



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas

Evaluación experimental del síndrome de  
polinización de *Penstemon gentianoides*  
(Plantaginaceae): abejas y colibríes como  
visitantes

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Lucía del Carmen Salas Arcos

Codirectores

Dr. Carlos Alberto Lara Rodríguez

Dr. Juan Francisco Ornelas Rodríguez

Tlaxcala, Tlax.

Febrero, 2018



# Universidad Autónoma de Tlaxcala

---

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta  
Posgrado en Ciencias Biológicas

Evaluación experimental del síndrome de  
polinización de *Penstemon gentianoides*  
(Plantaginaceae): abejas y colibríes como  
visitantes

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Lucía del Carmen Salas Arcos

### Comité Tutorial

Dr. Carlos Alberto Lara Rodríguez  
Dr. Juan Francisco Ornelas Rodríguez  
Dra. Mariana del S. Cuautle Arenas  
Dra. Citlalli Castillo Guevara  
Dr. José Luis Martínez y Pérez

Tlaxcala, Tlax.

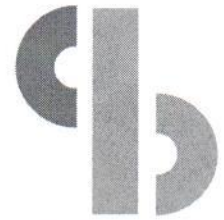
Febrero, 2018

## Hoja de financiamiento

- El trabajo se realizó en El Parque Nacional La Malinche, permiso SEMARNAT No. FAUT-0296
- El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) No. de beca 248118



**Universidad Autónoma de Tlaxcala**  
**Secretaría de Investigación Científica y Posgrado**  
**Posgrado en Ciencias Biológicas**



POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

**COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA**  
**P R E S E N T E**

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Lucía del Carmen Salas Arcos** realiza para la obtención del grado de **Doctora en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Evaluación experimental de los síndromes de polinización de *Penstemon gentianoides* (Plantaginaceae): abejas y colibríes como visitantes”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E  
TLAXCALA, TLAX., FEBRERO 2 DE 2018

DRA. CITLALLI CASTILLO GUEVARA

DR. JORGE ISRAEL AYALA BERDÓN

DRA. MARIANA CUAUTLE ARENAS

DR. JOSÉ LUIS MARTÍNEZ Y PÉREZ

DRA. SUSANA GUILLÉN RODRÍGUEZ



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:  
ISO 9001:2015-NMX-CC-9001-IMNC-2015



## **Agradecimientos**

Agradezco al Centro Tlaxcala Biología de la Conducta (CTBC), UAT por haberme brindado la oportunidad de realizar un doctorado.

Agradezco al Comité Tutorial que cada semestre enriqueció, con sus comentarios y sugerencias, este trabajo, en particular a mi director de tesis al Dr. Carlos Alberto Lara Rodríguez y al codirector Juan Francisco Ornelas Rodríguez. A la Dra. Susana Guillén y al Dr. Jorge Ayala por aceptar ser parte del jurado.

### **Agradecimientos a título personal**

Agradezco a todos quienes me apoyaron en diferentes maneras durante los cuatro años del doctorado. A la familia de Don Julio, (fondita a las faldas de la malinche) quienes siempre estuvieron al pendiente de mi seguridad e integridad física y por brindarme su amistad, a sus perritos que siempre me acompañaron hasta el sitio de muestreo y por defenderme de extraños y de las vacas; la puca quien es la líder de la manada, a Laura, el muñeco, el extraño, el chincola, al charpi, el mordelón y con especial cariño al canelo, se ganó mi cariño por ser el más travieso pero quien me cuidaba más, los llevo en mi pensamiento siempre.

Desde que llegué a Tlaxcala, la familia Lemus Hernández me aceptó y brindó su amistad, hasta la fecha, y deseo que por siempre sigamos siendo una familia.

A Todas mis amigas y amigo Juan Manuel (JM) quien me apoyó de manera incondicional en el primer año de muestreo (el más difícil) y a pesar de nuestras diferencias seguimos siendo amigos; a Chefa, Hellen, Sandy, Magy, Martha, Lily y Dulcecita, por ser la banda del laboratorio y su apoyo moral y en campo pero más su amistad, ¡gracias!

A mi familia por siempre apoyarme sin dudar, y que a pesar de las adversidades seguimos juntos, además porque siempre están cada que regreso a casa.

Al Dr. José Luis, no sólo por su apoyo académico, también su apoyo moral.

Y a todos y cada una de las valiosas personas que me ayudaron y que en este momento los olvidé.

Agradezco a Arturo Arellano Cantú por todo su apoyo, paciencia y amor, amor no solo a mí, sino a mi trabajo.

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mi familia, a mi mamá Lucía, hermana Irene, hermano Paúl; a mi hermano Beto y su familia, y por supuesto a mi papá José Crispín Salas Salgado.

De manera especial, también dedico este trabajo a mi esposo Arturo en agradecimiento por todo su apoyo.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	
1.1 Interacción planta-polinizador.....	1
1.2 Cambios en la interacción planta polinizador.....	7
1.3 Sistemas de polinización en el género <i>Penstemon</i> .....	10
2. HIPÓTESIS.....	17
3. PREDICCIONES.....	17
4. OBJETIVOS	
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos particulares.....	18
5. LITERATURA CITIADA .....	19
6. CAPITULO 1	
6.1 Abstract.....	26
6.2 Introduction.....	28
6.3 METHODS	
6.3.1 Study sites.....	30
6.3.2 Study species.....	30
6.3.3 Floral biology.....	31
6.3.4 Floral visitors.....	31
6.3.5 Breeding system.....	31
6.3.6 Nectar production dynamics.....	32
6.3.7 Pollinator efectiveness.....	37
6.4 DISCUSSION	
6.4.1 The hymenopteran pollination síndrome in <i>P. gentianoides</i> .....	38
6.4.2 Ancestral pollination síndrome and secondary functional groups.....	40
6.5 ACKNOELEDGEMENTS.....	44
6.6 REFERENCES.....	46
6.7 TABLAS	
6.7.1 Tabla 1.....	53
6.7.2 Tabla 2.....	54



7.7.2 Figura 4.....	86
7.7.2 Figura 5.....	87
8. DISCUSIÓN GENERAL.....	88
9. CONCLUSIÓN GENERAL.....	90
10. LITERATURA CITADA.....	91

## INTRODUCCIÓN GENERAL

### **Interacción planta-polinizador**

La amplia diversificación de las angiospermas ha sido atribuida a la polinización biótica, principalmente por el surgimiento de las estructuras florales y las interacciones de las plantas con diferentes animales (Ollerton 1999, Thompson 2001, Hu y cols. 2008, Kay y Sargent 2009, Toon y cols. 2014).

Las plantas con flores son un recurso esencial para los diferentes tipos de animales que las visitan; ya que al ofrecer recompensas como néctar, polen, tejidos florales, aceites, resinas, hojas, semillas, savia, etc., atraen a estos; situación que promueve diferentes tipos de interacciones (Ollerton 1999, Araújo y cols. 2011, Del Val y Dirzo 2004).

Las interacciones pueden ser neutras, antagónicas o benéficas, de acuerdo al resultado en los interactuantes. Aquellas interacciones donde las especies implicadas son beneficiadas se conocen como mutualismo (Del Val y Dirzo 2004). La mayoría de las plantas con flores dependen de la interacción con animales para la dispersión y deposición del polen en el estigma (polinización), y los animales dependen de las plantas para la obtención de recursos alimenticios (Barrett y Harder 1996); por ello, la polinización es un ejemplo de las interacciones benéficas (mutualismo) en la interacción planta-animal (Del Val y Dirzo 2004, Willmer 2011).

El mutualismo presente en la interacción planta-polinizador es un ejemplo de coevolución, la cual se refiere a la evolución conjunta de dos o más poblaciones que interactúan entre sí, sin tener intercambio genético. En este tipo de interacción existe especificidad, es decir, la evolución de un rasgo en una especie se debe a las presiones selectivas de otros rasgos de la otra especie, y ocurren al mismo tiempo (Janzen 1980, Odum 1995).

En el proceso de coevolución las especies involucradas presentan cierto grado de especialización, la cual se establece al maximizar la eficacia biológica, es decir, se favorece la sobrevivencia y reproducción de las especies interactuantes (Fontúrbel 2002, Fontúrbel y Molina 2005).

Las presiones selectivas de la especialización hacia un grupo de polinizadores por la elección de los rasgos florales representan adaptaciones a tipos particulares de polinizadores (Fenster y cols. 2004, Schiestl y Johnson 2013, Rosas-Guerrero y cols. 2014), y a los visitantes florales que tienen un efecto positivo en el éxito reproductivo de la planta se les considera como el polinizador efectivo o primario (Stebbins 1970, Rosas-Guerrero y cols. 2014).

El principio del polinizador efectivo menciona que la selección natural favorecerá aquellos rasgos morfológicos, fisiológicos o ecológicos de las plantas que atraen a los visitantes que llevan a cabo la polinización; así, la mayoría de las plantas son polinizadas por un grupo reducido de especies eficientes, lo que se conoce como especialización adaptativa mediada por polinizadores (Stebbins 1970, Armbruster y cols. 2000, Fenster y cols. 2004).

El grupo de especies eficientes en la polinización forman parte de un grupo funcional. A menudo, este conjunto de polinizadores comparten similitudes conductuales, y el grupo funcional es predecible con base en los síndromes de polinización. Mariposas, abejas pequeñas, abejorros, abejas colectoras de polen, palomillas, bombílidos, dípteros pequeños, colibríes, murciélagos, son ejemplos de grupos funcionales (Lázaro y cols. 2008).

La relación que existe entre las flores y sus visitantes ha permitido diferenciar la tendencia de una planta hacia la atracción de un grupo particular de animales, por ejemplo, alguno de los rasgos son el color y la forma de la corola, y estas preferencias permiten una clasificación entre el tipo de flor y su polinizador (van der Pijl 1961, Fishbein y Venable 1996, Thomson y cols. 2000, Castellanos y cols. 2003, Rausher 2008, Martén-Rodríguez y cols. 2010).

De las características florales que atraen a un grupo de polinizadores y dentro de éste, al polinizador efectivo o primario, se espera que las flores visitadas por este grupo compartan rasgos semejantes. De dicho razonamiento surge el concepto de síndrome de polinización; tal concepto refiere al conjunto de rasgos florales asociados a la atracción y utilización de un grupo de animales como polinizadores (van der Pijl 1961, Thomson y cols. 2000, Fenster y cols. 2004, Schiestl y Johnson 2013, Rosas-Guerrero y cols. 2014).

Los síndromes de polinización se clasifican según el grupo del polinizador, es decir, quien realiza la transferencia y colocación del polen entre plantas de especies particulares. De esta manera, aquellas flores usualmente polinizadas por grupos animales como escarabajos (cantharofilia), abejas (melitofilia), moscas (miofilia), mariposas diurnas (psicofilia), palomillas nocturnas (phalaenofilia), hormigas (mirmecofilia), murciélagos (quiropterofilia), y aves (ornitofilia); serán nombrados acorde a este concepto (van der Pijl 1961, Stebbins 1970, Shivana y Tandon 2014).

Las plantas que exhiben el síndrome de polinización ornitófilico generalmente presentan corolas de color rojo, con producción de néctar diluido y con alta proporción de sacarosa y baja concentración de aminoácidos, con anteras y estigma que sobresalen de la corola, el tubo floral angosto e inclinado, con pedicelos blandos y plataformas de aterrizaje reducidas o ausentes, sin olor y con el polen exhibido en un solo evento (Thomson y cols. 2000, Thomson 2003, Castellanos y cols. 2004, Thomson y Wilson 2008). Plantas con este síndrome están particularmente asociadas en América con los colibríes, los cuales son el principal grupo nectarívoro de aves en el continente (Gary 1981, Grant 1994).

Los colibríes generalmente muestran preferencia hacia las flores de color rojo. Por ejemplo, en una población de *Mimulus aurantiacus* (Phrymaceae), ubicada en la reserva ecológica de Cielo Azul, California, existen individuos cuyas flores tienen colores que van del naranja al rojo, los cuales fueron organizados dentro de cinco categorías: amarillo, amarillo-naranja, naranja, rojo-naranja y rojo. Los autores mencionan que los colibríes mostraron preferencia por las flores de color rojo, seguidas del color naranja y con menores visitas en las flores de color amarillo, aun cuando no hubo correlación con el tamaño de la flor y producción de néctar (Handelman y Kohn 2014).

Por otra parte, aquellas plantas polinizadas por himenópteros como las abejas, avispas, abejorros o síndrome de melitofilia (Thomson y Wilson 2008), presentan flores de color azul, violeta, blanco o amarillo, el néctar es de consistencia viscosa y es producido en pequeñas cantidades, con alta concentración de sacarosa, las anteras y estigmas no sobresalen de la corola, el tubo floral generalmente es ancho, usualmente poseen olor y el polen es exhibido en varios eventos de manera gradual (Thomson y cols. 2000, Wilson y cols. 2004, Wilson y cols. 2007).

Waser y cols. (1996), mencionan que el color de las flores forma un espacio fenotípico y cada polinizador percibe uno o alguno de estos colores. Estos autores mencionan que moscas y escarabajos realizan visitas de manera más frecuente en flores de color blanco mientras que abejas y mariposas visitan con mayor frecuencia las flores de color azul, púrpura, rosa y violeta. La percepción del polinizador asociada a su conducta, le confiere seleccionar ciertos rasgos florales, lo que sugiere las preferencias por parte del polinizador por algunos de estos rasgos particulares (Shiestl y Johnson 2013).

Diferentes estudios también han resaltado la importancia de otros rasgos florales en la atracción específica de visitantes animales, tales como el tamaño y ángulo de inclinación de la flor, la presencia o ausencia de estructuras a manera de pistas de aterrizaje, el grado de inserción de los órganos reproductivos, la concentración del néctar y las estructuras que contienen el polen (Fishbein y Venable 1996, Thomson y cols. 2000, Castellanos y cols. 2002, Castellanos y cols. 2003, Castellanos y cols. 2004, Wilson y cols. 2004, Castellanos y cols. 2006).

Del concepto de síndrome de polinización se han relacionado a los grupos funcionales, los cuales pueden contener varias especies y cualquier especie puede pertenecer a otros grupos funcionales, lo que es un sistema generalizado de polinización; y esta generalización sugiere que todos los polinizadores son equivalentes funcionalmente (Armbruster y cols. 2000, Fenster y cols. 2004, Martín-Rodríguez y cols. 2010).

Por otra parte, se ha sugerido que la evolución hacia la polinización por pocos grupos funcionales, o un cambio en la intensidad del uso de un conjunto de polinizadores pre-existentes, podría ser debida a cambios en rasgos florales como la forma, el color y el aroma (Fenster y cols. 2004, Martín-Rodríguez y cols. 2010). De esta manera, los grupos funcionales reflejan la especialización de la polinización, donde se reconoce que la expresión floral es el reflejo de las fuerzas selectivas mediada por la constitución del grupo funcional (Martín-Rodríguez y cols. 2010).

Así, en la ecología de la polinización se han definido dos sistemas de polinización, los sistemas generalizados y los sistemas especializados (Armbruster y cols. 2000; Martín-Rodríguez y cols. 2010). Es decir, si en un sistema hipotético dos especies de plantas que predominantemente son polinizadas por un grupo de cinco especies de abejas y veinte

especies de palomillas, respectivamente, un sistema especializado sería aquel donde una especie de planta es polinizada por las abejas y la otra especie es polinizada por las palomillas, pero si ambos grupos (abejas y palomillas) favorecen la polinización de ambas especies de plantas se habla de un sistema generalizado de polinización (Fenster y Martén-Rodríguez 2007).

Por ejemplo, Schemske y Horvitz (1984) mostraron en *Calathea ovandensis* (Maranthaceae), que cuando hay variación en el grupo de visitantes florales unos cuantos de ese grupo serán los polinizadores efectivos, una precondition para la especialización de las plantas sobre los polinizadores. Los autores analizaron la frecuencia de visitas y la formación de frutos en esta especie de planta; visitada por un grupo de nueve especies de insectos, pertenecientes a los órdenes Himenóptera (cinco especies) y Lepidóptera (cuatro especies). Sus resultados mostraron que los himenópteros realizaron más visitas (71%), y de estas visitas son responsables del 99% de la formación de frutos. Asimismo, dos especies de lepidópteros (*Heliconius ismenius* y *Astraptes* sp.) también fueron capaces de polinizar pero en menor medida en comparación con los himenópteros. La diferencia en la frecuencia de visitas y la formación de frutos en *C. ovandensis* sugiere al grupo de himenópteros como el grupo de polinizadores efectivos. Los autores concluyeron que el éxito reproductivo de una planta está en función de las características florales que determinan el número y tipo de visitantes que una planta puede atraer, estas características a su vez, determinan el potencial para la selección hacia los polinizadores. De esta manera, las flores de *C. ovandensis* pueden ser resultado de una previa selección para la especialización.

Por otro lado, Martén-Rodríguez y cols. (2010) evaluaron los sistemas de polinización de la tribu Gesnerieae, que incluye a los murciélagos, colibríes, palomillas y abejas visitantes, encontrando sistemas que van de la especialización a la generalización. Por ejemplo, *Gesneria pedunculosa* es polinizada por murciélagos, sus flores son acampanadas, blancas o verdes, con dehiscencia nocturna; *Gesneria decapleura* es polinizada por colibríes (de manera interesante, en ausencia de colibríes, es capaz de auto polinizarse) y sus flores son tubulares, rojas y con dehiscencia diurna; *Bellonia aspera* se ha especializado en la polinización por abejas grandes a través del zumbido y, las flores son

blancas, circulares, con los órganos reproductivos expuestos; *Rhytidophyllum auriculatum* es de flores sub acampanadas, flores diurnas y nocturnas, la polinización es realizada por colibríes, palomillas y murciélagos. Los autores mencionan que el efecto de los diferentes tipos de polinizadores en la diversificación floral de Gesnerieae es debido a la asociación de los fenotipos florales con los sistemas de polinización.

La presencia de sistemas de polinización especializados y generalistas también se han encontrado en otros grupos particulares de plantas, por ejemplo, en aquellas del género *Silene*. Por ejemplo, Reynolds y cols. (2009) evaluaron si los rasgos florales de las especies *Silene virginica*, *S. stellata* y *S. caroliniana*, especies cercanamente emparentadas, corresponden a lo predicho con base en los sistemas especializados de polinización. Para ello, analizaron sus rasgos florales (color, largo y ancho de pétalos y corola, calidad y volumen de néctar, antesis), la tasa de visitantes florales. Los autores realizaron experimentos de exclusión para determinar al polinizador primario y la producción de frutos por estas visitas. Demostraron que las tres especies tienen polinizadores diurnos y únicamente *S. stellata* tuvo un polinizador nocturno; los polinizadores primarios para *S. caroliniana* fueron abejas grandes y mariposas; *S. virginica* fue polinizada por colibríes (cuando estos están ausentes disminuye la producción de frutos) y *S. stellata* fue polinizada por palomillas. Los autores determinaron que *S. virginica* y *S. stellata* se especializaron a la polinización por colibríes y palomillas nocturnas, respectivamente, y *S. caroliniana* es menos especializada. Al comparar las tres especies, los estados divergentes de los rasgos florales fueron consistentes con el incremento en la atracción y/o eficiencia en la transferencia de polen y sus respectivos polinizadores primarios.

Aunque en los ejemplos antes mencionados se resalta el papel de los visitantes primarios para la especialización o generalización de los sistemas de polinización, muchas especies de plantas tienen polinizadores secundarios. Por ejemplo, en casos donde el polinizador primario no corresponde con el síndrome de polinización, es el polinizador secundario el que funge como el polinizador efectivo. Esto puede ser explicado considerando que en ausencia del polinizador primario, el polinizador secundario generalmente representa al polinizador ancestral del linaje de la planta, lo que refleja la

importancia de los polinizadores secundarios (Fenster y Dudash 2001, Reynolds y cols. 2009, Rosas-Guerrero y cols. 2014).

Lo mencionado anteriormente evidencia que la asociación de los rasgos florales con los grupos funcionales ha sido utilizada como una forma directa de probar hipótesis adaptativas hacia el tipo de polinizador. De esta manera, se sugiere que, los rasgos florales son seleccionados por los grupos funcionales de polinizadores, quienes ejercen medidas de selección que podrían explicar la convergencia en los caracteres florales, idea central dentro del concepto del síndrome de polinización (Stebbins 1970, Armbruster y cols. 2000, Fenster y cols. 2004).

Las presiones selectivas ejercidas por los grupos funcionales promueven la especialización a un subconjunto del grupo funcional, de esta manera, los cambios de un sistema generalizado a un sistema especializado de polinizadores es crucial en el entendimiento en la evolución floral (Armbruster y cols 2000, Fenster y cols. 2004, Martín-Rodríguez y cols 2010). Diferentes polinizadores pueden promover divergencia floral, por ejemplo, las especies cercanamente relacionadas en *Silene*, mientras que, polinizadores similares compartidos por diferentes especies de plantas, podrían promover convergencia en los rasgos florales, por ejemplo, el género *Penstemon* (Stebbins 1970, Fenster y cols. 2004, Wilson y cols. 2007, Reynolds y cols. 2009).

### **Cambios en la interacción planta-polinizador**

Se ha propuesto que en muchas familias de angiospermas la polinización por insectos es una condición ancestral y la polinización por aves es derivada, (Fleming y cols. 2009). De esta manera, el análisis de los cambios en los síndromes de polinización ha sido a través de reconstrucciones filogenéticas, por lo tanto, la reconstrucción es necesaria para conocer los síndromes de polinización (Beardsley y cols. 2003).

Por ejemplo, el género *Schizanthus* (Solanaceae) es endémico de la región andina de América del Sur, y datos moleculares y morfológicos indican que este género divergió temprano del resto de la familia Solanaceae. La reconstrucción ancestral de sus visitantes florales sugiere que las flores ancestrales fueron polinizadas por abejas. La única especie de este género que presenta las características del síndrome de polinización por colibríes es *S.*



*grahamii* y su especie hermana *S. hookeri* exhibe algunas características del síndrome de polinización por colibríes, como es el color rojo. Pérez y cols. (2006) sugieren que la combinación de los síndromes en *S. hookeri* puede ejemplificar el estado intermedio del cambio de polinización por abejas a la polinización por colibríes. La alta diversificación floral en *Schizanthus*, se sugiere, es producto de los cambios asociados con la adaptación a diferentes grupos de polinizadores presentes en los diferentes ecosistemas: mediterráneo, alpino y desierto. Una explicación en las transiciones a la polinización por colibríes es que ocurre en ambientes donde la actividad de insectos es baja (Pérez y cols. 2006).

Las fuerzas selectivas que son responsables del origen y sustento de los diferentes rasgos florales, definidos por los síndromes de polinización, pueden promover cambios en la adaptación de un polinizador a otro. Una transición evolutiva de polinizador son cambios que pueden experimentar diversos procesos evolutivos (Armbruster y cols. 2000, Thomson y Wilson 2008, Barrett 2013). Los síndromes de polinización son predecibles con base al polinizador efectivo, pero en ausencia de éste, el polinizador secundario es el que lleva a cabo la polinización y que forma parte del grupo funcional. Ejemplos de polinizadores secundarios son las aves en flores polinizadas principalmente por murciélagos, mariposas y moscas en flores polinizadas por abejas, y abejas en flores polinizadas por aves o por palomillas; abejas y escarabajos en flores que son polinizadas principalmente por moscas y avispas. De manera interesante, las flores polinizadas por moscas de probóscide larga no tienen polinizadores secundarios (Fenster y cols. 2004, Rosas-Guerrero y cols. 2014).

Rosas-Guerrero y cols. (2014) realizaron la primera evaluación cuantitativa de los síndromes de polinización en las angiospermas. A través de una revisión de los síndromes de 417 especies de plantas, pusieron a prueba la presencia de los polinizadores efectivos. Sus resultados soportan la idea de que la evolución convergente es dirigida por la adaptación de los grupos más efectivos de polinizadores. Asimismo, las tendencias de transiciones en los sistemas de polinización que reportan concuerdan con las mencionadas en otros estudios, por ejemplo, transición de abeja a palomilla, de abeja a ave (ver Beardsley y cols. 2003), y de ave a polinización por murciélagos (ver Muchhala 2007, Fleming y cols. 2009). De esta forma, se sugiere que de forma ancestral para las angiospermas, los himenópteros eran los polinizadores primarios (Cretácico), y que la

presencia de colibríes como polinizadores (Oligoceno) fue posterior. Situación similar sucede en la diversificación de los colibríes (como polinizadores secundarios) que antecede a la de los murciélagos. Estos patrones sugieren que las transiciones van de grupos de polinizadores ancestrales a los más recientes, un patrón común en la historia evolutiva de las angiospermas. Por todo ello, Rosas-Guerrero y cols. (2014) concluyen que los polinizadores secundarios son importantes para la reproducción de las plantas en ausencia de los polinizadores efectivos, además, podrían ser los promotores en las transiciones de un síndrome de polinización a otro.

Stebbins (1974) menciona que un cambio de polinizador a otro puede ocurrir al incrementar las adaptaciones en la efectividad de un polinizador cuando simultáneamente disminuye la efectividad del segundo (Steiner 1998, Fleming y cols. 2009). Por otra parte, el conjunto de rasgos florales en muchas especies de plantas tienen el potencial de adaptación a las nuevas condiciones bajo ambientes cambiantes de las presiones selectivas ejercidas por los polinizadores (Rosas-Guerrero y cols. 2014).

Los cambios en los sistemas de polinización pueden ocurrir a través de mutaciones florales. Por ejemplo, las transiciones en las flores de color azul a rojo; el cambio de color es generalmente causado por mutaciones, las cuales inactivan la actividad de la antocianina, lo que representa un cambio adaptativo en la preferencia por parte del polinizador. La antocianina son los pigmentos que otorgan los colores rojos, púrpuras o azules a las hojas, flores y frutos; en los géneros *Penstemon* e *Ipomoea* hay numerosas transiciones del color de las corolas de azul a rojo (Bradshaw y Schemske 2003, Rausher 2008).

Schemske y Bradshaw (1999) evaluaron la preferencia de los polinizadores (abejas y colibríes) hacia el color en dos especies de plantas cercanamente emparentadas del género *Mimulus*. *M. lewisii* es polinizada por abejas y exhibe las características florales del síndrome de polinización por estos visitantes, por otra parte, *M. cardinalis*, la otra especie, presenta las características florales del síndrome de polinización por colibríes y es polinizada por ellos. *M. cardinalis* se encuentra en la Sierra Nevada y *M. lewisii* en las Montañas Rocallosas, pero ambas especies se sobreponen al Sur del Río Tuolumne, California. Los autores realizaron observaciones de los visitantes de estas especies en la población que se sobreponen, y de manera interesante, las abejas solo visitaron a *M. lewisii*

y los colibríes a *M. cardinalis*. Los autores reportan que la concentración de antocianinas y carotenoides influyen en la elección por parte de los polinizadores: baja concentración de antocianinas favorece la visita de las abejas, altas concentraciones de antocianina favorece la visita por los colibríes y concluyen que las preferencias por parte de los polinizadores podrían contribuir a la evolución floral y a la permanencia del aislamiento reproductivo en este género.

En los ejemplos antes mencionados se ha observado que los síndromes de polinización reflejan la evolución convergente y la adaptación al polinizador efectivo del grupo funcional (Stebbins 1970, Fenster y cols. 2004). Los polinizadores secundarios no son menos importantes debido a las presiones selectivas que estos ejercen a lo largo de la historia evolutiva en los linajes de las plantas. Los sistemas generalizados favorecen el aseguramiento reproductivo por parte de las plantas cuando los polinizadores primarios son escasos o ausentes (Rosas-Guerrero y cols. 2014). Los estudios enfocados en la selección mediada por los polinizadores son de suma importancia para el entendimiento de la diversificación de las angiospermas.

### **Sistemas de polinización en el género *Penstemon***

El concepto de síndrome de polinización es comúnmente utilizado para generar hipótesis sobre la adaptación de los rasgos florales con respecto a las presiones selectivas por parte de los polinizadores, en este sentido, las plantas del género *Penstemon*, han sido un buen modelo de estudio debido a las interacciones con diferentes tipos de visitantes y sus polinizadores y, se ha evidenciado que la adquisición de rasgos florales han sido caracterizados por los síndromes de polinización y, de manera interesante, están aquellas especies de plantas que han cambiado de un tipo de polinizador a otro, por ejemplo, de abeja a colibrí.

El género *Penstemon* está integrado por aproximadamente 284 especies, y es considerado como el género endémico más grande de Norte América (Wolfe y cols. 2006, Wilson y cols. 2007). Se ha propuesto que las diferencias morfológicas de las especies que forman el género son el resultado de la alta plasticidad fenotípica, la gran variedad y

tamaño del genoma y, por presiones de selección por parte de los polinizadores (Broderick 2010).

El género antes mencionado, ha sido dividido en seis subgéneros, de los cuales dos son monotípicos, uno de ellos *Cryptostemon* está representado por *Penstemon personatus* y el subgénero *Dissecti* representado por *Penstemon dissectus*. Los otros cuatro subgéneros son *Habrohantus* (con 50 especies), *Sacantha* (con 28 especies), *Dasantha* (con 9 especies) y *Penstemon* (con 182 especies aproximadamente). Se considera a *Penstemon montanus* (subgénero *Dasantha*) más emparentada al subgénero *Penstemon*, por lo que se propone que los subgéneros *Dasantha* y *Penstemon* son grupos hermanos (Datwyler 2001, Datwyler y Wolfe 2004).

Por otra parte, dentro de los sistemas de apareamiento reportados para el género son: sistemas auto-compatibles: *P. centranthifolius*, *P. pinifolius* y *P. rostrifolius*; sistemas parcialmente auto-compatibles: *P. roseus* y sistemas auto-incompatibles como *P. ellipticus* (especie basal del linaje de *Penstemon*), *P. barbatus* y *P. palmeri*, sistemas desarrollados como estrategias por parte de las plantas para asegurar la reproducción cuando los polinizadores son escasos (sistemas auto-compatibles) o abundantes (sistemas auto-incompatibles) (Lange y Scott 2000, Walker-Lanser y Harder 2001, Barrett 2002, Fenster y Martín-Rodríguez 2007, Lara y Ornelas 2008).

La amplia variación de la morfología floral presente en este grupo de plantas es atractiva a una gran variedad de insectos, por ejemplo, abejas, avispas y abejorros; y de aves, como los colibríes; siendo estos animales los que llevan a cabo la polinización en diferentes especies del género (Thomson y cols. 2000, Fenster y cols. 2004, Wilson y cols. 2004, Wolfe y cols. 2006, Lara y Ornelas 2008).

Existen dos grandes sistemas de polinización en *Penstemon*, por abejas y por colibríes. La gran mayoría de las especies son polinizadas principalmente por diferentes especies de abejas y algunas especies de avispas. El grupo de los himenópteros son considerados los polinizadores ancestrales en este género (Straw 1956, Grant 1994, Walker-Larsen y Harder 2001, Dieringer y Cabrera 2002, Wilson y cols. 2007).

De manera interesante, existen 41 especies de *Penstemon* que son polinizadas por colibríes; relación que se considera ha evolucionado al menos 13 veces de forma

independiente dentro del género y, la polinización por colibríes es relativamente reciente (Grant 1994, Wilson y cols. 2004). Por otra parte, dentro del género, se han reportado sistemas de polinización mixto, es decir, tanto abejas como colibríes son polinizadores. Un ejemplo interesante de este sistema de polinización es en *Penstemon pseudospectabilis*. Reid y cols. (1988) realizaron un trabajo en Arizona, donde excluyen polinizadores y permiten a un cierto número de plantas las visitas de colibríes y, a otro grupo sólo la visita de abejas, excluyendo en ambos casos cualquier otro visitante. El grupo que recibió visitas de abejas tuvo formación de semillas al igual que el grupo que le fue permitido sólo visitas por colibríes.

Una posible explicación de los diferentes sistemas de polinización reportados para el género es que existen mecanismos selectivos asociados con los grupos de polinizadores y su eficacia en la transferencia del polen (Barrett 2013) y por otra parte, estos mecanismos selectivos pueden no solo favorecer la transferencia del polen sino afectarla y, de ésta manera excluir a un grupo de polinizadores (Castellanos y cols. 2003, Castellanos y cols. 2004).

Esta dualidad: características del polinizador y de las flores, son tan específicas que puede promover incluso que linajes hermanos tomen rumbos evolutivos distintos (Wilson y cols. 2007). Este fenómeno ha podido observarse en el género *Penstemon*, donde se han estudiado los mecanismos que han operado y que han contribuido a la gran diversidad floral dentro de este grupo de plantas (Castellanos y cols. 2004, Wilson y cols. 2004, Wilson y cols. 2006, Wolfe y cols. 2006, Wilson y cols. 2007).

Como se ha mencionado, *Penstemon* es un género en el cual los síndromes de polinización parecen estar bien definidos. Sin embargo, existen especies de plantas en este grupo que pueden mostrar características asociadas a los dos síndromes (color, calidad del néctar y morfología floral) y, en consecuencia, reciben la visita de ambos tipos de polinizadores. Esta particularidad, permite evaluar el posible papel que ejerce el tipo de visitante en la adquisición o pérdida de determinados rasgos para promover una transición hacia un síndrome particular (Lara y Ornelas 2008).

En una filogenia general de *Penstemon* se deduce una evolución convergente en los sistemas de polinización. Las especies polinizadas por colibríes se encuentran repartidas a

lo largo de todo el género y se ubican en los clados más inclusivos del árbol filogenético en comparación con las especies polinizadas por abejas, lo que sugiere que las transiciones han sido de polinización por insectos a polinización por colibríes (Wilson y cols. 2006, Wolfe y cols. 2006). De esta manera, resulta interesante determinar aquellos cambios en los rasgos florales que promovieron las transiciones a polinización por colibríes y en algunos casos llegar a la exclusión de la polinización por abejas (Castellanos y cols. 2003).

Por ejemplo, Castellanos y cols. (2003) compararon la eficiencia de transferencia de polen entre abejorros y colibríes en dos especies del género *Penstemon*, *P. barbatus* con síndrome de polinización por colibríes (flores rojas) y *P. strictus* con síndrome de polinización por abejas (flores moradas). Los colibríes demostraron ser eficientes en transferir polen de *P. strictus* y, los abejorros depositaron más granos de polen por visita que los colibríes. Sin embargo, la mayoría de los granos transportados por abejas se quedaban en las primeras flores visitadas, mientras que los colibríes transfieren de manera constante el polen. Los autores sugieren que los colibríes pueden ser más eficientes transfiriendo polen debido a que no lo consumen ni tienen adaptaciones específicas para recolectarlo. Para el caso de *P. barbatus* los colibríes fueron mucho más eficientes que en las flores de *P. strictus*. Se atribuye esta eficiencia a la forma de tubo alargado y angosto de la flor, lo que asegura un mejor contacto de los órganos reproductivos con la cabeza y frente del colibrí.

En el género *Penstemon* los cambios a una polinización por colibríes parecen resultar en una buena transferencia y deposición de polen, conllevando a que las abejas sean ineficientes. Dicha idea llevó a Castellanos y cols. (2004) a investigar si los rasgos florales pueden evolucionar hacia la exclusión de los polinizadores menos eficientes. Los autores se enfocaron en el estudio de cuatro rasgos florales que juegan un papel importante en la transferencia de polen debido a la interacción física entre el polinizador y la flor. Estos rasgos fueron modificados en *P. strictus* de la siguiente manera: las anteras y estigmas se proyectaron a 4 mm fuera de la corola, los pétalos de *P. strictus* fueron fusionados e inclinados, y se colocó un aro para reducir el diámetro de la corola a manera de evitar la pista de aterrizaje, y de esta manera simular la posición y forma de las flores de *P. barbatus*. Los resultados obtenidos sugirieron que varios rasgos florales tienen una

función anti-abeja, por ejemplo, extender las anteras y estigmas redujo el contacto con los abejorros, así mismo, los granos de polen depositados por ellos; constreñir el tubo (quitar la pista de aterrizaje) e inclinar las flores afectó la eficiencia de transferencia de polen y su atracción hacia las flores pero sin afectar la eficiencia de los colibríes. El inclinar las flores provocó el aumento en el tiempo que un abejorro necesitaba para visitarlas, aunque disminuyó la transferencia de polen por los colibríes y concluyen que la adquisición de determinados rasgos florales favorece a la polinización por colibríes y evitan la polinización por abejas.

Los rasgos evaluados por Castellanos y cols. (2004) se enfocan en las flores, por otra parte, es importante considerar que por sí mismas, las flores son órganos integrados en los que los rasgos cambian de manera conjunta y no independiente. Por ello, estos autores mencionan que otros rasgos asociados a las recompensas como lo es el néctar y el polen son importantes en las posibles transiciones en la polinización.

Avances recientes en el entendimiento de la función de las flores como donadoras y receptoras de polen, se han propuesto modelos que explican cómo la variación en la presentación de polen podría afectar el éxito reproductivo de las plantas. Por ejemplo, se ha sugerido que si los polinizadores son frecuentes, las plantas deberían colocar dosis pequeñas y restringidas de polen en los visitantes, esperándose mayor polinización y fecundación de más semillas que aquellas plantas que colocan la mayoría o todo su polen al primer visitante (Thomson y cols. 2000).

Si las visitas de polinizadores son raras y las plantas que tienen libre acceso de su polen deberían ser más exitosas, en este sentido, la Teoría de Presentación de Polen (TPP) pone atención en la forma en que las plantas controlan la transferencia de polen a través de características estructurales (e.g., la extensión a la cual las anteras son abiertas o permanecen cerradas), de desarrollo (e.g., anteras que abren gradualmente o asincrónicamente) y fisiológicas (e.g., cantidad y horario de secreción de néctar) en conjunto con la manera de liberar el polen (Thomson y cols. 2000).

En el género *Penstemon* se predice que los cambios hacia un tipo de polinizador específico puede ocurrir cuando un visitante con baja remoción y alta deposición de polen llega a ser abundante (Thomson y cols. 2000) y/o la composición y la dinámica de la

secreción del néctar afectan las visitas y en consecuencia, la producción de semillas (Castellanos y cols. 2002, Ornelas y Lara 2009).

En este sentido, diversos trabajos en las especies de *Penstemon* han evaluado el papel de los distintos rasgos florales en la especialización hacia polinizadores específicos. Por ejemplo, Wilson y cols. (2006) mencionan que la concentración del néctar es un rasgo por el cual difieren los polinizadores en *Penstemon*. En las especies de este género polinizadas por colibríes, el néctar que producen es generalmente más diluido en comparación con las especies polinizadas por abejas. Por ejemplo, en *P. barbatus* (síndrome por colibríes) los niveles de néctar son aproximadamente 5.4  $\mu\text{L}$  al 25% de azúcar, mientras que *P. strictus* (síndrome por abejas) es de 0.4  $\mu\text{L}$  al 42%. La cantidad y concentración del néctar requeridas por los colibríes hacen frecuentes sus visitas en las flores de *Penstemon*, por lo que se ha sugerido que este rasgo es el primer carácter que cambia en la polinización de abejas a colibríes (Wilson y cols. 2006).

Lara y Ornelas (2008) realizaron un estudio en La Malinche, Tlaxcala, con *Penstemon roseus*, una especie endémica de México, donde uno de los rasgos evaluados fue el néctar. Sus datos mostraron que el azúcar por flor (1-3 días) fue de 0.3 a 0.65 mg/ml, un valor bajo si se compara con otras especies polinizadas por colibríes, como *P. barbatus* con 1.51-1.78 mg/ml, *P. pinifolius* con 1.56 a 2.19 mg/ml, en *P. centrathifolius* con 5.37 mg/ml, *P. pseudospectabilis* con 3.96 mg/ml y *P. havardii* con 3.89 mg/ml. Los autores mencionan que los valores bajos de *P. roseus* podría ser un reflejo del estrés ambiental y /o la especialización a la polinización por colibríes debido a que los nectarios son rellenos con néctar diluido. Esta especie presenta una serie de caracteres asociados a la transición de polinización por abejas a la polinización por colibríes, aun cuando su morfología floral tiene aspectos relacionados al síndrome de polinización por abejas, son colibríes los vectores principales de su polen.

En la misma zona de estudio se encuentra *P. gentianoides*, una especie con floración de julio a octubre y con los rasgos característicos del síndrome de polinización por abejas, pues sus flores son de color azul-lavanda, no tubulares y con presencia de marcas asociadas a pistas de aterrizaje; sin embargo, reportes previos sugieren que los principales visitantes son los colibríes (Lara 2006).



La floración de esta planta coincide con la presencia de especies de colibríes tales como *Hylocharis leucotis*, *Eugenes fulgens*, *Archilochus colubris*, *Colibri thalassinus*, *Lampornis clemenciae*, *Selasphorus platycercus*, *S. rufus* y *S. sasin* (Lara 2006, Lara y cols. 2009).

La presencia de esta especie de planta en La Malinche, es una oportunidad excelente para poner a prueba si la planta presenta los rasgos asociados al cambio de un tipo de polinizador a otro, según lo propuesto por Castellanos y cols. (2004) y Zung y cols. (2005). Por ello, este sistema es utilizado en la presente tesis atendiendo el análisis de la información obtenida para describir la biología floral y reproductiva de esta especie, con la finalidad de determinar si presenta un sistema de polinización mixto basado en las visitas de abejorros y colibríes (Capítulo 1). Posteriormente se analiza el papel de la modificación de los rasgos florales que intervienen en la transferencia de polen a través de manipulaciones experimentales, donde se simula la adquisición de rasgos asociados a la polinización de colibríes en *P. gentianoides*, y se relacionan con la eficiencia polinizadora y el efecto en la atracción de abejorros (Capítulo 2).

## HIPÓTESIS

Si las características de la biología floral de *Penstemon gentianoides* corresponden al síndrome de polinización por abejas, entonces los abejorros serán los polinizadores, aun cuando los colibríes sean visitantes frecuentes.

## PREDICCIONES

- Las flores de *Penstemon gentianoides* serán longevas, y con bajo volumen y concentración de néctar.
- La presentación del polen será gradual en correspondencia con la constante tasa de visita de los abejorros.
- Esta tasa de visitas por parte de los abejorros será mayor en comparación con la realizada por colibríes.
- Los abejorros serán los polinizadores en *Penstemon gentianoides* y los colibríes serán visitantes frecuentes.
- La simulación de rasgos ornitofílicos en las flores de *Penstemon gentianoides* afectará el contacto de las estructuras reproductivas de la planta con el cuerpo de los abejorros.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar observacional y experimentalmente el síndrome de polinización de *Penstemon gentianoides* en el Parque Nacional La Malinche, Tlaxcala.

### **Objetivos Particulares**

- Describir la biología floral y sistema reproductivo de *Penstemon gentianoides*.
- Describir el ensamblaje de abejorros y colibríes visitantes y sus patrones de visita en *Penstemon gentianoides*.
- Evaluar la eficiencia de polinización de colibríes y abejorros en esta especie de planta.
- Evaluar el efecto de la simulación de rasgos ornitófilicos en la eficiencia de la polinización de los abejorros.

## LITERATURA CITADA

- Armbruster WS, Fenster CB y Dudash MR. 2000. Pollination “principles” revisited: specialization, pollination syndromes, and the evolution of flowers. *Det Nor Vidensk Acad I Mat Natur Kl Skr Ny Ser* 39: 179-200.
- Araújo FP, Almeida BAA y Olivera PE. 2011. Floral resources and hummingbirds on an island of flooded forest in Central Brazil. *Flora* 206: 827-835.
- Barrett SCH y Harder LD. 1996. Ecology and evolution of plant mating. *TREE* 11 (2): 73-79.
- Barrett SCH. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nat Rev Genet* 3: 274-284.
- Barrett SCH. 2013. The evolution of plant reproductive systems: how often are transitions irreversible?. *Proc R Soc B* 280: 20130913.
- Beardsley PM, Yen A y Olmstead RG. 2003. AFLP phylogeny of *Mimulus* section *Erythranthe* and the evolution of hummingbird pollination. *Evolution* 57(6): 1397-1410.
- Bradshaw HD y Schemske DW. 2003. Allele substitution at a flower color locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. *Nature* 426: 176-178.
- Broderick SR. 2010. An examination of the DNA content, taxonomy and phylogeny of *Penstemon* (Plantaginaceae) All thesis and dissertation, paper 2044.
- Castellanos MC, Wilson P y Thomson JD. 2002. Dynamic nectar replenishment in flowers of *Penstemon* (Scrophulariaceae). *Am J Bot* 89(1): 111-118.
- Castellanos MC, Wilson P y Thomson JD. 2003. Pollen transfer by hummingbirds and bumblebees, and the divergence of pollination modes in *Penstemon*. *Evolution* 57(12): 2742-2752.
- Castellanos MC, Wilson P y Thomson JD. 2004. ‘Anti-bee’ and ‘pro-bird’ changes during the evolution of hummingbird pollination in *Penstemon* flowers. *J Evol Biol* 17: 876-885.
- Castellanos MC, Wilson P, Keller SJ, Wolfe AD y Thomson D. 2006. Anther evolution: pollen presentation strategies when pollinators differ. *Am Nat* 167(2): 288-296.

- Datwyler SL. 2001. Evolution and dynamics of hybridization in *Penstemon* subgenus *Dasanthera* (Scrophularaceae). Dissertation for the degree Doctor of Philosophy. The Ohio State University. USA.
- Datwyler SL y Wolfe AD. 2004. Phylogenetic relationships and morphological evolution in *Penstemon* subgen. *Dasanthera* (Veronicaceae). *Syst Bot* 29(1): 165-176.
- Del Val E y Dirzo R. 2004. Mirmecofilia: Las plantas con ejército propio. *Interciencia* 29(12):673-679.
- Dieringer G y Cabrera-R L. 2002. The interaction between pollinator size and the bristle staminode of *Penstemon digitalis* (Scrophulariaceae). *Am J Bot* 89(6): 991-997.
- Fenster CB y Dudash MR. 2001. Spatiotemporal variation in the role of hummingbirds as pollinators of *Silene virginica*. *Ecology* 82 (3): 844-851.
- Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR y Thomson JD. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 35: 375-403.
- Fenster CB y Martén-Rodríguez S. 2007. Reproductive assurance and the evolution of pollination specialization. *Int J Plant Sci* 168 (2): 215-218.
- Fleming TH, Geiselman C y Kress WJ. 2009. The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Ann Bot* 104:1017-1043.
- Fishbein M y Venable DL. 1996. Diversity and temporal change in the effective pollinators of *Asclepias tuberosa*. *Ecology* 77(4): 1061-1073.
- Fontúrbel F. 2002. Rol de la coevolución planta insecto en la evolución de las flores cíclicas en las angiospermas. *Ciencia básica*. 17:11.
- Fontúrbel F y Molina C. 2005. Mecanismos genéticos del proceso de coevolución. *Elementos* 57: 21-27.
- Gary Stiles F. 1981. Geographical aspects of bird-flower coevolution, with particular reference to Central America. *Ann Missouri Bot Gard* 68: 323-351.
- Grant V. 1994. Historical development of ornithophily in the western North American flora. *Evolution* 91: 10407-10411.
- Handelman C y Kohn JR. 2014. Hummingbird color preference within a natural hybrid population of *Mimulus aurantiacus* (Phrymaceae). *Plant Spec Biol* 29: 65-72.

- Hu S, Dilcher DL, Jarzen DM y Tylor DW. 2008. Early steps of angiosperm-pollinator coevolution. PNAS 105(1): 240-245.
- Janzen DH. 1980. When is coevolution? Evolution 34(3): 611-612.
- Kay KM y Sargent RD. 2009. The role of animal pollination in plant specialization: integrating ecology, geography, and genetics. Annu Rev Ecol Evol S 40: 637-656.
- Lange RS, Scobell SA y Scott PE. 2000. Hummingbird-Syndrome traits breeding system, and pollinator effectiveness in two syntopic *Penstemon* species. Int J Plant Sci 161(2): 253-263.
- Lara C. 2006. Temporal dynamics of flower use by hummingbirds in a highland temperate forest in Mexico. Ecoscience 13: 23-29.
- Lara C y Ornelas JF. 2008. Pollination ecology of *Penstemon roseus* (Plantaginaceae), an endemic perennial shifted toward hummingbird specialization?. Plant Syst Evol 271: 223-237.
- Lara C, Lumbreras K y González M. 2009. Niche partitioning among hummingbirds foraging on *Penstemon roseus* (Plantaginaceae) in Central Mexico. Ornitol Neotrop 20: 73-83.
- Lázaro A, Hegland SJ y Totland O. 2008. The relationships between floral traits and specificity of pollination systems in three Scandinavian plant communities. Oecologia 157: 249-257.
- Martín-Rodríguez S, Fenster CB, Agnarsson I, Skog LE y Zimmer EA. 2010. Evolutionary breakdown of pollination specialization in a Caribbean plant radiation. New Phytol 188: 403-417.
- Muchhala N. 2007. Adaptive Trade-Off in floral morphology mediates specialization for flowers pollinated by bats and hummingbirds. Am. Nat. 169(4): 494-504.
- Ollerton J. 1999. La evolución de las relaciones polinizador-planta en los artrópodos. Bol. S.E.A. 26:741-758.
- Odum E. 1995. Ecología: Peligra la vida. Edit. Interamericana. México. pp 192.
- Ornelas JF y Lara C. 2009. Nectar replenishment and pollen receipt interact in their effects on seed production of *Penstemon roseus*. Oecología 160: 675-685.

- Pérez F, Arroyo MTK, Medel R y Hershkovitz MA. 2006. Ancestral reconstruction of flower morphology and pollination systems in *Schizanthus* (Solanaceae). *Am J Bot* 93(7): 1029-1038.
- Rausher MD. 2008. Evolutionary transitions in floral color. *Int. J. Plant Sci.* 169 (1): 7-21.
- Reid WH, Sensiba P y Freeman E. 1988. A mixed pollination system in *Penstemon pseudospectabilis*. M.E. Jones. (Scrophulariaceae). *Great Basin Nat* 48 (4): 489-494.
- Reynolds RJ, Westbrook MJ, Rohde AS, Cridland JM, Fenster CB y Dudash MR. 2009. Pollinator specialization and pollination syndromes of three related North American *Silene*. *Ecology*. 90(8): 2077-2087.
- Rosas-Guerrero V, Aguilar R, Martén-Rodríguez S, Ashworth L, Lopezaraiza-Mikel M, Bastida JM y Quesada M. 2014. A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators?. *Ecol Lett* 17: 388-400.
- Schemske DW y Bradshaw HD. 1999. Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). *PNAS* 96(21): 11910-11915.
- Schemske DW y Horvitz CC. 1984. Variation among floral visitors in pollination ability: A precondition for mutualism specialization. *Science* 225: 519-521.
- Schiest FP y Johnson SD. 2013. Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends Ecol Evol* 28(5): 307-315.
- Shivana KR y Tandon R. 2014. Reproductive ecology of flowering plants: A manual. Springer India. 1-170 pp.
- Stebbins GL. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms I: Pollination mechanisms. *Ann Rev Ecol Syst* 1: 307-326.
- Steiner KE. 1998. The evolution of beetle pollination in a South African orchid. *Am J Bot* 85(9): 1180-1193.
- Straw RM. 1956. Floral isolation in *Penstemon*. *Am Nat* 90(850): 47-53.
- Thomson JD, Wilson P, Valenzuela M y Malzone M. 2000. Pollen presentation and pollination syndromes, with special reference to *Penstemon*. *Plant Spec Biol.* 15: 11-29.

- Thompson JD. 2001. How do visitation patterns vary among pollinators in relation to floral display and floral design in a generalist pollination system?. *Oecologia* 126:386-394.
- Thomson J. 2003. When is it mutualism?. *Am Nat* 162: 1-9.
- Thomson JD y Wilson P. 2008. Explaining evolutionary shifts between bee and hummingbird pollination: convergence, divergence and directionality. *Int. J. Plant Sci.* 169(1): 23-38.
- Toon A, Cook LG y Crisp MD. 2014. Evolutionary consequences of shifts to bird-pollination in the Australian Pea flowered legumes (Mirbelieae and Bossiaeeae). *Evol Biol* 14:43.
- Van der Pijl L. 1961. Ecological aspects of flower evolution II Zoophilous flower clases. *Evolution* 15: 44-59.
- Walker-Larsen J y Harder DH. 2001. Vestigial organs as opportunities for functional innovation: the example of the *Penstemon* staminode. *Evolution* 55(3): 477-487.
- Waser NM, Chittka L, Price MV, Williams NM y Ollerton J. 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* 77(4): 1043-1060.
- Wilson P, Castellanos MC, Hogue JM, Thomson JD y Armbruster SW. 2004. A multivariate search for pollination syndromes among *Penstemons*. *Oikos* 104: 345-361.
- Wilson P, Castellanos MC, Wolfe AD y Thomson JD. 2006. Shifts between bee and bird pollination in *Penstemon*. En: *Plant-pollinator interactions, from specialization to generalization*. Waser Nm y Ollerton J(eds). The University of Chicago Press. Chicago. pp 47-68.
- Wilson P, Wolfe AD, Armbruster WS y Thomson JD. 2007. Constrained lability in floral evolution: counting convergent origins of hummingbird pollination in *Penstemon* and *Keckiella*. *New Phytol* 176: 883-890.
- Willmer P. 2011. *Pollination and floral ecology*. Princeton University press.
- Wolfe AD, Randle CP, Datwyler SL, Morawets JJ, Arguedas N y Díaz J. 2006. Phylogeny, taxonomic affinities, and biogeographic of *Penstemon* (Plantaginaceae) base on ITS and cpDNA sequence data. *Am J Bot* 93(11): 1699-1713.



## CAPÍTULO 1

### **Reproductive biology and nectar secretion dynamics of *Penstemon gentianoides* (Plantaginaceae): a perennial herb with a mixed pollination system?**

Lucia del Carmen Salas-Arcos<sup>1</sup>, Carlos Lara<sup>2</sup>, and Juan Francisco Ornelas<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Carretera Tlaxcala-Puebla Km 1.5, 90070 Tlaxcala, Mexico.

<sup>2</sup> Centro de Investigación en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala, Km. 10.5 Autopista Tlaxcala-San Martín Texmelucan, San Felipe Ixtacuixtla, Tlaxcala 90120, Mexico

<sup>3</sup> Departamento de Biología Evolutiva, Instituto de Ecología, A.C. (INECOL), Xalapa, Veracruz, Mexico.

Publicado en: PeerJ (2017) 5: e3636;DOI 10.7717/peerj.3636

## ABSTRACT

**Background:** In many plant species, pollination syndromes predict the most effective pollinator. When syndromes fail, the pollinator predicted is still present within the pollinator assemblage as the main secondary pollinator of the syndrome and may represent the ancestral pollination system of the plant lineage. Several species of the species-rich *Penstemon* exhibit a suite of floral traits that suggest adaptation for pollination by both hymenopterans and hummingbirds. Transitions from the ancestral hymenopteran pollination syndrome to more derived hummingbird pollination syndrome may be promoted if the quantity or quality of visits by hummingbirds is increased and if the ancestral pollinator group performs less efficiently. However, the quantification of such shifts in pollination systems in the group is still limited. We aimed to investigate floral traits linked to this pollination syndrome in *Penstemon gentianoides* (Plantaginaceae) with flowers visited by bumblebees and hummingbirds.

**Methods:** We investigated the floral biology, pollinator assemblages, breeding system and nectar production patterns of *P. gentianoides* inhabiting a temperate montane forest in central Mexico. Flowers of this species were also pollinated by either bumblebees or hummingbirds to assess their effectiveness as pollinators.

**Results:** *Penstemon gentianoides* flowers exhibited a protandrous breeding system, with 8-d male phase (staminate) flowers, followed by the ~ 1–7 d female phase (pistillate phase). Flowers display a suite of traits associated with hymenopteran pollination, including purple flowers abruptly ampliate-ventricose to a broad throat with anthers and stigmas included, and long lifespans. However, the abundant and dilute nectar available in the morning hours is linked to flowers with a hummingbird pollination syndrome. Two hummingbird species made most of the visits to flowers throughout the day, *Selasphorus platycercus* (30.3% of all visits), followed by *Archilochus colubris* (11.3%). Bumblebees (*Bombus ephippiatus*, *B. huntii* and *B. weisi*) accounted for 51.8% of all recorded visits, but their foraging activity was restricted to the warmer hours. Hummingbirds made more foraging bouts and visited more flowers per foraging bout to *P. gentianoides* plants than hymenopteran species, particularly early in the morning, but at noon and afternoon the latter exceed in their visits. Flowers experimentally pollinated by *B. ephippiatus* produced significantly more fruits than those pollinated by *S. platycercus*. However,

there was no statistical difference in the number of seeds produced per fruit when a bumblebee or a hummingbird was the pollinator.

**Conclusions:** We have shown that bumblebees and hummingbirds visit *P. gentianoides* flowers. Despite floral traits resembling the hymenoptera pollination syndrome, flowers of *P. gentianoides* offer characteristic nectar rewards to flowers with a hummingbird pollination syndrome. Although pollination efficiency is higher among flowers visited by hymenoptera, the remarkable percentage of fruit production and seed set derived from hummingbird pollination supports the relative importance of hummingbirds as a functional group of pollinators that might have potential evolutionary consequences to the plants.

**Subjects** Biodiversity, Ecology, Evolutionary Studies, Plant Science

**Keywords** Hummingbirds, Hymenoptera, *Penstemon*, Plantaginaceae, Mixed-pollination Syndrome

## INTRODUCTION

Animal pollination is the basis of pollen transfer and directed outcrossing, and the selection exerted on plant traits represents an important force in the process of reproductive isolation and speciation underlying the diversification of flowering plants (Ollerton, 1999; Thompson, 2001; Hu et al., 2008; Kay & Sargent, 2009; Toon, Cook & Crispi, 2014). Animal pollinators obtain most commonly pollen or nectar resources from the flowers they visit, leading to an interaction with divergent 'interests' and sometimes to an extreme dependence on these rewards (Proctor, Yeo & Lack, 1996). To maintain pollinator services, flowering plants have evolved suites of floral traits (so called 'pollination syndromes'; Faegri & van der Pijl, 1979) and specialized mechanisms to filtering functional groups of pollinators such as insects or birds to act as the main pollinators (van der Pijl, 1961; Stebbins, 1970; Shivana & Tandon, 2014).

Although insects represent the most important pollinators of flowering plants, pollination by vertebrate animals plays also a fundamental role (Proctor, Yeo & Lack, 1996). In the Americas, hummingbirds (Trochilidae) can support pollination of around 15% of Angiosperms in any environment (Buzato, Sazima & Sazima, 2000). These plants generally possess very distinctive floral traits from those pollinated by insects (ornitophily; van der Pijl, 1961; Faegri & van der Pijl, 1979). Typically, flowers pollinated by hummingbirds are distinguished by presenting red and alike colors, dilute nectar, amino acids in low concentrations, and a high proportion of sucrose (Brown & Kodrick-Brown, 1979; Freeman et al., 1984). Other morphological traits include anthers and stigma protruding from the corolla, a narrow and tilted floral tube, soft pedicels, and limited or absent landing structures; they are scentless and pollen is generally displayed on a single event (Martínez del Rio, 1990; Thomson et al., 2000; Castellanos, Wilson & Thomson, 2004; Thomson & Wilson, 2008). On the other hand, flowers pollinated by diverse type of bees (melittophily) usually show blue, violet, white or yellow colors and they present low quantities of nectar of a sticky, viscous consistency containing a low ratio of sucrose (Proctor, Yeo & Lack, 1996). Also, anthers and stigma usually stand within the corolla and in most cases, the floral tube is wide; they scent and the pollen is displayed gradually in several events (Thomson et al., 2000; Wilson et al., 2004; Wilson et al., 2007).

Native to North America, *Penstemon* (Plantaginaceae) species (280–284 perennial herbs and sub-shrubs) show a wide floral variety and pollination systems (Wolfe et al., 2006; Wilson et al.,

2007; Wessinger et al., 2016). Although most species have flowers pollinated by diverse type of insects (bees, bumblebees, butterflies, wasps, flies), flowers of 41 species are hummingbird-adapted (Lyon & Chadek, 1971; Bateman, 1980; Clinebell & Bernhardt, 1998; Tepedino, Sipes & Griswold, 1999; Wilson et al., 2004; Tepedino et al., 2007; Wilson et al., 2007; Lara & Ornelas, 2008). Traits associated with hymenopteran pollination in this group of *Penstemon* species include blue or purple short corollas, petals joined as a landing platform, and reproductive structures included within such corollas (Thomson et al., 2000). In contrast, *Penstemon* species pollinated by hummingbirds usually display red long tubular corollas, exerted reproductive structures and do not possess joined petals (Wilson et al., 2004). Within the genus, however, there are species that overlap between these pollination syndromes. When this occurs, plants show suites of floral traits linked to attract and reward both pollinator types and both insects and hummingbirds transfer and deposit pollen effectively (Reid, Sensiba & Freeman, 1988; Lange & Scott, 1999; Lara & Ornelas, 2008). These pollination systems have been considered as transitions between pollination syndromes, i.e. intermediate stages regarding shifts from 'bee' pollination toward hummingbird pollination (Wilson et al., 2006; Wilson et al., 2007; Lara & Ornelas, 2008; Ornelas & Lara, 2009; Rosas-Guerrero et al., 2014).

*Penstemon gentianoides* (Kunth) Poir. is a species with melittophilous floral traits, which suggest bumblebee pollination (Wilson et al., 2004). However, several hummingbird species were reported defending intensively the floral patches of this species (Lara, 2006). Here we investigated the pollination biology of *P. gentianoides* and hypothesized a mixed pollination system. Specifically, we focused on the pollination biology and breeding system of *P. gentianoides*, and described its floral visitors, quantified nectar secretion dynamics, and determined the relative pollinator effectiveness of main floral visitors of a *P. gentianoides* population inhabiting a temperate montane forest in central Mexico. The study was centered on the following questions: (1) are the suites of floral traits a transition from ancestral hymenopteran pollination syndrome to more derived hummingbird pollination syndrome; (2) Is the quantity or quality of visits increased when visited by hummingbirds; and (3) Are the ancestral pollinator group (bumblebees) less effective as pollinators?

## METHODS

### Field study permissions

We obtained permits for fieldwork from the Mexican government to conduct this work from the Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Dirección General de Vida Silvestre (permit number: INE, SEMARNAT, SGPA/DGGFS/02439/16/0296). The permit specifically allowed for the fieldwork at the study area through municipal and community authorities of La Malinche National Park.

### Study sites

Fieldwork was carried out from July to November 2014 and from July to December 2015–2016 in a temperate montane forest located at the La Malinche National Park, in the state of Tlaxcala, Mexico (19°15.205'N, 098°02.080'W; at 3,700 m above sea level, m a.s.l.). Mean annual precipitation is 800 mm, the rainy season is between June and October, and mean annual temperature is 15°C. Coniferous forest is the dominant vegetation type. Above 3,500 m a.s.l., pine forest contains pure stands of *Pinus hartwegii* Lindl. and *Abies religiosa* (Kunth) Schlttdl. & Cham. The main shrubs are *Baccharis conferta* Kunth and *Eupatorium glabratrum* Kunth and herbaceous plants include *Senecio platanifolius* Benth., *Muhlenbergia macroura* (Kunth) Hitchc., and *P. gentianoides* (Lara, 2006; Villers, Rojas & Tenorio, 2006).

### Study species

*Penstemon gentianoides* is an herbaceous perennial plant commonly found in pine and fir forests (3,000–4,200 m a.s.l.) along the Trans-Mexican Volcanic Belt (Michoacán, State of Mexico, Puebla, Tlaxcala, Oaxaca and Veracruz) southward into Chiapas and Guatemala (Straw, 1962). Individuals (0.5–1.5 m high) bear 15–25 paniculate inflorescences, each with 2–4 pendant flowers from terminal branching stems opening per day, and ~ 90 floral buds may eventually reach the flower stage during the blooming season (4 months), which extends from July to November for the region (Lara, 2006). *Penstemon gentianoides* display suites of floral traits associated with the hymenopteran pollination syndrome, including blue, violet or purple and vestibular flowers abruptly expanding into a broadly inflated throat and a prominent lower lip with anthers and stigmas nearly included (Calderón de Rzedowski & Rzedowski, 2002; Fig. 1).

However, Lara (2006) observed large hummingbird species (*Colibri thalassinus*, *Eugenes fulgens*, *Lampornis clemenciae*) defending floral patches of *P. gentianoides* at lower elevation in the La Malinche National Park.

### **Floral biology**

During the blooming season (July–November 2014), we selected 125 plants and measured two fully developed flowers from each of the plants ( $n = 250$  flowers). Corolla tube length (distance from the base of the corolla to the corners of the corolla mouth), corolla-entrance width, corolla-entrance height, and filament and style lengths were measured with a digital caliper (error: 0.01 mm).

A different group of flowers ( $n = 40$ ) was collected in order to count the number of ovules per ovary. We also assessed receptivity by submerging stigmas into a 32% hydrogen peroxide solution and using the presence of bubbling on the stigma to infer receptivity (Kearns & Inouye, 1993). Stigma receptivity of 55 flowers was recorded over 12 days after flower opening. To evaluate floral longevity, we conducted daily inspections following 235-tagged buds growing on 70 additional plants until wilting during August 2014.

### **Floral visitors**

From July–September 2015, we randomly selected 58 floral patches (each composed by ~ 20 plants) to determine the identity and foraging patterns of the floral visitor species. We performed 20 h focal observations (20-minute floral patch), at different periods of the day, beginning at 9:30 until 16:00 on different days. We used binoculars (12 × 50, Eagle Optics) to record every hymenopteran and hummingbird visit, time until some of them visited the focal patch, and the number of plants and number of flowers visited per foraging bout. We recorded the beginning of our observations as time zero and subsequent foraging events as minutes from start time. An event was defined as the arrival of any visitant at one of the flowers of the target patch. Hummingbirds were identified with the aid of field guides (Williamson, 2001; Arizmendi & Berlanga, 2014), while insects were collected using entomological nets and sacrificed through a cyanide camera for a later identification. Total visits recorded from *Apis mellifera* bees and

*Bombus* bumblebees were grouped and coded as visits from hymenoptera, while visits from different hummingbird species were grouped under the hummingbird category.

### **Breeding system**

To determine the breeding system of *P. gentianoides*, we conducted a manual-pollination experiment from July to December 2015 with bagged buds about to open in mesh bags (1-mm bridal tulle) to exclude floral visitors. Six pollination treatments were applied to each plant: (1) autonomous self-pollination and fruit set, flowers about to open were bagged to exclude floral visitors ( $n = 54$ ); (2) hand-self pollination, flowers about to open ( $n = 54$ ) were bagged to exclude floral visitors and after having being emasculated by cutting off the stamens, flowers were pollinated on day 8 of flower lifespan (time until stigma receptivity) by brushing their own anthers onto the stigma. After this, flowers were bagged again until fruit maturation; (3) hand-geitonogamy pollination, flowers were emasculated on their opening day and hand-pollinated (day 8) by brushing anthers from another flower of the same individual plant and pollinators excluded by enclosing the flowering branch as explained above ( $n = 65$ ); (4) hand-outcross pollination, flowers were emasculated immediately after opening and pollinated by smearing one anther from an arbitrarily selected pollen donor onto the receptive virgin stigma, and pollinators excluded by enclosing the flower as explained ( $n = 60$ ); (5) open-pollination, previously emasculated flowers were exposed to visitors ( $n = 49$ ); and (6) natural open-pollination, flowers remained unbagged and exposed to natural floral visitation ( $n = 40$ ). Fruits from experimental flowers were collected 2 months later, quantified, measured (length and width) and weighed with an analytic balance (to the nearest 0.01 mg), and their seeds counted.

### **Nectar production dynamics**

Nectar standing crop, accumulated nectar per sexual phase and accumulated nectar throughout the lifespan of flowers were quantified to determine reward availability for pollinators. Because pollinators probably respond to nectar standing crop, we extracted the nectar available in flowers that had been exposed to floral visitors and measured its volume and concentration. Data were collected in August 2014 three times at 3-h intervals, at 09:00 ( $n = 93$  flowers), 12:00 ( $n = 82$  flowers) and at 15:00 ( $n = 82$  flowers), to evaluate variation in the availability of nectar during



the period of floral visitors activity. Nectar volume per flower was removed and measured by using calibrated micropipettes (5  $\mu$ L) and a digital caliper (error: 0.1 mm). Sugar concentration (percentage sucrose) was measured by a hand-held pocket refractometer (Atago, Tokyo, Japan; range concentration 0–32° BRIX units), and the amount of sugar produced was expressed as milligrams of sugar after *Kearns & Inouye (1993)*.

In a different group of plants, buds about to open were randomly selected and bagged as explained above ( $n = 45$ ) and excluded from floral visitors to let nectar accumulate. After flower opening, the accumulated nectar was extracted from the bagged flowers after the staminate phase of these flowers reached an end (first removal) and then bagged again right afterwards. Accumulated nectar was extracted from the same flowers at the end of the pistillate phase (second removal). Flowers remained bagged between nectar removals. In addition, the accumulated nectar throughout the lifespan of individual flowers was extracted one day before senescence from a different group of buds previously bagged ( $n = 40$ ). Nectar volume and sugar concentration were measured as explained above.

### **Pollinator effectiveness**

From July to September 2016, we conducted a pollination experiment to compare the effectiveness of bumblebees and hummingbirds as pollinators of *P. gentianoides* flowers. Individuals ( $n = 10$ ) of the most common visitor bumblebee species (*Bombus ephippiatus* as representative of the hymenopteran group) were captured with an entomological net, enclosed in test tubes and then used as pollen vectors. Buds ready to open were chosen ( $n = 40$ ) and once they opened, flowers were emasculated and bagged with bridal netting until stigmatic receptivity. Pollination was accomplished by placing the test-tube entrance in front of the corolla of a donor flower with dehisced anthers and allowed the bumblebee to enter and leave the flower in a single event, and then repeated this procedure into the corolla of a receptive recipient flower. We used flowers as pollen donors only from one plant to minimize possible genetic factors and to simplify our experimental design. To evaluate effectiveness of hummingbirds, a female individual of the most frequent floral visitor (*Selasphorus platycercus*) was caught with a mist net, and used as a pollen vector. Pollination was accomplished when the hummingbird was allowed to insert its bill once into the corolla of a donor flower with dehisced anthers and then into the corolla of a

receptive recipient flower ( $n = 37$ ), as described by *Lara & Ornelas (2002, 2003)*. We mimicked hummingbird behavior in probing flowers as closely as possible. Pollen donors were used as explained above. After pollinations were performed the bumblebees and the hummingbird were released, and flowers remained bagged until fruit production, then fruits were weighed and the seeds per fruit produced were counted by pollination treatment as explained above.

### **Data analyses**

We used survival analysis (*Muenchow, 1986*) to analyze hymenopteran and hummingbird visitation because the observation periods were too short for all possible events to occur. For these data, the actual time of occurrence is not always known; only a minimum length of time during which the event did not occur (censored data) is always known. If a pollinator species visited a given focal plant, then it became uncensored data, and if it never occurred, then it became censored data. We used the Kaplan–Meier product-limit non-parametric method for the computation of the probability that a pollinator had not yet visited a plant 20-min after the start of the observation on each period of time and the logrank (Mantel–Cox) statistic to test differences between pollinator types.

Observed visitation frequency and number of flowers visited per foraging bout (continuous response variables) by pollinator type for each period of time (fixed effects) were analyzed using a generalized linear model (GLM) in RStudio v. 0.98.490 (R Development Core Team; <http://www.r-project.org/>) with Poisson error distribution and logarithmic link function. Differences between pollinator groups per time period were evaluated with Tukey multiple comparisons (*Zar, 1999*).

To assess differences in fruit production among pollination treatments a GLM was performed with binomial error and a logit link function. The full GLM model included pollination treatment treated as fixed effects and fruit production as a binary response variable. Lastly, to compare the number of seed produced per fruit (continuous response variable) and pollination treatment (fixed effects) we used a GLM with Poisson error distribution and logarithmic link function. A Tukey post-hoc test was used for multiple comparisons among pairs of means of pollination treatments.

A GLM with Poisson error distribution and logarithmic link function was also used to compare nectar standing crop (volumes and amount of sugar as continuous response variables) throughout the day (fixed effects). To assess the variation in the amount of accumulated nectar throughout the lifespan of individual flowers (staminate phase, pistillate phase and accumulated throughout the life span), a GLM with Poisson error distribution and logarithmic link function was performed in R. The model incorporates flower age treated as fixed effects and the accumulated nectar (nectar volume and amount of sugar) as continuous response variables.

To evaluate differences between hymenoptera and hummingbirds in their effectiveness as pollinators, a GLM was performed with binomial error and a logit link function. The full GLM model included pollinator type treated as fixed effects and fruit production as a binary response variable. Lastly, to compare the number of seed produced per fruit (continuous response variable) by pollinator type (fixed effects) we used a GLM with Poisson error distribution and logarithmic link function. A Tukey post-hoc test was used for multiple comparisons among pairs of means of pollinators.

## RESULTS

### Floral biology

In 2014, *P. gentianoides* individuals flowered from mid-July to the beginning of November, with a flowering peak occurring in September. In Table 1, we show mean values for each of the morphological attributes of *P. gentianoides*. Flowers present the three inferior petals fused, and the four stamens surrounding the pistil do not protrude from the corolla. Most flowers showed typically a remarkable purple color, but some flowers showed shades of color ranging from violet to blue. Flower longevity ranged from 6 to 15 d (mean  $\pm$  SE,  $9.9 \pm 2.21$  days,  $n = 235$ ; Table 1).

*Penstemon gentianoides* flowers exhibited a protandrous breeding system. Flowers on their first day of anthesis developed an eight-day male phase (staminate), followed by the  $\sim 1$ –7 d female phase (pistillate phase). At the beginning of anthesis, the style is shorter than the stamens and projects far above the stamens; the stigma stands erect whereas the filaments become shorter and positioned with a remarkable spatial gap between stigma and anthers (Fig. 1). Because growing stigmas make physical contact with the anthers, this very short transitional stage can be

delineated as the zone at which autonomous self-pollination can theoretically take place. Stigmatic receptivity was highest between the 8–11 d.

Pollen presentation was gradual in *P. gentianoides*, restricting pollen presentation to one dehiscent anther on the first day of flower opening, and then throughout the 8 or 9 days of the staminate phase the other anthers dehisced, depending on flower longevity. At stigmatic receptivity, one of the anthers could be on its last pollen exposure event. Ovaries can form up to 218 ovules and 201 seeds per fruit on average under natural conditions (Table 1).

### Floral visitors

A total of 77 visits from four hummingbird species were registered during our observations. The most common hummingbird species was *Selasphorus platycercus* displaying territorial behavior on focal floral patches, followed by *Archilochus colubris* (66.2% and 24.6% of total visits, respectively). Other less common hummingbird visits accounted for the remaining visits (Table 2). Hummingbirds were active throughout the day. Bumblebees (*Bombus ephippiatus*, *Bombus huntii* and *Bombus weisi*) were the main floral visitors (87 visits), and their foraging activity was more restricted to warmer hours (Table 2). These hymenopteran species accounted for 95.6% of all recorded visits by insects, contrasting with the only 4 visits by honeybees (*Apis mellifera*).

We found no significant differences between pollinator groups (hymenopteran and hummingbirds) in the probabilities of *P. gentianoides* plants to be visited throughout the day. Waiting times for a given plant to be visited by both pollinator groups were similar at the morning ( $\chi^2 = 0.779$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.377$ ), noon ( $\chi^2 = 1.773$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.183$ ) and afternoon observation periods ( $\chi^2 = 1.422$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.233$ ). However, we found differences in the number of foraging bouts and number of flowers visited between pollinator groups and period of time (Table 3). In general, hummingbirds made more foraging bouts to *P. gentianoides* plants than hymenopteran species, particularly early in the morning, but at noon and afternoon the latter exceed their visits to the plants. Interestingly, hummingbirds visited more flowers per foraging bout than insects at any period of time (Table 3, Fig. 2).

### **Breeding system**

Flowers from all pollination treatments set fruit (Table 4). However, the probability of fruit production was not independent of pollination treatment according to the GLM model (pollination treatment effects:  $\chi^2 = 123.09$ ,  $df = 5$ ,  $P < 0.0001$ ; Fig. 3), with higher fruit production among flowers exposed to open pollination (100%), followed by hand-crossed pollinated flowers (46.7%) and geitonogamous and previously emasculated flowers exposed to natural pollination (~ 25% and 28%, respectively).

Seed set also varied significantly across pollination treatments (pollination treatment effects:  $\chi^2 = 123.09$ ,  $df = 5$ ,  $P < 0.0001$ ). Fruits from both open pollination and hand-crossed pollination treatments were larger and produced more seeds as compared to all of the remaining pollination treatments (Table 4), and the mean differences per fruit were statistically significant (Fig. 3).

### **Nectar production dynamics**

Nectar standing crop (volume and amount of sugar) in flowers available to floral visitors varied significantly throughout the day (GLM, nectar volume: time-of-day effect,  $\chi^2 = 30.07$ ,  $df = 2$ ,  $P < 0.0001$ ; amount of sugar: time-of-day effect,  $\chi^2 = 16.16$ ,  $df = 2$ ,  $P = 0.0003$ ; Fig. 4). On average, flowers of *P. gentianoides* had more nectar available in the morning hours than flowers at noon or in the afternoon (Table 5).

Bagged flowers accumulated ~13  $\mu\text{L}$  and 4 mg of sugar/mL per flower throughout their lifespan, similar to those during the staminate phase, but more than twice than those in the pistillate phase (Table 5), and these differences were statistically significant (GLM, nectar volume: floral phase effect,  $\chi^2 = 98.94$ ,  $df = 2$ ,  $P < 0.0001$ ; amount of sugar: floral phase effect,  $\chi^2 = 50.86$ ,  $df = 2$ ,  $P < 0.0001$ ) (Fig. 5).

### **Pollinator effectiveness**

Fruit production was significantly affected by pollinator type (GLM; pollinator type effects:  $\chi^2 = 6.82$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0.008$ ; Fig. 6), with higher number of fruits produced when flowers were pollinated by *Bombus ephippiatus* (78.7%) than flowers pollinated by *Selasphorus platycercus* (46.15%). However, there was no statistical difference in the number of seeds produced per fruit

when a bumblebee (mean  $\pm$  SE: 138.8  $\pm$  23.59 seeds) or a hummingbird (156.3  $\pm$  18.21 seeds) was the pollinator (GLM; pollinator type effects:  $\chi^2 = 0.34$ , df = 1,  $P = 0.558$ ; Fig. 6).

## DISCUSSION

We have shown that *Penstemon gentianoides* flowers fit the hymenopteran-pollination syndrome in being blue-violet, having a vestibular corolla, a lower lip in a position of a landform platform, and relatively included reproductive organs. However, flowers of *P. gentianoides* were visited and pollinated by both bumblebees and hummingbirds. Although pollination was more effective when flowers were pollinated by bumblebees, the remarkable high fruit production and seed set in flowers pollinated by hummingbirds highlights the relative importance of hummingbirds as a functional group of pollinators that might have potential evolutionary consequences to the plants.

### The hymenopteran pollination syndrome in *P. gentianoides*

The ancestral pollination syndrome in *Penstemon* is considered to be hymenopteran-adapted (Wolfe et al., 2006; Wilson et al., 2007; Wessinger et al., 2016). The vast majority of *Penstemon* species display the hymenopteran pollination syndrome, particularly species pollinated by *Osmia* and *Bombus* (Tepedino, Sipes & Griswold, 1999; Reed, 2002; Castellanos, Wilson & Thomson, 2003; Tepedino et al., 2007). However, *P. barretiae*, *P. centranthifolius*, *P. newberryi*, *P. rupicola*, *P. pinifolius*, *P. ramosus*, and *P. superbus* to name some species, display floral traits linked to hummingbird pollination, such as long and narrow corollas, colored in shades from purple pink to red (Bateman, 1980; Lodewick & Lodewick, 1993; Lange & Scott, 1999; Tepedino, Sipes & Griswold, 1999; Datwyler, 2004; Castellanos et al., 2006; Walker-Larsen & Harder, 2001; Broderick, 2010). Similarly, several species that present floral traits initially linked to insect pollination, such as *P. pseudospectabilis* and *P. bridgesii*, increase their seed production when visited by hummingbirds, suggesting mixed pollination systems (Carpenter, 1983; Lange & Scott, 1999). Here we showed that *P. gentianoides* is effectively pollinated by both hymenoptera and hummingbirds, even while maintaining its auto-compatibility capacity; a phenomenon previously described in numerous species such as *P. centranthifolius*, *P. rostrifolius*, *P. ellipticus*, *P. palmeri*, *P. penlandii* and *P. pseudospectabilis* (Lange & Scott, 1999; Tepedino,

*Sipes & Griswold, 1999; Lange, Scobell & Scott, 2000; Walker-Lanser & Harder, 2001; Tepedino et al., 2007).*

Some studies have documented variation in several *Penstemon* floral traits, particularly flower size, corolla shape and color, in addition to the offered nectar rewards (*Keck, 1937; Straw, 1956, Freeman et al., 1984*). However, as *Lange & Scott (1999)* stated, variation in the amount of nectar rewards as a characteristic to be linked to a given pollination syndrome has been overlooked. In our study, the intensity of pollinator visitation through the day was differential, displaying a pattern linked to nectar availability. For instance, the amount of nectar available in *P. gentianoides* flowers in the morning hours (volume: 1.32  $\mu$ L; amount of sugar: 0.38 mg/mL) is about twice the amount collected at noon (0.53  $\mu$ L; 0.10 mg/mL) and afternoon (1.00  $\mu$ L; 0.21mg/mL). Coincidentally, *P. gentianoides* flowers were more visited by hummingbirds early in the morning, when more and dilute nectar is available. Water input in semi-concentrated nectar volumes is a hummingbird preference already documented (*Baker, 1975; Pyke & Waser, 1981*). However, at noon, when flowers had less nectar but sugar concentration was higher, bumblebees were the ones who visited the most. Interestingly, at this particular schedule is when hummingbirds substitute the lack of high nectar volumes by probing more flowers per foraging bout.

On average, we found that the accumulated nectar during the male phase (staminate phase) of *P. gentianoides* flowers was higher than the amount accumulated during the female phase (pistillate phase). The variation in the capacity to produce and replenish nectar throughout the sexual phases of *Penstemon* has been formerly documented. For example, *Castellanos, Wilson & Thomson (2002)* compared nectar replenishment patterns in protandrous flowers of *Penstemon* mainly visited by several species of Hymenoptera (*P. speciosus*), bumblebees (*P. strictus*) or by hummingbirds (*P. barbatus*). Species with the hymenopteran pollination syndrome quickly replenished a small amount of concentrated nectar, and hummingbird-adapted species refilled their nectaries to a higher level with more dilute nectar. In these *Penstemon* species, male- and female-phase flowers are intermingled within a plant, so nectar in a female-phase flower may actually be serving male function in an adjacent flower even after its own stigma has been saturated. Therefore, there is little reason to expect an association between nectar production and sexual phase (*Castellanos, Wilson & Thomson, 2002*). In *P. gentianoides*, we found that the

amount of dilute nectar accumulated during the extended 8-d male phase was significantly higher than the amount accumulated during the 1–7-d female phase, and stigmatic receptivity was highest between the 8–11 d. Secreting large quantities of dilute nectar during the staminate phase may encourage non-territorial hummingbird pollinators to revisit plants while keeping low the rate of geitonogamy. Another reason for producing more dilute nectar during the staminate phase and for reducing the amount and the extent of the pistillate phase is conservation of energy and water at high elevations, particularly when nectar production and replenishment and pollination intensity jointly affect seed production (Ornelas & Lara, 2009).

Lara & Ornelas (2008) found in *P. roseus* a daily secretion rate of 0.3 mg of sugar per flower per day, a relatively low amount of sugar relative to nectar sugar production in hummingbird-adapted *Penstemon* species (range 1.5–5 mg sugar per flower per day; Lara & Ornelas, 2008 and references therein). To our knowledge, there is no comparative data for bee-adapted *Penstemon* flowers except that they produce more concentrated nectar (e.g., Freeman & Worthington, 1985; Kimball, 2008; Kimball & Campbell, 2009). However, Lara & Ornelas (2008) hypothesized that the daily secretion rate in *P. roseus* was intermediate between hummingbird- and bee adapted *Penstemon* species. They further suggested that the nectar secretion patterns (large volumes of dilute nectar) in the usually bright red flowers of *P. roseus* represents a shift toward hummingbird pollinations, in which a ‘despecialized’ *Penstemon* species attracts high-energy pollinators (hummingbirds) and profits from outcrossing, but retains bee-syndrome floral traits and low sugar production. The lower daily nectar rate reported for a population of *P. gentianoides* at lower elevation (0.23 mg per flower per day; Lara, 2006) would support the hypothesis of increased nectar secretion rates in *Penstemon* species that presumably have shifted to hummingbird pollination. Further comparative studies are required to test these ideas.

### **Ancestral pollination syndrome and secondary functional groups**

Evolutionary shifts from insect pollination to more efficient hummingbird pollination have occurred repeatedly in *Penstemon*, with minimally ten and up to 21 origins of hummingbird pollination (Wolfe et al., 2006; Wilson et al., 2007; Wessinger et al., 2016). The ancestral adaptation to hymenopteran pollination to adaptation toward hummingbird pollination has resulted in the convergent evolution of floral traits commonly present in *Penstemon*



hummingbird-pollinated flowers (Wilson et al., 2004; Wilson et al., 2007). However, the floral phenotypes consonant with hymenopteran and hummingbird pollination syndromes are not always predominantly adapted to their predicted principal pollinators and flowers may have suites of mixed floral traits and a mixed set of floral visitors. For instance, the floral morphology of *P. roseus* corresponds to the *Penstemon* bee-pollination syndrome that has undergone ‘despecialization’ in the sense of the flowers taking hummingbirds as pollinators while still having the characters that allow locally rare bumblebee pollination (Wilson et al., 2006; Lara & Ornelas, 2008). Species of *Penstemon* that have acquired hummingbirds as pollinators are pink or magenta. This shift in color seems to have occurred in nearly all species of *Penstemon* that have begun a shift toward hummingbird utilization (Wilson et al., 2006), including the ‘despecialized’ *P. roseus* (Lara & Ornelas, 2008). In contrast, the morphology of the violet *P. gentianoides* flowers represents an intermediate stage regarding shifts from bumblebee pollination toward hummingbird pollination because both groups of floral visitors are effective pollinators.

Our data showed that the bumblebees *Bombus ephippiatus*, *Bombus huntii* and *Bombus weisi* are the primary floral visitors of *P. gentianoides*. These social, underground nesters are generally found in pine-oak forest and other kinds of mountain forest habitat where populations are experiencing declines as a consequence of extensive agriculture and pollution by insecticides and overcollection of queens from the wild or are susceptible to genetic dilution from hybridization between native and commercially imported species for greenhouse pollination and certain virus that infect honey bees (*Apis mellifera*) (Duennes et al., 2012; Duennes & Vandame, 2015; Hatfield et al., 2015; Vandame & Martínez López, 2016). Another characteristic of these insects is their tolerance and restriction to high-altitude environments such as the tops of tall volcanoes as our study site (3700–4000 m a.s.l.; Hines, 2008; Duennes et al., 2012; Duennes & Vandame, 2015). Flowers visited by these species include penstemons with melittophilous floral traits, however, we registered flower visitation by four hummingbird species, three of the hummingbird species assemblage previously reported to visit *P. gentianoides* at lower elevation from our study site (Lara, 2006; Lara & Ornelas, 2008; Lara, Lumbreras & González, 2009) and *Atthis heloisa*, a new record for the region. The remaining five hummingbird species (*Eugenes fulgens*, *Colibri thalassinus*, *Lampornis clemenciae*, *Selasphorus rufus*, *S. sasin*) were not recorded during our

observations likely because the winter flowering of this species overlaps with the flowering season of *P. roseus* distributed at a lower elevation, which extends from July to December (Ornelas & Lara, 2009), and these hummingbird species display territorial and non-territorial foraging behaviors forming dynamic, species-rich hummingbird assemblages for the region (Lara, 2006; Lara & Ornelas, 2008; Lara, Lumbreras & González, 2009; Ornelas & Lara, 2009).

As stated above, *P. gentianoides* produce flowers for hymenopteran pollination, while nectar characteristics have the potential for adapting to a hummingbird pollination environment (produced more and dilute nectar). However, other morphological floral traits have been evidenced as to play an important role in the pollination system evolution within this group of plants such as scheduling of pollen presentation (PPT, 'pollen presentation' theory; Percival, 1955). Based on the frequency of visits by pollinators and the capacities of those pollinators to remove and deposit pollen, Thomson *et al.* (2000) re-examined the optimal schedule of pollen presentation and the implications of the PPT models in the context of bee- and hummingbird-adapted species of *Penstemon*. They showed that high visitation rates, high removal and low deposition of pollen all favor plants that present pollen by dosing through gradual opening of anthers and through anthers opening only narrowly. Based on this, Thomson *et al.* (2000) hypothesized that bumblebees would have higher rates of removal and lower rates of pollen deposition than hummingbirds. This is the reason why they predicted that bee-pollinated *Penstemon* species should have anthers that open and release pollen more gradually and less-completely than hummingbird-pollinated species (Thompson *et al.*, 2000). Flowers of *P. gentianoides* opened the anthers and released pollen gradually, a response that might be related to the high rates of flower visitation by bumblebees (see also Williams & Thomson, 1998). Accordingly, the number of ovules per ovary and the number of seeds produced by *P. gentianoides* flowers exposed to open pollination suggest that pollen is not limited, a feature usually linked to pollinator efficiency (Barrett, 2014). However, most traits that characterize the hymenopteran-pollination syndrome failed to predict the high visitation rates and pollination effectiveness by hummingbirds.

Evolutionary shifts between pollination syndromes presumably take many generations of incremental change in the many characters involved (Thompson *et al.*, 2000). However, the

failure to resolve relationships at the species level within the crown group using fast-evolving markers (Wolfe *et al.*, 2006), gene tree discordance due to incomplete lineage sorting, introgression or hybridization (Wolfe, Xiang & Kephart, 1998; Datwyler & Wolfe, 2004; Wolfe *et al.*, 2006), and the difficulty to confidently infer short internal branches, even using RADseq phylogenomic analyses, all support the hypothesis that *Penstemon* has experienced a recent and rapid radiation (Wessinger *et al.*, 2016). This suggests that major pollinator shifts, from hymenopteran- to hummingbird-adapted pollination between closely related species, could occur rapidly in a few scores of generations in which intermediate stages are ephemeral (see also Thomson *et al.*, 2000). Accordingly, the higher frequency of hummingbird floral visits and their effectiveness as pollinators is a relatively recent phenomenon, in which the more reliable hummingbirds are allowed to take over the ancestral hymenopteran pollination system by simply regulating the amount of nectar present in the flower.

By means of phylogenetic meta-analysis, Rosas-Guerrero *et al.* (2014) assessed whether floral traits predict the most effective pollinators of plants and whether the predictability of pollination syndromes was associated with the pollinator functional group. In general, their findings supported the Stebbins' principle (Stebbins, 1970) of convergent evolution of floral traits driven mainly by the most effective pollination functional group. When syndromes failed, they found in the pollination networks that the pollinator predicted by the syndrome was still present within the pollinator assemblage. In these cases, the most effective pollinator was often the main secondary pollinator of the syndrome and may represent the ancestral pollination system of the plant lineage (Rosas-Guerrero *et al.*, 2014). According to this, transitions from the ancestral hymenopteran pollination syndrome to more derived hummingbird pollination syndrome in *P. gentianoides* may be initiated when the quantity or quality of visits by hummingbirds is increased compared to the less efficient ancestral pollinator group.

Along the distributional range of *P. gentianoides* in Mexico, its primary habitat is related to montane environments, particularly pine and fir forests, mountain hayfields and grasslands (Calderon de Rzedowski & Rzedowski, 2001). Coincidentally, these habitats are also reservoir for species-rich hummingbird communities composed of both resident and migratory species. For that reason, although native *Bombus* species registered throughout our study are still currently important for *P. gentianoides* pollination, contemporary changes in the pollination environments

could change depending on the composition of pollinator assemblages and consequently make the described mixed system to increase the potential for a transition from the ancestral pollinator syndrome to hummingbird pollination. When hummingbird visitation is sufficiently reliable, we would expect *P. gentianoides* flowers to experience selection to attract, reward or increase the efficiency of hummingbirds but also for those that deter or decrease removal by bumblebees (Castellanos *et al.*, 2004; Zung *et al.*, 2015). Further manipulation of traits linked to the attractiveness of *P. gentianoides* and the efficiency of its pollinators would be needed to test these ideas.

### **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank J M. González García, Octavio Rojas, J. Loera, A. Arellano Cantu, M. Luna Luna, S. Rodríguez Mendieta, H. Martínez Roldán, D. Santillán, I. Morales, V. Mendiola and L. Salinas for field assistance, C. Hernán Vergara for bumblebee identification and to the staff of the La Malinche National Park for logistic support and for allowing the access to their facilities; M. Cuautle Arenas, C. Castillo Guevara, J. L. Martínez y Pérez and two anonymous reviewers provided useful comments on previous versions of the manuscript. To Mónica Loya for the grammar revision. This work constitutes partial fulfillment of L.S.A.'s doctorate requirements at UAT.

### **ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS**

#### **Funding**

The Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT:248118) provided the first author with financial support in the form of a scholarship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

#### **Grant Disclosures**

The following grant information was disclosed by the authors: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología: 248118.

#### **Competing Interests**

The authors declare that they have no competing interests.

#### **Author Contributions**

Lucia del Carmen Salas-Arcos conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, contributed reagents/materials/analysis tools, wrote the paper, prepared figures and/or tables, reviewed drafts of the paper.

Carlos Lara conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, contributed reagents/materials/analysis tools, wrote the paper, prepared figures and/or tables, reviewed drafts of the paper.

Juan Francisco Ornelas conceived and designed the experiments, wrote the paper, prepared figures and/or tables, reviewed drafts of the paper.

#### **Field Study Permissions**

The following information was supplied relating to field study approvals (i.e., approving body and any reference numbers): The field research reported here was performed using the required permit (SEMARNAT No. FAUT-0296).

#### **Data Deposition**

## REFERENCES

- Arizmendi MC, Berlanga H. 2014.** *Hummingbirds of Mexico and North America*. Conabio. Mexico, p. 160.
- Baker HG. 1975.** Sugar concentrations in nectars from hummingbird flowers. *Biotropica* **7(1)**:37–41 DOI DOI: 10.2307/2989798.
- Barret SCH. 2014.** Evolution of mating system: outcrossing versus selfing. In: Losos J, eds. *The Princeton Guide to Evolution*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey, 356–362.
- Bateman L. 1980.** Comparative floral biology of *Penstemon eatonii* and *Penstemon cyananthus* in central UTAH: A preliminary study. *Great Basin Naturalist* **40**:268–272.
- Broderick SR. 2010.** *An examination of the DNA content, taxonomy and phylogeny of Penstemon (Plantaginaceae)*. Doctoral dissertation, Brigham Young University.
- Brown JH, Kodric-Brown A. 1979.** Convergence, competition, and mimicry in a temperate community of hummingbird-pollinated flowers. *Ecology* **60(5)**:1022–1035 DOI 10.2307/1936870.
- Buzato S, Sazima M, Sazima I. 2000.** Hummingbird-pollinated floras at three Atlantic forest sites. *Biotropica* **32(4)**:824–841 DOI 10.1111/j.1744-7429.2000.tb00621.x.
- Calderón de Rzedowski G, Rzedowski J. 2001.** *Flora fanerogámica del Valle de México*. 2d ed. Instituto de Ecología, AC, Centro Regional del Bajío y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, Mexico, p. 1406.
- Carpenter FL. 1983.** Pollination energetics in avian communities: simple concepts and complex realities. In: Jones CE, Little RS, eds. *Handbook of experimental pollination biology*. Scientific and Academic Editions (Van Nostran Reinhold), New York, NY, p. 215–234.
- Castellanos MC, Wilson P, Thomson JD. 2002.** Dynamic nectar replenishment in flowers of *Penstemon* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany* **89(1)**:111–118 DOI 10.3732/ajb.89.1.111.
- Castellanos MC, Wilson P, Thomson JD. 2003.** Pollen transfer by hummingbirds and bumblebees, and the divergence of pollination modes in *Penstemon*. *Evolution* **57(12)**:2742–2752 DOI 10.1111/j.0014-3820.2003.tb01516.x.
- Castellanos MC, Wilson P, Thomson JD. 2004.** ‘Anti-bee’ and ‘pro-bird’ changes during the

- evolution of hummingbird pollination in *Penstemon* flowers. *Journal of Evolutionary Biology* **17(4)**:876–885 DOI 10.1111/j.1420-9101.2004.00729.x.
- Castellanos MC, Wilson P, Keller SJ, Wolfe AD, Thomson D. 2006.** Anther evolution: pollen presentation strategies when pollinators differ. *The American Naturalist* **167(2)**:288–296 DOI 10.1086/498854.
- Clinebell RR, Bernhardt P. 1998.** The pollination ecology of five species of *Penstemon* (Scrophulariaceae) in the tallgrass prairie. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **85(1)**:126–136 DOI 10.2307/2992002.
- Datwyler SL, Wolfe AD. 2004.** Phylogenetic relationships and morphological evolution in *Penstemon* sub. *Dasanthera* (Veroniaceae). *Systematic Botany* **29(3)**:165–176 DOI 10.3852/14-084.
- Duennes MD, Vandame RV. 2015.** *Bombus ephippiatus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T21215149A21215217. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-4.RLTS.T21215149A21215217.en>. Downloaded on 24 March 2017.
- Duennes MA, Lozier JD, Hines HM, Cameron SA. 2012.** Geographical patterns of genetic divergence in the widespread Mesoamerican bumble bee *Bombus ephippiatus* (Hymenoptera: Apidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **64(1)**:219–231 DOI 10.1016/j.ympev.2012.03.018.
- Faegri K, Van der Pijl L. 1979.** *The principles of pollination ecology*, 3<sup>rd</sup> ed. Pergamon Press, London, UK, 291 pp.
- Freeman CE, Worthington RD. 1985.** Some floral nectar-sugar compositions of species from southeastern Arizona and southwestern New Mexico. *Madroño* 32: 78–86.
- Freeman CE, Reid WH, Becvar JE, Scogin R. 1984.** Similarity and apparent convergence in the nectar-sugar composition of some hummingbird-pollinated flowers. *Botanical Gazette* **145(1)**:132–135.
- Hatfield R, Jepsen S, Thorp R, Richardson L, Colla S. 2015.** *Bombus huntii*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015: e.T21215139A21215245. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2015-2.RLTS.T21215139A21215245.en>. Downloaded on 24 March 2017.

- Hines HM. 2008.** Historical biogeographic, divergence times, and diversification patterns of bumble bees (Hymenoptera: Apidae: *Bombus*). *Systematic Biologists* **57(1)**:58–75 DOI 10.1080/10635150801898912.
- Hu S, Dilcher, DL, Jarzen DM, Taylor DW. 2008.** Early steps of angiosperm–pollinator coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **105(1)**:240–245 DOI 10.1073/pnas.0707989105.
- Kay KM, Sargent RD. 2009.** The role of animal pollination in plant specialization: integrating ecology, geographic, and genetics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* **40**:637–656 DOI 10.1146/annurev.ecolsys.110308.120310.
- Kearns CN, Inouye DW. 1993.** *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado, Niwot, Colorado.
- Keck DD. 1937.** Studies in *Penstemon* V. The Section Peltanthera. *American Midland Naturalist* **18(5)**:790–829 DOI 10.2307/2420419.
- Kimball S. 2008.** Links between floral morphology and floral visitors along an elevational gradient in a *Penstemon* hybrid zone. *Oikos* **117(7)**:1064–1074 DOI 10.1111/j.2008.0030-1299.16573.x.
- Kimball S, Campbell D. 2009.** Physiological differences among two *Penstemon* species and their hybrids in field and common garden environments. *New Phytologist* **181(2)**:478–488 DOI 10.1111/j.1469-8137.2008.02654.x.
- Lange RS, Scott PE. 1999.** Hummingbird and bee pollination of *Penstemon pseudospectabilis*. *The Journal of the Torrey Botanical Society* **126(2)**:99–106 DOI 10.2307/2997285.
- Lange RS, Scobell SA, Scott PE. 2000.** Hummingbird-syndrome traits, breeding system, and pollinator effectiveness in two syntopic *Penstemon* species. *International Journal of Plant Sciences* **161(2)**:253–263.
- Lara C. 2006.** Temporal dynamics of flower use by hummingbirds in a highland temperate forest in Mexico. *Ecoscience* **13(1)**:23–29.
- Lara C, Ornelas JF. 2008.** Pollination ecology of *Penstemon roseus* (Plantaginaceae), an endemic perennial shifted toward hummingbird specialization? *Plant Systematics and Evolution* **271(3)**:223–237 DOI 10.1007/s00606-007-0624-0.



- Lara C, Lumbreras K, González M. 2009.** Niche partitioning among hummingbirds foraging on *Penstemon roseus* (Plantaginaceae) in Central Mexico. *Ornitologia Neotropical* **20(1)**:73–83.
- Lara C, Ornelas JF. 2002.** Effects of nectar theft by flower mites on hummingbird behavior and the reproductive success of their host plant, *Moussonia deppeana* (Gesneriaceae). *Oikos* **96(3)**:470–480 DOI 10.1034/j.1600-0706.2002.960309.x.
- Lara C, Ornelas JF. 2003.** Hummingbirds as vectors of fungal spores in *Moussonia deppeana* (Gesneriaceae): taking advantage of a mutualism? *American Journal of Botany* **90(2)**:260–267 DOI 10.3732/ajb.90.2.262.
- Lodewick K, Lodewick R. 1992.** Oregon penstemons and clues to Pacific Northwest botanical history. *Oregon Historical Quarterly* **93(4)**:406–417.
- Lyon DL, Chadek C. 1971.** Exploitation of nectar resources by hummingbird, bees (*Bombus*) and *Diglossa baritula* and its role in the evolution of *Penstemon kunthii*. *The Condor* **73(2)**:246–248.
- Martínez del Rio C. 1990.** Sugar preferences in hummingbirds: The influence of subtle chemical differences on food choice. *The Condor* **92(4)**:1022–1030 DOI 10.2307/1368738.
- Muenchow G. 1986.** Ecological use of failure time analysis. *Ecology* **67(1)**:246–250 DOI 10.2307/1938524.
- Ollerton J. 1999.** La evolución de las relaciones polinizador-planta en los artrópodos. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* **26**:741–758.
- Percival MS. 1955.** The presentation of pollen in certain angiosperms and its collection by *Apis mellifera*. *New Phytologist* **54(3)**:353–368 DOI 10.1111/j.1469-8137.1955.
- Proctor M, Yeo P, Lack A. 1996.** *The natural history of pollination*. Harper-Collins Publishers.
- Pyke GH, Waser NM. 1981.** The production of dilute nectars by hummingbird and honeyeater flowers. *Biotropica* **13(4)**:260–270 DOI 10.2307/2387804.
- R Core Development Team. 2014.** R: a language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing, Vienna, <http://WWW.r-project.org/>.
- Reed CC. 2002.** *Penstemon grandiflorus* Nutt. reproductive ecology: prediction of pollinator limitation from experiments and field studies. *Natural Areas Journal* **22**:220–229.

- Reid WH, Sensiba P, Freeman E. 1988.** A mixed pollination system in *Penstemon pseudospectabilis*. ME Jones (Scrophulariaceae). *Great Basing Naturalist* **48(4)**:489–494.
- Rosas-Guerrero V, Aguilar R, Martén-Rodríguez S, Ashworth L, Lopezaraiza-Mikel M, Bastida JM, Quesada M. 2014.** A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators? *Ecology Letters* **17(3)**:388–400 DOI 10.1111/ele.12224.
- Shivanna KR, Tandon R. 2014.** *Reproductive ecology of flowering plants: A manual*. New Delhi, India: Springer, p. 170.
- Stebbins GL. 1970.** Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms I: Pollination mechanisms. *Annual Review Ecology Systematic* **1**:307–326.
- Straw RM. 1956.** Adaptive morphology of the *Penstemon* flower. *Phytomorphology* **6**:112–19.
- Straw RM. 1962.** The penstemons of Mexico. II. *Penstemon hartwegii*, *Penstemon gentianoides*, and their allies. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* **27**:1–36.
- Tepedino VJ, Sipes SD, Griswold TL. 1999.** The reproductive biology and effective pollinators of the endangered beardtongue *Penstemon penlandii* (Scrophulariaceae). *Plant Systematics and Evolution* **219(1)**:39–54 DOI 10.1007/BF01090298.
- Tepedino VJ, Toler TR, Bradley BA, Hawk JL, Griswold TL. 2007.** Pollination biology of a disjunct population of the endangered sandhills endemic *Penstemon haydenii* S. Wats (Scrophulariaceae) in Wyoming USA. *Plant Ecology* **193(1)**:59–69 DOI 10.1007/s11258-006-9248-7.
- Thompson JD. 2001.** How do visitation patterns vary among pollinators in relation to floral display and floral design in a generalist pollination system? *Oecologia* **126(3)**:386–394 DOI 10.1007/s004420000531.
- Thomson JD, Wilson P, Valenzuela M, Malzone M. 2000.** Pollen presentation and pollination syndromes, with special reference to *Penstemon*. *Plant Species Biology* **15(1)**:11–29 DOI 10.1046/j.1442-1984.2000.00026.x.
- Thomson JD, Wilson P. 2008.** Explaining evolutionary shifts between bee and hummingbird pollination: convergence, divergence, and directionality. *International Journal of Plant Sciences* **169(1)**:23–38 DOI 10.1086/523361.

- Toon A, Cook LG, Crisp MD. 2014.** Evolutionary consequences of shifts to bird-pollination in the Australian pea-flowered legumes (Mirbelieae and Bossiaeeae). *BMC Evolutionary Biology* **14(1)**:43 DOI 10.1186/1471-2148-14-43.
- Vandame RV, Martínez López OG. 2016.** *Bombus weisi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T21215167A21215329. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T21215167A21215329.en>. Downloaded on 20 March 2017.
- van der Pijl L. 1961.** Ecological aspects of flower evolution. II. Zoophilous flower classes. *Evolution* **15(1)**:44–59 DOI 10.2307/2405842.
- Villers VR, Rojas GF, Tenorio LP. 2006.** *Guía botánica del Parque Nacional Malinche, Tlaxcala-Puebla*. Universidad Autónoma de México, México DF, p. 171.
- Walker-Larsen J, Harder DH. 2001.** Vestigial organs as opportunities for functional innovation: the example of the *Penstemon* staminode. *Evolution* **55(3)**:477–487 DOI 10.1554/0014-3820.
- Wessinger CA, Freeman CC, Mort ME, Rausher MD, Hileman LC. 2016.** Multiplexed shotgun genotyping resolves species relationships within the North American genus *Penstemon*. *American Journal of Botany* **103(5)**:912–922 DOI 10.3732/ajb.1500519.
- Williams NM, Thomson JD. 1998.** Trapline foraging by bumble bees: III. Temporal patterns of visitation and foraging success at single plants. *Behavioral Ecology* **9(6)**:612–621 DOI 10.1093/beheco/9.6.612.
- Williamson SL. 2001.** *A field guide to hummingbirds of North America* (Peterson Field Guides). Houghton Mifflin Co. New York, NY. USA, p. 263.
- Wilson P, Castellanos MC, Hogue JN, Thomson JD, Armbruster WS. 2004.** A multivariate search for pollination syndromes among penstemons. *Oikos* **104(2)**:345–61 DOI 10.1111/j.0030-1299.2004.12819.x.
- Wilson P, Castellanos M. C, Wolfe A. D, Thomson J. D. 2006.** Shifts between bee- and bird-pollination among penstemons. In: Waser NM, Ollerton J. (eds.). *Specialization and generalization in pollination systems*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA. p. 47–68.

- Wilson P, Wolfe AD, Armbruster WS, Thomson JD. 2007.** Constrained lability in floral evolution: counting convergent origins of hummingbird pollination in *Penstemon* and *Keckiella*. *New Phytologist* **176(4)**:883–890 DOI 10.1111/j.1469-8137.2007.02219.x.
- Wolfe AD, Xiang QY, Kephart SR. 1998.** Diploid hybrid speciation in *Penstemon* (Scrophulariaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **95(9)**:5112–5115 DOI .
- Wolfe AD, Randle CP, Datwyler SL, Morawetz JJ, Arguedas N, Diaz J. 2006.** Phylogeny, taxonomic affinities, and biogeography of *Penstemon* (Plantaginaceae) based on ITS and cpDNA sequence data. *American Journal of Botany* **93(11)**:1699–713 DOI 10.3732/ajb.93.11.1699.
- Zar JH. 1999.** *Biostatistical analysis*. Prentice Hall, London, UK 633 p.

**Table 1** Flower and fruit measurements (mm) for individuals of *Penstemon gentianoides* (Plantaginaceae) in a montane temperate forest, at the La Malinche National Park, Tlaxcala, Mexico.

	<i>n</i>	Mean ± SE (Min–Max)
<i>Flower longevity</i> (d)		
Lifespan	235	9.97 ± 2.21 (6–15)
<i>Flower morphology</i> (mm)		
Corolla length	250	21.06 ± 1.76 (17.69–29.24)
Corolla-entrance height	250	11.23 ± 2.37 (7.40–16.10)
Corolla-entrance width	250	9.09 ± 1.33 (5.26–13.46)
Filament length	250	14.69 ± 1.30 (10.40–20.25)
Style length	250	17.74 ± 1.85 (5.11–21.87)
Ovules/flower	40	218.02 ± 4.42 (131–338)
<i>Fruit morphology</i>		
Fruit weight (g)	40	0.11 ± 0.03 (0.04–0.18)
Fruit length (mm)	40	12.64 ± 1.28 (10.22–15.32)
Fruit width (mm)	40	6.73 ± 0.62 (5.54–8.16)
Seeds/fruit	40	201.48 ± 50.05 (97–353)

**Table 2** Visitation frequency and number of flowers visited (in parenthesis) per observational period by pollinators of *Penstemon gentianoides* flowers in a montane temperate forest, at the La Malinche National Park, Tlaxcala, Mexico. Data are given for 20-min observation periods throughout the day.

<b>Floral visitor</b>	<b>Morning</b>	<b>Noon</b>	<b>Afternoon</b>	<b>Total</b>
<i>Apis mellifera</i>	0 (0)	3 (5)	1 (5)	4 (10)
<i>Bombus</i> spp.	13 (62)	52 (269)	22 (216)	87 (547)
<i>Archilochus colubris</i>	17 (209)	2 (14)	0 (0)	19 (223)
<i>Atthis heloisa</i>	1 (4)	1 (5)	0 (0)	2 (9)
<i>Hylocharis leucotis</i>	2 (11)	1 (1)	2 (7)	5 (19)
<i>Selasphorus platycercus</i>	10 (81)	33 (379)	8 (98)	51 (558)

**Table 3** The results of GLM for pollinator group (hymenopteran and hummingbird) and time period as fixed effects, and frequency of visits and number of flowers visited on *Penstemon gentianoides* as predictor variables.

Fixed effects	$\chi^2$	df	Pr(> $\chi^2$ )
<i>Frequency of visits</i>			
Pollinator group	32.678	1	<0.0001
Time period	15.766	2	0.0003
Pollinator group×time period	32.678	2	<0.0001
<i>Number of flowers visited</i>			
Pollinator group	115.974	1	<0.0001
Time period	27.285	2	<0.0001
Pollinator group×time period	22.363	2	<0.0001

**Table 4** Measurements for fruits produced by pollination treatment in *Pesntemon gentianoides* (Plantaginaceae). Data are mean  $\pm$  SE (Min–Max).

Treatment	n	Total fruits/treatment (%)	Fruit			Total seeds/treatment
			Weight (g)	Length (mm)	Width (mm)	
Open	40	40 (100)	0.15 $\pm$ 0.01	11.90 $\pm$ 0.21	6.45 $\pm$ 0.12	7,595
			(0.04–0.25)	(9.26–15.02)	(4.84–7.89)	
Open-emasculated	49	14 (28.5)	0.06 $\pm$ 0.01	8.97 $\pm$ 0.46	5.41 $\pm$ 0.18	1,251
			(0.02–0.16)	(6.38–11.92)	(4.46–7.02)	
Hand-cross	60	28 (46.7)	0.08 $\pm$ 0.01	10.61 $\pm$ 0.50	5.66 $\pm$ 0.26	3,122
			(0.00–0.23)	(5.82–14.88)	(4.60–8.03)	
Geitonogamy	65	16 (24.6)	0.05 $\pm$ 0.01	8.97 $\pm$ 0.73	5.09 $\pm$ 0.33	1,254
			(0.00–0.21)	(4.96–14.58)	(3.38–7.15)	
Autogamy	54	4 (7.4)	0.02 $\pm$ 0.01	6.67 $\pm$ 1.77	4.65 $\pm$ 0.45	233
			(0.00–0.04)	(0.86–10.23)	(4.24–5.41)	
Manual autogamy	54	12 (22.2)	0.05 $\pm$ 0.01	9.15 $\pm$ 1.01	4.90 $\pm$ 0.50	825
			(0.00–0.13)	(5.31–12.45)	(3.47–6.22)	



**Table 5** Nectar production patterns (standing crops and accumulated nectar) in *Penstemon gentianoides*.

	<i>n</i>	Mean $\pm$ SE (Min–Max)
Standing crop		
<i>Nectar volume (<math>\mu</math>L/flower)</i>		
09:00	93	9.32 $\pm$ 0.11 (0–3.95)
12:00	81	0.53 $\pm$ 0.11 (0–5.87)
15:00	81	1.00 $\pm$ 0.16 (0–4.36)
<i>Amount of sugar (mg/ml/flower)</i>		
09:00	93	0.38 $\pm$ 0.03 (0–1.05)
12:00	81	0.10 $\pm$ 0.04 (0–1.63)
15:00	81	0.21 $\pm$ 0.03 (0–0.93)
Accumulated		
<i>Nectar volume (<math>\mu</math>L/flower)</i>		
Staminate phase	40	12.24 $\pm$ 1.26 (0–35.71)
Pistillate phase	40	6.88 $\pm$ 0.92 (0–23.51)
Flower lifespan	40	13.57 $\pm$ 1.28 (0.23–29.98)
<i>Amount of sugar (mg/ml/flower)</i>		
Pistillate phase	40	4.29 $\pm$ 0.41 (0–11.28)
Flower lifespan	40	1.88 $\pm$ 0.27 (0–6.74)
Pistillate phase	40	4.74 $\pm$ 0.47 (0.23–10.50)

## Figure legends

**Figure 1 Morphology and floral visitors of *Penstemon gentianoides* (Kunth) Poir at La Malinche National Park, Tlaxcala, Mexico.** (A) Inflorescence and lateral view of *P. gentianoides* pendant flowers. Note the broad purple corolla tubes that allow large bumblebees to reach the nectaries, lower lips that extend as a landing platform, anthers and stigmas nearly included, and a stiff pedicel that holds the flowers nearly horizontal. (B) *Bombus ephippiatus* resting on a flower of *P. gentianoides*, while accessing nectar. (C) *Selasphorus platycercus* hovering and taking nectar during a visit to *P. gentianoides*. Photos by Carlos Lara, Lucía Salas and Magali Luna.

**Figure 2 Foraging behavior throughout the day by hymenopteran and hummingbird floral visitors of *Penstemon gentianoides*.** (A) Number of foraging bouts. (B) Number of flowers visited per bout. Data (mean  $\pm$  SE) with the same superscript letters are not significantly different between groups ( $P < 0.05$ ).

**Figure 3 Fruit and seed production in *Penstemon gentianoides* by pollination treatment.** (A) Fruit set (%; number of fruit/number of flowers) by pollination. (B) Number of seeds per fruit. Data (mean  $\pm$  SE) with the same superscript letters are not significantly different between groups ( $P < 0.05$ ).

**Figure 4 Nectar standing crop in flowers of *Penstemon gentianoides* throughout the day.** (A) Nectar volume ( $\mu\text{L}$  per flower). (B) Amount of sugar (mg of sugar/ml per flower). Data (mean  $\pm$  SE) with the same superscript letters are not significantly different between groups ( $P < 0.05$ ).

**Figure 5 Accumulated nectar in *Penstemon gentianoides* flowers through the staminate phase, pistillate phase, and throughout the flower lifespan.** (A) Nectar volume ( $\mu\text{L}$  per flower). (B) Amount of sugar (mg of sugar/ml per flower). Data (mean  $\pm$  SE) with the same superscript letters are not significantly different between groups ( $P < 0.05$ ).

**Figure 6 Effectiveness of bumblebees and hummingbirds as pollinators in *Penstemon gentianoides*.** (A) Fruit set (%). (B) Number of seeds produced per fruit. Data (mean  $\pm$  SE) with the same superscript letters are not significantly different between groups ( $P < 0.05$ ).

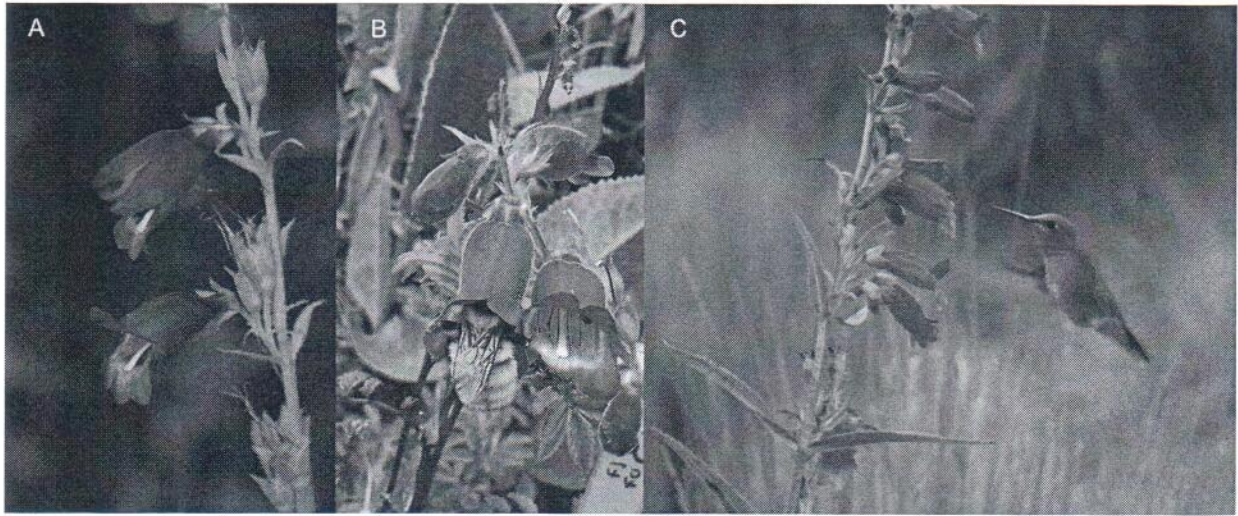


Figure 1.

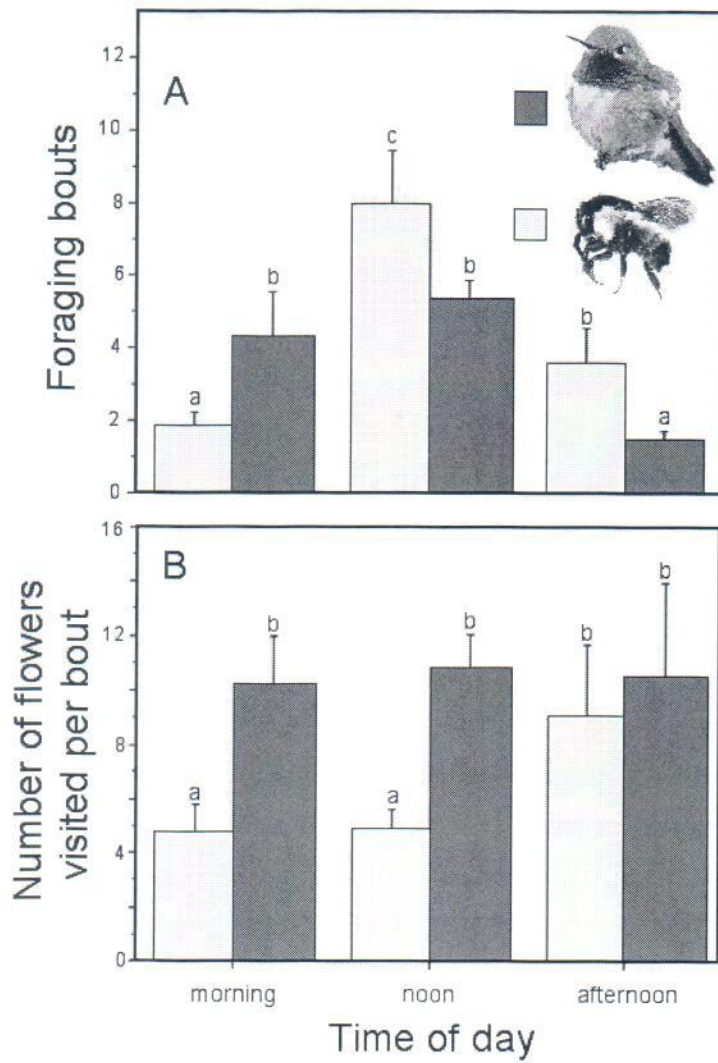


Figure 2.

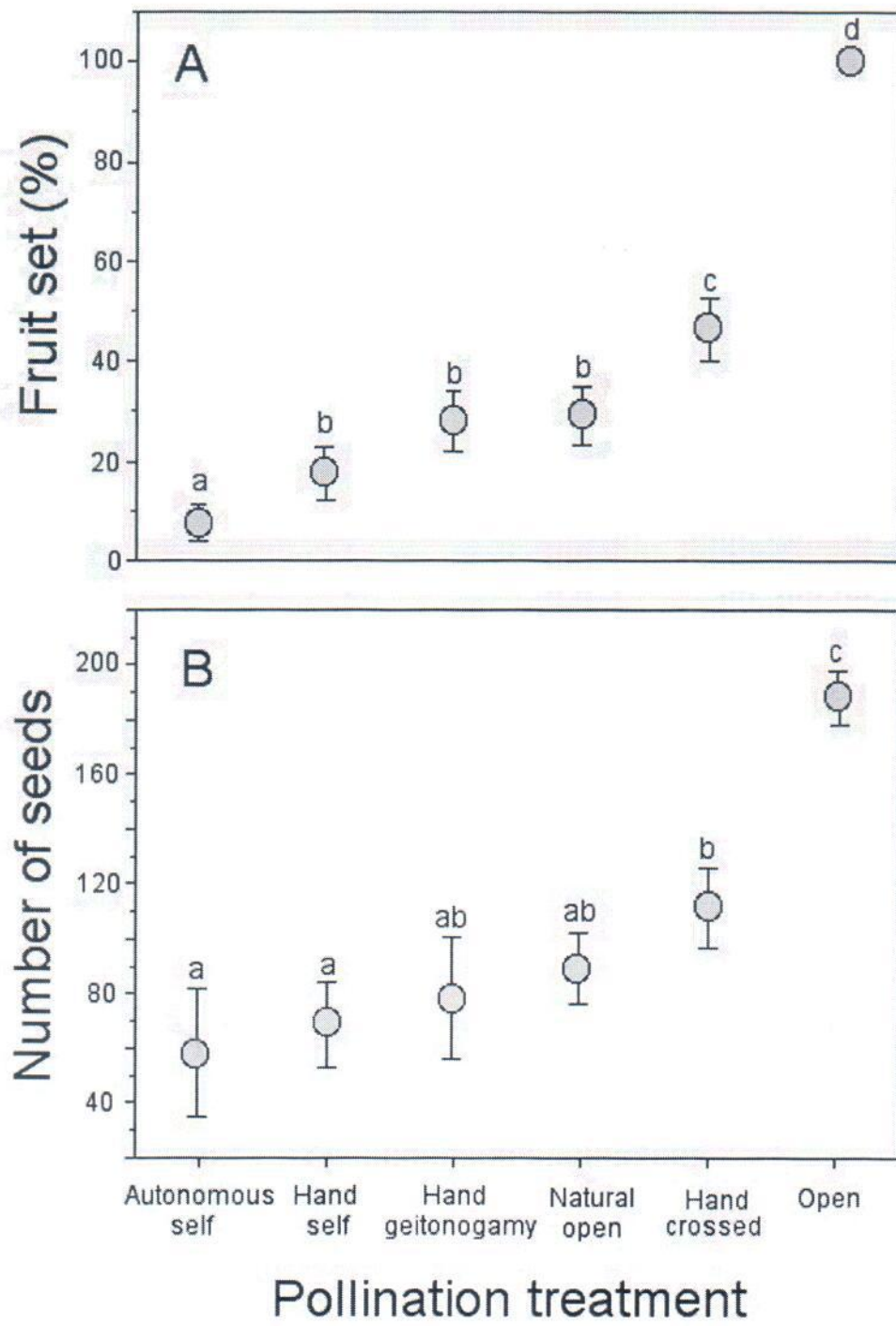


Figure 3.

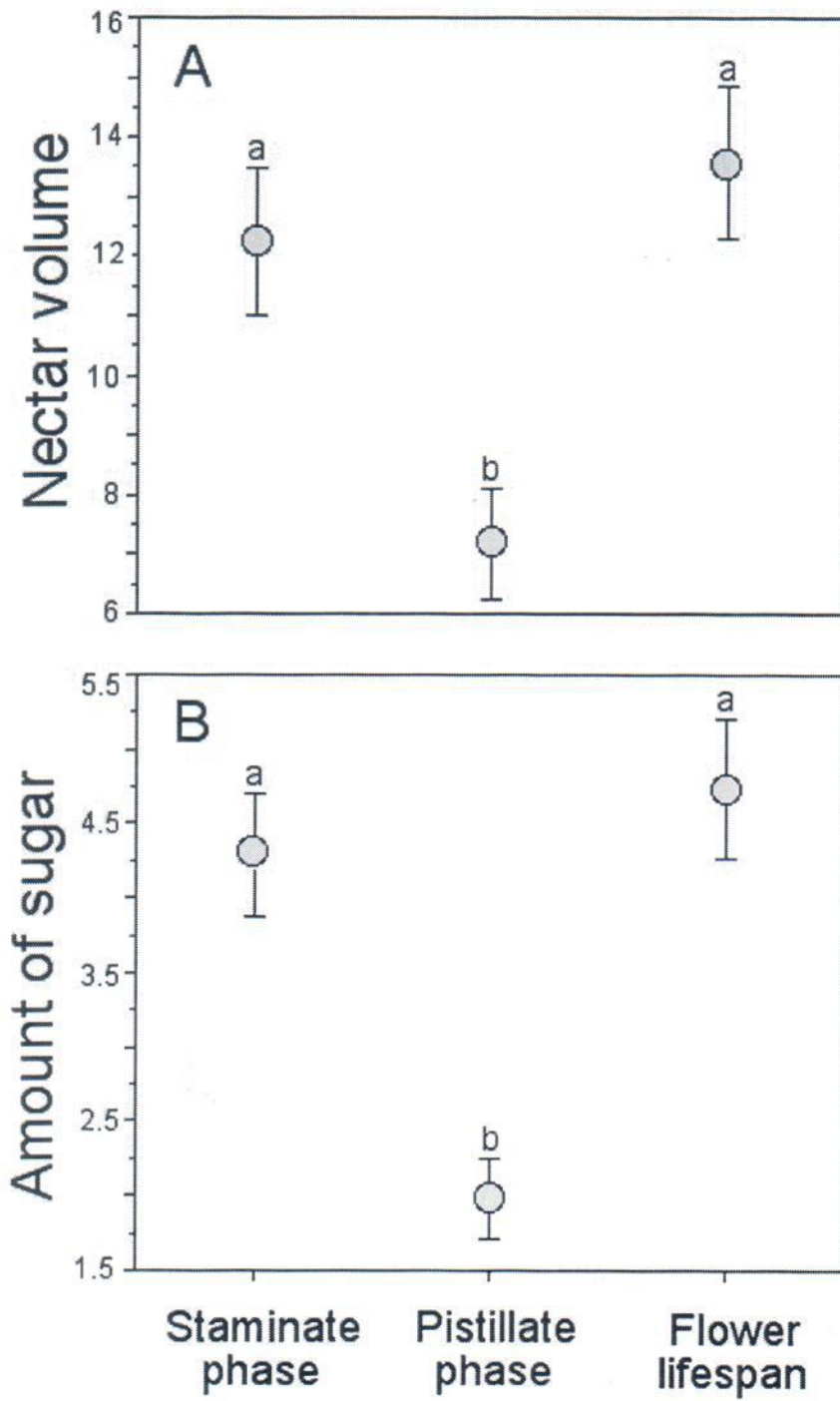


Figure 5.

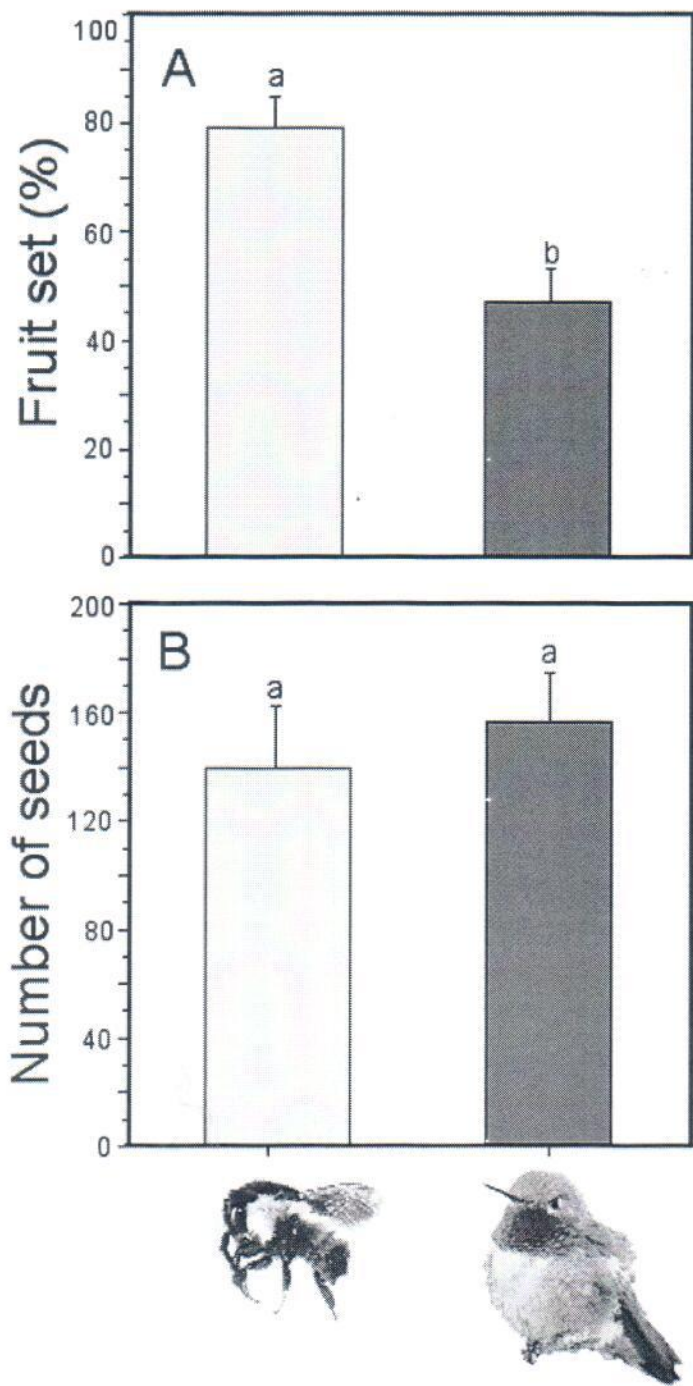


Figure 6.

## CAPÍTULO 2

*Penstemon gentianoides* (Plantaginaceae): de un sistema mixto de polinización a la especialización por colibríes ¿es posible?

### RESUMEN

El concepto de síndromes de polinización permite establecer las características florales resultado de la selección por evitar o promover la interacción con visitantes florales particulares. *Penstemon* es un género de plantas que exhibe una gran diversidad floral asociada principalmente con abejorros y colibríes. Aun cuando varias especies de este grupo mantienen sistemas mixtos de polinización por ambos tipos de visitantes, algunos estudios han mostrado que la polinización por colibríes se originó a partir de la ancestral polinización por himenópteros, por ejemplo, abejorros. Por ello, rasgos florales que afectan los mecanismos de transferencia de polen deberían ser seleccionados para promover estas transiciones. En este trabajo se evaluó el efecto de las modificaciones de los rasgos florales que afectan a la polinización por abejorros en *Penstemon gentianoides*, una planta con un sistema mixto de polinización. Experimentalmente se simuló rasgos ornitófilicos en una especie de planta con rasgos melitófilicos. Nuestros resultados mostraron que la reducción del ancho de la entrada de la flor y la eliminación de la base de la corola afecta a la eficiencia de los abejorros como polinizadores. Concluimos que la adquisición de estos rasgos puede considerarse como anti-abeja, debido a que se afectó el éxito reproductivo de la planta de estudio.

**Palabras clave:** Parque Nacional La Malinche, himenópteros, *Penstemon gentianoides*, síndromes de polinización, transiciones.



## INTRODUCCIÓN

Al requerir vectores para el transporte de sus gametos, las plantas están sujetas a la fuerza selectiva de los polinizadores sobre aquellos rasgos florales asociados a favorecer este movimiento (Barrett y Harder 1996). Esta presión selectiva puede ser dinámica, como consecuencia de las fluctuaciones poblacionales de los polinizadores (Kay y cols. 2005). Por ello, la selección mediada por polinizadores en los rasgos florales ha sido considerada una importante fuerza evolutiva en la diversificación de las angiospermas (Rosas-Guerrero y cols. 2014).

La adaptación de caracteres florales hacia promover un mejor transporte de polen y/o evitar la visita de animales no deseados (polinizadores poco efectivos) conlleva diversos procesos evolutivos (Armbruster y cols. 2000; Thomson y Wilson 2008). De esta manera, la transición hacia adquirir un polinizador (y evitar al otro) pueden ocurrir al incrementar los rasgos florales que favorecen la efectividad de un polinizador cuando simultáneamente disminuye la efectividad del segundo (Steiner 1998; Fenster y cols. 2004; Fleming y cols. 2009), un fenómeno documentado en diversos sistemas florales (Castellanos y cols. 2004; Wilson y cols. 2006; Thomson y Wilson 2008; Fleming y cols. 2009).

En este sentido, la reconstrucción ancestral es necesaria para el entendimiento de los cambios que presentan algunas especies de plantas en los polinizadores que ofrecen efectivos servicios del movimiento del polen. Por ejemplo, en plantas del género *Mimulus*, sección *Erythranthe*, se ha sugerido que el ancestro de la especie *M. cardinalis* presentaba el síndrome de polinización por insectos. Sin embargo, los rasgos ornitofílicos que actualmente exhiben sus flores se han interpretado como adaptaciones que promueven el aislamiento reproductivo al divergir las poblaciones ancestrales (Beardsley y cols. 2003).

Otro género interesante donde es posible trazar cambios en rasgos asociados a polinizadores particulares es *Penstemon*, en el cual se han estudiado y definido sus sistemas de polinización. La mayoría de sus 284 especies son polinizadas por himenópteros, y aproximadamente 41 especies de colibríes. Sin embargo, algunas especies tales como *P. pseudospectabilis* y *P. gentianoides* exhiben sistemas mixtos de polinización (Reid y cols. 1988; Lange y Scott 1999; Tepedino y cols. 1999; Thomson y Wilson 2008; Salas-Arcos y cols. 2017).

Las especies consideradas ancestrales en *Penstemon* presentan síndrome de polinización por abejas, y se considera que la polinización por colibríes es relativamente reciente (Grant 1994; Wolfe y cols. 2006; Wilson y cols. 2007). En plantas de este género, se ha sugerido que los cambios hacia

un polinizador específico pueden ocurrir cuando ciertas características se cumplen en un sistema particular, por ejemplo, entre el ensamble de visitantes que algunos ofrezcan escaso transporte y deposición de polen, pero que otros muestren ser eficientes en sus visitas y que estos lleguen a ser abundantes (Thomson y cols. 2000; Wilson y cols. 2006).

En este sentido, se ha sugerido que la polinización por colibríes en este grupo de plantas, se favorece cuando estos visitantes son más eficientes en la transferencia y deposición de polen y, comparativamente con respecto a las abejas, y los cambios en los rasgos florales durante la especialización a la polinización por colibríes pueden interpretarse como adaptaciones para optimizar el contacto físico entre la flor y el colibrí (Castellanos y cols. 2003).

Aunque el concepto de síndrome de polinización refiere al conjunto de rasgos florales relacionados con la atracción y utilización de los polinizadores por parte de las plantas (Stebbins 1970; Faegri and Van Der Pijl 1979; Muchhala 2007); la especialización hacia un polinizador eficiente promueve que los rasgos florales sean adaptaciones negativas para los polinizadores menos eficientes (Fenster y cols. 2004; Gegeer y cols. 2017). En este sentido, la especialización hacia la polinización por colibríes en plantas del género *Penstemon* ha sido interpretada como la evolución de rasgos florales hacia la exclusión de los polinizadores menos eficientes, es decir, la exclusión de la atracción de himenópteros (Castellanos y cols. 2004; Gegeer y cols. 2017).

Plantas con sistemas mixtos de polinización (que reciben dos o más tipos de visitantes que ofrecen servicios como polinizadores), son modelos excelentes para el estudio de los rasgos florales asociados a la eficiencia en la transferencia de polen y en consecuencia con los rumbos evolutivos hacia sistemas especializados de polinización. *Penstemon gentianoides* (Plantaginaceae), es una planta que exhibe un sistema mixto de polinización independientemente de los rasgos melitofílicos de sus flores. Salas-Arcos y cols. (2017) han mostrado que en estas plantas los colibríes ofrecen importantes servicios de polinización, con una intensidad de visitas aun mayor que la de abejorros. Los autores sugieren que las características del néctar explican inicialmente su elevada frecuencia de visitas por estas aves (Salas-Arcos y cols. 2017). Bajo este contexto, y basándonos en que plantas de este género con especialización hacia colibríes no solo evolucionan rasgos para mejorar el ajuste con estas aves, sino de forma conjunta para excluir a los himenópteros, es posible simular efectos en la selección de rasgos florales particulares (Zung y cols. 2015).

En el presente estudio probamos la hipótesis de que la adquisición de rasgos florales particulares en una planta con sistema mixto de polinización, pueden conllevar a la exclusión de los

himenópteros (específicamente abejorros) como visitantes. Nosotros evaluamos cuatro rasgos florales asociados con la eficiente transferencia de polen por parte de los visitantes. A través de la modificación de estos rasgos, simulando más una planta con rasgos florales ornitofílicos, nosotros cuantificamos los efectos de la atracción de abejorros y su comportamiento de forrajeo.

## MÉTODOS

### Sitio de Estudio

El trabajo de campo se llevó a cabo de septiembre del 2016 a marzo del 2017, en el Parque Nacional La Malinche (PNLM, 19°15.205'N, 098°02.080'W), a 3700 msnm. El PNLM, es un Área Natural Protegida con una extensión de 46,093 ha. Presenta una temperatura media anual de 12 a 18°C. De los 3500 a los 4000 msnm predomina un clima frío-semihúmedo con temperaturas que oscilan entre los 4 y 6°C, y en los meses de invierno con temperaturas bajo cero; la precipitación media anual es de 1000 a 1200 mm; las lluvias son en verano, con mayor intensidad de junio a septiembre. Se han reconocido las comunidades vegetales de bosque de pino, bosque de pino-encino, bosque de oyamel, pastizales y vegetación secundaria. El Parque Nacional La Malinche se encuentra a 80 km al noreste de la Ciudad de Tlaxcala, Tlaxcala, México (López-Domínguez y Acosta 2005; Lara 2006).

### Especie de Estudio

*Penstemon gentianoides* (Kunth) Poir. (Plantaginaceae) es una planta herbácea perenne de hasta 1.5 m de altura, con tallos erectos y glabros, hojas opuestas, lanceoladas y numerosas. Inflorescencias en panícula, las flores son de color azul-violeta a morado hasta 3.5 cm de largo, fruto pequeño, ovoide y glabro de color café. Se distribuye en la Cordillera Volcánica Transmexicana, Estado de México, en los estados de Hidalgo a Veracruz y hasta Guatemala, suele ser abundante. Está asociada a bosques de pino y oyamel, zacatonales alpinos y matorrales secundarios (Calderon y Rzedowski 2001) y en el PNLM, su rango altitudinal es de los 3000 a los 3900 msnm (Villers Ruiz y cols. 2006).

### Modificaciones en los rasgos florales

Los rasgos florales pueden afectar o favorecer directamente a la eficiencia de un visitante como vector de polen, particularmente a través del contacto físico del cuerpo del polinizador con las estructuras reproductivas de las flores (Castellanos y cols. 2003). Los rasgos florales que proponen Castellanos y cols. (2004) con efecto en la transferencia y deposición del polen en plantas del género incluyen el ángulo de inclinación, la presencia o ausencia de los pétalos fusionados a manera de pista de aterrizaje, el ancho de la entrada del tubo floral y las estructuras reproductivas al sobresalir o no de la corola. Por otra parte, Zung y cols. (2015) sugieren que reducir el ancho de la entrada de la corola en combinación con la pérdida de los pétalos fusionados a manera de pista de aterrizaje

afecta el acceso a los nectarios por parte de los abejorros, y en consecuencia, se esperaría que se redujera el contacto con las estructuras reproductivas de la flor. Con base a los trabajos antes mencionados, en flores de *P. gentianoides* se modificaron los siguientes rasgos: el ancho de la corola, a través de la colocación de una liga de 6 mm en la región intermedia de la corola para constreñirla (Fig. 1a), el ángulo de inclinación, colgando un par de pequeñas rondanas de metal de aproximadamente 1 gr de peso, en el pedicelo de la flor (Fig. 1b), el ancho de la corola (colocando la liga antes mencionada) y removiendo la base de la flor, la cual funciona como pista de aterrizaje para los abejorros (Fig. 1c), la remoción de la base de la flor (Fig. 1d), y se tuvieron flores sin modificación o control (Fig. 1e).

#### Observaciones focales y eficiencia de polinización

Previo al registro conductual de los abejorros visitantes a las flores modificadas, del 19 de agosto-12 de septiembre de 2016 se realizaron observaciones focales en numerosas plantas de la zona de estudio, periodo en el cual se corroboró la no presencia de colibríes en la misma. Estas aves realizan movimientos altitudinales en el PNLM siguiendo la fenología de floración de *P. gentianoides*, por lo cual su presencia y abundancia es temporal y fluctuante en sitios particulares. De esta manera, las observaciones abajo detalladas estuvieron centradas en visitas de los abejorros *Bombus huntii*, *B. ephippiatus* y *B. weisi*.

Para establecer las modificaciones de rasgos florales y evaluar la respuesta en la conducta de forrajeo de los abejorros visitantes se eligieron cuatro parches conformados de aproximadamente de 7-8 plantas en floración. En cada parche se eligieron 5 plantas, a las cuales se les realizó modificación en todas sus flores. De esta manera, todas las flores de cada planta recibieron solo uno de los tratamientos antes mencionados.

El registro de las visitas de abejorros a las plantas con las flores modificadas fue realizado del 13-18 de septiembre de 2016, en periodos de 30 minutos de las 0900 a las 1400 h. Durante las observaciones se registró (1) el tiempo transcurrido hasta la llegada de un abejorro, (2) si este tuvo o no contacto con las estructuras reproductivas de la flor visitada y, (3) el número de flores visitadas.

## Polinización y modificación de rasgos ornitófilos

La definición de eficiencia en la polinización ha sido abordada de diversas maneras, incluyendo diferentes componentes que intervienen en la polinización tales como la proporción de flores polinizadas con respecto a la pérdida de polen (Scopece y cols. 2010) o la relación entre el número de flores visitadas y el número de semillas que sus frutos producen (Rodríguez-Rodríguez y cols. 2013). Sin embargo, para fines de nuestro estudio se evaluó a la eficiencia del polinizador como el éxito o fracaso en la formación de frutos (Shemske y Horvitz 1984).

De manera paralela a las modificaciones arriba mencionadas, el 14 de septiembre de 2016 se embolsaron botones a punto de abrir, previamente emasculados, en plantas aledañas a los parches utilizados para las observaciones focales. Las flores fueron modificadas de acuerdo a los tratamientos anteriormente mencionados como sigue: a) ligada con base (n= 17), b) inclinada (n= 16), c) ligada sin base (n= 18), e) sin base (n= 15) y d) control (n= 15). Tras la manipulación, las flores fueron marcadas y expuestas a las visitas por abejorros, y los frutos formados fueron colectados, pesados y sus semillas cuantificadas.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

### *Observaciones focales*

Para evaluar diferencias en el tiempo transcurrido hasta el momento de la visita de un abejorro a flores de cada tratamiento aplicado, se realizó un análisis de curvas de sobrevivencia en el programa Stat View 5.0, utilizando pruebas de Mantel-Cox para las comparaciones. Por otro lado, diferencias en la frecuencia de ocurrencia de contacto o no (variable respuesta) por parte de los abejorros visitantes a las estructuras reproductivas de las flores sometidas a modificación (factor fijo), fueron analizadas utilizando un Modelo Lineal Generalizado (GLM) con distribución de errores tipo binomial y enlace logarítmico. Asimismo, para evaluar las diferencias en el número de flores visitadas (variable de respuesta) en cada tipo de flor modificada (factor fijo), se realizó un (GLM) con distribución de errores tipo Poisson y enlace logarítmico. Por último, las diferencias en la duración (variable respuesta) de la visita de los abejorros a flores de cada tipo de modificación (factor fijo), se analizaron con un GLM con distribución de errores de tipo Poisson y enlace logarítmico. En todos los GLM aplicados se realizaron de forma subsecuente pruebas post hoc de Tukey.

### *Efecto de las modificaciones en la eficiencia de la polinización por abejorros*

Para evaluar el efecto de las modificaciones (factor fijo) en el éxito (1) o fracaso (0) en la formación de frutos (variable de respuesta), se realizó un GLM con distribución de errores tipo binomial y enlace logarítmico. Diferencias entre flores modificadas (factor fijo) en el peso de los frutos obtenidos y número de semillas por frutos (variables respuesta), fue analizada a través de un GLM con distribución de errores tipo Poisson y enlace logarítmico, y enlace raíz cuadrada respectivamente.

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa estadístico R Studio 3.2.2.

## RESULTADOS

### Comportamiento de forrajeo

La conducta de forrajeo de los abejorros se vio afectada en general por las modificaciones en los rasgos florales de *Penstemon gentianoides*. Con respecto a las flores control y los demás tratamientos de modificación, los tiempos transcurridos hasta la visita de un abejorro fueron significativamente más prolongados en flores que presentaron constricción de la corola y con la eliminación de la pista de aterrizaje (Mantel-Cox,  $\chi^2 = 10.609$ ; gl= 4;  $P = 0.0313$ ; Fig.2).

Similarmente, flores mostrando constricción de la corola, y particularmente aquellas que además tuvieron eliminación de la base de la corola o pista de aterrizaje, mostraron una menor probabilidad de contacto por parte de los abejorros con las estructuras reproductivas de las flores (GLM: tipo de modificación,  $\chi^2 = 269.33$ , gl = 4,  $P < 0.0001$ ; Fig.3). En comparación con las flores control, la ausencia de pista de aterrizaje por si sola, y la modificación del ángulo de inclinación de las flores no tuvo efecto en este parámetro, posibilitando una alta probabilidad de contacto con anteras y estigma por parte de los abejorros a estas flores.

El número de flores visitadas por cada evento de forrajeo de los abejorros a las flores modificadas también mostró un efecto significativo. Los abejorros visitaron significativamente menos flores con modificación de su inclinación con respecto a los demás tipos de flores (GLM: tipo de modificación,  $\chi^2 = 114.4$ , gl = 4,  $P < 0.0001$ ; Fig, 4a). Asimismo, con respecto a las flores control, las flores con constricción de su corola (los dos tipos) y aquellas con solo la eliminación de la pista de aterrizaje, mostraron también un menos número de visitas por abejorros (aunque significativamente mayor que las flores inclinadas).

La duración de las visitas de abejorros a flores con constricción de corola (los dos tipos) e inclinación fue significativamente menor con respecto a los demás tratamientos (GLM: tipo de modificación,  $\chi^2 = 1871.8$ , gl = 4,  $P < 0.0001$ ; Fig. 4b). Interesantemente, en las flores con sólo la eliminación de la pista de aterrizaje los abejorros mostraron las mayores visitas.

### Eficiencia en la polinización

Flores con constricción de la corola (los dos tipos) y con sólo eliminación de la pista de aterrizaje, expuesta a la visita ad libitum de abejorros, mostraron menor probabilidad en la formación de frutos



(GLM: tipo de modificación,  $\chi^2 = 65.104$ ,  $gl = 4$ ,  $P = <0.0001$ ; Fig. 5a). Sin embargo, las flores con inclinación tuvieron una probabilidad tan alta en la formación de frutos como las flores control.

Por otra parte, la simulación de los rasgos ornitofílicos que no afectaron la eficiencia del abejorro como polinizador fueron las flores que se modificó el ángulo de inclinación. Al aplicar un GLM se obtuvo que no hubo diferencias en el peso de los frutos, sin embargo, al evaluar el número de semillas de los frutos formados por modificación se obtuvo que hay diferencias significativas, se realizó la prueba *post hoc* de Tukey en la cual se obtuvo que las diferencias están dadas entre todos los grupos (Fig. 5b).

## DISCUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que las modificaciones realizadas para simular rasgos ornitófilos en las flores de *Penstemon gentianoides* tienen un efecto negativo en varios aspectos del forrajeo y eficiencia en la polinización de los abejorros visitantes. La evidencia obtenida muestra que los rasgos asociados a la forma y estructura de la corola tales como la construcción del tubo floral y la ausencia de pista de aterrizaje parecen ser importantes en el proceso de des-especialización de la polinización por abejorros.

Nuestros resultados concuerdan con el único estudio previo que manipuló rasgos asociados a la tendencia anti-abeja y que posiblemente promuevan la eficiencia de los colibríes (Zung y cols. 2015). En su estudio, los autores resaltan que la adquisición de rasgos florales como corolas angostas y pérdida de pétalos fusionados en la base (pistas de aterrizaje) tenderán a hacer menos efectivos como polinizadores a los abejorros (Castellanos y cols. 2004). Los datos obtenidos por nuestro estudio soportan estas ideas y además muestran contundentemente que los abejorros disminuyen drásticamente su eficiencia como polinizadores cuando se simulan estos rasgos en flores de especies donde son los polinizadores principales.

La importancia de rasgos florales particulares en la promoción de una polinización eficiente por himenópteros ha sido previamente resaltada. Por ejemplo, Straw (1956) mencionó que las diferencias morfológicas de la flor en aquellas especies polinizadas por abejas con respecto a aquellas polinizadas por colibríes pueden afectar el contacto del polinizador con la flor. El autor resalta que la aparición de rasgos tales como corolas angostas, las estructuras reproductivas que sobresalen de la corola, el ángulo de inclinación respecto al pedicelo, pueden evolucionar como adaptaciones positivas para el transporte y colocación de polen por parte de los colibríes, conllevando a evitar a los himenópteros (Castellanos y cols. 2004; Wilson y cols. 2006).

En este contexto, nuestro estudio ha mostrado que un sistema de polinización mixto como el mostrado por *P. gentianoides* puede especializarse hacia la polinización por colibríes a través de la modificación de pocos rasgos florales. De esta manera, corolas angostas sin pétalos fusionados a manera de pista de aterrizaje, favorecerían el transporte y colocación de polen por estas aves, llevando a los abejorros a tomar un papel secundario en el sistema de polinización. Aun cuando los sistemas mixtos de polinización pueden ser estables, circunstancias tales como cambios en la abundancia de abejorros (disminución) y colibríes (aumento) podrían llevar a una selección mediada

por el polinizador que afecte a los rasgos melitofílicos presentes y favorezca entonces a los rasgos ornitofílicos (Stebbins 1970; Castellanos y cols. 2003; Fenster y cols. 2004; Rosas-Guerrero 2014).

La amplia variedad floral en el género *Penstemon* ha sido explicada por la convergencia floral que exhiben las diferentes especies pertenecientes a este género, y su estudio se ha abordado desde los dos grandes sistemas de polinización: por himenópteros y por colibríes (Wilson y cols. 2004). Se ha sugerido que las especies basales ancestrales son polinizadas por himenópteros y las especies recientes son polinizadas por colibríes. Sin embargo, también existen especies con sistemas mixtos de polinización (Reid y cols. 1988; Lange y Scott 1999; Lara y Ornelas 2008), cómo por ejemplo, *P. gentianoides* (Salas-Arcos y cols. 2017). De manera interesante, estos sistemas son considerados el estado intermedio del cambio evolutivo de la polinización por himenópteros a la polinización por colibríes (Wilson y cols. 2007; Rosas-Guerrero y cols. 2014). Varios estudios han sugerido que la dirección de las transiciones ocurre de himenópteros hacia colibríes como polinizadores (Wilson y cols. 2006; Wolfe y cols. 2006, Wilson y cols. 2007; Thomson y Wilson 2008).

Diversos estudios han analizado la importancia de rasgos específicos en la promoción de cambios en los sistemas de polinización en plantas. Por ejemplo, se ha mostrado que la ruta de mutación en el color de las flores, un rasgo asociado a la atracción de tipos particulares de visitantes, es generalmente del azul o violeta (rasgo melitofílico) al rojo (rasgo ornitofílico) y no de manera inversa (Zufall y Rausher 2004). En sistemas particulares se han comprobado estos hallazgos. Por ejemplo, en el género *Ipomea* se ha mostrado evidencia sobre la transición del color púrpura al rojo (controlado por la biosíntesis de la antocianina) y el cambio de la polinización por abejas a la polinización por colibríes (Cronk y Ojeda 2008). Algo similar ha sido mostrado también en plantas del género *Penstemon*. En *Penstemon barbatus*, una especie de planta con rasgos ornitofílicos y polinizada por colibríes, se ha reportado la evolución hacia el color rojo de las flores (Wessinger y Rausher 2013), situación que sugiere que el color es inicialmente un rasgo floral que promueve los cambios de polinizador (Cronk y Ojeda 2008).

Castellanos y cols. (2004) sugieren que los rasgos florales pueden, por una parte, favorecer la interacción con el mejor polinizador, pero por otra parte, estos rasgos florales pueden excluir a los polinizadores menos eficientes. En este sentido, los resultados que obtuvimos en *P. gentianoides* sugieren que los abejorros son eficientes en la polinización cuando las flores muestran rasgos particulares asociados con la polinización por colibríes tales como reducción en el ancho de la

entrada de la flor y ausencia de pista de aterrizaje. La simulación de estos rasgos modificó el comportamiento de forrajeo de los abejorros visitantes con resultados contrastantes. Por un lado, los abejorros mostraron una reducción en el número de flores visitadas. Sin embargo, el impedimento para acceder eficientemente a las flores también promovió un aumento en la frecuencia de visita con respecto a las flores no manipuladas. Estos resultados son contrarios a los reportados por Zung y cols. (2015), quienes encontraron que al cortar la base de la flor los abejorros reducen la frecuencia de visitas. Nuestras observaciones sugieren que aunque la tasa de visitas no es reducida sino promovida, conductas no mostradas en flores no manipuladas son exhibidas. Por ejemplo, al faltar la pista de aterrizaje varios abejorros entraban a la flor por un costado de la misma, rodeando las anteras para buscar los nectarios. De esta manera, se redujo el contacto del abejorro con las estructuras reproductivas de la flor, situación similar a lo reportado por Castellanos y cols. (2004). Estas conductas pueden explicar inicialmente el escaso éxito en la formación de frutos y semillas que encontramos. Por ello consideramos el rasgo floral “pista de aterrizaje” desempeñan un papel importante en la eficiencia como polinizador en los abejorros.

La reducción en el número de las visitas conjuntamente con el aumento en la duración de cada visita hacia las flores que se les modificó el ángulo de inclinación sugiere una dificultad de acceso para los abejorros. Por ejemplo, nuestras observaciones sugieren que los abejorros invertían más tiempo para poder acceder a una flor, pues la inclinación hacía obsoleta la presencia de “pista de aterrizaje”. Por ello, tras largos intentos fallidos por acceder a la flor los abejorros disminuyeron su frecuencia de visita (Cartar 2004; Cnaani y cols. 2006). Interesantemente, la modificación del ángulo de inclinación no afectó la probabilidad de contacto con las estructuras reproductivas ni la probabilidad de formar frutos. Por ello, nuestros resultados han mostrado que aquellos rasgos en los que se afecta el ancho de la entrada de la flor, los abejorros son menos eficientes al forrajear (Gómez y Perfectti 2010).

En resumen, en nuestro estudio *Penstemon gentianoides* fue un modelo interesante para evaluar rasgos florales que funcionan como anti-abeja, es decir, rasgos que evaden a los abejorros como polinizadores. Esta especie exhibe un sistema mixto de polinización (Salas-Arcos y cols. 2017) donde los rasgos melitofílicos son evidentes. Sin embargo, al simular rasgos ornitofílicos, particularmente la constricción de la corola, los abejorros muestran una disminución en su eficiencia polinizadora. Es necesario explorar de manera conjunta el papel de la adquisición de rasgos florales

particulares en sistemas mixtos de polinización, incluido el color de las corolas, y sus efectos en estabilidad de estos sistemas.

## LITERATURA CITADA

- Armbruster WS, Fenster CB y Dudash MR. 2000. Pollination “principles” revisited: specialization, pollination syndromes, and the evolution of flowers. *Det Nor Vidensk Acad I Mat Natur Kl Skr Ny Ser* 39: 179-200.
- Barrett SCH y Harder LD. 1996. Ecology and evolution of plant mating. *TREE* 11 (2): 73-79.
- Beardsley PM, Yen A y Olmstead RG. 2003. AFLP phylogeny of *Mimulus* section *Erythranthe* and the evolution of hummingbird pollination. *Evolution* 57(6): 1397-1410.
- Cnaani J, Thomson JD y Papaj DR. 2006. Flower choice and learning in foraging bumblebees: effects of variation in nectar volume and concentration. *Ethology*. 112: 278-285.
- Cartar RV. 2004. Resource tracking by bumble bees: responses to plant-levels differences in quality. *Ecology* 85 (10): 2764-2771.
- Castellanos MC, Wilson P y Thomson JD. 2003. Pollen transfer by hummingbirds and bumblebees, and the divergence of pollination modes in *Penstemon*. *Evolution* 57(12): 2742-2752.
- Castellanos MC, Wilson P y Thomson JD. 2004. ‘Anti-bee’ and ‘pro-bird changes’ during the evolution of hummingbird pollination in *Penstemon* flowers. *J Evol Biol* 17: 876-885.
- Cronk Q y Ojeda S. 2008. Bird-pollinated flowers in an evolutionary and molecular context. *Journal Exp Bot* 59 (4): 715-727.
- Faegeri y Van Der Pijl. 1979. *The principles of pollination ecology*. Third Edition. Pergamon Press Ltd.
- Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR y Thomson JD. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 35: 375-403.
- Fleming TH, Geiselman C y Kress WJ. 2009. The evolution of bat pollination: a phylogenetic perspective. *Ann Bot* 104:1017-1043.
- Gegear RJ, Burns R y Swoboda-Battarai KA. 2017. “Hummingbird” floral traits interact synergistically to discourage visitation by bumble bee foragers. *Ecology* 98(2): 489-499.
- Grant V. 1994. Historical development of ornithophily in the western North American flora. *Evolution*. 91: 10407-10411.
- Gómez JM y Perfectti F. 2010. Evolution of complex traits: the case of *Erysimum* corolla shape. In *J. Plant Sci.* 171(9): 987-998.

- Kay KM, Reeves PA, Olmstead RG y Schemske DW. 2005. Rapid speciation and the evolution of hummingbird pollination in Neotropical *Costus* subgenus *Costus* (Costaceae): evidence from nrDNA ITS and ETS sequences. *Am J. Bot.* 92: 1899-1910.
- Lange RS y Scott PE. 1999. Hummingbird and bee pollination of *Penstemon pseudospectabilis*. *J Torrey Bot Soc* 126(2): 99-106.
- Lara C y Ornelas JF. 2008. Pollination ecology of *Penstemon roseus* (Plantaginaceae), an endemic perennial shifted toward hummingbird specialization?. *Plant Syst Evol* 271: 223-237.
- Muchhala N. 2007. Adaptive Trade-Off in floral morphology mediates specialization for flowers pollinated by bats and hummingbirds. *Am. Nat.* 169(4): 494-504.
- Reid WH, Sensiba P y Freeman E. 1988. A mixed pollination system in *Penstemon pseudospectabilis*. M.E. Jones. (Scrophulariaceae). *Great Basing Nat* 48(4): 489-494.
- Rodríguez-Rodríguez MC, Jordano P y Valido A. 2013. Quantity and quality components of effectiveness in insular pollinator assemblages. *Oecologia* 173: 179-190.
- Rosas-Guerrero V, Aguilar R, Martén-Rodríguez S, Ashworth L, Lopezaraiza-Mikel M, Bastida JM y Quesada M. 2014. A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators?. *Ecol Lett* 17 (3): 388-400.
- Salas-Arcos L, Lara C y Ornelas F. 2017. Reproductive biology and nectar secretion dynamics of *Penstemon gentianoides* (Plantaginaceae): a perennial herb with a mixed pollination system?. *PeerJ* 5:e3636; DOI 10.7717/peerj.3636.
- Schemske DW y Horvitz CC. 1984. Variation among Floral Visitors in pollination ability: a precondition for mutualism specialization. *Science* 225: 519-521.
- Scopece G, Cozzolino S, Johnson SD y Schiestl F. 2010. Pollination efficiency and the evolution of specialized deceptive pollination systems. *Am Nat* 175(1): 98-105.
- Stebbins GL. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms I: Pollination mechanisms. *Ann Rev Ecol Syst* 1: 307-326.
- Steiner KE. 1998. The evolution of beetle pollination in a South African orchid. *Am J Bot* 85(9): 1180-1193.
- Straw RM. 1956. Floral isolation in *Penstemon*. *Am Nat* 90(850): 47-53.
- Tepedino VJ, Sipes SD y Griswold TL. 1999. The reproductive biology and effective pollinators of the endangered beardtongue *Penstemon penlandii* (Scrophulariaceae). *Plant Syst Evol* 219: 39-54.

- Thomson JD, Wilson P, Valenzuela M y Malzone M. 2000. Pollen presentation and pollination syndromes, with special reference to *Penstemon*. *Plant Spec Biol.* 15: 11-29.
- Thomson JD y Wilson P. 2008. Explaining evolutionary shifts between bee and hummingbird pollination: convergence, divergence and directionality. *Int. J. Plant Sci.* 169(1): 23-38.
- Wessinger CA, Hileman LC, Rausher MD. 2014. Identification of major quantitative trait loci underlying floral pollination syndrome divergence in *Penstemon*. *Phil Tran Royal Soc B.* 369(1648): 20130349 DOI 10.1098/rstb.2013.0349.
- Wilson P, Castellanos MC, Hogue JM, Thomson JD y Armbruster SW. 2004. A multivariate search for pollination syndromes among *Penstemons*. *Oikos* 104: 345-361.
- Wilson P, Castellanos MC, Wolfe AD y Thomson JD. 2006. Shifts between bee and bird pollination in *Penstemon*. En: *Plant-pollinator interactions, from specialization to generalization*. Waser Nm y Ollerton J. (eds). The University of Chicago Press. Chicago. pp 47-68.
- Wilson P, Wolfe AD, Armbruster WS y Thomson JD. 2007. Constrained lability in floral evolution: counting convergent origins of hummingbird pollination in *Penstemon* and *Keckiella*. *New Phytologist* 176: 883-890.
- Wolfe AD, Randle CP, Datwyler SL, Morawets JJ, Arguedas N y Díaz J. 2006. Phylogeny, taxonomic affinities, and biogeographic of *Penstemon* (Plantaginaceae) base on ITS and cpDNA sequence data. *Am J Bot* 93(11): 1699-1713.
- Zufall RA y Rausher MD. 2004. Genetic changes associated with floral adaptation restrict future evolutionary potential. *Nature* 428: 847-850.
- Zung JL, Forrest JRK, Castellanos MC, Thomson JD. 2015. Bee- to bird- pollination shifts in *Penstemon*: effects of floral-lip removal and corolla constriction on the preferences of free-foraging bumble bees. *Evol. Ecol.* 29: 341-354.



## LEYENDA DE FIGURAS

Figura 1. Modificaciones realizadas en flores de *Penstemon gentianoides* sometidas a la visita por abejorros. a) flor ligada con presencia de base, b) flor inclinada, c) flor ligada sin presencia de base, d) flor con eliminación de base y, e) flores sin modificación o control.

Figura 2. Comparación entre los distintos tipos de manipulación realizadas en flores de *P. gentianoides*, en la probabilidad de ser visitadas por abejorros durante periodos de observación de 30 minutos. 'Tiempo hasta la visita de un abejorro' se refiere al tiempo transcurrido desde el inicio de la observación.

Figura 3. Probabilidad de contacto de los abejorros visitantes a las estructuras reproductivas en flores manipuladas de *Penstemon gentianoides*. Datos (media  $\pm$  error estándar) con la misma letra superíndice muestran diferencias no significativas entre grupos ( $P < 0.05$ ).

Figura 4. Efecto de las modificaciones en los rasgos de flores de *Penstemon gentianoides*, sobre (a) el número de flores visitadas por los abejorros y (b) la duración de estas visitas. Datos (media  $\pm$  error estándar) con la misma letra superíndice muestran diferencias no significativas entre grupos ( $P < 0.05$ ).

Figura 5. (a) Probabilidad de éxito en la formación de frutos en flores manipuladas expuestas a visitas por abejorros y, (b) número de semillas cuantificado en los frutos colectados. Datos (media  $\pm$  error estándar) con la misma letra superíndice muestran diferencias no significativas entre grupos ( $P < 0.05$ ).

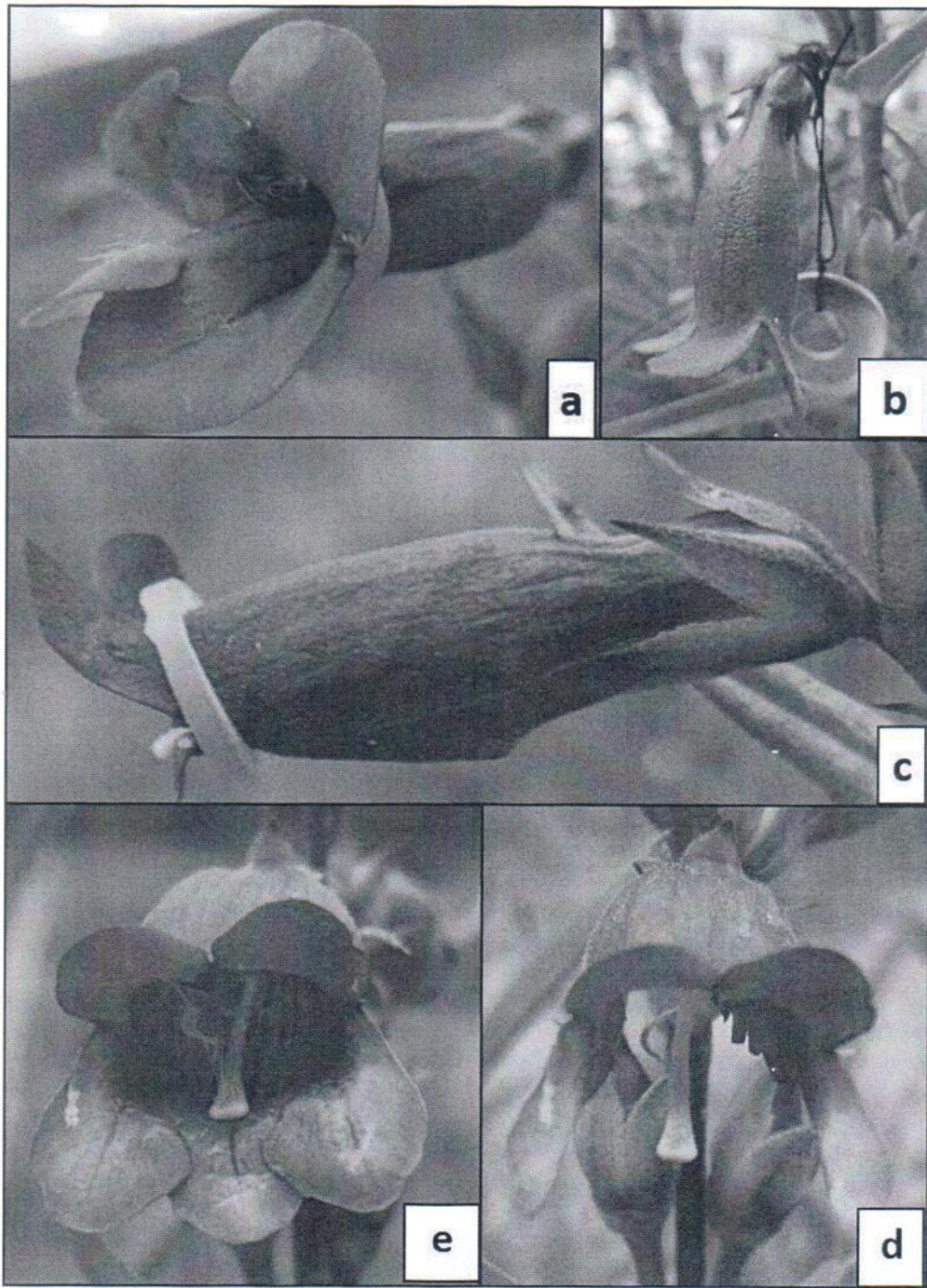


Figura 1.

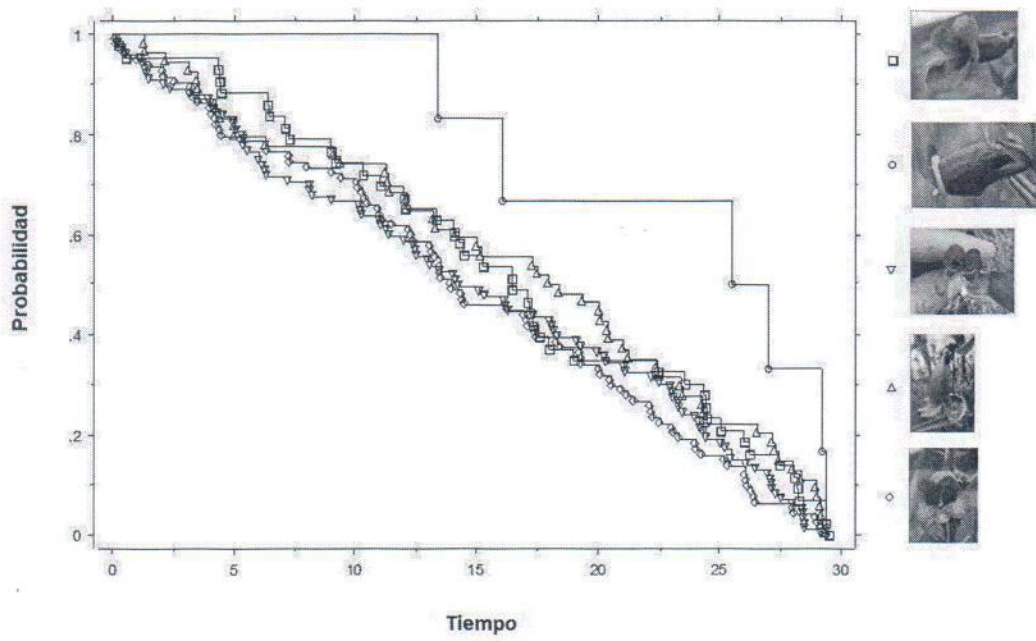


Figura 2.

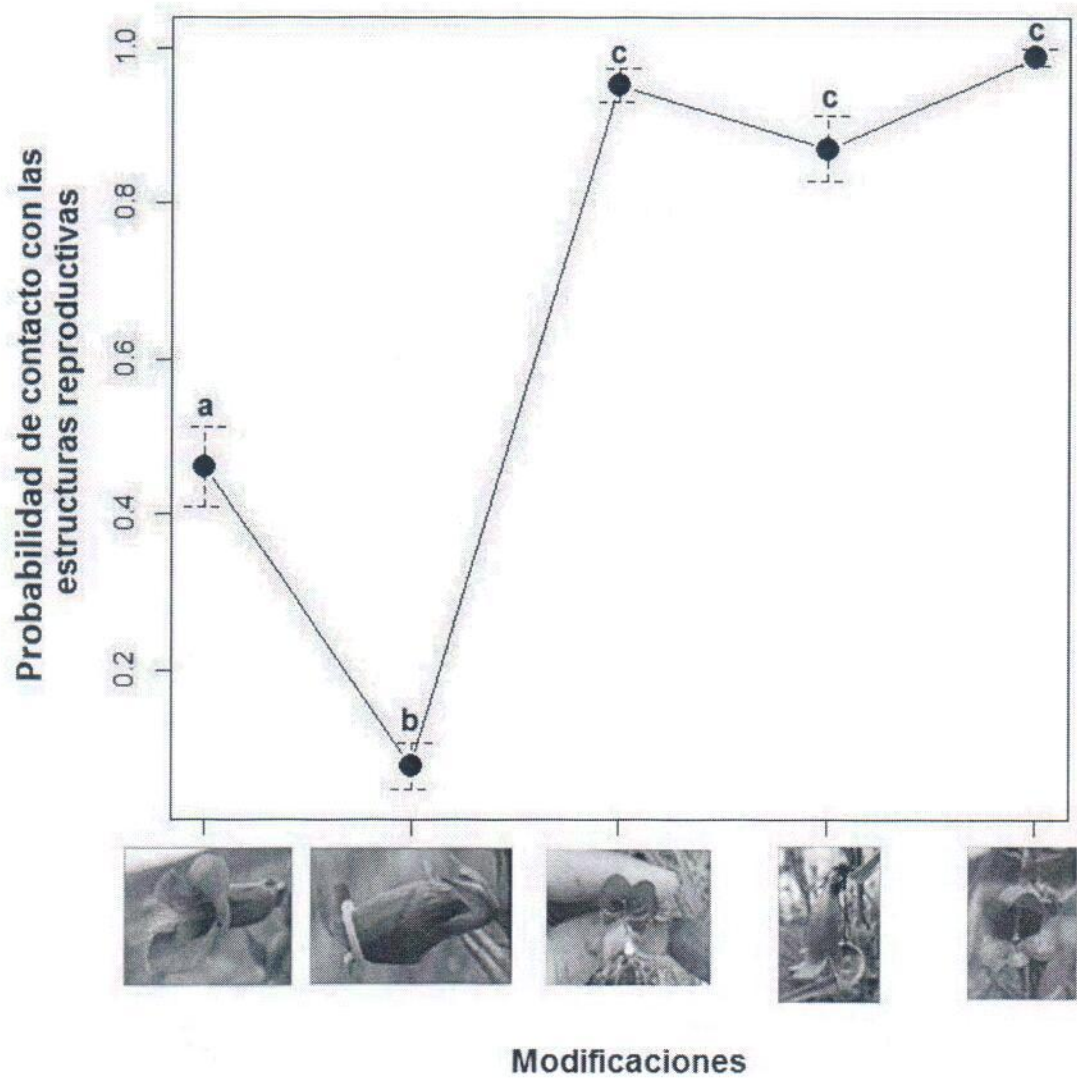


Figura 3.

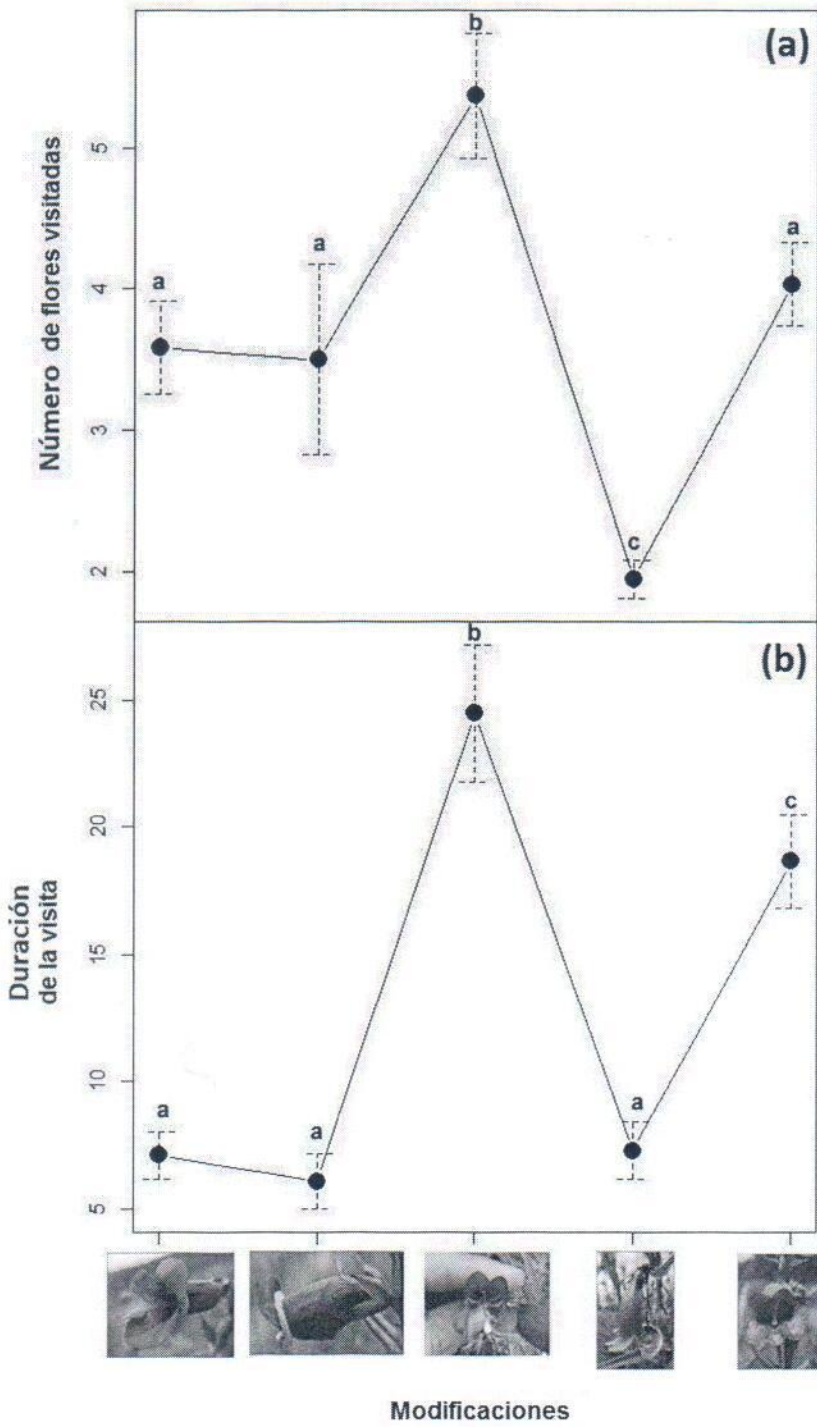


Figura 4.

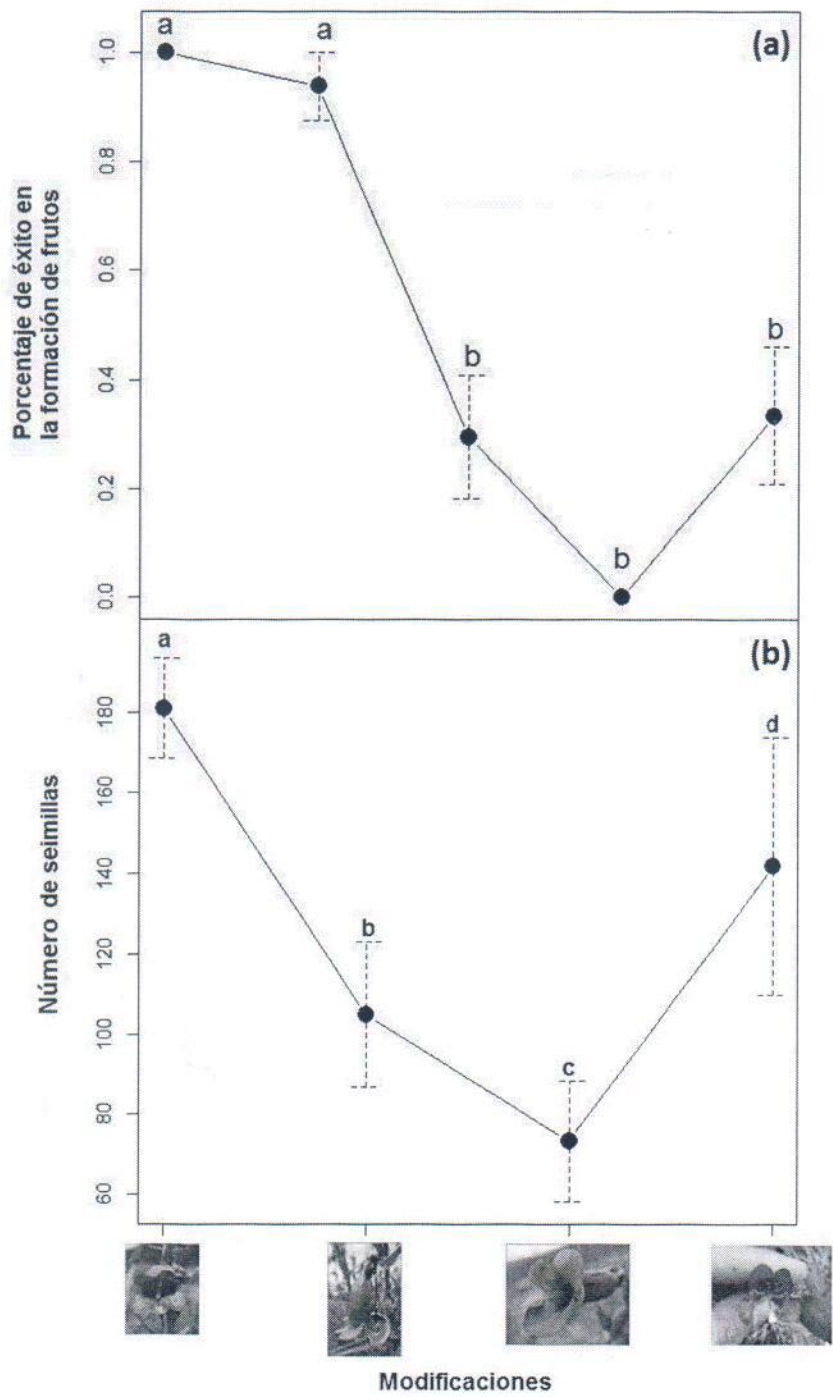


Figura 5.

## DISCUSIÓN GENERAL

Las flores han sido un paradigma para muchos ecólogos y ecólogos evolucionistas debido a su gran complejidad e interacción con gran diversidad de animales que fungen como vectores de su polen. La fuerza de las interacciones entre plantas y sus polinizadores es inicialmente promovida por las recompensas ofrecidas a los visitantes y dispuestas fundamentalmente en las flores, las cuales incluyen por ejemplo, néctar, polen, tejidos florales, aceites y resinas (Ollerton 1999; Araújo y cols. 2011; Del Val y Dirzo 2004).

La relación que existe entre las flores y sus visitantes ha permitido diferenciar la tendencia hacia grupos particulares de rasgos asociados hacia la atracción de un grupo particular de animales. Por ejemplo, el color y la forma de la corola promueve cierta preferencia por parte de los visitantes, la cual históricamente utilizada para determinar síndromes de polinización (Van Der Pijl 1961; Fishbein y Venable 1996; Thomson y cols. 2000; Castellanos y cols. 2003; Rausher 2008; Martén-Rodríguez y cols. 2010).

En este sentido, especies del género *Penstemon* han sido un excelente modelo de estudio debido a que exhiben una amplia diversidad floral, así como un amplio ensamble de polinizadores, principalmente himenópteros y colibríes (Tepedino 1999; Wilson y cols. 2004; Tepedino y cols. 2007; Wilson 2007). Sin embargo, dentro del género existen especies cuyos rasgos permiten la presencia de sistemas mixtos de polinización, es decir, la presencia como polinizadores de himenópteros y colibríes son los polinizadores (Reid y cols. 1988). En la filogenia de este género se ha sugerido una evolución convergente en los sistemas de polinización y, se ha evidenciado que las transiciones de un sistema particular de polinización ha sido principalmente de abejas hacia colibríes (Wilson y cols. 2006; Wolfe y cols. 2006), y los sistemas mixtos de polinizadores son considerados como fases de transición (Wilson y cols. 2007; Rosas-Guerrero y cols. 2014).

Las especies de *Penstemon* con sistema mixto de polinizadores pueden mostrar rasgos florales asociados a ambos tipos de síndromes de polinización, melitofilia y ornitofilia (Reid y cols. 1988; Lara y Ornelas 2008). En la presente tesis mostramos que *P. gentianoides* es una especie con sistema de polinización mixto, evidenciando que abejorros (*Bombus*) y colibríes (por ejemplo el género *Selasphorus*) llevan a cabo la polinización (Capítulo 1). En este sentido, diversos estudios han sugerido cambios o transiciones evolutivas de un tipo de polinizador a otro en plantas de este grupo (por ejemplo, de abeja a colibrí), particularmente en especies que presentan sistemas mixtos de polinizadores, resaltándolos como sistemas modelo para este tipo de cambios evolutivos

mediados por los polinizadores (Van Der Pijl 1961; Fishbein y Venable 1996; Thomson y cols. 2000; Castellanos y cols. 2003; Pérez y cols. 2006; Lara y Ornelas 2008; Rausher 2008; Martén-Rodríguez y cols. 2010; Rosas-Guerrero y cols. 2014).

De manera interesante, en *P. gentianoides*, tanto abejorros como colibríes responden diferencialmente a través de su comportamiento de forrajeo a los rasgos florales de esta especie. Por ejemplo, diferencias en la calidad del néctar ofrecido a lo largo del día; promueve que la tasa de visita por parte de los colibríes sea mayor en la mañana (néctar más diluido) en comparación con el medio día y la tarde, donde aumenta la visita por abejorros. De esta manera, la presencia de un néctar diluido en una planta que mayormente tiene rasgos melitofílicos parece estar promoviendo la presencia de colibríes como polinizadores (Baker 1975, Pyke y Waser 1981).

Por otra parte, al comparar la eficiencia en la polinización de abejorros y colibríes, evidenciamos la importancia como grupo funcional de estos últimos para *P. gentianoides*. Aunque en cuanto a la formación de frutos no hubo diferencias significativas entre visitantes, al evaluar el número de semillas formadas por la polinización realizada por abejorros y colibríes si hubo diferencias. De esta manera, mostramos que los frutos formados cuando se realizó la polinización por colibríes tienen mayor número de semillas con respecto a los polinizados por los abejorros, situación que evidencia un sistema mixto de polinización.

Los *Penstemon* ancestrales presentan síndrome de polinización por abejas y la polinización por colibríes es relativamente reciente (Grant 1994; Wolfe y cols. 2006; Wilson y cols. 2007). En este género, se predice que los cambios hacia un polinizador específico puede ocurrir cuando está presente un visitante con baja remoción y alta deposición de polen y que llega a ser abundante (Thomson y cols. 2000; Wilson y cols. 2006). En el género *Penstemon* los cambios a una polinización por colibríes parecen resultar en una buena transferencia de polen, conllevando a que esta función por parte de las abejas sea ineficiente. Dicha idea llevó a Castellanos y cols. (2004) y Zung y cols. (2015) a investigar si los rasgos florales pueden evolucionar hacia la exclusión de los polinizadores menos eficientes en especies de *Penstemon*. Los autores se enfocaron en el estudio de rasgos florales que juegan un papel importante en la transferencia de polen debido a la interacción física entre el polinizador y la flor, los cuales afectan directamente el forrajeo de los abejorros visitantes. Nosotros nos basamos en estos trabajos para realizar modificaciones florales en *P. gentianoides* y con ello simular rasgos ornitofílicos y, poner a prueba si hay un efecto negativo en el papel como polinizador de los abejorros.



Esta idea fue desarrollada en el capítulo 2. Nuestros resultados evidenciaron que al modificar el ancho de la entrada de la flor y al eliminar la “pista de aterrizaje”, se afectó de manera significativa a la eficiencia en la polinización por parte de los abejorros. Estos datos sugieren la adquisición de estos rasgos en sistemas mixtos de polinización actuarían como anti-abeja, ya que dificultan la labor polinizadora de estos visitantes, tal como fue propuesto previamente por Castellanos y cols. (2004). Desde esta perspectiva, se esperaría que la selección mediada por el polinizador afecte a los rasgos melitofílicos y favorecería a los rasgos ornitofílicos (Stebbins 1970; Castellanos y cols. 2003; Fenster y cols. 2004; Rosas-Guerrero 2014).

## CONCLUSIÓN GENERAL

La presente tesis ha mostrado que *P. gentianoides* tiene un sistema mixto de polinización. Aunque la eficiencia de polinización es alta en flores polinizadas por abejorros, el importante número de semillas producido por visitas de colibríes soporta la importancia de estas aves como grupo funcional. Así mismo, hemos mostrado que la constricción artificial de las corolas y el ángulo de inclinación actúan como barreras que evitan la visita y polinización por abejorros. Estos rasgos junto con el néctar diluido asociado a la baja visita matutina de abejorros parece ser rasgos clave en la evolución de las transiciones evolutivas abejorro-colibrí en plantas de este género.

## LITERATURA CITADA

- Araújo FP, Almeida BAA y Olivera PE. 2011. Floral resources and hummingbirds on an island of flooded forest in Central Brazil. *Flora* 206: 827-835.
- Baker HG. 1975. Sugar concentrations in nectars from hummingbirds flowers. *Biotropica* 7 (1): 37-41 DOI:10.2307/2989798.
- Castellanos MC, Wilson P y Thomson JD. 2003. Pollen transfer by hummingbirds and bumblebees, and the divergence of pollination modes in *Penstemon*. *Evolution* 57(12): 2742-2752.
- Castellanos MC, Wilson P y Thomson JD. 2004. 'Anti-bee' and 'pro-bird changes' during the evolution of hummingbird pollination in *Penstemon* flowers. *J Evol Biol* 17: 876-885.
- Del Val E y Dirzo R. 2004. Mirmecofilia: Las plantas con ejército propio. *Interciencia* 29(12):673-679.
- Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR y Thomson JD. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 35:375-403.
- Fishbein M y Venable DL. 1996. Diversity and temporal change in the effective pollinators of *Asclepias tuberosa*. *Ecology* 77(4): 1061-1073.
- Grant V. 1994. Historical development of ornithophily in the western North American flora. *Evolution*. 91: 10407-10411.
- Lara C y Ornelas JF. 2008. Pollination ecology of *Penstemon roseus* (Plantaginaceae), an endemic perennial shifted toward hummingbird specialization?. *Plant Syst Evol* 271: 223-237.
- Martén-Rodríguez S, Fenster CB, Agnarsson I, Skog LE y Zimmer EA. 2010. Evolutionary breakdown of pollination specialization in a Caribbean plant radiation. *New Phytol* 188: 403-417.
- Ollerton J. 1999. La evolución de las relaciones polinizador-planta en los artrópodos. *Bol. S.E.A.* 26:741-758.
- Pérez F, Arroyo MTK, Medel R y Hershkovitz MA. 2006. Ancestral reconstruction of flower morphology and pollination systems in *Schizanthus* (Solanaceae). *Am J Bot* 93(7): 1029-1038.
- Pires ND y Dolan L. 2012. Morphological evolution in land plants: new designs with old genes. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 507: 508-518.

- Pyke GH y Waser NM. 1981. The production of dilute nectars by hummingbird and honeyeater flowers. *Biotropica* 13(4): 260-270.
- Rausher MD. 2008. Evolutionary transitions in floral color. *Int. J. Plant Sci.* 169 (1): 7-21.
- Reid WH, Sensiba P y Freeman E. 1988. A mixed pollination system in *Penstemon pseudospectabilis*. M.E. Jones. (Scrophulariaceae). *Great Basing Nat* 48 (4): 489-494.
- Rosas-Guerrero V, Aguilar R, Martén-Rodríguez S, Ashworth L, Lopezaraiza-Mikel M, Bastida JM y Quesada M. 2014. A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators?. *Ecol Lett.* 17: 388-400.
- Stebbins GL. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms I: Pollination mechanisms. *Ann Rev Ecol Syst* 1: 307-326.
- Thomson JD, Wilson P, Valenzuela M y Malzone M. 2000. Pollen presentation and pollination syndromes, with special reference to *Penstemon*. *Plant Spec Biol* 15: 11-29.
- Tepedino VJ, Sipes SD y Griswold TL. 1999. The reproductive biology and effective pollinators of the endangered beardtongue *Penstemon penlandii* (Scrophulariaceae). *Plant Syst Evol* 219: 39-54.
- Tepedino VJ, Toler TR, Bradley BA, Haw JL y Griswold TL. 2007. Pollination biology of a disjunct population of the endangered sandhills endemic *Penstemon haydenii* S. Wats (Scrophulariaceae) in Wyoming USA. *Plant Ecol* 193 (1): 59-69. DOI 10.1007/s11258-006-9248-7.
- Van der Pijl L. 1961. Ecological aspects of flower evolution II Zoophilous flower clases. *Evolution* 15: 44-59.
- Wilson P, Castellanos MC, Hogue JM, Thomson JD y Armbruster SW. 2004. A multivariate search for pollination syndromes among Penstemons. *Oikos* 104: 345-361.
- Wilson P, Castellanos MC, Wolfe AD y Thomson JD. 2006. Shifts between bee and bird pollination in *Penstemon*. En: *Plant-pollinator interactions, from specialization to generalization*. Waser Nm y Ollerton J(eds). The University of Chicago Press. Chicago. pp 47-68.
- Wilson P, Wolfe AD, Armbruster WS y Thomson JD. 2007. Constrained lability in floral evolution: counting convergent origins of hummingbird pollination in *Penstemon* and *Keckiella*. *New Phytol* 176: 883-890.

Wolfe AD, Randle CP, Datwyler SL, Morawets JJ, Arguedas N y Díaz J. 2006. Phylogeny, taxonomic affinities, and biogeographic of *Penstemon* (Plantaginaceae) base on ITS and cpDNA sequence data. Am J Bot 93(11): 1699-1713.

Zung JL, Forrest JRK, Castellanos MC, Thomson JD. 2015. Bee- to bird- pollination shifts in *Penstemon*: effects of floral-lip removal and corolla constriction on the preferences of free-foraging bumble bees. Evol. Ecol. 29: 341-354.