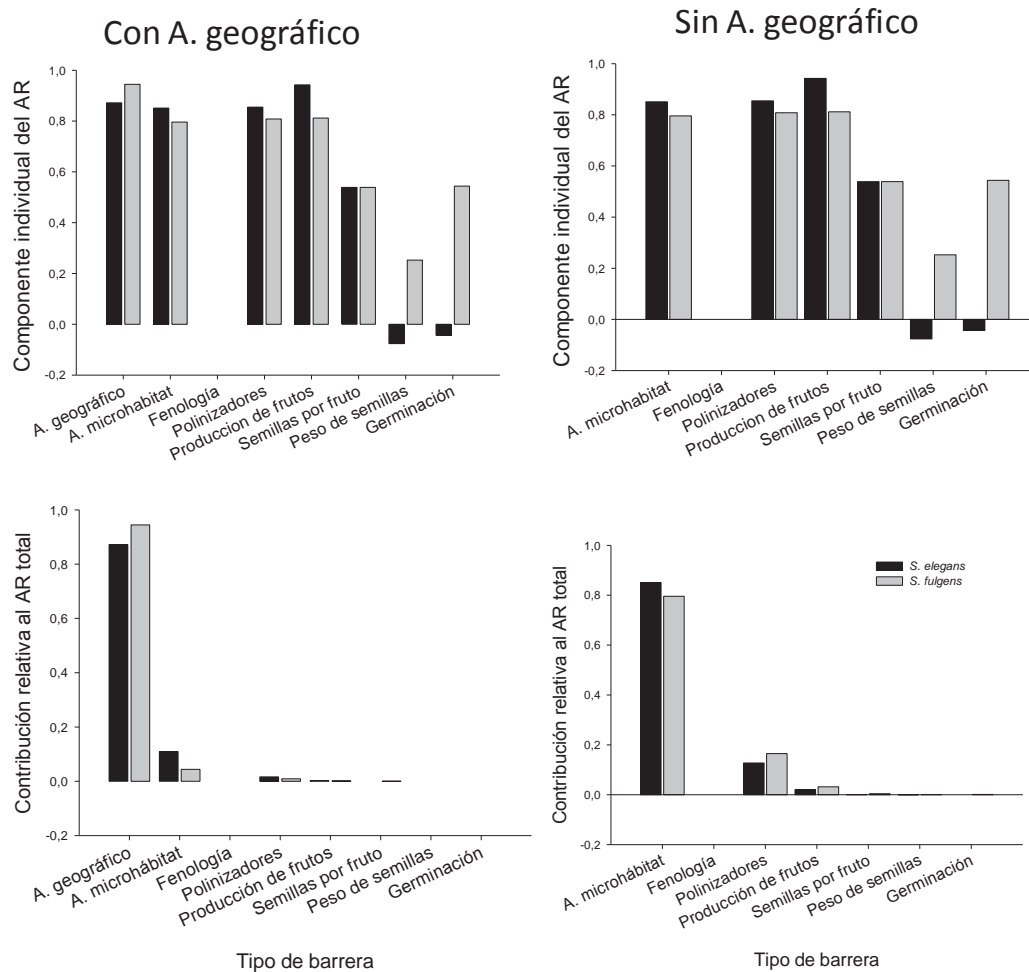
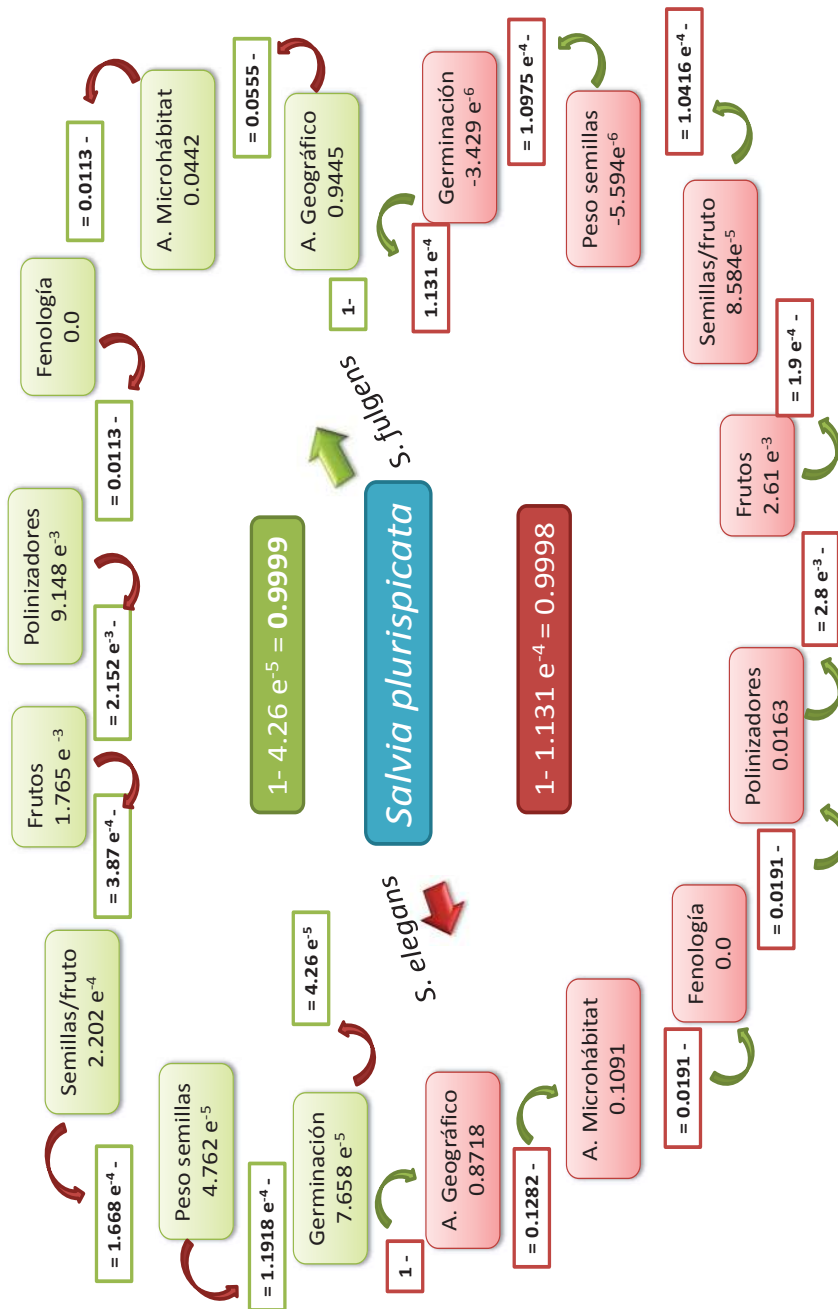


Figura 19. Contribución individual y relativa de cada barrera al aislamiento total en simpatría con y sin aislamiento geográfico para *S. plurispicata*.



Cuadro 7. Aislamiento reproductivo total con y sin el valor del Aislamiento geográfico para cada especie con respecto a las dos restantes. Valor de 1 es igual a aislamiento reproductivo completo.

| Esp. Donadora Esp. receptora | CON AISLAMIENTO GEOGRÁFICO | | | SIN AISLAMIENTO GEOGRÁFICO | | |
|---------------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------|
| | <i>S. fulgens</i> | <i>S. elegans</i> | <i>S. plurispicata</i> | <i>S. fulgens</i> | <i>S. elegans</i> | <i>S. plurispicata</i> |
| <i>S. fulgens</i> | | 1 | 1 | | 1 | 1 |
| <i>S. elegans</i> | 0.9943 | | 0.9992 | 0.9591 | | 0.9695 |
| <i>S. plurispicata</i> | 0.9999 | 0.9998 | | 0.9988 | 0.9989 | |

Cruzas con híbridos putativos

Cuando las flores de los híbridos putativos recibieron polen de *S. fulgens* y *S. elegans* solo se produjeron 3 frutos y 4 semillas, únicamente cuando *S. fulgens* actuó como donadora de polen (fruit-set de 0.428. Por otro lado, las cruzas con polen de plantas híbridas en *S. fulgens* solo produjeron un fruto con una semilla (fruit-set de 0.083).

DISCUSIÓN

Aislamiento precigótico.

Los rangos geográficos son el producto de factores ecológicos e históricos que delimitan la distribución de las especies (Schemske 2000; Angert y Schemske 2005; Thorpe *et al.* 2008) y en el caso particular de especies cercanamente emparentadas estos factores son la primer barrera que disminuye el contacto entre éstas. Desafortunadamente, no existe una filogenia para las tres especies de *Salvia* aquí estudiadas que dé a conocer la cercanía entre ellas, solo se sabe que pertenecen al mismo subgénero.

La mayoría de los estudios que han analizado la fuerza con la que actúan las barreras, tanto precigóticas como postcigóticas, no se dieron a la tarea de incluir el aislamiento geográfico. Lowry y colaboradores (2008) realizaron un metanálisis en el cual examinaron 19 trabajos de aislamiento reproductivo dentro de los cuales solamente Ramsey y colaboradores (2003) y Kay (2006) evaluaban el papel que juega el aislamiento geográfico entre pares de especies. Lowry *et al.* (2008) menciona que lo tedioso de analizar y procesar muestras de herbarios es una de las causas por las que los investigadores dejan a un lado esta tarea. Sin embargo, esta barrera juega un papel relevante al momento de la diferenciación ecológica, sobre todo entre pares de especies que potencialmente pueden generar nuevas especies (Mayr 1942; Sobel *et al.* 2009). De acuerdo a la secuencia en la que actúan las barreras, el aislamiento geográfico es la barrera que en primera instancia aumenta o disminuye la posibilidad de flujo génico entre poblaciones (Schemske 2000, Ramsey *et al.* 2003, Coyne y Orr 2004). De acuerdo al nivel de aislamiento geográfico aquí analizado (500 m) se encontró que, la contribución al AR total por parte de aislamiento geográfico es alta para la mayoría de las combinaciones de pares de especies. *S. fulgens* presento el valor más bajo de aislamiento geográfico con respecto a *S. elegans*, es decir, están menos aisladas geográficamente. Sin embargo, la posibilidad de coexistir se ve disminuida ya que se encontró que *S. elegans* prefiere altitudes significativamente menores.

Es probable que las poblaciones simpátricas de las especies aquí estudiadas, sean el producto de un contacto secundario, sin embargo, se requiere de otros estudios para tener mayor certeza.

A nivel de microhábitat, utilizando los cuadros de 10 x 20 m se encontró que no hay aislamiento a este nivel.

Como se mencionó anteriormente, *S. fulgens* fue la especie menos abundante y solo se localizó en pequeños parches, sobre todo en la parte superior del sitio de estudio, mientras que *S. plurispicata* y *S. elegans* se encuentran dispersas en toda el área sin preferencias altitudinales. Aun usando la escala mínima de cuadrante (1 x 1m) las tres especies se traslapan a nivel de microhábitat, lo que aumenta las posibilidades de que un polinizador visite en un mismo vuelo a las tres especies, sobre todo si hablamos de colibríes que presentan un comportamiento territorial en donde, al defender un parche que integra a más de una de las especies de estudio, visita en algunas ocasiones, a las dos e incluso a las tres especies en un mismo vuelo (J. Espino, obs. pers). Esta situación aumenta las posibilidades de depósito de polen interespecífico debido a que en la mayoría de los casos existen periodos en los que se traslapa la floración de las tres especies.

La especie que más desfasó su floración fue *S. fulgens*, ya que ésta comenzó su floración semanas antes que las otras dos. Grant y Grant (1964) observaron un comportamiento similar en *Salvia apiana* y *S. melliera*, estas dos especies se encuentran en simpatria en un área considerable de su distribución natural, donde además se han encontrado híbridos entre estas especies. Aunque para *Salvia apiana* y *S. mellifera* el traslape de su fenología floral se da solo en una semana, que corresponde al periodo en donde *S. mellifera* termina su floración y *S. apiana* la inicia, este traslape es menor que el presentado por *S. fulgens* y *S. elegans*. Este comportamiento es predecible en especies con mayores posibilidades de hibridación (Grant y Grant 1964). En el caso particular de *S. elegans* y *S. fulgens* las cuales comparten visitantes florales (*Selasphorus platycercus* y *Eugenes fulgens*) y son similares en largo de la corola y color, se esperaría un patrón de desfase del periodo de floración entre estas dos especies.

De manera general se ha propuesto que los polinizadores son una parte fundamental del aislamiento reproductivo (Kay 2006; Schiestl y Schluter. 2009; Xu *et al.* 2011). Se ha sugerido que comunidades de polinizadores y flores particulares exhiben patrones en morfología y fenología que limitan un comportamiento generalizado afianzando relaciones mutualistas entre plantas y polinizadores (Memmott *et al.* 2007; Gutiérrez-Zamora 2008). De manera que, el comportamiento de los polinizadores debería ser limitado por la morfología y fenología creando patrones bien delimitados (Gutiérrez-Zamora 2008). En lo referente a la morfología, los síndromes de polinización se han usado como una manera de agrupar morfologías similares que entre otras finalidades está la de tratar de predecir cuál es el polinizador de una especie dada, analizando las

características morfológicas cualitativas y cuantitativas de esta (Fenster *et al.* 2004, Ollerton *et al.* 2009).

Un porcentaje considerable de las visitas florales de las tres especies (30.55%) no correspondieron al síndrome de polinización que presenta la especie visitada. Es relevante mencionar que el porcentaje de visitas que no concuerdan con el síndrome en *S. plurispicata* (principalmente visitas de *Selasphorus platycercus*) fueron realizadas al inicio de la temporada de floración de *S. elegans*, cuando esta especie presentaba pocas flores. Al observar las visitas de los abejorros a *S. plurispicata* (filmaciones y obs. personales) se puede apreciar el ensamblaje morfológicamente preciso entre ellos, además la tasa visita de los colibríes es menor que la de los abejorros para *S. plurispicata* lo cual revela que el síndrome está funcionando como atrayente de abejorros que son los que aseguran el éxito reproductivo de esta especie y que las visitas que no corresponden al síndrome de polinización son una consecuencia de la baja disponibilidad de alimento en el área.

Dados los altos requerimientos energéticos de los colibríes (Chittka y Thomson, 2001; Gutierrez *et al.* 2004) es posible que estos no obtengan suficiente alimento de las plantas que presentan un síndrome que corresponde a colibríes y por lo tanto requieran visitar a *S. plurispicata* a pesar de que esta posee menos cantidad de néctar, lo cual es compensado con la cantidad de flores que visitan. En el caso de *S. elegans*, este comportamiento de no concordancia con el síndrome floral se presenta al final de la temporada de floración de *S. plurispicata*, lo que disminuye la disponibilidad de alimento para los abejorros y abejas, por lo cual posiblemente roban polen de *S. elegans* que aun presenta flores. Esto es posible ya que *Bombus ephippiatus* consume tanto polen como néctar de las flores. Esta especie utiliza el polen de *S. elegans* y se alimenta del néctar de *S. plurispicata*.

Memmontt y colaboradores (2007) demostraron mediante el análisis de una red de interacciones con 1420 polinizadores y 429 especies de plantas que por causa del calentamiento global la fenología floral se ha desviado del periodo normal provocando la disminución de alimento disponible para los polinizadores entre 17 y 50%. Esta posibilidad, aunada a la tala del sitio de muestreo que está provocando la desaparición de refugio para las especies polinizadoras, probablemente estén afectando los patrones de forrajeo de las especies que visitan a las especies de estudio.

Dado que varias especies de visitantes flores forrajean en dos o tres de las especies de *Salvia*, se considera que el comportamiento de los colibríes genera una barrera de AR

débil que, aunado a la corta distancia a la que se encuentran plantas de las tres especies y comparándola con las distancias a las que puede viajar un polinizador (400 m para *Selasphorus platycercus*, según Schulke y Waser 2001), incrementa la posibilidad de flujo de polen interespecífico.

Sin embargo, este flujo de polen provocado por una barrera débil es compensado por la siguiente barrera secuencial, el aislamiento mecánico o floral. En donde la morfología floral y el tamaño floral dificultan el transporte y el depósito de polen interespecífico en estigmas receptivos (Grant 1994; Schiestl y Schluter 2009; Xu *et al.* 2011). Al igual que para *Costus pulverulentus* y *C. scaber* esta barrera es una de las más importantes para aislar a las especies reduciendo la posibilidad de que polen interespecífico haga contacto con el estigma (Kay 2006). En este caso el aislamiento floral es mayor en *S. plurispicata* con respecto a las otras dos especies ya que, el tamaño de su corola es mucho menor. De esta manera, el sitio de colocación del polen de *S. plurispicata* en el cuerpo del polinizador es muy diferente. De los colibríes que visitan a *S. plurispicata* probablemente solo *Atthis heloisa* funcione como colibrí polinizador en esta especie, ya que es el único caso en el cual las plumas de su cabeza hacen un leve contacto con el polen. En el caso de los abejorros y abejas el aislamiento mecánico es fuerte entre *S. plurispicata* y *S. elegans*. El polen de *S. plurispicata* es depositado en la parte dorsal, mientras que, en *S. elegans*, *Apis mellifera* y *Bombus ephippiatus* actúan como robadores de polen, por lo tanto, el contacto con el polen se realiza en la parte ventral de cualquiera de los dos visitantes. Lo que disminuye la posibilidad de transporte de polen.

Aislamiento postcigótico

Los estudios del aislamiento postcigótico por lo general se basan en dos categorías, el aislamiento intrínseco y extrínseco. El aislamiento intrínseco se refiere a problemas de desarrollo que no tienen que ver con el ambiente, mientras que el extrínseco se refiere a variación de la viabilidad y fertilidad de los híbridos con respecto al ambiente en el que ellos se desarrollan (Turelli *et al.* 2001; Rieseberg y Blackman 2010). Estos problemas pueden ser debidos a poliploidias, incompatibilidades genéticas o a los reacomodos cromosomales que resultan por la combinación de una parte materna con un acomodo cromosomal diferente al de la parte paterna (Wu 2001b; Servedio y Noor 2003; Rieseberg y Willis 2007). En este trabajo solo se analizó el aislamiento intrínseco

referente a la producción de frutos, cantidad de semillas por fruto, peso y la germinación de las semillas con respecto a sus padres.

Se encontró que las barreras postcigóticas intrínsecas tienen una contribución importante en el AR total al impedir la formación de frutos híbridos y consecutivamente al disminuir la cantidad de semillas producidas en cada fruto y la germinación de los híbridos principalmente en *S. fulgens*. En esta especie se produjo la menor cantidad de semillas híbridas, las cuales presentaron bajo peso y nula germinación (estériles). Algo similar fue reportado para dos especies de *Solanum* en donde se produjeron semillas estériles como resultado de cruza interespecíficas (Moyle 2007). Esto probablemente debido a incompatibilidades en alelos nucleares o reacomodos cromosomales (Lowry *et al.* 2008, Rieseberg y Blackman 2010).

En la temporada 2010-2011 la producción de semillas híbridas cuando *S. plurispicata* fue receptora de polen fue nulo independientemente de cuál especie fungiera como donadora de polen, cabe mencionar que no fue así cuando esta especie fue donadora. Esto debido a que probablemente durante la temporada 2008-2009 las cruza interespecíficas se contaminaron con polen de la misma flor al manipular la flor para hacer la crusa manual, y por lo tanto estas fueron cruza de autopolinización y no interespecíficas. A pesar de que *S. plurispicata* coexiste con las otras dos especies y su floración y visitantes florales se llegan a sobrelapar, es muy poco probable que ocurra flujo génico entre ellas y de ocurrir muy probablemente estén actuando otros mecanismos que eviten la producción de semillas híbridas.

Por otro lado en el caso de *S. fulgens* y *S. elegans* existen mayores probabilidades de que ocurra cierto flujo génico. Se encontró que estas dos especies coexisten en 30 poblaciones, lo que concuerda con el hallazgo de individuos que posiblemente sean híbridos de estas especies ya que presentan características intermedias. Sus flores son muy similares a *S. fulgens* pero con diferencias en la morfología del cáliz y el brillo de su pétalo floral, estas características son más parecidas a las que presenta *S. elegans*. Esto sugiere que *S. elegans* y *S. fulgens* pueden ser especies relativamente cercanas. Sin embargo, de acuerdo a los resultados de los experimentos en campo, las cruza interespecíficas en las cuales *S. fulgens* fue receptora de polen y *S. elegans* donadora produjeron únicamente un fruto con una semilla, la cual no germinó. Una posible explicación para esta contradicción es que probablemente los colibríes, en comparación con las polinizaciones manuales, tienen un mayor éxito al depositar el polen en los estigmas. Además, los colibríes polinizan más cantidad de flores en un día que el total

de cruas que se realizaron en este trabajo, lo que aumenta las posibilidades de éxito de cruas interespecíficas. Finalmente, es posible que existan más individuos híbridos y que no hayan sido detectados, por lo que un análisis genético podría darnos idea de que tan frecuentes son en la población estudiada.

Un resultado que no resulta fácil de explicar es el que los híbridos producidos en plantas de *S. elegans* y *S. plurispicata* tuvieran mayor peso de semillas y germinación, que las especies parentales (valores negativos de AR, Figs 16 y 17). Entonces, ¿Por qué no encontramos híbridos entre estas especies en campo? Dejando a un lado las barreras precigóticas, esto podría ser una consecuencia de una baja adaptación en el medio natural por la acción de las barreras postcigóticas extrínsecas que desafortunadamente no fueron analizadas en este trabajo, además de la existencia de selección negativa en contra de los híbridos (Grant y Grant 1964; Servedio y Noor 2003). Aunado a esto, probablemente los individuos híbridos no se diferencien fácilmente de las especies parentales, lo que hace más difícil la identificación de estos en campo y posiblemente no los estemos viendo, si es que los hay. Aún queda pendiente el analizar las barreras postcigóticas extrínsecas entre estas especies, sin embargo, podemos concluir que las barreras postcigóticas intrínsecas tienen un efecto significativo en el AR en estas especies.

Aislamiento total: el AR total es fuerte entre las tres especies, con diferencias entre ellas producidas por asimetrías, como es el caso para varios pares de especies (Tiffin 2001). El AR total debe ser más fuerte ya que no se evaluaron todas las etapas del ciclo de vida. Como se mencionó anteriormente, la inclusión del aislamiento geográfico ha sido cuestionada por algunos autores, sin embargo, en este trabajo se decidió incluirlo ya que se consideró y se comprobó que tiene una contribución importante en el AR total. En el caso de *S. elegans* y *S. plurispicata* el AR total aumenta si se incluye el valor de aislamiento geográfico en la fórmula correspondiente (Cuadro 7). Esto también pasa en *Mimulus cardinales* y *M. lewisii*, en donde sin tomar en cuenta el aislamiento geográfico disminuye ligeramente el AR total (Ramsey *et al.* 2003). De manera que, si esta barrera no se incluye para el cálculo final el AR total será menor.

BIBLIOGRAFÍA.

- Angert, A. L. y D. W. Schemske. 2005 **The evolution of species' distributions: reciprocal transplants across the elevation ranges of *Mimulus cardinalis* and *M. lewisii*.** *Evolution* 59, 1671–1684.
- Campbell, D. R. 2008. **Pollinator shifts and the origin and loss of plant species.** *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 95 (2): 264-274.
- Castellanos N. C., Wilson P., Keller S. J., Wolfe A. D. y J. D. Thomson. 2006. **Anther Evolution: Pollen Presentation Strategies when pollinators differ.** *The American Naturalist*. 167: 288-295.
- Chittka L. y J. D. Thomson. 2001. **Cognitive Ecology of pollination.** Cambridge University press. New York.
- Claßen-Bockhoff, R., P. Wester y E. Tweraser. 2004. **The staminal lever arm mechanism in *Salvia* — a review.** *Plant Biology*, 5: 33–41.
- Costa, C. B., S. M. Lambert., E.L. Borba y L.P. De Queiroz. 2007. **Postzygotic reproductive isolation between sympatric taxa in the *Chamaecrista desvauxii* complex (Leguminosae Caesalpinioideae).** *Ann Bot.* 99: 625-635.
- Coyne J. A. y H. A. Orr 2004. Speciation. *Sinauer Associates, Inc.* U.S.A. 545 pp.
- Cozzolino, S. y G. Scopece. 2008. **Specificity in pollination and consequences for postmating reproductive isolation in deceptive Mediterranean orchids.** *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363: 3037-3046.
- Ellstrand, N., R. Whitkus y L. H. Riseberg. 1996. **Distribution of spontaneous plant hybrids.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5090-5093.
- Epling, C. 1939. **A revision of *Salvia*, subgenus *Calosphace*.** Verlag des reptotiums, fabeckstr. Berlin. Pp. 222-223.
- Fenster C. B., Armbruster W. S., Wilson P., Dudash M. R. y J. D. Thomson. 2004. **Pollination syndromes and floral specialization.** *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35: 375-403.
- Gutiérrez-Zamora A. 2008. Las interacciones ecológicas y estructura de una comunidad altoandina de colibríes y flores en la cordillera oriental de Colombia. *Ornitología Colombiana*. 7:17-42
- Grant, K. A y V. Grant. 1964. **Mechanical isolation of *Salvia apiana* and *S. mellifera* (Labiatae).** *Evolution* 18:196-212.

- Grant, V. 1981. **Plant Speciation**. Columbia Univ. Press, New York, 2nd ed.
- Grand V. 1994. **Modes and origins of mechanical and ethological isolation in angiosperms**. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 3-10.
- Howell S. N. G. y S. Webb. 2010. **A Guide to the Birds of Mexico and Northern Central America**. Oxford University Press.
- Johnson, S. D. 2006. **Pollinator-driven speciation in plants**. En *Ecology and evolution of flowers*. Oxford. New York. 370 pp.
- Kay, K. M. 2006. **Reproductive insolation between two closely related hummingbird-pollinated neotropical gingers**. *Evolution*, 60(3): 538-552.
- Kay K. y R. D. Sargent. 2009. **The Role of Animal Pollination in Plant Speciation: Integrating Ecology, Geography, and Genetics**. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40: 637-656.
- Lexer, C. y A. Widmer. 2008. **The genic view of plant speciation: recent progress and emerging questions**. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363: 3023-3036.
- Lowry, D. B., R. C. Rockwood y J. H. Willis. 2008. **Ecological reproductive isolation of coast and inland races of *Mimulus guttatus***. *Evolution*, 62-9: 2196-2214.
- Madd, J. y A. Nilsson. 2004. **On the mechanism of floral shifts in speciation: gained pollination efficiency from tongue- to eye-attachment of pollinia in *Platanthera* (Orchidaceae)**. *Biological Journal of the Linnean Society*. 83: 481-495.
- Martin, N. H. y J. H. Willis. 2007. **Ecological divergence associated with mating system causes nearly complete reproductive isolation between sympatric *Mimulus* species**. *Evolution*, 61: 68-82
- Mayr E. 1942. **Systematics and the origin of species**. Columbia University Press, New York.
- Memmott, J., Craze, P. G., Waser N. M. y M. V. Price. 2007. **Global warming and the disruption of plant-pollinators interactions**. *Ecology Letters* 10: 1-8.
- Mitchell, R. J., R. J. Flanagan, B. J. Brown, N. M. Waser y J. D. Karron. 2009. **New frontiers in competition for pollination**. *Annals of Botany*. 103: 1403-1413.
- Moyle, L.C. 2007. **Comparative genetics of potential prezygotic and postzygotic isolating barriers in a *Lycopersicon* species cross**. *Journal of Heredity* 98: 123-235

- Ollerton J, Alarcón R, Waser N. M, Price M. V, Watts S, Cranmer L, Hingston A, Peter C. I. y J. Rotenberry. 2009. **Aglobal test of the pollination syndrome hypothesis**. *Annals of Botany* 103: 1471-1480.
- Pauw A. 2006. **Floral syndromes accurately predict pollination by a specialized oil collecting bee (*rediviva peringueyi*, *melittidae*) in a guild of south african orchids (*coryciinae*)**. *America journal of botany*. 93(6): 917-926. 2006.
- Peterson R. T. y E. L. Chalif. 1998. **AVES DE MEXICO Guía de campo**. Editorial Diana. México D.F.
- Pianka, E. R. 1973. **The structure of lizard communities**. *Annual Review of Ecology and Systematics* 4: 53-74.
- Ramamoorthy, T. P. y M. Elliott. 1998. **Lamiaceae de México: diversidad, distribución, endemismo y evolución**. Instituto de Biología, UNAM, *México*, D. F. *pp.* 501-526.
- Ramsey, J., H. D. Bradshaw y D. W. Schemske. 2003. **Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (*Phrymaceae*)**. *Evolution*, 57 (7): 1520-1534.
- Reith M, Baumann G, Claben-Bockhoff R y T. Speck. 2007. **New insights into the functional morphology of the lever mechanism of *Salvia pratensis* (*Lamiaceae*)**. *Annals of Botany* 100: 393-400.
- Richads A. J. 1986. **Plant breeding systems**. University Press, Cambridge. 527 pp.
- Rieseberg L. H. y J. H. Willis. 2007. **Plant speciation**. *Science*. 317: 910-914.
- Rieseberg, L. M. y B. K. Blackman. 2010. **Speciation genes in plants**. *Annals of Botany*, 1-17.
- 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.
- Rzedowski, G. C. y J. Rzedowski. 2005. **Flora fanerogámica del Valle de México**. 2ª. ed., 1ª. reimp., Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 1406 pp.
- Schemske, D. W. 2000 **Understanding the origin of species**. *Evolution* 54: 1069-1073.
- Schiestl F y P. Schluter. 2009. **Floral isolation, specialized pollination, and pollinator behavior in orchids**. *Annu. Rev. Entomol.* 54: 425-446.

- Schulke B. y N. M. Waser. 2001. **Long-distance pollinator flights and pollen dispersal between populations of *Delphinium nuttallianum***. *Oecologia* 127: 239-245.
- Servedio M. R. y M. A. F. Noor. 2003. **The role of reinforcement in speciation: theory and data**. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34: 339-364.
- Sheffield R. 1994. **The bee genera of North and Central America (Hymenoptera: Apoidea)**. *Smithsonian Institution Press*. Washington y Londres.
- Sobel J, Chen G, Watt L y D. Schemske. 2009. **The biology of speciation**. *Evolution* 64: 295-315.
- Tiffin, P, M. S. Olson y L. C. Moyle. 2001 **Asymmetrical crossing barriers in angiosperms**. *The royal society*. 268, 861-867.
- Turelli M, Barton N. H. y J. A. Coyne. 2000. **Theory and speciation**. *TRENDS in Ecology & Evolution*. 16: 330-343.
- Walker J, Sytsma K, Treutlein J y M. Wink. 2004. ***Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae**. *American Journal of Botany* 97: 1115-1125.
- Walker J. B. Y K. J. Sytsma. 2007. **Staminal evolution in the genus *Salvia* (Lamiaceae): Molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever**. *Annals of botany*, 100: 375-391.
- Wester P. y R. Claben-Bockhoff. 2006. **Hummingbird pollination in *Salvia haenkei* (Lamiaceae) lacking the typical lever mechanism**. *Pl. Syst. Evol* 257: 133-146.
- Westerkamp C. y R. Claben-Bockhoff. 2007. **Bilabiate flowers: The ultimate Response to Bees?**. *Annals of Botany* 100: 361-374.
- Widmer, A., C. Lexer y S. Cozzolino. 2009. **Evolution of reproductive isolation in plants**. *Heredity*, 102: 31-38.
- Wu, C. 2001. **The genic view of the process of speciation**. *J. Evol. Biol.* 14: 851-865.
- Wu, C. 2001b. **Genes y speciation**. *J. Evol. Biol.* 14: 889-891.
- Xu S, Schluter P, Scopece G, Breitkopf H, Gross K, Cozzolino S y F. Schiestl. 2011. **Floral isolation is the main reproductive barrier among closely related sexually deceptive orchids**. *Evolution* 65: 2606-2620).

CAPITULO II. DEPOSITO DE POLEN EN EL ESTIGMA Y TIEMPO DE VIDA DE LA FLOR DE TRES ESPECIES DE *Salvia* CON DIFERENTES SÍNDROMES DE POLINIZACIÓN

RESUMEN

La efectividad de los polinizadores se puede estimar por la deposición de polen en el estigma de las flores. En el género *Salvia* la transferencia de polen se da mediante un mecanismo de palanca, el cual es una modificación del estambre, y al cual se le ha atribuido la radiación adaptativa del género. En este trabajo se comparó la cantidad de polen que recibe el estigma de tres especies de *Salvia* (*S. fulgens*, *S. elegans* y *S. plurispicata*) a lo largo de la vida de la flor, y se relacionó con el síndrome de polinización (las dos primeras con síndrome de polinización por aves y la tercera por abejas) y la activación (*S. plurispicata* y *S. fulgens*) o inactivación del mecanismo de palanca (*S. elegans*). Se realizaron observaciones para determinar los visitantes de cada especie, el fruit-set (la proporción de flores que pasa a fruto), la producción promedio de frutos y el número de semillas por fruto. El principal visitante de *S. fulgens* fue el colibrí *Eugenes fulgens*, mientras que *S. elegans* fue visitada por cuatro colibríes, siendo *Hylocharis leucotis* el principal. *S. plurispicata* fue visitada por cuatro especies abejas (*Bombus ephippiatus*, *Deltoptila* sp., *Apis mellifera* y *Tetraloniella* sp.) y tres colibríes aunque es poco probable que estos polinicen sus flores. *S. elegans* fue la especie que recibió significativamente más granos que las otras dos especies (91.5 ± 6.7) y se detectaron diferencias entre días en la deposición de polen, seguida de *S. fulgens* (61.5 ± 6.7) en la cual no hubo diferencias entre días. Finalmente, *S. plurispicata* recibió en promedio 31 ± 1.97 granos por día. Estos resultados sugieren que la polinización por aves y la inactivación del mecanismo de palanca confieren una ventaja en la cantidad de polen recibido en el estigma. Sin embargo, *S. plurispicata*, la especie con síndrome de polinización por abejas tuvo la tasa de visita más alta lo que se tradujo en el valor más alto del fruit-set y la mayor producción de frutos.

INTRODUCCIÓN

Las plantas potencialmente compiten para donar polen a estigmas receptivos, ya que esto se traduce en un aumento de su éxito reproductivo (Castellanos *et al.* 2006). Los granos de polen necesitan un agente que los transporte hacia la parte femenina de la flor donde puedan germinar (Abrol 2012), y en la mayoría de las angiospermas los polinizadores son los encargados de esta tarea. Waser y colaboradores (1996) encontraron que el 91% de plantas silvestres son visitadas por más de una especie animal, y recientemente se estima que el 78% de las especies de zonas templadas y el 94% de zonas tropicales son polinizadas por animales (Ollerton *et al.* 2011). De acuerdo al principio de “El Polinizador Más Efectivo”, los polinizadores varían en su efectividad en el transporte de polen y las características morfológicas florales serán modeladas principalmente por el polinizador más abundante y/o efectivo (Kay y Sargent 2009). De manera que para aumentar la cantidad y calidad de las visitas florales por parte de los polinizadores, así como un transporte más eficiente de los granos de polen, las plantas con flor deben desarrollar mecanismos de atracción y manipulación de los visitantes florales. Por ejemplo, las plantas pueden modular la cantidad de recompensa, el color de la corola, su olor, forma y tiempo del despliegue floral entre otros. Estos mecanismos estarán bajo presión selectiva y ayudarán a aumentar el éxito reproductivo de las plantas (Madd y Nilson 2004; Campbell 2008; Kay y Sargent 2009; Mitchell *et al.* 2009; Araujo y Freitas 2010). Esta manipulación de caracteres en muchas ocasiones lleva a un ensamble especialista entre las flores y los polinizadores.

La especialización de los sistemas de polinización ha sido un factor central en la diversificación de las angiospermas y sus flores (Waser *et al.* 1996; Tripp y Manos 2008; Muchhala y Thomson 2009). Las plantas con polinización especializada facilitan la polinización primaria y restringen el acceso a otros polinizadores potenciales (Muchhala 2006). Por lo tanto, las especies pueden especializarse en ciertos polinizadores de acuerdo a la efectividad de estos, es decir, a aquellos que depositen más del polen que remueven, y así finalmente darse una transición de polinizador (Thomson *et al.* 2000). El tema de transición de polinizadores ha sido estudiado en varios géneros (Van der Niet y Johnson 2012). En el género *Penstemon*, se ha dilucidado que ha habido una transición de polinización de himenópteros a aves con sus correspondientes cambios morfológicos (Castellanos *et al.* 2006). Se cree que este

fenómeno es una respuesta de las plantas a comportamientos negativos de las abejas, que se alimentan del polen y lo limpian de su cuerpo constantemente durante su jornada de forrajeo, lo cual disminuye la posibilidad de que este llegue a un estigma receptivo (Castellanos 2003, 2006; Thomson *et al.* 2000).

La eficiencia de los polinizadores es un parámetro que es ampliamente usado para estimar el éxito reproductivo y es usualmente medida por la remoción de polen de las anteras y el depósito de éste en el estigma, y posteriormente por la calidad y cantidad de frutos y semillas producidas (Alonso 2005, Araujo y Freitas 2010, Abrol 2012).

La cantidad de polen depositado en el estigma depende de varios factores. Dentro de los cuales podemos mencionar, la cantidad de polen que el polinizador ha recogido anteriormente, un contacto adecuado del cuerpo del polinizador con el estigma y de la receptividad del estigma al momento de la visita del polinizador (Castellanos *et al.* 2003).

La receptividad del estigma ocurre en un tiempo preciso durante el desarrollo de la flor, sobre todo en especies con dicogamia (separación temporal entre la maduración del estigma y la liberación del polen). El periodo en el cual el estigma está receptivo tiene implicaciones en el éxito reproductivo de un individuo, en la biología de la polinización de las poblaciones y en el sistema de apareamiento de las especies (Sanzol *et al.* 2003). La receptividad del estigma generalmente se relaciona con la longevidad de las flores (Araujo y Freitas 2010). El aumentar la vida de las flores puede incrementar el éxito de polinización pero también el costo del mantenimiento de las flores. Por ejemplo, en *Kalmia latifolia* la duración de las flores de 21 días asegura el éxito reproductivo femenino, ya que aumenta las posibilidades de atracción de polinizadores, y se ha interpretado como una respuesta a la competencia que ejercen las especies que están floreciendo simultáneamente (Rathcke 2003).

El género *Salvia* presenta una morfología floral especializada que se distingue por presentar un mecanismo de palanca el cual en ocasiones se encuentra inactivo, lo que provoca que el sitio de colocación de polen en los polinizadores también varíe (Claben-Bockhoff *et al.* 2004). A pesar de la gran diversidad de formas florales en *Salvia*, se ha observado que, solamente han evolucionado síndromes de melitofilia (abejas) y ornitofilia (aves). El síndrome de melitofilia está presente tanto en especies del viejo como del nuevo mundo, a diferencia de las especies ornitófilas, que solo están

presentes en el nuevo mundo; se propone que estas especies han evolucionado en respuesta a los colibríes neotropicales (Westerkamp y ClaBen-Bockhoof 2007).

Se ha argumentado que el mecanismo de palanca contribuye a una mayor precisión en la colocación del polen, y que por lo tanto disminuye la posibilidad de que un polinizador combine polen de especies diferentes. Otra ventaja que se le atribuye a dicho mecanismo es que reduce la pérdida de gametos masculinos, restringiendo el acceso al polen a visitantes no efectivos. Se ha propuesto que este mecanismo surgió en las especies polinizadas por abejas, como una respuesta al efecto negativo de éstas sobre el éxito reproductivo de las plantas, ya que se suelen alimentar del polen de las flores; mientras que en las especies polinizadas por aves ya no sería necesaria la palanca, porque las aves no consumen polen (Wester y Claben-Bockhoff 2006). El éxito de la parte masculina depende del vaciado completo de los sacos polínicos, la manera de suministrar el polen, el número de granos de polen que llegan al estigma receptivo, y de la precisión de recepción y disposición del polen (Claben-Bockhoff *et al.* 2004; Pauw 2006).

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la efectividad de los polinizadores en base a la cantidad de polen depositado en el estigma de tres especies de *Salvia*.

Objetivos Particulares

- Registrar a los visitantes florales de cada especie
- Relacionar el síndrome de polinización y la activación o inactivación del mecanismo de palanca, de acuerdo a la cantidad de polen depositado en el estigma de las especies, el fruit-set y la producción de frutos y semillas producidas en campo.
- Evaluar, finalmente, qué combinación de caracteres es más exitosa en términos reproductivos generales.

MATERIALES Y METODOS

El sitio de estudio y las especies de estudio con las cuales se trabajo en este capítulo corresponden con las descritas en el capitulo anterior.

Para registrar a los visitantes florales de las tres especies, se realizaron observaciones directas y filmaciones de los visitantes de cada especie durante la temporada de floración (octubre 2010 a marzo 2011).

Para estimar la cantidad de granos en el estigma de las flores, se marcaron 30 plantas de *S. elegans*, (153 botones), 30 plantas de *S. plurispicata* (158 botones) y en 20 plantas de *S. fulgens* (58 botones). De cada botón se registró el día de apertura de la flor, para tomar en cuenta la longevidad de cada flor al momento de la colecta de las flores, la cual se realizó durante cinco días, que es el promedio de longevidad de las flores de las tres especies. Cada día fueron colectadas ocho flores por planta de *S. elegans*, cinco flores por planta de *S. plurispicata* y tres flores por planta de *S. fulgens*. De las flores colectadas se retiro el estigma, el cual fue calentado y prensado en un portaobjetos acompañado de gelatina coloreada con fucsina (Kearns e Inouye 1993), para posteriormente contabilizar en el laboratorio el polen que contenía cada estigma con la ayuda de un microscopio estereoscópico.

Al terminar la época de floración, se contabilizó el número de frutos producidos por cada planta. También en cada una de las 30 plantas se marcaron controles, que se dejaron expuestos a los polinizadores de manera natural, y se contabilizo la cantidad de flores que llegaron a frutos, (fruit-set) y el número de semillas por fruto.

RESULTADOS

Visitantes florales

De acuerdo a las observaciones personales y filmaciones el principal visitante de *S. fulgens* fue la especie de colibrí *Eugenes fulgens*. Para *S. plurispicata* los principales fueron tres especies de abejas *Bombus ephippiatus*, *Deltoptila sp.* y *Tetraloniella sp.* y tres especies de colibríes (*Selasphorus platycercus*, *Archilocus colubris* y *Atthis heloisa*). Cabe mencionar que aún no está claro si en esta especie los colibríes son capaces de trasportar polen entre flores, ya que el polen de esta especie solo toca el pico de los colibríes y no las plumas que es el sitio donde comúnmente transportan el polen. *S. elegans* fue visitada principalmente por las especies de colibríes *Selasphorus platycercus*, *Hylocharis leucotis*, *Archilocus colubris* y *Lampornis clemenciae* (Fig. 1).

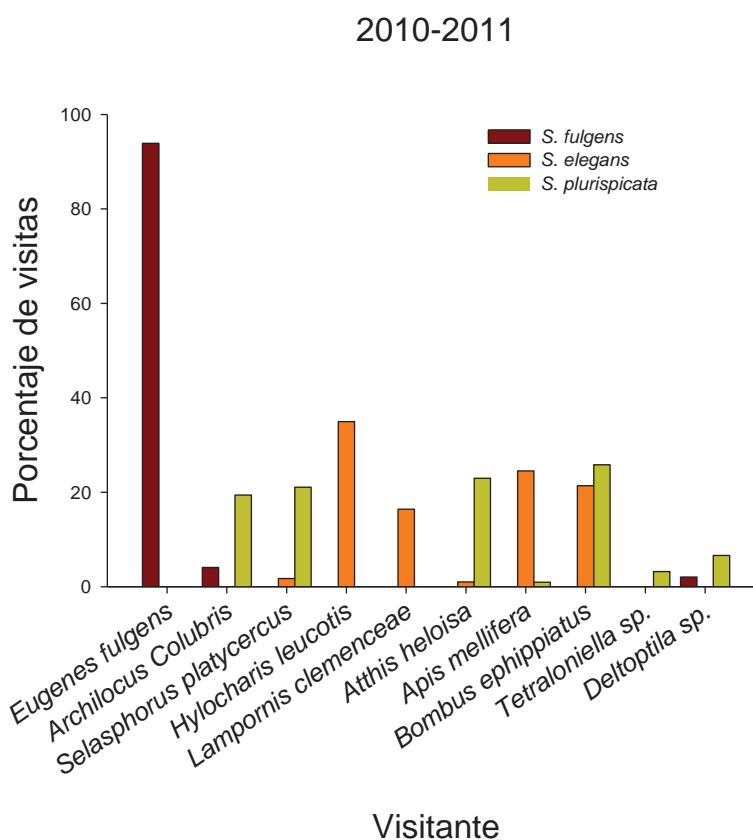


Figura 1. Porcentaje de vistas que realizaron los visitantes flores a las tres especies.

Posteriormente se analizó la tasa de visitas (flores visitadas/hora) de los visitantes de cada especie de planta. Para *S. plurispicata*, a pesar de que no está bien determinado si los colibríes desempeñan un papel como polinizadores, estos fueron separados en un grupo aparte. *S. plurispicata* recibió significativamente más visitas por hora ($0.54 \pm$

0.15) en comparación con las visitas por hora que recibieron *S. elegans* (0.46 ± 0.12) y *S. fulgens* (0.13 ± 0.06) ($P = 0.006$, $F = 4.2$, g. l. = 3). Además, el número de visitas por hora que realizaron los colibríes (*Archilocus colubris*, *Selasphorus platycercus* y *Atthis heloisa*) en *S. plurispicata* no es significativamente diferente al número de flores que visitan en *S. elegans* o *S. fulgens* (Fig. 2).

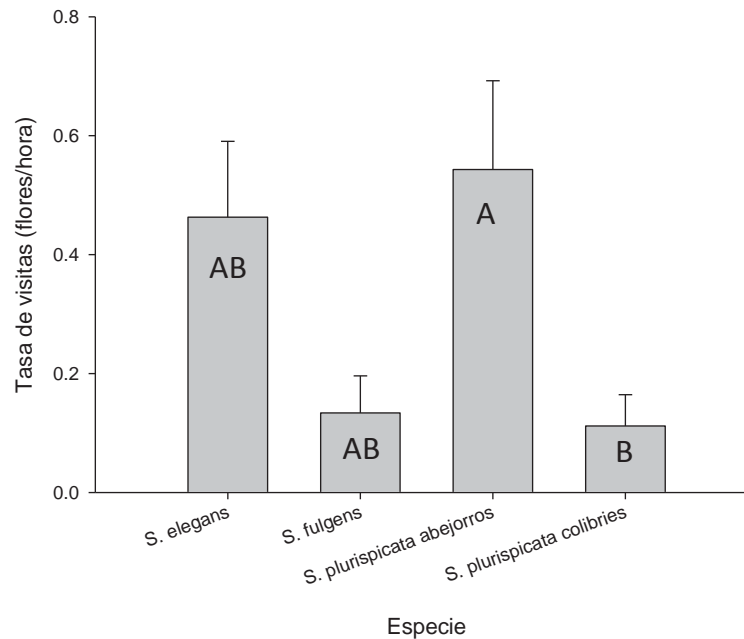


Figura 2. Tasa de visita para cada especie de planta. En el caso de *S. fulgens* y *S. elegans* se tomaron en cuenta solo las visitas de colibríes ya que no es claro el papel de las abejas en estas especies, al igual que el papel que juegan los colibríes en *S. plurispicata*.

Recepción de polen

En promedio *S. elegans* recibió 91.5 ± 6.7 granos de polen durante los cinco días, siendo el primer día de exposición a los polinizadores el día que recibió menos polen ($P < 0.0001$, $F = 11.89$, g. l. = 4) (Fig. 3).

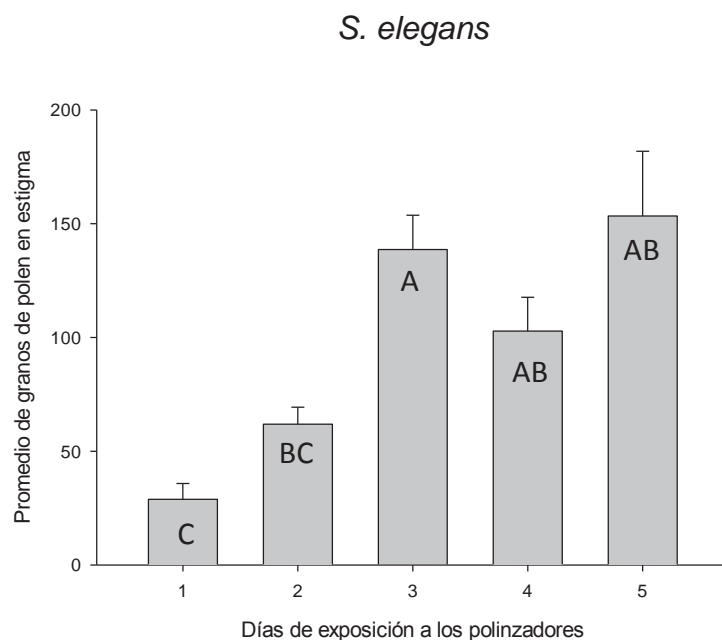


Figura 3. Promedio de granos de polen depositados diariamente en el estigma de *S. elegans* durante el tiempo de vida de las flores.

S. fulgens recibió en promedio 61.5 ± 6.7 granos de polen y no hubo diferencia significativa en la cantidad de granos de polen recibió a lo largo de los días ($P = 0.066$, $F = 2.34$, g. l. = 4) (Fig. 4).

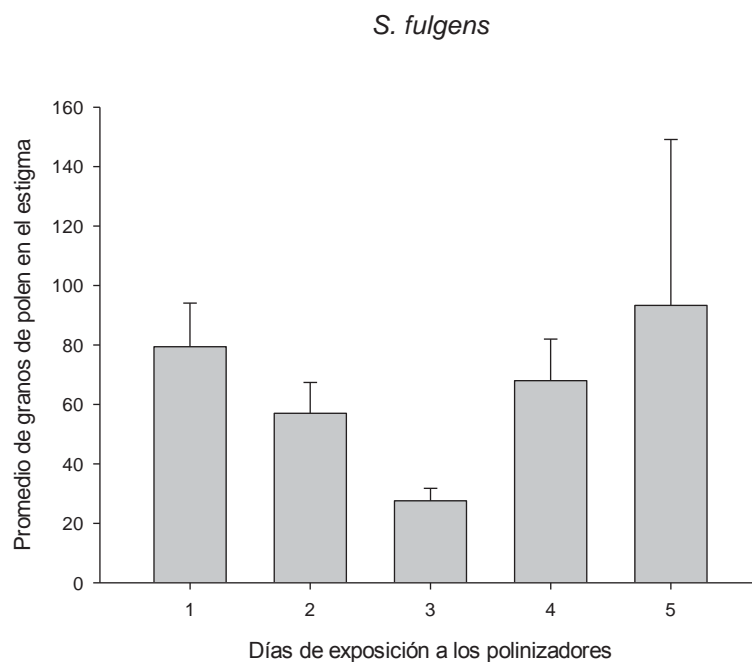


Figura 4. Promedio de granos de polen depositados diariamente en el estigma de *S. fulgens* durante el tiempo de vida de las flores.

S. plurispicata recibió en promedio 30.8 ± 1.97 granos de polen por día, y solo se detectaron diferencias entre el primer y cuarto día de exposición a los polinizadores ($P = 0.036$, $F = 2.63$, g. l. = 4; Fig. 5).

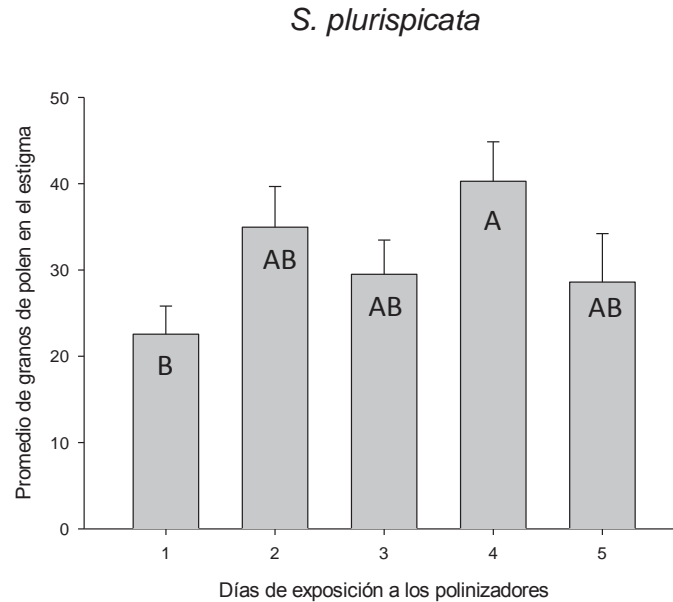


Figura 5. Promedio de granos de polen depositados diariamente en el estigma de *S. plurispicata* durante el tiempo de vida de las flores.

Al comparar los promedios de granos depositados entre especie, se encontró que *S. elegans* recibió significativamente más granos de polen que *S. fulgens* y *S. plurispicata* y de estas dos *S. fulgens* recibió significativamente más granos de polen que *S. plurispicata* ($P < 0.0001$, $F = 25.195$, g. l. = 2; Fig. 6).

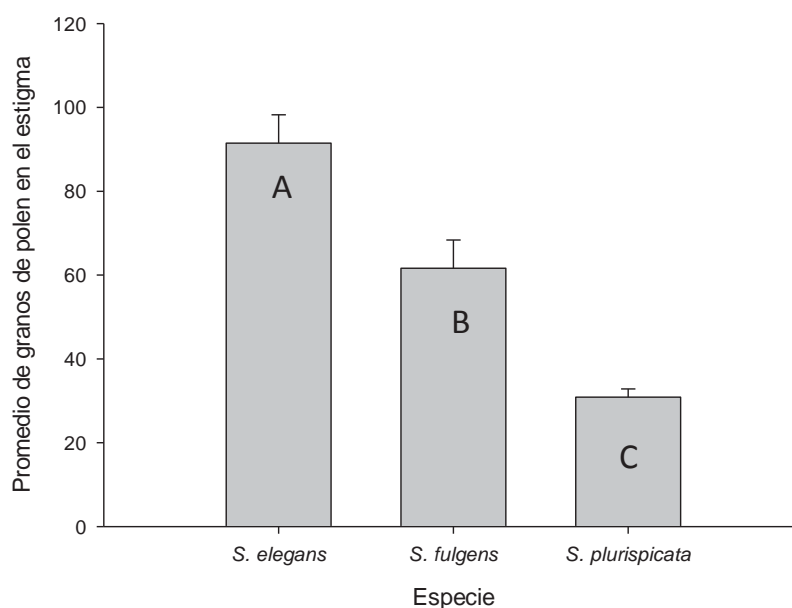


Figura 6. Promedio de granos de polen depositados en el estigma de cada especie a los largo de los cinco días de exposición a los polinizadores.

Producción de frutos y semillas

La cantidad de frutos promedio que produjo *S. plurispicata* (779.96 ± 159.56) fue significativamente mayor que la de *S. elegans* (244.18 ± 63.04) y la de *S. fulgens* (23.53 ± 3.4 ; $P < 0.0001$, $F = 19.93$, g. l. = 72; Fig. 7). Cabe mencionar que, probablemente la cantidad de frutos de las especies fue subestimada, ya que los cálices (frutos) que se produjeron al principio de la temporada ya no estaba presentes al hacer la estimación al final de la temporada.

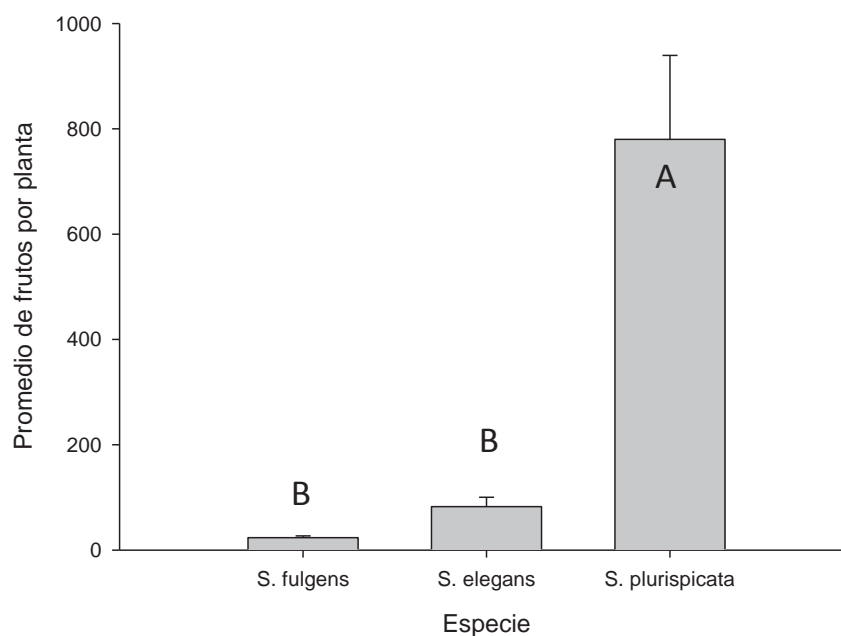


Figura 7. Comparación del promedio de frutos producidos por planta en cada especie durante la temporada de floración. Las letras iguales indican que no hay diferencia, mientras que letras diferentes indican diferencia significativa.

Por otro lado, el fruit-set de *S. plurispicata* (0.6436 ± 0.05) fue significativamente mayor que el de *S. elegans* (0.34 ± 0.08) y el de *S. fulgens* (0.20 ± 0.04) ($P < 0.0001$, $F = 18.24$, g. l. = 2; Fig. 8).

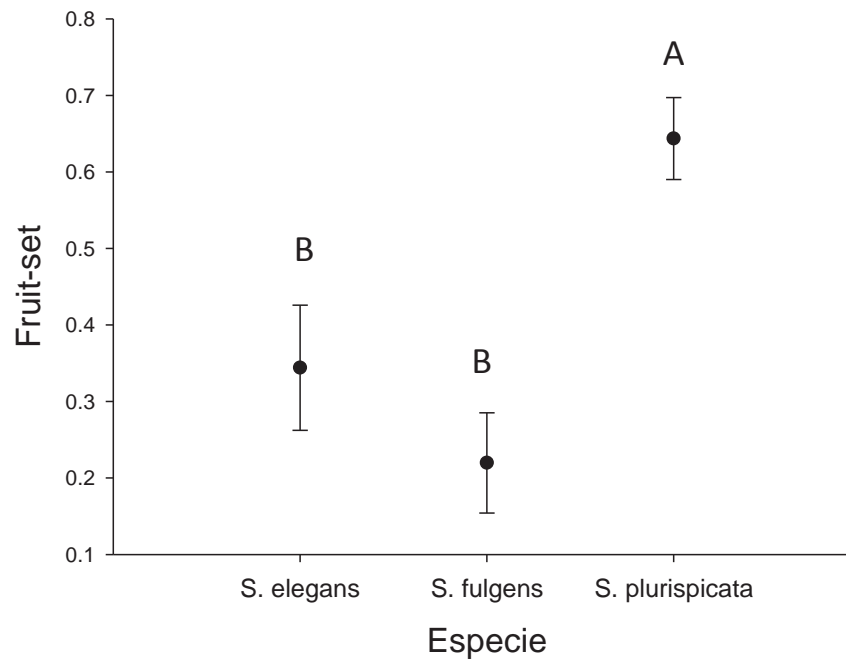


Figura 8. Promedio de flores de las tres especies que se convirtieron en fruto (fruit-set). Las letras diferentes indican diferencia significativa.

Finalmente los frutos de *S. fulgens* produjeron significativamente menos semillas ($P = <0.0001$, $F = 14.18$, g. l. = 2) que los de *S. elegans* y *S. plurispicata* (Fig. 9).

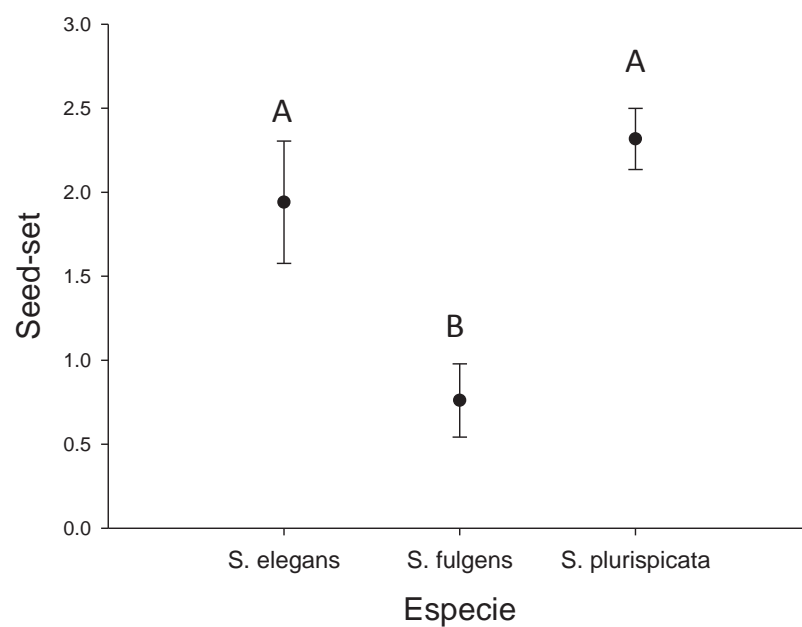


Figura 9. Promedio de semillas por fruto en cada una de las especies. Las diferentes indican diferencia significativa.

DISCUSIÓN

Visitantes florales

En *S. fulgens* se observó la mayor especialización al ser visitada en más de un 90 % por la especie de colibrí *Eugenes fulgens*, aunque presentó la menor tasa de visita totales de las tres especies. *S. elegans* fue visitada por cuatro especies de colibríes y dos especies de abejas que colectan polen de las anteras expuestas. Finalmente *S. plurispicata* fue visitada por cuatro especies de abejas y en menor proporción por tres especies de colibríes. Debido a que sabemos que en ninguna de las tres especies ocurre la polinización autónoma, la visita de polinizadores es fundamental para fecundar los óvulos (Espino 2010).

La cantidad de polen que recibieron los estigmas de las tres especies es alta en comparación con la cantidad de óvulos por flor que presentan las especies (4 óvulos). Sin embargo, se ha documentado que es necesaria una alta cantidad de granos de polen para lograr una fertilización exitosa, ya que no todos los granos de polen que llegan al estigma son viables o con la energía necesaria para viajar a través del estilo y fecundar un óvulo (Cruden 2000).

Cada especie presentó un patrón diferente en lo referente a la cantidad de polen que les es depositado diariamente. Por ejemplo, *S. fulgens* no mostro diferencias entre días, algo similar a lo reportado por Araujo y Freitas (2010) en *Salvia sellowiana*. Posiblemente la baja tasa de visitas de su principal polinizador (*Eugenes fulgens*) fue la responsable del bajo fruit-set y número de semillas que se encontró en este estudio. *S. elegans* recibió una mayor cantidad de granos de polen a partir del tercer día de apertura de la flor, lo que puede relacionarse con los resultados de un estudio de esta especie, en el cual encontraron que las flores polinizadas manualmente el tercer y cuarto día tienen una mayor probabilidad de pasar a fruto, y de que estos produzcan una mayor cantidad de semillas (Hernández 2009). A pesar de que en *S. plurispicata* no se han realizado estudios minuciosos para conocer el día en el que el estigma es más receptivo, de acuerdo con lo encontrado en este trabajo se esperaría que fuera a partir del segundo día de apertura de la flor.

Un dato relevante de este estudio fue el haber encontrado que las dos especies con síndrome de polinización por colibríes (*S. elegans* y *S. fulgens*) tuvieron una mayor cantidad de granos de polen en los estigmas en comparación con *S. plurispicata*. Este

resultado, apoya la idea de que los colibríes son más eficientes para transportar una mayor cantidad de polen en comparación con las abejas (Fig. 6). Anteriormente se realizó en pocas flores, una estimación de la cantidad de polen que producen las anteras de las tres especies, estimándose para las tres especies una producción de entre 18,000 a 22,000 granos de polen en las dos anteras, desafortunadamente debido al bajo tamaño muestral no fue posible evaluar si hubo diferencia significativa en el número de granos de polen que producen las tres especies. Sin embargo, probablemente la cantidad de polen impregnado en el cuerpo de las abejas es menor, por efecto del aseo corporal que realizan estas especies y no por efecto de la cantidad de polen que producen las especies (Castellanos *et al.* 2003, 2006; Thomson 2000). Castellanos y colaboradores (2003), reportaron que las abejas depositan gradualmente menos polen en comparación con la que depositan los colibríes. Sin embargo, en años anteriores se ha encontrado limitación de polen únicamente en *S. fulgens*. Esto nos habla de que son varios los factores que determinan el éxito reproductivo de una especie y que la especialización puede tener desventajas como la limitación de polen (Espino 2010).

Por otra parte, *S. plurispicata* a pesar de ser la especie que recibió en promedio menos granos de polen presentó el valor más alto de fruit-set, posiblemente debido a que tiene una alta tasa de visitas. La alta tasa de visitas puede estar relacionada a que durante el pico de floración es la especie que presentó el mayor número de flores expuestas (~60 flores) seguida de *S. elegans* (~25) y finalmente *S. fulgens* (~5 flores). Es relevante mencionar que el mismo orden de producción de flores se mantiene en la producción de frutos promedio por planta, aunque con varios órdenes de magnitud mayor en *S. plurispicata* (Fig. 7). Finalmente, en la actualidad desconocemos los valores de geitonogamia (fertilización de flores con polen de la misma planta), por lo que podríamos encontrar fuertes efectos de depresión endogámica durante la germinación y sobrevivencia de las plántulas, principalmente en *S. plurispicata* producto de autofecundaciones. Sin embargo esto requiere de un estudio enfocado a contestar esta pregunta.

Al comparar la cantidad de polen que reciben las dos especies con síndrome de polinización por colibríes *S. elegans* (mecanismo inactivo) y *S. fulgens* (mecanismo activo) se puede decir que la inactivación del mecanismo de palanca, confiere un aumento en la cantidad de polen recibido en el estigma, lo cual se traduce en un aumento en la probabilidad de fertilización de los óvulos. Esto confirma la hipótesis de

que el mecanismo de palanca activo ya no sería necesario en especies polinizadas por aves con la desventaja, de recibir más visitas de abejas que consuman el polen al quedar visible en las anteras expuestas como es el caso de *S. elegans* (Wester y ClaBen-Bockhoff 2006). Por otro lado, *S. plurispicata*, la especie que recibió la menor cantidad de granos de polen, sin embargo, probablemente el mecanismo de palanca aunado al síndrome de polinización por abejas, crean un sistema que le está permitiendo ser más eficiente y poder producir más frutos y semillas con la poca cantidad de polen que llega a sus estigmas.

Estos resultados demuestran la relevancia de incorporar distintos estimadores del éxito reproductivo tanto a nivel floral como a nivel de planta pues de no hacerlo podríamos llegar a conclusiones muy limitadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrol D. P. 2012. **Pollination Biology, Biodiversity Conservation and Agricultural production**. Springer. 792 pp.
- Alonso C. 2005. **Pollination success across an elevation and sex ratio gradient in gynodioecious *Daphne laureola***. *American Journal of Botany*. 92: 1264-1269.
- Araujo A. I. y L. Freitas. 2010. **Is pollen removal or seed set favoured by flower longevity in a hummingbird-pollinated *Salvia* species?**. *Annals of Botany*. 106: 413-419.
- Campbell, D. R. 2008. **Pollinator shifts and the origin and loss of plant species**. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 95 (2): 264-274.
- Castellanos M. C., Wilson P. y J. D. Thomson. 2003. **Pollen transfer by hummingbirds and bumblebees, and the divergence of pollination modes in *Penstemon***. *Evolution*. 57: 2742-2752.
- Castellanos N. C., Wilson P., Keller S. J., Wolfe A. D. y J. D. Thomson. 2006. **Anther Evolution: Pollen Presentation Strategies when pollinators differ**. *The American Naturalist*. 167: 288-295.
- ClaBen-Bockhoff R., Speck T., Tweraser E., Wester P., Thimm S. y M. Reith. 2004. The staminal lever mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae): a key innovation for adaptative radiation?. *Organisms diversity and Evolution*. 4: 189-205.
- Cruden R. W. 2000. **Pollen grains: why so many?** *Plant Syst. Evol.* 222: 143-165.
- Espino J. 2010. **Evolución de los mecanismos de aislamiento reproductivo en tres especies de arbustos del bosque templado**. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. U.M.S.N.H.
- Hernandez D. 2009. **Evolución de los mecanismos de aislamiento reproductivo en tres especies de arbustos del bosque templado**. Tesis de licenciatura. Facultad de biología. U.M.S.N.H.
- Kay K. y R. D. Sargent. 2009. **The Role of Animal Pollination in Plant Speciation: Integrating Ecology, Geography, and Genetics**. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40: 637-656.

- Madd, J. y A. Nilsson. 2004. **On the mechanism of floral shifts in speciation: gained pollination efficiency from tongue- to eye-attachment of pollinia in *Platanthera* (Orchidaceae).** *Biological Journal of the Linnean Society*. 83: 481-495.
- Mitchell R. J., Irwin R. E., Flanagan R. J. y J. D. Karron. 2009. **Ecology and evolution of plant-pollinator interactions.** *Annals of Botany*. 103: 1355-1363.
- Muchhala N. 2006. **The pollination biology of *Burmeistera* (Campanulaceae): specialization and syndromes.** *American Journal of Botany*. 93: 1081-1089.
- Muchhala N. y J. D. Thomson. 2009. **Going to great lengths: selection for long corolla tubes in an extremely specialized bat-flower mutualism.** *Proc. R. Soc. B*. 276: 2147-2152.
- Ollerton J, Winfree R y S. Tarrant. 2011. **How many flowering plants are pollinated by animals?.** *Oikos* 120: 321-326.
- Pauw A. 2006. **Floral syndromes accurately predict pollination by a specialized oil-collecting bee (rediviva peringueyi, melittidae) in a guild of south african orchids (coryciinae).** *American journal of Botany*. 93: 917-926.
- Rathcke B. J. 2003. **Floral longevity and reproductive assurance: seasonal patterns and an experimental test with *Kalmia latifolia* (Ericaceae).** *American Journal of Botany*. 90: 1328-1332.
- Sanzol J., Rallo P. y M. Herrero. 2003. **Asynchronous development of stigmatic receptivity in the pear (*Pyrus communis*; Rosaceae) flower.** *American Journal of Botany*. 90: 78-84.
- Thomson J. D., Wilson P., Valenzuela M. y M. Malzone. 2000. **Pollen presentation and pollination síndromes, with special reference to *Penstemon*.** *Plant Species Biology*. 15: 11-29.
- Tripp E. A. y P. S. Manos. 2008. **Is floral specialization an evolutionary dead-end? Pollination system transitions in *Ruellia* (Acanthaceae).** *Evolution*. 32: 1712-1737.
- Van der Niet T. y S. D. Johnson. 2012. **Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms.** *Trends in ecology and evolution*. En prensa.

Waser, N. M., L. Chittka, M. V. Price, N. Williams, and J. Ollerton. 1996.

Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* 77:1043-1060.

Wester P. y R. ClaBen-Bonckhoff. 2006. **Hummingbird pollination in *Salvia***

Haenkei (Lamiaceae) lacking the typical lever mechanism. *Pl. Syst. Evol.* 257: 133-146.

Westerkamp C. y R. ClaBen-Bonckhoff. 2007. **Bilabiate flowers: The ultimate**

response to bees? *Annals of Botany*. 100: 361-374.

DISCUSIÓN GENERAL

De acuerdo a los reportes de herbario y los mapas realizados, la población estudiada es una de las pocas (quizá la única) donde coexisten las tres especies, lo que permitió estudiar a detalle las complejas interacciones que se desarrollan entre estas, y que en ocasiones dan como resultado la producción de híbridos naturales.

De manera general los resultados de este estudio demuestran la efectividad de las distintas barreras reproductivas entre especies de un mismo género. En *S. fulgens*, las barreras precigóticas demostraron ser menos efectivas pues compartió con *S. elegans* una distribución similar en el país, así como el mismo tiempo de floración y la visita de la especie de colibrí *Selasphorus platycercus* con ambas especies. Sin embargo, las barreras postcigóticas en conjunto tuvieron un valor más alto de AR en *S. fulgens*, al disminuir la producción de frutos híbridos cuando esta fue receptora de polen y *S. elegans* y *S. plurispicata* donadoras, además los pocos frutos híbridos producidos no lograron germinar. Por otro lado, en *S. elegans* y *S. plurispicata* las barreras postcigóticas fueron débiles, ya que hubo una producción de frutos híbridos mayor a la producida por *S. fulgens* cuando estas fueron receptoras de polen, e incluso las semillas de tales frutos superaron el peso y germinación de los controles. Por lo tanto, como una manera de compensar la debilidad de las barreras postcigóticas, las barreras precigóticas en *S. elegans* y *S. plurispicata* son fuertes. El aislamiento geográfico, sobretodo en *S. plurispicata*, tuvo una contribución importante al separarla de las especies hermanas aquí estudiadas. Además, por la morfología floral de *S. plurispicata* se reduce la posibilidad de flujo de polen entre esta y las otras dos especies estudiadas. Ya que el sitio de colocación de polen de *S. elegans* y *S. fulgens* es muy diferente al de *S. plurispicata* para un mismo visitante floral.

El mecanismo de palanca contribuye de alguna manera al aislamiento reproductivo por la colocación del polen en un lugar específico en el cuerpo del polinizador (Wester y Claben-Bockhoff 2006). En *S. plurispicata* el tamaño de las flores limita el flujo de polen con las otras dos especies. En el caso de *S. fulgens* y *S. elegans* la colocación del polen en un mismo polinizador es distinta ya que *S. fulgens* tiene activo el mecanismo de palanca a diferencia de *S. elegans*, la cual por la inactivación del mecanismo de

palanca tiene expuestas sus anteras. Por lo que es más probable que un colibrí transporte polen en el sentido de *S. fulgens* a *S. elegans* que al contrario.

Lo anterior debido a que, *S. fulgens*, por tener activo el mecanismo de palanca, no deposita su polen a lo largo de la cabeza del colibrí como lo hace *S. elegans*. *S. fulgens* coloca su polen en un sitio específico de la cabeza del colibrí y lo hace hasta el momento en el que el pico del colibrí presiona el tejido conectivo, de manera que no esparce su polen en un área grande de la cabeza del colibrí como lo hace *S. elegans* por el hecho de tener inactivo el mecanismo de palanca. Esto concuerda con los híbridos encontrados en campo, los cuales debido a sus caracteres morfológicos parecieran ser la cruce de *S. fulgens* como receptora y *S. elegans* como donadora. Sin embargo, de acuerdo a los resultados de cruces interespecíficas, la producción de híbridos ocurrió cuando *S. elegans* recibió polen de *S. fulgens*.

Por otro lado, los resultados de la deposición de polen concuerdan con la hipótesis de que en las especies polinizadas por colibríes el mecanismo de palanca no parece conferir ya una ventaja. Sin embargo, una posible desventaja en el caso de *S. elegans* es que al tener expuestas las anteras aumentaron las visitas de abejas hurtadoras de polen. También se pudo observar cómo *S. plurispicata*, la especie que recibió la menor cantidad de granos de polen, produjo más frutos y semillas, probablemente por la presencia del mecanismo de palanca aunado al síndrome de polinización por abejas, que en conjunto crean un sistema que le está permitiendo tener un proceso de polinización mas eficiente.

BIBLIOGRAFIA GENERAL

- Abrol D. P. 2012. **Pollination Biology, Biodiversity Conservation and Agricultural production**. Springer. 792 pp.
- Alonso C. 2005. **Pollination success across an elevation and sex ratio gradient in gynodioecious *Daphne laureola***. *American Journal of Botany*. 92: 1264-1269.
- Angert, A. L. y D. W. Schemske. 2005 **The evolution of species' distributions: reciprocal transplants across the elevation ranges of *Mimulus cardinalis* and *M. lewisii***. *Evolution* 59, 1671–1684.
- Araujo A. I. y L. Freitas. 2010. **Is pollen removal or seed set favoured by flower longevity in a hummingbird-pollinated *Salvia* species?**. *Annals of Botany*. 106: 413-419.
- Campbell, D. R. 2008. **Pollinator shifts and the origin and loss of plant species**. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 95 (2): 264-274.
- Castellanos M. C., Wilson P. y J. D. Thomson. 2003. **Pollen transfer by hummingbirds and bumblebees, and the divergence of pollination modes in *Penstemon***. *Evolution*. 57: 2742-2752.
- Castellanos N. C., Wilson P., Keller S. J., Wolfe A. D. y J. D. Thomson. 2006. **Anther Evolution: Pollen Presentation Strategies when pollinators differ**. *The American Naturalist*. 167: 288-295.
- Chittka L. y J. D. Thomson. 2001. **Cognitive Ecology of pollination**. Cambridge University press. New York.
- Claßen-Bockhoff R., Speck T., Tweraser E., Wester P., Thimm S. y M. Reith. 2004. **The staminal lever mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae): a key innovation for adaptative radiation?**. *Organisms diversity and Evolution*. 4: 189-205.
- Claßen-Bockhoff, R., P. Wester. y E. Tweraser. 2004. **The staminal lever arm mechanism in *Salvia* — a review**. *Plant Biology*, 5: 33–41.
- Costa, C. B., S. M. Lambert., E.L. Borba y L.P. De Queiroz. 2007. **Postzygotic reproductive isolation between sympatric taxa in the *Chamaecrista desvauxii* complex (Leguminosae Caesalpinioideae)**. *Ann Bot.* 99: 625-635.

- Coyne J. A. y H. A. Orr 2004. Speciation. *Sinauer Associates, Inc.* U.S.A. 545 pp.
- Cozzolino, S. y G. Scopece. 2008. **Specificity in pollination and consequences for postmating reproductive isolation in deceptive Mediterranean orchids.** *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363: 3037-3046.
- Cruden R. W. 2000. **Pollen grains: why so many?** *Plant Syst. Evol.* 222: 143-165.
- Ellstrand, N., R. Whitkus y L. H. Riseberg. 1996. **Distribution of spontaneous plant hybrids.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5090-5093.
- Epling, C. 1939. **A revision of Salvia, subgenus Calosphace.** Verlag des reptotiums, fabeckstr. Berlin. Pp. 222-223.
- Espino J. 2010. **Evolución de los mecanismos de aislamiento reproductivo en tres especies de arbustos del bosque templado.** Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. U.M.S.N.H.
- Fenster C. B., Armbruster W. S., Wilson P., Dudash M. R. y J. D. Thomson. 2004. **Pollination syndromes and floral specialization.** *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35: 375-403.
- Galen C. 1999. **Why do flowers vary? The functional ecology of variation in flower size and form within natural plant populations.** *BioScience.* 49:631-340.
- Grant, K. A y V. Grant. 1964. **Mechanical isolation of Salvia apiana and S. mellifera (Labiatae).** *Evolution* 18:196-212.
- Grant, V. 1981. **Plant Speciation.** Columbia Univ. Press, New York, 2nd ed.
- Grand V. 1994. **Modes and origins of mechanical and ethological isolation in angiosperms.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 3-10
- Gutiérrez-Zamora A. 2008. Las interacciones ecológicas y estructura de una comunidad altoandina de colibríes y flores en la cordillera oriental de Colombia. *Ornitología Colombiana.* 7:17-42
- Hausdorf B. 2011. **Progress toward a general species concept.** *Evolution* 65: 923-931.
- Hernández D. 2009. **Evolución de los mecanismos de aislamiento reproductivo en tres especies de arbustos del bosque templado.** Tesis de licenciatura. Facultad de biología. U.M.S.N.H.
- Howell S. N. G. y S. Webb. 2010. **A Guide to the Birds of Mexico and Northern Central America.** Oxford University Press.

- Johnson, S. D. 2006. **Pollinator-driven speciation in plants**. En Ecology and evolution of flowers. Oxford. New York. 370 pp.
- Kay, K. M. 2006. **Reproductive insolation between two closely related hummingbird-pollinated neotropical gingers**. *Evolution*, 60(3): 538-552.
- Kay K. y R. D. Sargent. 2009. **The Role of Animal Pollination in Plant Speciation: Integrating Ecology, Geography, and Genetics**. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40: 637-656.
- Lexer, C. y A. Widmer. 2008. **The genic view of plant speciation: recent progress and emerging questions**. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363: 3023-3036.
- Lowry, D. B., R. C. Rockwood y J. H. Willis. 2008. **Ecological reproductive isolation of coast and inland races of *Mimulus guttatus***. *Evolution*, 62-9: 2196-2214.
- Madd, J. y A. Nilsson. 2004. **On the mechanism of floral shifts in speciation: gained pollination efficiency from tongue- to eye-attachment of pollinia in *Platanthera* (Orchidaceae)**. *Biological Journal of the Linnean Society*. 83: 481-495.
- Martin, N. H. y J. H. Willis. 2007. **Ecological divergence associated with mating system causes nearly complete reproductive isolation between sympatric *Mimulus* species**. *Evolution*, 61: 68-82
- Mayfield M., Waser N. y M. Price. 2001. **Exploring the “Most effective Pollinator Principle” with complex flowers: bumblebees and *Ipomopsis aggregata***. *Annals of Botany* 88:591-596.
- Mayr E. 1942. **Systematics and the origin of species**. Columbia University Press, New York.
- Mayr, E. 1963. **Animal Species and Evolution**. The Belknap press, Cambridge, MA.
- Memmott, J., Craze, P. G., Waser N. M. y M. V. Price. 2007. Global warming and the disruption of plant-pollinators interactions. *Ecology Letters* 10: 1–8.
- Mishler B. D. y E. De Luna. 1997. **Sistemática filogenética y el concepto de especie**. *Biol. Soc. Bot. México* 60: 45-57.
- Mitchell R. J., Irwin R. E., Flanagan R. J. y J. D. Karron. 2009. **Ecology and evolution of plant-pollinator interactions**. *Annals of Botany*. 103: 1355-1363.
- Moyle, L.C. 2007. **Comparative genetics of potential prezygotic and postzygotic isolating barriers in a *Lycopersicon* species cross**. *Journal of Heredity* 98: 123-235.

- Muchhala N. 2006. **The pollination biology of Burmeistera (Campanulaceae): specialization and syndromes.** *American Journal of Botany*. 93: 1081-1089.
- Muchhala N. y J. D. Thomson. 2009. **Going to great lengths: selection for long corolla tubes in an extremely specialized bat-flower mutualism.** *Proc. R. Soc. B*. 276: 2147-2152.
- Ollerton J, Alarcón R, Waser N. M, Price M. V, Watts S, Cranmer L, Hingston A, Peter C. I. y J. Rotenberry. 2009. **Aglobal test of the pollination syndrome hypothesis.** *Annals of Botany* 103: 1471-1480.
- Ollerton J, Winfree R y S. Tarrant. 2011. **How many flowering plants are pollinated by animals?.** *Oikos* 120: 321-326.
- Pauw A. 2006. **Floral syndromes accurately predict pollination by a specialized oil-collecting bee (rediviva peringueyi, melittidae) in a guild of south african orchids (coryciinae).** *American journal of Botany*. 93: 917-926.
- Peterson R. T. y E. L. Chalif. 1998. **AVES DE MEXICO Guía de campo.** Ediatorial Diana. México D.F.
- Pianka, E. R. 1973. **The structure of lizard communities.** *Annual Review of Ecology and Systematics* 4: 53-74.
- Ramamoorthy, T. P. y M. Elliott. 1998. **Lamiaceae de México: diversidad, distribución, endemismo y evolución.** Instituto de Biología, UNAM, México, D. F. *pp.* 501-526.
- Ramsey, J., H. D. Bradshaw y D. W. Schemske. 2003. **Components of reproductive isolation between the monkeyflowers Mimulus lewisii and M. cardinalis (Phrymaceae).** *Evolution*, 57 (7): 1520-1534.
- Rathcke B. J. 2003. **Floral longevity and reproductive assurance: seasonal patterns and an experimental test with Kalmia latifolia (Ericaceae).** *American Journal of Botany*. 90: 1328-1332.
- Reith M, Baumann G, Claben-Bockhoff R y T. Speck. 2007. **New insights into the functional morphology of the lever mechanism of Salvia pratensis (Lamiaceae).** *Annals of Botany* 100: 393-400.
- Richads A. J. 1986. **Plant breeding systems.** University Press, Cambridge. 527 pp.
- Rieseberg L. H. y J. H. Willis. 2007. **Plant speciation.** *Science*. 317: 910-914.

- Rieseberg, L. M. y B. K. Blackman. 2010. **Speciation genes in plants**. *Annals of Botany*, 1-17.
- 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.
- Rzedowski, G. C. y J. Rzedowski. 2005. **Flora fanerogámica del Valle de México**. 2ª. ed., 1ª. reimp., Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), 1406 pp.
- Sanzol J., Rallo P. y M. Herrero. 2003. **Asynchronous development of stigmatic receptivity in the pear (*Pyrus communis*; Rosaceae) flower**. *American Journal of Botany*. 90: 78-84.
- Schemske, D. W. 2000 **Understanding the origin of species**. *Evolution* 54: 1069–1073.
- Schiestl F y P. Schluter. 2009. **Floral isolation, specialized pollination, and pollinator behavior in orchids**. *Annu. Rev. Entomol.* 54: 425-446.
- Schulke B. y N. M. Waser. 2001. **Long-distance pollinator flights and pollen dispersal between populations of *Delphinium nuttallianum***. *Oecologia* 127: 239-245.
- Servedio M. R. y M. A. F. Noor. 2003. **The role of reinforcement in speciation: theory and data**. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 34: 339-364.
- Sheffield R. 1994. **The bee genera of North and Central America (Hymenoptera: Apoidea)**. *Smithsonian Institution Press*. Washington y Londres.
- Sobel J, Chen G, Watt L y D. Schemske. 2009. **The biology of speciation**. *Evolution* 64: 295-315.
- Thomson J. D., Wilson P., Valenzuela M. y M. Malzone. 2000. **Pollen presentation and pollination síndromes, with special reference to *Penstemon***. *Plant Species Biology*. 15: 11-29.
- Tiffin, P, M. S. Olson y L. C. Moyle. 2001 **Asymmetrical crossing barriers in angiosperms**. *The royal society*. 268, 861-867.
- Tripp E. A. y P. S. Manos. 2008. **Is floral specialization an evolutionary dead-end? Pollination system transitions in *Ruellia* (Acanthaceae)**. *Evolution*. 32: 1712-1737.

- Turelli M, Barton N. H. y J. A. Coyne. 2000. **Theory and speciation.** *TRENDS in Ecology & Evolution*. 16: 330-343.
- Vallejo-Martín, M, Da Silva E, Sargent. R. y S. Barrett. 2010. **Trait correlates and functional significance of heteranthery in flowering plants.** *New phytologist* 188: 418-425.
- Van der Niet T. y S. D. Johnson. 2012. **Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms.** *Trends in ecology and evolution*. En prensa.
- Walker J, Sytsma K, Treutlein J y M. Wink. 2004. **Salvia (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of Salvia and tribe Mentheae.** *American Journal of Botany* 97: 1115-1125.
- Walker J. B. Y K. J. Sytsma. 2007. **Staminal evolution in the genus Salvia (Lamiaceae): Molecular phylogenetic evidence for multiple origins of the staminal lever.** *Annals of botany*, 100: 375-391.
- Waser, N. M., L. Chittka, M. V. Price, N. Williams, and J. Ollerton. 1996. **Generalization in pollination systems, and why it matters.** *Ecology* 77:1043-1060.
- Wester P. y R. ClaBen-Bonckhoff. 2006. **Hummingbird pollination in Salvia Haenkei (Lamiaceae) lacking the typical lever mechanism.** *Pl. Syst. Evol.* 257: 133-146.
- Westerkamp C. y R. ClaBen-Bonckhoff. 2007. **Bilabiate flowers: The ultimate response to bees?** *Annals of Botany*. 100: 361-374.
- Widmer, A., C. Lexer y S. Cozzolino. 2009. **Evolution of reproductive isolation in plants.** *Heredity*, 102: 31-38.
- Wu, C. 2001. **The genic view of the process of speciation.** *J. Evol. Biol.* 14: 851-865.
- Wu, C. 2001b. **Genes and speciation.** *J. Evol. Biol.* 14: 889-891.
- Xu S, Schluter P, Scopece G, Breikopf H, Gross K, Cozzolino S y F. Schiestl. 2011. **Floral isolation is the main reproductive barrier among closely related sexually deceptive orchids.** *Evolution* 65: 2606-2620).