

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Ciencias Biológicas

**“BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *VIGNA CARACALLA*
(FABACEAE)”**

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área Biología.**

Ing. Agr. Angela Virginia Etcheverry

DIRECTORES: Dr. Stefan Vogel (Instituto de Botánica de Viena-Austria)

Ing. Ramón Palacios (UBA).

CONSEJERO DE ESTUDIOS: Dra. Patricia Susana Hoc (UBA)

**LUGAR DE TRABAJO: Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional
de Salta.**

LUGAR Y FECHA DE PRESENTACIÓN: Buenos Aires-Noviembre 2005

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
AGRADECIMIENTOS	3
1. INTRODUCCION	4
1.1. OBJETIVO GENERAL	12
1.2. OBJETIVOS PARCIALES	12
2. MATERIALES Y METODOS	14
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
3.1. CARACTERES FLORALES	
3.1.1. MORFOLOGÍA FLORAL DE <i>V. caracalla</i>	24
3.1.2. OBSERVACIONES DE LA ESTRUCTURA FLORAL CON MEBA	36
3.1.3. OBSERVACIONES DE LA FENOLOGIA FLORAL	41
3.1.4. VARIABILIDAD DE LOS CARACTERES FLORALES	42
3.1.5. PATRÓN DE SECRECIÓN DE NÉCTAR Y EFECTOS DE REMOCIÓN	46
3.2. VISITANTES FLORALES	
3.2.1. ELENCO DE VISITANTES	57
3.2.2. NÚMERO TOTAL DE VISITAS, TASA Y DURACIÓN	62
3.2.3. INTERACCIÓN ENTRE LA FLOR Y LOS VISITANTES	67
3.3. SISTEMA REPRODUCTIVO	
3.3.1. PROPORCIONES POLEN/OVULOS, NÚMERO DE GRANOS DE POLEN POR ANTERA, NÚMERO DE ÓVULOS POR OVARIO	69
3.3.2. ENSAYOS DE REPRODUCCION A CAMPO	72
3.3.3. ÉXITO REPRODUCTIVO	76
4. CONCLUSIONES	80
5.2.1. REFERENCIAS	84

BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *VIGNA CARACALLA* (FABACEAE)

Resumen

Se estudio la biología reproductiva de *Vigna caracalla* en cinco poblaciones de Salta y Jujuy (1570, 1400, 1240, 980 y 700 m.s.n.m.). La flor es asimétrica, los pétalos se hallan modificados, la quilla forma de 3,75 a 5,25 revoluciones. Los caracteres morfológicos varían entre poblaciones y están correlacionados ente sí, pero no están relacionados con el éxito reproductivo materno. La antesis dura 12 horas, la secreción de néctar ocurre en las primeras 6 horas. Las extracciones repetidas no tienen efecto en el peso del azúcar total secretado. *Bombus morio* (Reina y obreras), *Centris bicolor*, *Eufriesea mariana* y *Xylocopa eximia* operan el mecanismo de polinización (tipo cepillo). El sistema reproductivo es mixto, pero depende obligadamente de polinizadores para formar frutos, dada la ocurrencia de “membrana estigmática”. En todas las poblaciones existe limitación por polinizadores y el polen alógamo tiene mayor capacidad fecundante que el propio, excepto en la población de mayor altitud. Existe una relación inversa entre producción de polen, relación P/O y altitud. En la población de mayor altitud se observó menor separación anteras-estigma, mayor nivel de autocompatibilidad, ocurrencia de autopolinización automática, el menor número de especies polinizadoras (sólo *B. morio*) y el menor éxito reproductivo materno.

Palabras clave: asimetría, gradiente altitudinal, néctar, sistema reproductivo, *Vigna caracalla*, visitantes florales.

REPRODUCTIVE BIOLOGY OF *VIGNA CARACALLA* (FABACEAE)

Abstract

Floral morphology, floral biology, nectar production, removal effects, floral visitors and breeding system were analysed in five populations of *V. caracalla* from Salta and Jujuy along an altitudinal gradient. The petals are modified and the keel shows 3.75-5.25 revolutions. Floral characters differ among populations and are significantly correlated, but there is no relationship between them and female reproductive success. Flowers lasted for 12 hours and produced nectar during the morning hours. The overall sugar production is not affected by nectar removal. Hand crosses showed that this species is self-compatible, but depends on pollinators to set seeds. At the highest site, automatic self-pollination takes place, suggesting the occurrence of spontaneous rupture of the stigmatic membrane. All populations exhibited pollinator limitation. Hand crossed fruits were more successful than hand selfed ones, with the exception of the highest site. *Bombus morio* (Queen and workers), *Centris bicolor*, *Eufriesea mariana* and *Xylocopa eximia* trigger the pollination mechanism (brush type). Neither reproductive success, nor floral size showed an altitudinal pattern, however, pollen production and P/O decreased with altitude. Besides, the highest level of self-compatibility and automatic self-pollination as well as the lowest number of pollinators (*B. morio* only) were found at the highest altitude.

Key words: asymmetry, breeding system, *Vigna caracalla*, Fabaceae, flower visitors , nectar features.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi sentimiento de gratitud hacia las siguientes personas: mis Directores, mi esposo Julio y mi hijo Julián, a mis familiares y amigos.

A Dulce Figueroa-Castro, Trinidad Figueroa, Mercedes Alemán por su ayuda. A Christian Westerkamp, Lawrence Harder, Roberto Newmann, por las sugerencias. A Andrés Tálamo por el asesoramiento estadístico.

1. INTRODUCCION

Interacción planta-polinizador y morfología floral

La reproducción en las Angiospermas incluye cuatro procesos secuenciales: la floración, la polinización, la fructificación y la dispersión de las semillas. La polinización, *i.e.*, la transferencia del polen desde las anteras al estigma de la flor se realiza, en gran medida, a través de mutualismos con animales que actúan como vectores de polen o polinizadores. Se considera que la interacción entre plantas y sus polinizadores es una de las principales causas de la evolución de los caracteres florales y del sistema reproductivo de las plantas (*e.g.*, Wyatt 1983, Barrett y Harder 1996). Con respecto a los caracteres florales, existe una considerable variación en forma y tamaño de la corola, cantidad y calidad de las recompensas y disposición de las estructuras reproductivas, la cual habría surgido en respuesta a la selección mediada por los polinizadores (Stebbins 1970, Feisinger 1983). Para que los caracteres florales evolucionen en respuesta a las presiones selectivas de los polinizadores se requiere de: 1) variación fenotípica; 2) correlación entre los rasgos florales y el éxito reproductivo y 3) un componente heredable de la variación fenotípica (Campbell 1991).

En las últimas décadas, numerosos autores han estudiado los caracteres florales desde diferentes ángulos: 1) variación de la morfología floral entre poblaciones; (*e.g.*, Herrera 1990, Guitián *et al.* 1997, Silva Montellano y Eguiarte 2003 y referencias en éste); 2) variación de la morfología floral dentro de la población y dentro de la planta (Johnson *et al.* 1995, y referencias en éste), y 3) efectos de la variación de la morfología floral en el éxito paterno (exportación de

polen) y en el éxito materno (producción de semillas) (Murcia 1990, Young y Stanton 1990, Campbell *et al.* 1991, Wilson 1995, Wilson y Thomson 1996).

Interacción planta-polinizador y sistemas reproductivos

En sentido amplio, el sistema reproductivo involucra aquellos atributos de un organismo que gobiernan el modo en que las gametas se unen para dejar descendencia (Barrett y Eckert 1990). La dispersión de gametas masculinas alojadas en el grano de polen, es mediada por vectores, debido al carácter sésil de las mismas. Por lo tanto, la reproducción de las plantas resulta compleja, dado que un individuo puede recibir polen de diversos donantes, incluido él mismo (Barrett y Harder 1996). Los sistemas reproductivos han sido interpretados en el contexto de una dicotomía, *i.e.*, especies xenógamas auto-incompatibles y especies autógamas auto-compatibles (*e.g.*, Faegri y Pijl 1971) o de una tricotomía, *i.e.*, predominantemente xenógamas, predominantemente autógamas y mixtas (Baker 1959). Más recientemente se determinó que el sistema reproductivo no es una propiedad estática de un individuo, de una población o de una especie. El modo de reproducción de una especie puede diferir entre poblaciones, mostrando un continuum entre los dos extremos propuestos (*e.g.*, *Lupinus nanus*: Horovitz y Harding 1972; *Phaseolus vulgaris* y *P. coccineus*: Escalante *et al.* 1994, *Ipomoea hederaceae*: Hull-Sanders *et al.* 2005).

Los sistemas reproductivos se hallan influenciados por factores ambientales, demográficos y genéticos (Barrett y Eckert 1990), dado que están regulados por genes sujetos a selección (Brown 1990). Entre los factores ambientales, se considera que las interacciones planta-polinizador constituyen un factor muy importante (Wyatt 1983, Barrett y Eckert 1990, Holsinger 1996). El proceso de

polinización es fundamental porque determina las oportunidades reproductivas determinando la dispersión de polen entre las flores y la estructura genética de la población. A pesar de la obvia relación entre polinización y sistemas reproductivos, ambos tópicos han sido estudiados por separado hasta la última década (Barrett y Harder 1996). Bawa y Beach (1981) enfatizan que las consideraciones teóricas acerca de la naturaleza adaptativa de los sistemas reproductivos debe considerar la ecología reproductiva de las plantas. Por lo tanto, resulta importante estudiar este aspecto dentro de un marco ecológico para identificar posibles variaciones en el sistema reproductivo.

Interacciones planta-polinizador en un contexto geográfico

A partir de la teoría del mosaico geográfico de coevolución, desarrollada por Thomson (1994, 1999) se podría esperar que las interacciones planta-polinizador varíen entre poblaciones, generando un patrón complejo, tanto en características florales como en los sistemas reproductivos de una especie. En síntesis, dicha teoría propone que: 1) las interacciones interespecíficas difieren entre poblaciones; 2) una interacción puede coevolucionar, afectar la evolución de una de las partes o no tener efecto; 3) las poblaciones difieren en la magnitud de especialización a una o varias especies; 4) estas diferencias interpoblacionales crean un mosaico geográfico de interacciones.

En situaciones de escasez de polinizadores ya sea en número o en especies, se espera que la autogamia sea favorecida (Wyatt 1983, Jarne y Charlesworth 1988), de modo que especies auto-compatibles, pero predominantemente xenógamas cambian hacia la auto-polinización para asegurar la reproducción (Dole 1992, Fausto 2001). Esta hipótesis, conocida como del “reaseguro reproductivo” es

una de las propuestas por Jain (1976) para explicar la evolución de la autogamia. La situación planteada puede estar causada por ocurrencia de la planta en la periferia del rango de distribución del polinizador (Spears 1987, Fausto *et al.* 2001), por extinción local de polinizadores, por fluctuaciones demográficas que causan variaciones anuales (Jennersten 1988), o por competencia por polinizadores (Rathcke 1983, Campbell 1985, Kasagi y Kudo 2003).

La capacidad para la autogamia esta relacionada con dos grupos de rasgos morfológicos de las flores. En primer lugar, la proximidad de anteras y estigma dentro de una flor determinará las probabilidades de acceso del polen al estigma de la misma flor (e.g., Holtsford y Ellstrand, 1992, Karron *et al.* 1997, Kalisz *et al.* 1999). Segundo, la separación temporal de la maduración de ambos (dicogamia) funciona en el mismo sentido, a mayor solapamiento entre las fases madurativas del polen y del estigma, mayor será la tasa de autogamia (Bertin y Newman 1993).

Lloyd y Schoen (1992), Diggle (1992) y Kalisz *et al.* (1999) destacan que el estudio de los aspectos funcionales de la autogamia es fundamental para comprender la evolución y selección de los sistemas reproductivos.

A pesar de su importancia, hay pocos trabajos que analicen la hipótesis de reaseguro reproductivo a través de la comparación de tasas de visitas, limitación por polen y habilidad para la autogamia entre poblaciones situadas en medio ambientes diferentes (Karoly 1992, Fausto *et al.* 2001, Goodwillie 2001, Totland y Schulte-Herbruggen 2003).

Biología Reproductiva en Fabaceae

En familias caracterizadas por mecanismos de polinización especializados y flores con simetría bilateral, tales como Fabaceae, se ha registrado que la

xenogamia predomina sobre la autogamia y que las abejas son los principales polinizadores, además de aves y murciélagos. (Arroyo 1981, Lloyd y Schoen 1992). Con respecto a la Subfam. Papilionoideae, Arroyo (1981) informó que la auto-compatibilidad es más frecuente que la auto-incompatibilidad. A la fecha se realizaron numerosos estudios de biología reproductiva en este grupo, pero la mayoría de ellos se centraron en una población única y además no integraron todos los aspectos aquí planteados, con lo cual las posibles variaciones de acuerdo al contexto ecológico quedan inexploradas.

Especies de diversas tribus dentro de la subfamilia presentan flores asimétricas con morfología floral diferente a la típica (Polhill 1976, Marechal *et al.* 1981, Yeo 1993 y Westerkamp, com. pers.):

Phaseoleae: *Phaseolus*, *Macroptilium*, *Vigna*, *Sphenostylis*, *Adenolichos oliveri*, *Canavalia cathartica*, *Vatovea pseudolablab*.

Vicieae: *Lathyrus* (algunas especies).

Galegeae: *Swainsonia*.

Robineae: *Coursetia*.

Crotalarieae: *Bolusia*, *Crotalaria*.

Indigofereae: *Vaughania*.

La modificación más notable es la prolongación de la quilla. Esta adopta un aspecto tubular y forma una a más revoluciones superpuestas que forman un espiral en la vía de acceso al nectario. En estas flores se informó la ocurrencia desde xenogamia obligada hasta autogamia obligada, inclusive dentro del mismo individuo [flores chasmógamas xenógamas y cleistógamas subterráneas con autopolinización automática en *Macroptilium panduratum* (Etcheverry *et al.* 2001); flores ceistógamas en *M. fraternum* (Drewes y Hoc 2000); xenogamia facultativa en *M. bracteatum*

(Brizuela *et al.* 1993), *M. lathyroides* (Etcheverry *et al.* 1998), *M. erythroloma* (Etcheverry *et al.* 1999), *Phaseolus vulgaris* var. *aborigeneus* (Hoc y Amela García 1999); xenogamia obligada en *Phaseolus augustii* (Hoc y Amela García 1998)]. En todos los estudios citados los polinizadores fueron Himenópteros.

Dentro de las Papilionoideae con flores asimétricas se conocen sólo dos estudios a nivel multipoblacional. Uno de ellos fue realizado por Búrquez y Sarukhán (1984) en *Phaseolus coccineus* a través de un gradiente altitudinal en Méjico. Dichos autores encontraron en las poblaciones de elevada altitud caracteres distintivos con respecto a las de menor altitud: mecanismos de auto-incompatibilidad, (ausentes en el segundo grupo) polinización por colibríes (versus abejorros), y diferencias notables en el éxito reproductivo (mayor relación fruto/flor y semilla/óvulo en las poblaciones de altura).

El segundo estudio se realizó con *Vigna minima* en distintas poblaciones de India. Gopinathan y Babu (1987) estudiaron el sistema reproductivo de *Vigna minima*, y encontraron cuatro tipos florales (chasmogamia, pseudocleistogamia aérea, pseudocleistogamia subterránea, y cleistogamia subterránea), cuya ocurrencia variaba a nivel intra e interpoblacional. Dichos autores concluyeron que el sistema reproductivo es mixto (autogamia y xenogamia).

Complejidad floral y biomecánica

En general, las flores han sido clasificadas como simples o complejas dependiendo del grado de dificultad de obtención (medido en tiempo) de las recompensas (usualmente néctar) por parte de sus polinizadores (Lavery 1980). En el caso de flores complejas se observó que polinizadores del género *Bombus* emplean más tiempo en el aprendizaje de manipulación de las mismas con respecto

a otras con las recompensas relativamente más expuestas (Lavery 1994). Otros estudios realizados con polinizadores con habilidades adquiridas llegaron a conclusiones similares. Los tiempos de acceso fueron mayores en flores complejas con respecto a flores simples (Harder 1983,1986, Lavery 1994, Gegear y Lavery 1995).

La manipulación de las flores complejas, como las de la Subfam. Papilionoideae requiere de “habilidad” y de la aplicación de fuerzas por parte de los polinizadores para acceder a las recompensas que se hallan dentro de la quilla (Faegri y Pijl 1979).

Westerkamp (1997) sugirió que la fuerza necesaria para vencer la resistencia del complejo alas-quilla y acceder al néctar no guarda relación con el peso de sus polinizadores. Sin embargo, no existen datos empíricos que lo confirmen, excepto el trabajo realizado en *Lathyrus latifolius* (Westerkamp 1993). En esta especie, la fuerza aplicada por el polinizador para acceder a la recompensa resultó de 10 gr, mientras que el peso de la abeja más liviana que operaba eficazmente la flor fue de 0,07 gr (*Megachile ericetorum* macho). Dichas fuerzas también son evidentes en las considerables lesiones que producen las abejas en los pétalos que funcionan como superficies de apoyo. Cuando cesa la fuerza, el complejo alas-quilla retorna a la posición inicial, excepto en los mecanismos explosivos. Se ha hipotetizado que las flores complejas tienen la ventaja de excluir a polinizadores ineficientes y a ladrones de néctar (Heinrich 1979, Lavery 1980, Thomson *et al.* 2000), pero en contraste pueden estar sujetas a limitación por polinizadores, por lo que deberían incrementar sus recompensas y/o extender su longevidad para recibir suficiente número de visitas (Kunin e Iwasa 1996). Esta predicción coincide con los hallazgos de Heinrich (1979), Harder (1988) y Harder y Cruzan (1990), quienes observaron

que algunas flores complejas, entre ellas algunas Papilionoideae, producían más néctar que otras flores de arquitectura más simple.

Por lo expuesto, resulta de interés relacionar el aspecto biomecánico de la polinización, a través de la medición de las fuerzas necesarias para acceder al néctar, con la cantidad de recompensas ofrecidas, así como con la limitación por polinizadores.

El género *Vigna* Savi, es de distribución pantropical y cuenta con alrededor de 150 especies, en su gran mayoría africanas. La simetría de las flores es muy diversa: algunas especies presentan flores monosimétricas, e.g., *Vigna luteola*, y otras son altamente asimétricas. Existen pocos estudios de la biología reproductiva de especies del género, y en su mayoría se refieren preferentemente a la biología de la polinización: *V. vexillata* (Hedstrom y Thulin 1986); *V. minima* (Gopinathan y Babu 1987; *V. longifolia* (Hoc et al. 1993) y *V. luteola* (Agulló et al. 1993). En todos los casos los polinizadores fueron Himenópteros de los géneros *Xylocopa* y *Megachile*, excepto en *V. minima* donde también se reportaron Lepidópteros (Gopinathan y Babu 1987). En cuanto al sistema reproductivo se cita la xenogamia facultativa para las tres últimas especies, mientras que en *V. vexillata* no se informan datos al respecto. En su trabajo de recopilación, Arroyo (1981) informa que de ocho especies de *Vigna* estudiadas, todas resultaron autocompatibles, pero no se consigna el listado de especies consideradas.

La especie sudamericana *Vigna caracalla* (L.) Verdc. posee flores que representan el máximo grado de complejidad en el género, con cinco revoluciones de la quilla (descripciones breves en Lindman 1902, Troll 1951, Einsiedel 1976, Faegri y Pijl 1979 de ejemplares fijados provenientes de Brasil y Méjico). Su llamativa morfología floral y su funcionamiento han intrigado a los botánicos por

más de un siglo, pero debido a la falta de información se han hecho múltiples especulaciones acerca de su biología reproductiva. Por ejemplo, se hipotetizó que su gran complejidad podría llevar a una pérdida de la funcionalidad de la flor, siendo capaz de reproducirse sólo a través de autogamia obligada, sin ninguna interacción con insectos (Faegri y Pijl 1979).

El área de distribución de *V. caracalla* es América del Sur y probablemente América Central (Marechal *et al.*, 1978). En Argentina se han encontrado poblaciones de esta especie en Córdoba, Jujuy, Misiones, Salta y Tucumán (Burkart 1943).

Dada su amplia distribución, *V. caracalla* es un excelente sistema para estudiar las interacciones planta-polinizador en un contexto de mosaico geográfico. Además, y debido a su complejidad floral, resulta interesante estudiar los aspectos biomecánicos y su relación con la biología de la polinización.

1.1. Objetivo General:

Estudiar la biología de la reproducción de *V. caracalla* en un contexto geográfico.

1.2. Objetivos parciales:

A. Caracteres de la flor en las distintas poblaciones bajo estudio.

-Analizar la morfología floral y su funcionamiento.

-Describir la fenología floral.

-Esclarecer el mecanismo de presentación de polen.

-Analizar la relación entre la producción de néctar y la remoción de néctar con el patrón de visitas.

-Estudiar la variación de algunos caracteres morfológicos a nivel inter-poblacional y su efecto en la producción de semillas.

B. Visitantes florales en las distintas poblaciones.

-Determinar los visitantes florales, su comportamiento y su posible importancia en la reproducción.

-Analizar los elencos de polinizadores a lo largo del gradiente.

-Analizar los aspectos biomecánicos de la flor en relación con la polinización.

C. Sistema reproductivo

-Comparar los sistemas reproductivos de las poblaciones bajo estudio.

-Analizar la posible ocurrencia de mecanismos que aseguren la reproducción en escasez o ausencia de polinizadores.

D. Éxito reproductivo pre-emergente

-Analizar las razones fruto/flor y semilla/óvulo en las poblaciones estudiadas en condiciones de polinización natural.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

La especie: *V. caracalla* (L.) Verdc. es una herbácea perenne de hábito trepador (Burkart 1943). En la provincia de Salta y Jujuy se han detectado varias poblaciones (Ing. Agr. R. Neumann, Banco de Germoplasma del INTA, Salta, com. pers.) localizadas en la provincia fitogeográfica de las Yungas, en la provincia fitogeográfica Chaqueña (Cabrera 1976), y en una zona de transición entre éstas denominada “Umbral al Chaco” (Prudkin 1995). Dichas regiones están localizadas en un gradiente altitudinal que va desde los 1500 hasta los 200 m. s. n. m., el cual coincide con un gradiente de precipitaciones cuyo rango va de 3000 mm. hasta 400 mm.

Las flores de *V. caracalla* son las más grandes entre las Phaseolinae de América (Lackey 1983) y producen néctar como recompensa. Según Faegri y Pijl (1979) las visitas pueden durar hasta medio minuto. Los colectores han reportado que ocurre cambio de color de los antófilos (de blanco-rosado a amarillento) al final de la antesis.

Sitios de estudio: Se estudiaron cinco poblaciones de *Vigna caracalla* localizadas en las provincias de Salta y Jujuy en un gradiente altitudinal que va desde los 1570 hasta los 700 m.s.n.m. (Fig. 1, Tabla 1) De las cinco poblaciones estudiadas, cuatro pertenecen a la Provincia fitogeográfica de las Yungas, y Betania se halla dentro del Distrito de Chaco Serrano, en la Provincia Fitogeográfica del Chaco. Dentro de las poblaciones de Yungas, Campo Quijano y La Caldera pertenecen al Distrito de Selva Montana (Fig. 2), Vaqueros pertenece a la Selva de Tipa y Pacará, dentro del Distrito de Selvas de Transición y Calilegua, situada en el

Parque Nacional Calilegua (Provincia de Jujuy) se halla en la Selva Pedemontana (Cabrera 1976). En la Tabla 1 se consignan los datos de temperaturas medias anuales, precipitaciones totales anuales poblaciones estudiadas. Además se informan las distancias, en línea recta, entre las poblaciones estudiadas.

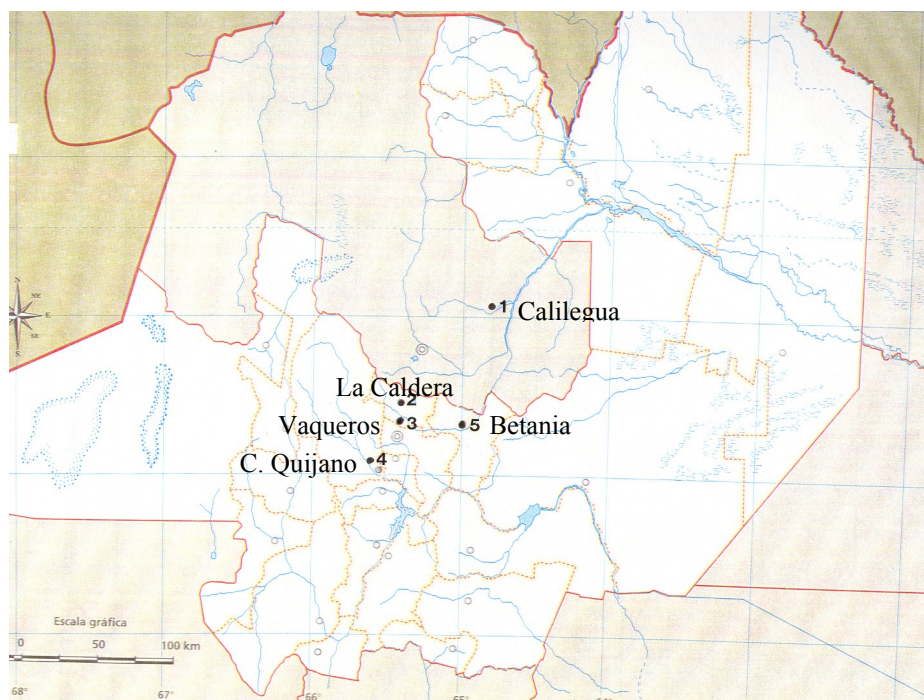


Figura 1. Localización de las poblaciones estudiadas de *V. caracalla* en las Provincias de Salta y Jujuy.

Tabla 1. Promedios de temperaturas medias anuales, precipitaciones totales anuales en las cinco poblaciones de *V. caracalla* y distancia entre pares de poblaciones (considerando las más próximas) en línea recta (Fuente, INTA-Salta, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria y mapas del Instituto Geográfico Militar, respectivamente).

Población (m.s.n.m)	Promedio de temperaturas anuales (° C)	Precipitación anual (mm)	Distancia (en línea recta) entre las poblaciones más cercanas (km.)
C. Quijano (1570)	14,3	891	C. Quijano-La Caldera = 87
La Caldera (1400)	15,2	1.101	La Caldera-Vaqueros = 11,5
Vaqueros (1240)	16,2	1.046	Vaqueros-Betania = 27,5
Betania (980)	18,7	525	Betania-Calilegua = 90
Calilegua (700)	21,5	897	-

Las plantas de la población de Vaqueros, se encontraban creciendo sobre un barranco próximo al Arroyo Vaqueros (Villa Urquiza), sobre *Tecoma stans*, *Erythrina falcata* y *Phoebe porphyria* y las de La Caldera estaban también en zona de

barranco, sobre el Río La Caldera, utilizando como soporte varias plantas de *Sapium haematospermum* (lecherón). En Campo Quijano las plantas crecían sobre lecherón y *E. falcata* (Fig. 2). En Betania se hallaban sobre garabato (*Acacia praecox*).



Figura 2. Sitios de estudio. A la izquierda, Campo Quijano, a la derecha, La Caldera.

En Calilegua las plantas se encontraban creciendo sobre el camino que recorre internamente el Parque (Ruta Provincial 83), a la altura del paraje El Mirador, utilizando como soporte varias plantas, entre ellas, *Nectandra angusta* Rohwer (laurel blanco) y *Astronium urundeuva* (Alemao) Engl. (urundel), a 10 metros de altura (Fig. 3).



Figura 3. Aspecto de la población de *Vigna caracalla* en Calilegua. Nótese la altura a la que se encontraban las flores.

A. Caracteres florales en las distintas poblaciones.

Morfología y fenología floral: En todas las poblaciones se colectaron flores maduras de distintos individuos y se preservaron en alcohol 70% para el análisis morfológico. Para analizar la antesis se marcaron cohortes de pimpollos, 20 por planta. En cada observación se utilizaron 10 flores de distinto origen. Se realizaron registros cada dos horas, desde las 7.00 hs. (apertura floral) hasta las 19.00 hs. (senescencia). En cada muestra se registraron: forma, olor, colores del perianto y los cambios (Munsell Color Charts, 1977), período de dehiscencia, presentación de polen y néctar y receptividad estigmática. Esta última se estimó a través de la producción de peroxidasas mediante el ensayo con peróxido de hidrógeno (Kearns e Inouye 1993), a lo largo del ciclo floral, cada dos horas. En cada muestra se analizaron 10 flores de distinto origen. Se realizaron dibujos con cámara clara de las estructuras morfológicas de las flores.

Funcionamiento floral: Se observó el número y el sentido de revoluciones de la quilla (levógiro o dextrógiro), y si eran giros completos o incompletos. Se determinó cuáles partes de la flor son rígidas y cuáles son móviles, y se analizó qué rol juega cada parte dentro y entre los pétalos, en flores frescas, realizando las observaciones con un estereoscopio.

Osmóforos: Se localizaron glándulas de olor con la tinción de rojo neutro (Vogel 1963).

Estudios con MEBA (Microscopio Electrónico de Barrido Ambiental): Se analizó la estructura del estigma, las superficies de apoyo de las alas, y la fusión entre las alas y la quilla, teniendo en cuenta el lado derecho e izquierdo de la flor por separado con un microscopio de barrido ambiental (Philips XL30 ESEM-SEGEMAR, Buenos

Aires), con el cual es posible la observación directa sin ningún tipo de tratamiento previo.

Anatomía floral: Se estudió la anatomía floral mediante cortes seriados, longitudinales y transversales, con micrótomo, y se realizó tinción doble con safranina-fast-green.

Variación de caracteres morfológicos y su efecto en la producción de semillas: En cada población se eligieron al azar 10-15 individuos en estado reproductivo. En cada individuo se marcaron 5 flores de igual estadio de madurez y se tomaron medidas de longitud y ancho floral, ancho del ala izquierda, profundidad del nectario y longitud de pedicelo. Se considera que las medidas seleccionadas se relacionan con el proceso de polinización (Herrera 1990 y ejemplos en éste). Luego se cosecharon los frutos y se contó el número de semillas producidas.

Patrón de secreción de néctar (según Bernardello *et al.*, 1994): En cada población, se determinó en grupo de flores tapadas, (cada grupo de 5 flores, total = 35 flores) con bolsas de voile, elegidas al azar. Se obtuvieron medidas una vez de cada grupo, a intervalos de dos horas, desde las 7.00 hs. hasta las 19 hs. Se midió el volumen producido con capilares de microanálisis Drummond, y la concentración con refractómetro de mano. La cantidad de azúcar producida se expresó en mg. según Bolten *et al.* (1979). Se obtuvo la tasa de producción de néctar por hora como sigue: mg. de azúcar producido entre medidas/número de horas entre las mismas

B. Visitantes florales en las distintas poblaciones.

Visitantes florales: El estudio del comportamiento de los visitantes y de las flores durante las visitas, y el modo de deposición del polen (nototribo, esternotribo, pleurotribo) se basó en observaciones directas, observaciones con binoculares y en

macrofotografías. Se colectaron ejemplares para su identificación, los que se hallan depositados en el Museo de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia, Buenos Aires, así como en la colección personal de la autora. Las observaciones fueron realizadas durante el pico de floración de las poblaciones (*i. e.*, mediados de febrero para La Caldera, Betania y Campo Quijano y principio de Marzo para Vaqueros y Calilegua). Se realizaron censos distribuidos a lo largo del ciclo floral (desde las 7 hs. hasta las 19 hs.) en períodos de 15 minutos. El grupo de observación osciló entre 22 a 44 flores dependiendo de la disponibilidad en cada sitio. En cada visita, se registró: la especie visitante, la conducta de forrajeo, el recurso colectado (polen o néctar) y la duración de cada visita. La tasa de visitas (visitas/flor/período) se obtuvo a través del cociente entre el número de flores visitadas por período y el número total de flores del grupo de observación.

Biomecánica floral: Se observó especialmente el movimiento relativo del estilo a través de las revoluciones de la quilla, analizando la existencia de lubricación (con Sudán IV). La fuerza requerida por las abejas para accionar las partes móviles de las flores se midió de la siguiente manera: se aplicó una fuerza externa al ala izquierda en flores recientemente cortadas ($N = 10$), atando un hilo de seda a la misma (en el punto donde aplican la fuerza los insectos = centro de presión), la cual tenía en el otro extremo un pequeño contenedor. En el contenedor se fueron colocando una a una pequeñas masas (municiones), de tal forma que la fuerza se iba incrementando continuamente hasta que el estilo emergía aproximadamente 6 mm desde la quilla. Se tomó este punto dado que constituye el desplazamiento promedio logrado por los insectos. La fuerza necesaria para reproducir el mecanismo floral se midió pesando el sistema utilizado (cuerda + contenedor + masas adicionales).

C. Sistema reproductivo de las distintas poblaciones.

El análisis del sistema reproductivo se efectuó a través de los siguientes tratamientos de polinización:

Autopolinización autónoma (APA): Flores cubiertas con bolsas de voile.

Autopolinización manual (APM): Flores autopolinizadas manualmente con polen de la misma flor y cubiertas.

Xenogamia (X): Flores polinizadas con polen alógamo y cubiertas.

Apomixis: flores emasculadas y cubiertas

Flores con polinización libre (PL).

Con fines comparativos, el grado de auto-incompatibilidad de cada población se estimó usando la siguiente fórmula:

$$\text{ISI f} = \% \text{ frutos APM} / \% \text{ frutos X},$$

donde ISI f es el índice de auto-incompatibilidad para la producción de frutos.

Cuando el ISI es $<0,2$ se considera que las plantas son auto-incompatibles (Bawa 1974, Ruiz y Arroyo, 1978, Arroyo y Uslar 1993). El éxito de cada tratamiento se evaluó a través del cociente frutos iniciados/ flores tratadas.

Razón P/O: En cada población se seleccionaron diez pimpollos de distintas plantas. En cada uno de ellos se estimó el número de granos de polen con un hemocitómetro y se cuantificó el número de óvulos por ovario bajo lupa (Cruden 1977).

Caracteres morfológicos relacionados con la autogamia: *Separación anteras-estigma y longitud de tricomas estilares y periestigmáticos:* Se seleccionaron diez flores de distintas plantas de cada población y se midió en cada una de ellas la

separación anteras-estigma en lupa (0,5 mm). Además, se disectaron los estilos y se midió la longitud de los tricomas del estilo y los tricomas periestigmáticos en microscopio dotado de ocular micrométrico.

D. Éxito reproductivo

Al final de la estación reproductiva, se colectaron al azar 3-4 inflorescencias de 10-15 plantas en cada población y se cuantificó: el número de flores por inflorescencia a través de las cicatrices florales, el número de frutos maduros por inflorescencia, el número de semillas por fruto y el número de óvulos abortados o no fertilizados (con la ayuda de una lupa). La relación fruto/flor se definió como el número de frutos maduros cuajados en cada inflorescencia. La relación semillas/óvulos se determinó como la proporción de óvulos que se desarrolla en semillas en cada inflorescencia. Se define el éxito reproductivo de la inflorescencia como el producto de Fruto/Flor x Semilla/Ovulo (Kasagi y Kudo 2003).

Análisis estadísticos: Los datos fueron analizados con el programa SYSTAT (1992). Se aplicaron pruebas paramétricas y no paramétricas, según correspondiera, en función de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. Para comparar dos muestras se realizaron pruebas *t* (Student) y *U* (Mann Whitney). Para comparar más de dos muestras se utilizaron análisis de varianza (ANOVA) y pruebas *H* (Kruskal-Wallis). En casos donde se encontraron diferencias significativas se aplicó la prueba de Tukey *a posteriori*.

Se aplicaron pruebas χ^2 para comparar proporciones del sistema reproductivo. Además se realizaron análisis de regresión lineal y correlación para analizar el grado de relación entre dos variables (altitud vs. número de granos de polen, néctar, éxito

reproductivo, P/O, tasa de visitas; mg. de azúcar vs. tasa de visitas). Debido a que los caracteres morfométricos están correlacionados entre sí, la relación de los mismos con el número de semillas producidas se analizó a través de una regresión múltiple, tomando el número de semillas como variable dependiente.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Floración y características de la inflorescencia

En todas las poblaciones estudiadas de *V. caracalla*, la floración ocurrió desde fines de enero hasta comienzos de marzo. Las flores se disponen en inflorescencias denominadas pseudoracimos (*sensu* Tucker 1986), con maduración acrópeta. Es un racimo compuesto de varios racimos simples (rango 4-21). Cada racimo simple tiene un raquis contraído con dos o raramente tres flores; las otras flores no se desarrollan, el raquis toma un aspecto hinchado, globoso, y constituye un nectario extra-floral.

Las inflorescencias tenían mayormente una posición invertida (con el ápice hacia abajo) o de costado, presentaban una (80-85%) o dos flores (20-25%) (de nudos consecutivos) abiertas del día. El pedicelo floral es flexible, y permite que la orientación de la flor sea la misma (con la superficie de “aterizaje”, *i.e.*, el ala izquierda, siempre en posición inferior) independientemente de la orientación que adopte el raquis. En el caso de raquis invertido, la flor toma el carácter de resupinada.

3.1. Caracteres florales

3.1.1. Morfología floral de *V. caracalla*

La flor de *V. caracalla* (Fig. 4) presenta grandes modificaciones con respecto al patrón floral típico de las Papilionoideas. A la fecha, los botánicos la describieron sólo a partir de material fijado (S. Vogel y C. Westerkamp, com. pers.). La detallada descripción de la misma y sin ánimo de encontrar un significado adaptativo, se realizará en relación con el comportamiento observado de los polinizadores durante las visitas.

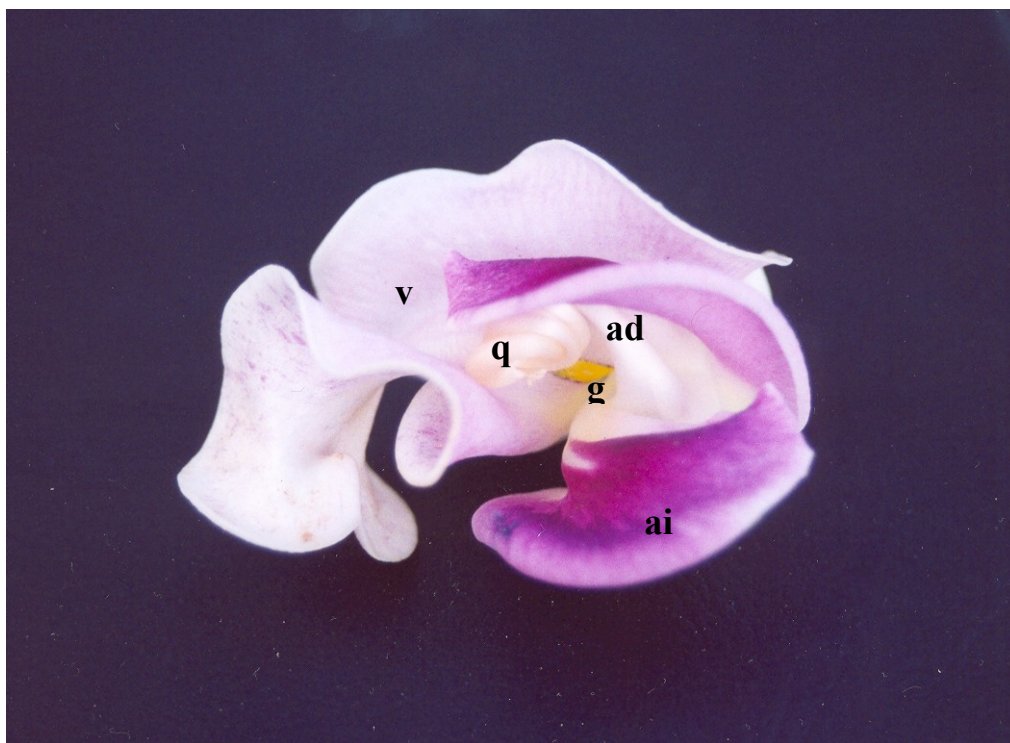


Figura 4. Flor de *Vigna caracalla* perteneciente a la población de Calilegua. Referencias: v= vexilo, ai= ala izquierda, ad= ala derecha, q= quilla, g= guía de néctar.

La flor de *V. caracalla* es totalmente asimétrica, excepto por el cáliz (Fig. 5A), que presenta un plano de simetría. La asimetría ocurre tardíamente en el desarrollo floral. Las yemas florales jóvenes presentan simetría zigomorfa. El vexilo se halla doblado a lo largo de la vena media y cubre completamente a las demás piezas florales. Algunos días antes de la antesis (ca. de siete días), la quilla comienza a curvarse hacia la izquierda que finalmente alcanza un valor de 720° (dos revoluciones). Esta curvatura es acompañada por el estilo, la columna estaminal y el vexilo. Como resultado, la yema floral madura es completamente asimétrica, con dos revoluciones levóginas. Cuando se produce la apertura floral, la quilla desarrolla dos o tres revoluciones adicionales. Al registrar la secuencia de movimientos, se observó que la quilla, en el momento que se separa del vexilo, se retrae con cierta fuerza y muy rápido, ejecutando los giros adicionales. Como resultado, la quilla queda oculta bajo el ala derecha y en posición transversal con respecto al eje floral, con ca. de cinco revoluciones.

Presenta tres labios inferiores y dos superiores, éstos últimos apenas marcados. Los bordes del vexilo y de las alas se ajustan fuertemente en los senos del diente

Cáliz

El cáliz es bilabiado y succulento, con una forma tubular y cinco lóbulos en su borde distal (Fig. 5A). Constituye una estructura resistente que encierra firmemente todas las bases del resto de las piezas florales. Si es retirado artificialmente, las piezas florales se desarticulan entre sí durante las visitas. El lóbulo inferior es más largo que los laterales y en sus escotaduras se encajan los bordes del vexilo (Fig.

5B, flechas). Esta característica permite que el vexilo permanezca fijo durante las visitas.

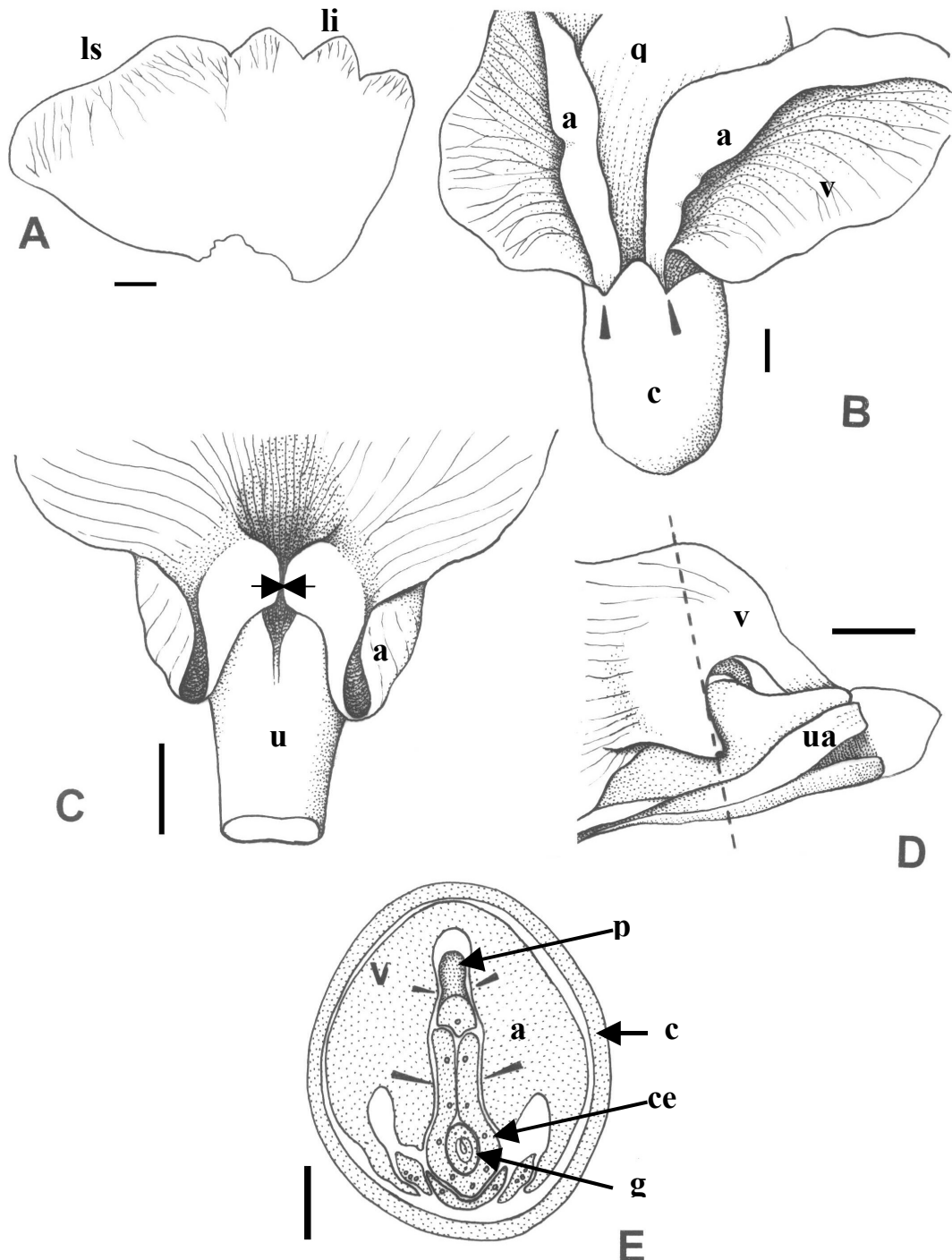


Figura 5. Características morfológicas de las flores de *V. caracalla*. A. Cáliz disectado y abierto, mostrando los dientes inferiores y superiores. ls= labio superior, li= labio inferior. B. Flor vista de abajo, mostrando la interrelación del cáliz con el vexilo (v) y las alas (a) cubriendo la quilla (q). C. Base del vexilo. Las flechas indican las callosidades que limitan el canal hacia el néctar; a= aurículas y u=uña del vexilo. D. Vista lateral

de la base floral (cáliz removido). v= vexilo; ua= uña de las alas. La línea punteada indica el nivel de corte de la figura 5E. E. Sección transversal de la flor a nivel de la proyección del filamento vexilar (p). c= cáliz, a= aurículas del vexilo, ce= columna estaminal, g= gineceo, V= vexilo. Nótese las relaciones entre las callosidades del vexilo y el estambre vexilar (flechas superiores), así como entre las aurículas de vexilo y la columna estaminal (flechas inferiores). Barras: A-D= 1mm, E= 0.7 mm.

Corola

Todos los pétalos se diferencian en uña y limbo, y presentan una consistencia muy succulenta.

El vexilo (v) (Fig. 4) es emarginado y doblado hacia atrás mientras que el tercio distal describe una torsión hacia la izquierda. Es de color lila claro y presenta en la base del limbo una línea de 9 mm de largo de color amarillo bordeada por una fina línea verde-azulada, que actuaría como una guía de néctar (g) (Fig. 4) (Faegri y Pijl 1979, Kevan y Baker 1983, Dafni y Giurfa 1999). La misma se continúa con un canal limitado por dos callosidades muy prominentes (Fig. 5C, flechas), que conducen la proboscis de los insectos hacia la cámara nectarífera. Las callosidades se continúan con sendas aurículas (a) (Fig. 5C), cuyos bordes son involutos, *i.e* se enrollan hacia adentro, de cada lado. Además, las citadas callosidades mantienen apretado el estambre libre (vexilar) contra el canal, cerrando la entrada al nectario (Fig. 5E flechas superiores), mientras que las aurículas (a) se introducen en depresiones de la columna estaminal (Fig. 5E, flechas inferiores). La uña del vexilo (u) es ancha, rígida y muy engrosada (Fig. 5C). Si uno trata de alcanzar la cámara de néctar levantando el vexilo, se produce una ruptura entre el límite uña-limbo.

Las alas son panduriformes, pero sus contornos no son totalmente idénticos (Fig. 6). Presentan color púrpura en sus caras externas, mientras que sus caras internas son blancas. Las alas presentan una torsión de 90° con respecto a la línea

media, que las coloca en una orientación transversal, exponiendo sus caras coloreadas. El ala izquierda (ai) (Fig. 4) adopta un aspecto similar a un labio inferior y funciona como superficie donde “aterrizan” los insectos visitantes. El ala derecha (ad) (Fig. 4) se encuentra torcida hacia la izquierda, formando un labio superior, con la cara externa (epidermis inferior) mirando hacia arriba ocultando a la quilla con su cara interna (cóncava). Las uñas de las alas (ua) (Fig. 6) son largas, levemente curvadas, y forman un ángulo de 130° con su limbo. Se encuentran soldadas a la columna estaminal en la base. Las láminas de las alas presentan aurículas en un solo lado. Además poseen esculturaciones horizontales en la base del limbo (Fig. 6, flecha) orientadas hacia el nectario.

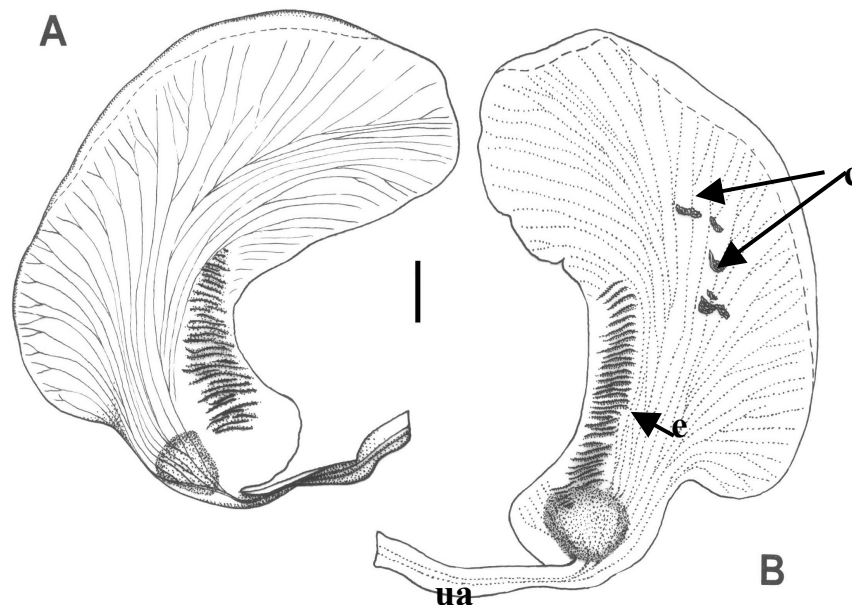


Figura 6. Morfología floral de *V. caracalla*. A. Ala derecha, lado externo. B. Ala izquierda, lado externo. Nótese las cicatrices de los visitantes producidas durante sus actividades de forrajeo y la asimetría entre ambas alas. La zona de conexión con la quilla (localizada en las caras internas) están sombreadas. Barra= 3.6 mm.

La quilla (q) (Fig. 4) es la parte de la flor que presenta más transformaciones con respecto al patrón típico, debido a las revoluciones (r) que forma (Fig. 7 B). Está constituida La quilla (q) (Fig. 4) está constituida por dos pétalos de color blanco, con uñas angostas y flexibles y con láminas que se encuentran unidas por sus bordes inferiores por medio de fusión postgenital (por encima de las uñas). Los bordes superiores presentan filas de tricomas unicelulares (t) (Fig 7A), muy pequeños en la parte proximal, mientras que en la parte distal (último giro de la quilla) son más grandes y se interpenetran entre sí (“capillinection”, Sigmond 1930 en Weberling 1992). Estos tricomas, al estar interconectados a modo de los dientes de un cierre, cierran la quilla, excepto en el ápice, que permanece abierto. A través de dicha abertura se proyecta el estigma (e) y los tricomas estilares, denominado “cepillo estilar” (ce), cargado de polen, durante las visitas (Fig. 7B). En la parte basal de cada pétalo de la quilla se encuentra una protuberancia (Fig. 7A, flecha), siendo la izquierda (la cual soporta el peso de los insectos) más prominente que la derecha. Las mismas encajan en correspondientes depresiones de las alas. A nivel anatómico, la epidermis de las protuberancias de la quilla presentan conexiones cuticulares con las alas (Fig. 8), formando un complejo funcional que se mueve en forma conjunta durante el accionar de los insectos, provocando la exposición del estigma y del cepillo estilar. La fusión es tan fuerte que resulta imposible separar ambos pétalos sin romper la epidermis de la quilla.

Otras especies donde se observó dicha adnación cuticular son *Macroptilium lathyroides* (Etcheverry *et al.* 1998), *M. erythroloma* (Etcheverry *et al.* 1999) y *M. panduratum* (Etcheverry *et al.* 1999).

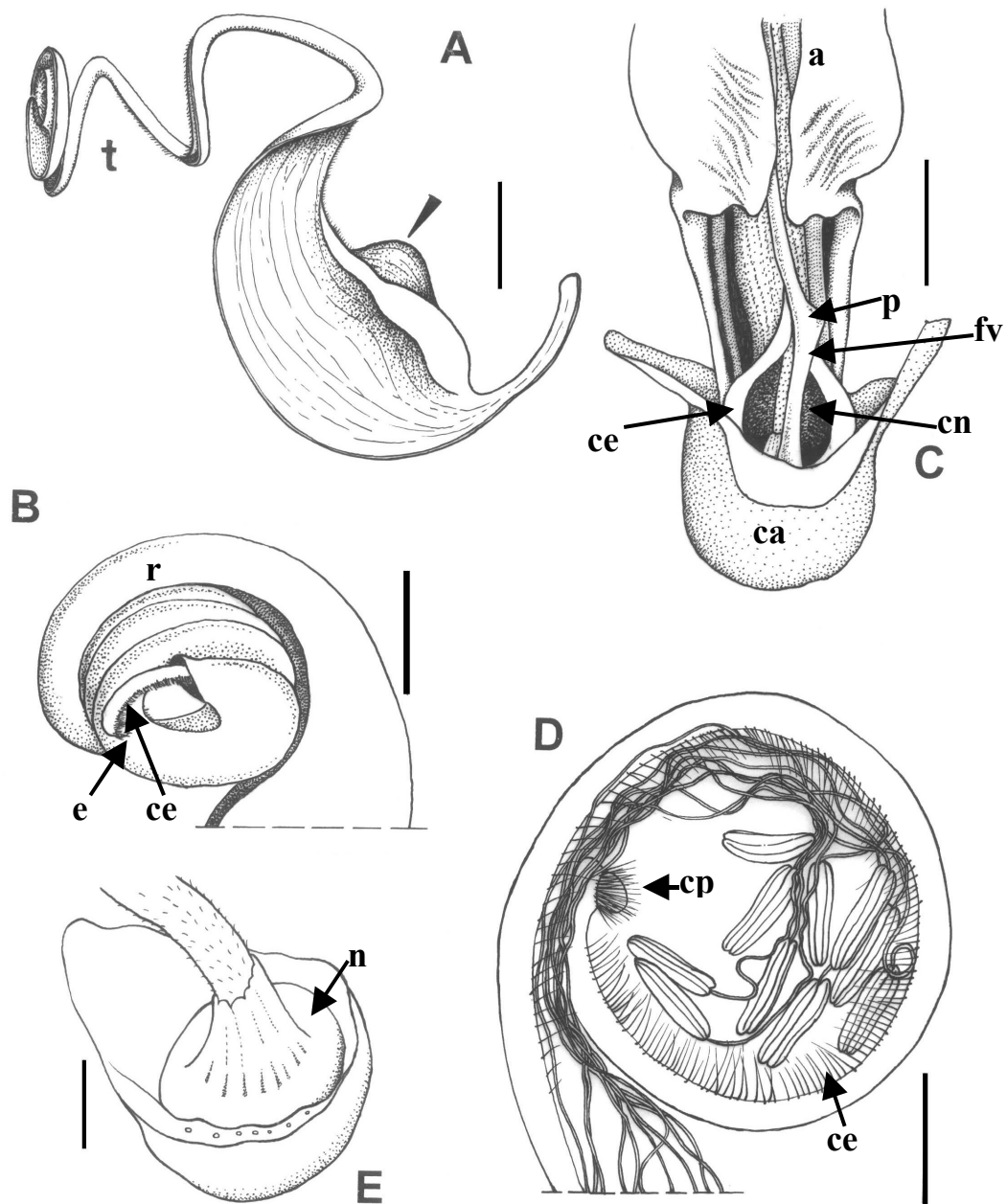


Figura 7. Morfología floral de *Vigna caracalla*. A. Pétalo izquierdo de la quilla mostrando la protuberancia (flecha) que encaja en la depresión correspondiente del ala y los tricomas (t) que se conectan con los correspondientes al pétalo derecho de la quilla. B. Parte distal de la quilla con cinco revoluciones (r) mostrando el estigma (e) y el

cepillo estilar (ce) asomando a través del extremo abierto. C. Base de la flor vista desde arriba. El vexilo y parte del cáliz (c) están removidos. Los dos accesos a la cámara nectarífera (cn) entre el filamento vexilar (fv) y la columna estaminal (ce) están sombreadas. D. Parte distal de los estambres y el estilo. Nótese que los filamentos estaminales acompañan la curvatura de la quilla. El estigma se halla rodeado por un collar periestigmático (cp) y el estilo presenta un cepillo estilar (ce). E. Base del gineceo mostrando el nectario (n). Barras: A, B, C= 5mm; D y E= 2mm.

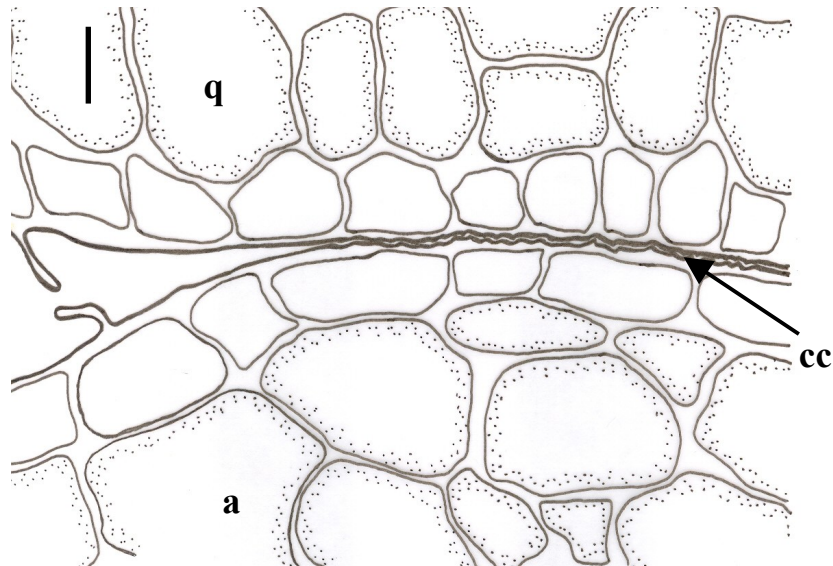


Figura 8. Corte transversal de la zona de adnación entre las alas y la quilla (lado izquierdo). Q= quilla, A= ala. Barra= 5 μ .

Distalmente, las láminas de la quilla se angostan abruptamente, formando un tubo de 1.50 mm de diámetro y 80 mm de largo, que encierra el estilo y la parte distal del androceo, y forma revoluciones (r), las cuales son siempre levógiras (Fig. 5 B). La última revolución, que contiene el cepillo estilar y la parte distal (libre) de los filamentos es más ancha (3 mm). Las revoluciones en conjunto forman un disco espiralado, cuya orientación es transversal con respecto al eje de la flor. Esta característica es diferente con respecto a los especímenes colectados en Méjico, donde el conjunto de revoluciones adopta una posición vertical, es decir paralela al eje floral (S. Vogel, com. pers.).

El sentido de la asimetría fue hacia la izquierda en todas las poblaciones; esta característica también se observó en otras Phaseolinae, como *Macroptilium*,

Phaseolus y otras especies de *Vigna*, con la excepción de *V. vexillata*. Endress (2001) postuló que habría una presión selectiva hacia la producción de un solo morfo floral de asimetría en plantas con esta característica. El citado autor apuntó que las flores asimétricas con órganos reproductores ocultos son más complejas que las simétricas, pero si están siempre orientadas a un mismo lado, esa desventaja se reduciría, porque las visitas llevarían menos tiempo.

En la Tabla 2 se consignan las revoluciones observadas en las cinco poblaciones, las cuales resultaron estadísticamente diferentes. Las tres poblaciones de mayor altura forman un grupo con menor número de revoluciones con respecto a las dos restantes. Se observa que existe variabilidad intrapoblacional en este carácter, pero todas las flores resultaron funcionales, independientemente del número de revoluciones. En cada población, se manipularon flores con distinto número de revoluciones y el mecanismo de polinización funcionaba de igual modo entre ellas. Además, el coeficiente de regresión no fue significativo entre número de revoluciones y éxito reproductivo materno (ver en la sección *Variabilidad de los caracteres florales*).

Tabla 2. Promedio y error estándar de revoluciones de la quilla (en grados) en cinco poblaciones de *V. caracalla*. Entre paréntesis, tamaño muestral. El rango está expresado en grados y entre parentesis se informa su equivalente en número de revoluciones.

Población (msnm)	Revoluciones (grados) (N)	Rango (N° de revoluciones)
C. Quijano (1560)	1642,91 ± 17,55 (55) ^a	1350-1890 (3.75-5.25)
La Caldera (1400)	1638,83 ± 14,57 (43) ^a	1395-1800 (3.87-5)
Vaqueros (1.240)	1649,73 ± 9,47 (56) ^a	1440-1800 (4-5)
Betania (980)	1698,00 ± 15.49 (27) ^b	1530-1800 (4.25-5)

Calilegua (700)	1758,00 ± 16,17 (15) ^b	1665-1845 (4.62-5.12)
H, Kruskal-Wallis, Probabilidad	22,86; g.l.=4; P= 0,001	

Androceo

El androceo es diadelfo y describe las mismas revoluciones que la quilla. Presenta nueve filamentos unidos en la porción proximal formando una columna semirígida, mientras que el décimo estambre es libre. La base de la columna estaminal es dilatada y conforma un espacio para alojar el néctar (Fig. 7C). Presenta una abertura en la parte superior (fenestra) que utilizan las abejas para acceder a la cámara nectarífera (cn) (Fig. 7C). Esta abertura se halla dividida en dos por la base del filamento vexilar (fv) (Fig 7C), y está cubierta por la uña del vexilo. La base del filamento vexilar (por encima de la fenestra) presenta una proyección (p) (Fig 7C) hacia fuera, que encaja dentro del canal nectarífero del vexilo, y que lo obtura a modo de una compuerta. Los insectos empujan la base del vexilo para lograr introducir su proboscis por encima del filamento vexilar. Un corte transversal de la flor a este nivel (Fig. 5E), muestra una estrecha relación de todas las piezas florales: las dos callosidades del vexilo encajan en las depresiones de la columna estaminal (ce); la proyección del estambre vexilar (p) se introduce en el canal del vexilo, cerrando la entrada al néctar; las aurículas del vexilo (a) encajan en las depresiones de la columna estaminal (ce) mientras que el cáliz tubuloso (c), funciona como una funda que permite movimientos dentro de ciertos límites, impidiendo de esa forma el desencaje de las piezas durante las visitas.

La parte distal libre de los filamentos (que representa $\frac{1}{4}$ de la longitud total) es muy flexible y se presenta algo enroscada (Fig. 7D). Dicha porción no es expuesta al

exterior durante las visitas; dada su flexibilidad se retrae acompañando el movimiento de la quilla.

Gineceo

El gineceo de *V. caracalla* comienza en un corto ginóforo, alrededor del cual se observa un nectario discoidal (n) (Fig. 7E). El néctar es colectado entre el nectario y la columna estaminal, que forma un tubo en su parte proximal. El estilo describe distalmente las mismas revoluciones que la quilla. La parte distal del mismo es rígida y engrosada, característica que fue interpretada en relación con su función de aplicar el polen a los visitantes (Lavin y Delgado 1990). Dicha estructura es denominada entasis y fue citada en seis tribus de Papilionoideae, incluyendo Phaseoleae (Shivanna y Owens 1989).

El estilo presenta varias filas de tricomas que conforman el “cepillo estilar (ce)” (sensu Lavin y Delgado 1990) (Fig. 7D). En la periferia del estigma se observan tricomas (“collar periestigmático” cp, Fig. 7D). El cepillo estilar fue citado en seis tribus de Papilionoideae, mientras que el collar periestigmático fue citado en siete tribus de dicho grupo (Shivanna y Owens 1989).

Perfume

El perfume de *V. caracalla*, dulce e intenso, es producido por el borde del vexilo y las alas, según la coloración con Rojo Neutro (una zona de 4-5 mm., Fig. 9). En pruebas de pétalos separados en frascos de vidrio, el vexilo y las alas emitían aroma, aunque estas últimas con menor intensidad.

Colores de los pétalos

En la Tabla 3 se describen los colores de los pétalos, en todas las poblaciones de *V. caracalla*. Es de destacar que se observaron diferencias en Calilegua con respecto a las otras poblaciones. En general, en esta localidad los colores son un poco más claros. La epidermis inferior del vexilo mostró diferencia con respecto a las otras poblaciones: mientras que en Calilegua presenta un tono lila claro con manchas violáceas, en el resto de las poblaciones es blanquecino.



Figura 9. Tinción de la flor de *V. caracalla* con rojo neutro. Nótese la zona coloreada en el borde del estandarte y alas.

Tabla 3. Colores de los pétalos tomados al inicio de la antesis, según carta de colores (Munsell 1977), para las poblaciones de Vaqueros, La Caldera, C. Quijano y Betania (columna 2) y Calilegua (columna 3).

Pétalo	Población	
	C. Quijano, La Caldera, Vaqueros y Betania	Calilegua
Alas	5 RP 3/8, borde 5 RP 6/4: Púrpura borde lila	5 RP 3/6, bordes 5 RP 5/2: Lila borde lila claro
Estandarte		
Epidermis superior	5 RP 7/4, Lila blanco	5 RP 7/2: Lila 2.5 R 8/2. Lila claro , manchas 5 RP 5/4:
Epidermis inferior		violáceo

Guía de néctar	2.5 Y 8/8 borde 5 BG $\frac{3}{4}$; Amarillo, borde verde-azulado	5 Y 8/10 borde 5 BG $\frac{3}{4}$; Amarillo, borde verde-azulado
----------------	--	---

3.1.2. Observaciones de la estructura floral con

M E B A

Estigma

Se observó que el estigma de flores no polinizadas está cubierto por una “membrana” (Fig. 10), la cual consiste en la cutícula dilatada de las células estigmáticas, que retiene las sustancias secretadas, de naturaleza pegajosa. Según Gosh y Shivanna (1982) y Heslop-Harrison y Heslop-Harrison (1983), el exudado estigmático es producido por las células del estigma y por las 4-5 capas subyacentes a éste. Dicha membrana fue reportada en siete tribus de Papilionoideae, entre ellas Phaseoleae (Shivanna y Owens 1989). En el género *Vigna*, Castro y Agulló (1998) demostraron la presencia de esta membrana en *V. adenantha*.

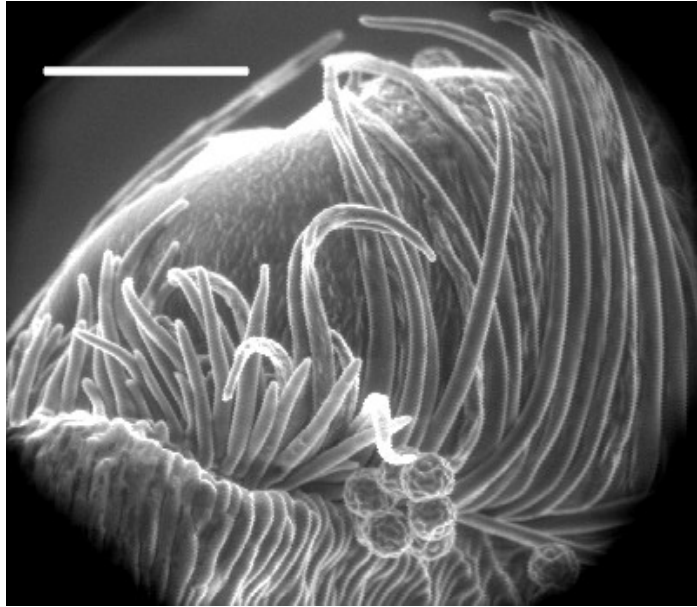


Figura 10. Superficie estigmática de una flor no visitada de *V. caracalla*, donde se observa la membrana cuticular del estigma, y el collar periestigmático. Barra= 200 μ

La membrana estigmática previene la ocurrencia de autogamia espontánea, por lo tanto *V. caracalla* requiere de polinizadores, los que rompen dicha membrana por fricción durante las visitas, como muchas otras Papilionoideae, e.g., *Vicia faba* (Holden y Bond 1960), *Crotalaria juncea* (Free 1970), *Trifolium pratense* (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison 1983) y *Phaseolus coccineus* (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison 1984). Se observan los tricomas unicelulares que rodean la base del estigma (collar periestigmático) (Fig. 10). La ocurrencia de dichos tricomas podría actuar a favor de la xenogamia, dado que previenen en algún grado que el polen propio ingrese al estigma durante los movimientos de los insectos. Observaciones similares fueron realizadas por Ibrahim y Coyne (1975) en *Phaseolus coccineus*; Juncosa y Webster (1989) en *Lupinus nanus*; Etcheverry (2001b, 2003) en *Crotalaria stipularia* y *Crotalaria micans*.

Tricomas estilares

Se observó que los tricomas del cepillo estilar son unicelulares, canaliculados y orientados hacia arriba (Fig. 11). El mismo está relacionado con la presentación del polen, que es de tipo secundaria. El cepillo toma el polen desde las anteras y durante las visitas, es proyectado hacia fuera, depositando una porción de polen en el cuerpo del visitante (presentación de polen tipo “cepillo”, Delpino 1868/9, Yeo 1993, Westerkamp 1997).

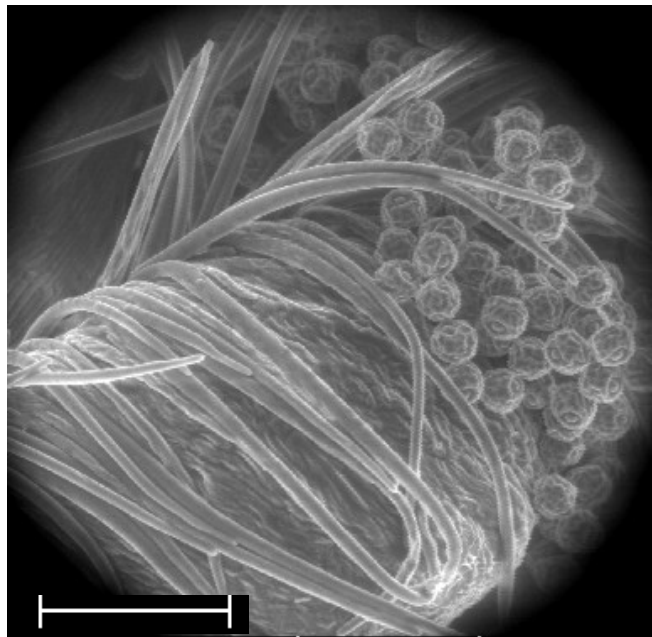


Figura 11. Tricomas del cepillo estilar, que se hallan curvados levemente hacia el estigma y retienen los granos de polen para ser presentados a los polinizadores durante las visitas. Barra= 200 μ .

Pliegues epidérmicos de las alas

Los pliegues transversales de las alas (Fig. 12), constan de crestas y valles alternados. Las células de la epidermis situadas en las crestas presentan estriación cuticular alternada, ésta estriación se encuentra ausente en los valles (Fig. 13). El mesófilo no participa de estas estructuras. Estas esculturaciones, también informadas en *V. vexillata* (Hedstrom y Thulin 1986), ofrecen una superficie de apoyo a los visitantes y adicionalmente podrían interpretarse como guías táctiles de néctar (además de la guía visual del vexilo), debido a que se hallan orientadas hacia el nectario. Kevan y Lane (1985) y Etcheverry (2001a) llegaron a conclusiones similares en *Asteraceae* y en *Crotalaria* (Fabaceae: Papilionoideae), respectivamente. De acuerdo con la distribución tribal de este carácter en Papilionoideae (Stirton 1981), Phaseolae está ubicada en el grupo de 13 tribus que presenta géneros con y sin esculturaciones.

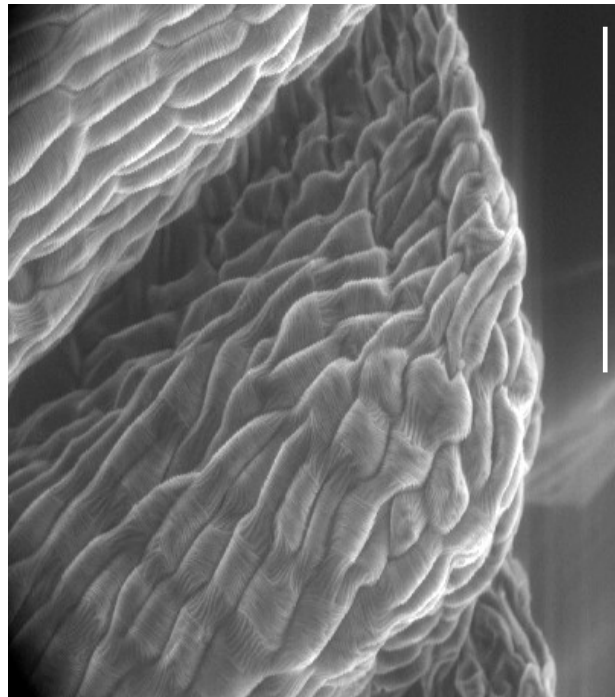


Figura 12. Plegamiento en la epidermis del ala izquierda. Se observan zonas salientes y zonas deprimidas. Barra= 200 μ .

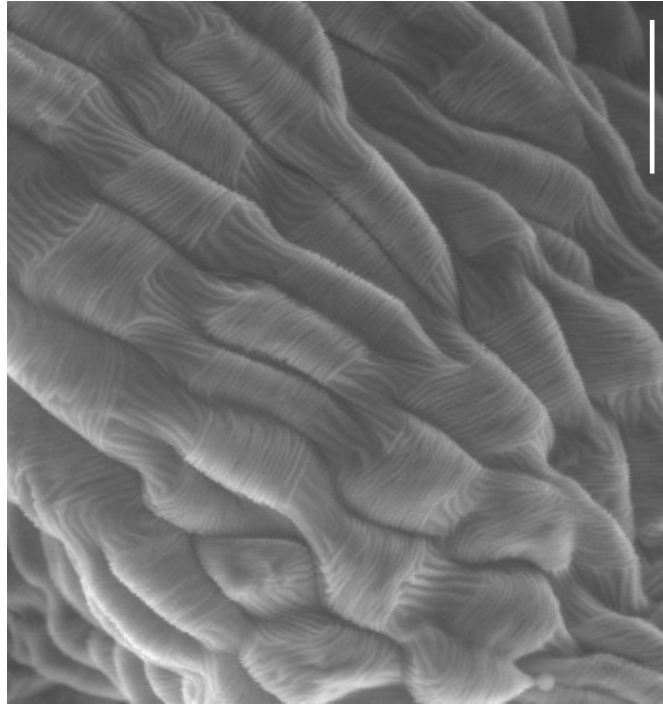


Figura 13. Detalle de la epidermis plegada del alal izquierda. Nótese la estriación cuticular alternada. Barra= 50 μ .

Separación anteras-estigma, longitud de tricomas estilares y de tricomas periestigmáticos

En la Tabla 4 se describen los resultados concernientes a la distancia entre anteras y estigma, longitud de los tricomas estilares y de los tricomas periestigmáticos. Se observa que la población de C. Quijano presenta los menores valores de las tres variables con respecto a las otras poblaciones. Con respecto a la distancia anteras estigma, Quijano es significativamente menor en comparación con las otras poblaciones. La longitud de los tricomas estilares es estadísticamente menor en Quijano con respecto a Vaqueros, Betania y Calilegua. La longitud de los tricomas periestigmáticos en Quijano es también estadísticamente menor en relación a Vaqueros y Betania.

La separación anteras-estigma fue estudiada por Lush (1979) en líneas silvestres y cultivadas de *Vigna unguiculata* y encontró diferencias que se correspondían con el sistema reproductivo: la autogamia era menor (0-4%) en

aquellas líneas con separación marcada de ambos ciclos, mientras que en otras líneas sin separación, la autogamia resultó muy exitosa (90-100 %). La menor longitud de tricomas periestigmáticos actuaría en el mismo sentido, permitiendo al acceso de los granos de polen al estigma. La menor longitud de los tricomas estilares reduciría la capacidad de contener y presentar granos de polen durante las visitas. Estos resultados se discutirán en la sección Sistema Reproductivo de *V. caracalla*.

Tabla 4. Promedios y error estándar de distancias anteras-estigma, longitud de tricomas estilares y longitud de tricomas periestigmáticos en cinco poblaciones de *V. caracalla* de Salta y Jujuy (N= 10).

Población (msnm)	Distancia anteras-estigma	Longitud tricomas estilares (μm)	Longitud tricomas periestigmáticos (μm)
C. Quijano (1570)	1,45 \pm 0,21 ^a	690,38 \pm 50,35 ^a	520,80 \pm 30,31 ^a
La Caldera (1400)	3.27 \pm 0,32 ^b	742,08 \pm 30,29 ^{ab}	607,68 \pm 47,787 ^{ab}
Vaqueros (1240)	2.79 \pm 0.19 ^b	960,19 \pm 40,38 ^c	620,88 \pm 20,90 ^b
Betania (980)	3.68 \pm 0.61 ^b	920,64 \pm 50,95 ^c	690,12 \pm 40,24 ^b
Calilegua (700)	2.77 \pm 0.35 ^b	860,40 \pm 30,20 ^{bc}	610,92 \pm 20.72 ^{ab}
H; Probabilidad	17,65; 0,0013	18,94; 0,0007	9,64; 0,044

3.1.3. Observaciones de la fenología floral

En todas las poblaciones estudiadas, las flores duraban 12 horas en antesis, abriéndose al amanecer (7 hs.). A partir de ese momento comenzaban la secreción de néctar y las visitas de los insectos. Todas las anteras se encontraban dehiscentes, mientras que el estigma dio reacción positiva con Peróxido de Hidrógeno sólo si la flor fue visitada previamente o si el estigma era frotado

artificialmente. En flores no visitadas, en las cuales el estigma no había sido contactado, la prueba de peroxidasas fue negativa a lo largo del ciclo floral.

Entre 12 hs. y 15 hs. se registró la máxima emisión de perfume. A las 18 hs. se produjo cambio de color (de lila a amarillo) y rotación de ca. 45° de la flor en sentido contrario a las agujas del reloj. A las 19 hs. comenzó la marchitez del vexilo y de las alas. En las poblaciones de Vaqueros, Campo Quijano y Betania, el 10% de las flores del día resultaron pseudoclesitógamas (*sensu* Lord 1981), las cuales son similares morfológicamente a las chasmógamas, excepto que permanecen cerradas, es decir con vexilo cubriendo el resto de las partes florales, separándose éste por sus bordes ca. de 1 mm. Esta separación no es suficiente para que los visitantes ingresen a las mismas.

3.1.4. Variabilidad de los caracteres florales

Diferencias entre poblaciones

Todos los rasgos analizados en este apartado serían potencialmente importantes en la relación de *V. caracalla* con sus polinizadores, *i.e.*, el ancho del ala izquierda, donde se aplican las fuerzas requeridas para acceder al néctar y además constituir la “superficie de aterrizaje”; la longitud del pedicelo floral, por la altura de presentación de la flor con respecto a la superficie de la planta; la longitud del “tubo” floral (profundidad), por la accesibilidad del néctar. Con respecto a esta última variable, es importante aclarar que se midió desde la base del cáliz hasta la base del vexilo de las flores “cerradas”. Cuando los polinizadores realizan movimientos para acceder al néctar y “abrir” la flor se produce el descenso de las alas y la quilla. Consecuentemente se genera un espacio para introducir la cabeza y parte del pronoto y de esa manera la profundidad real del nectario se acorta.

Los caracteres morfológicos (excepto longitud del pedicelo) muestran diferencias significativas entre poblaciones (Tabla 5), aunque dichas diferencias son pequeñas en magnitud absoluta, por lo cual se puede concluir que todas las poblaciones mostraron un patrón morfológico común. No existe un patrón clinal en el tamaño floral. Vaqueros presenta las flores más pequeñas y La Caldera, la población más cercana, presenta las flores más grandes. En C. Quijano, la población de mayor altitud, las flores son intermedias.

Tabla 5. Promedio y error estándar de las variables estudiadas en cinco poblaciones de *V. caracalla*. También se muestran los estadísticos básicos para el conjunto total de datos ($N = 214$ flores).

Población (msnm) (N)	Longitud floral	Ancho floral	Profundidad del nectario	Ancho del ala izquierda	Pedicelo
C. Quijano (1570) (40)	49.12 ± 8.11 ^b	35.14 ± 2.36 ^b	16.54 ± 1.22 ^b	19.73 ± 2.36 ^b	9.07 ± 2.14
La Caldera (1400) (50)	51.25 ± 4.63 ^c	38.22 ± 5.25 ^c	20.72 ± 5.40 ^c	22.65 ± 3.04 ^c	11.39 ± 4.63
Vaqueros (1240) (50)	45.80 ± 2.60 ^a	34.04 ± 2.81 ^a	15.68 ± 0.99 ^a	18.43 ± 1.94 ^a	8.59 ± 1.70
Betania (980) (49)	50.67 ± 2.18 ^c	35.65 ± 2.23 ^b	18.49 ± 0.97 ^c	24.46 ± 2.18 ^d	8.41 ± 1.29
Calilegua (700) (25)	50.52 ± 2.85 ^c	35.81 ± 2.79 ^{bc}	19.09 ± 1.8 ^c	20.43 ± 1.58 ^b	8.39 ± 1.33
Todas las Poblaciones	49.12 ± 4.00	35.80 ± 3.85	18.06 ± 3.39	21.28 ± 3.25	9.27 ± 2.90
Rango	34.87-58.2	23.3-49.6	12.5-29.6	13.5-28.8	4.1-19.6
<i>H</i> , Probabilidad	70,47 <0,0001	26,78 <0,0001	99,18 <0,0001	107,86 <0,0001	8,95 0,06 (N.S.)

La variación fenotípica que se observa en una especie determinada es ocasionada por diferencias genéticas entre plantas y por diferencias en el ambiente donde los individuos crecen (Futuyma 1986). La determinación precisa de cada uno de estos factores a la variabilidad total requiere manipulación y experimentación en condiciones controladas (Futuyma *op. cit.*), lo cual no es un objetivo del presente estudio. Se podría afirmar que el componente ambiental sería importante en las variaciones observadas, dado que existen diferencias en los ambientes estudiados,

tanto en temperaturas como en precipitaciones. Con respecto a los polinizadores, se observó que los mismos son varios Himenópteros en todas las poblaciones, excepto en Quijano, donde se observó un único polinizador, *Bombus morio* obreras, con la menor longitud de proboscis. Se podría esperar que en dicha población las flores presenten menor profundidad del nectario; sin embargo, los datos del presente trabajo no muestran esa correlación.

Cada una de las cinco variables está correlacionada positivamente y significativamente con cada una de las otras variables (Tabla 6), lo cual indica que los caracteres florales varían en forma conjunta. Existiría entonces una gran integración entre los componentes del fenotipo floral, situación que es común en plantas polinizadas por insectos (Berg 1960).

Tabla 6. Coeficientes de correlación múltiple (r , Spearman) entre todas las variables florales de *V. caracalla*, $N = 214$. Todos los valores son positivos y significantes ($P < 0.05$).

	Longitud	Ancho	Profundidad	Ala izquierda	Pedicelo
Longitud	-				
Ancho	0.70	-			
Profundidad del nectario	0.67	0.66	-		
Ala izquierda	0.58	0.40	0.55	-	
Pedicelo	0.47	0.57	0.75	0.39	-

Producción de semillas de flores individuales

A partir de las flores que produjeron fruto, se examinó si el número de semillas en la legumbre presenta alguna relación con la morfología de la flor que la originó. Se utilizó una regresión múltiple para medir el efecto de los caracteres florales (variables independientes) en el número de semillas producidas por cada flor (variable dependiente) (Tabla 7). Ninguna de las variables morfométricas analizadas

exhibió coeficientes de regresión significativos. Numerosos trabajos han demostrado evidencias positivas (longitud del espolón, Nilsson 1988; tamaño de la corola Galen y Newport 1987, diámetro y longitud de la corola, Galen 1989, profundidad del nectario, Jhonston 1991) y negativos (tamaño de la corola, Stanton y Preston 1988, Young y Stanton 1990) de la variación cuantitativa de los rasgos florales en el éxito reproductivo materno. Los resultados del presente estudio indican una evidencia negativa, pero se debe considerar que se ha examinado solamente uno de los componentes del éxito reproductivo. *V. caracalla* posee flores perfectas y la variación en los rasgos florales podría estar relacionada con la función masculina. Con respecto a este último aspecto, Murcia (1990) encontró que la cantidad de polen depositado en los estigmas de *Ipomoea trichocarpa* dependía del ancho de la corola ($r^2 = 0.22$). En *Ipomopsis aggregata*, el número de partículas de polvo (análogos a granos de polen) dispersados a los estigmas desde un donante dependía del ancho de la corola ($r^2 = 0.20$). Más aún, podría haber una influencia de la variación floral en las tasas de cruzamiento (Thomson y Stratton 1985) y consecuentemente en la calidad de las semillas. En algunas especies, rasgos como peso de las semillas, tasas de germinación y vigor de las plántulas se incrementa con la cantidad y diversidad de polen que arriba a los estigmas (Winsor *et al.* 1987).

Tabla 7. Efecto de los caracteres florales en el número de semillas de *V. caracalla*, (sólo se consideran las flores que formaron fruto). *b*, coeficiente de regresión; *t*, *t* de Student; *P*, significancia del coeficiente de regresión parcial. *N* = 147.

Variable independiente	B	T	P
Longitud floral	0,01	0,13	0,90
Ancho floral	0,07	0,72-	0,47
Profundidad del nectario	-0,15	-1,08	0,28
Ancho del Ala izquierda	0,10.	-1,26	0,21
Pedicelo	-0,08	-0,67	0,54
Revoluciones de la quilla	<0,001	0,07	0,94

3.1.5. Patrón de secreción de néctar y efectos de remoción

Secreción de néctar

En la Tabla 8 se brinda la información referente a concentración del néctar, volumen y cantidad de azúcar producida a lo largo del ciclo floral en cuatro poblaciones de *V. caracalla*. En Calilegua no se pudo realizar esta parte del trabajo debido a la altura en que se encontraban las flores (10 m), lo cual hacía imposible la manipulación correspondiente.

De las cuatro poblaciones estudiadas, tres de ellas (C. Quijano, Vaqueros y La Caldera) mostraron patrones de secreción de néctar similares, mientras que Betania, el medio más seco, presenta un patrón diferente, por lo que se describe por separado. En el momento de la apertura floral se midió un volumen disponible para los polinizadores de 7,8-8-10 μl (Campo Quijano, Vaqueros y La Caldera, respectivamente, Fig. 14 y Tabla 8). A partir de allí la secreción es activa y continua, y, coincidiendo con el aumento de temperatura, se extiende durante las primeras seis horas de la antesis, con una tasa de producción promedio de 1.53 ± 0.49 mg/h, alcanzando un pico de producción a las 13 hs., con 22, 24 y 26 μl , respectivamente. A partir de este punto comienza el período de reabsorción hasta llegar al fin de la antesis (19 hs.) con un volumen de 8, 3,4 y 10 μl respectivamente, en cada población. La tasa de reabsorción promedio de las cuatro poblaciones fue de $1,74 \pm 0,21$ mg/h. En La Caldera se observa una reanudación de secreción de 15 a 17 horas, para luego continuar con la reabsorción hasta finalizar el ciclo floral. Un patrón de secreción similar fue descrito por Búrquez (1979) para *Phaseolus coccineus*.

Tabla 8. Volumen (μ l) (V), concentración (%) (C) y contenido de azúcar (mg.) (A) del néctar secretado durante la vida de la flor de *V. caracalla* en cuatro poblaciones.(media \pm E.E.) ; (N = 5).

	7:00	9:00	11:00	13:00	15:00	17:00	19:00
Betania							
V	4,0 \pm 1,2	13,4 \pm 2,9	9,8 \pm 1,6	21,2 \pm 1,6	10,6 \pm 0,32	15,6 \pm 2,6	8,8 \pm 2,9.
C	32,2 \pm 3,7	37,9 \pm 2,8	41,0 \pm 1,6	44,1 \pm 1,1	41,5 \pm 2,1	40,9 \pm 0,8	42,6 \pm 0,9
A	1,6 \pm 0,7	4,6 \pm 0,7	9,2 \pm 0,8	11,3 \pm 1,1	7,8 \pm 1,4	4,8 \pm 0,2	4,5 \pm 1,5
Vaqueros							
V	8,0 \pm 1,9	14,2 \pm 0,6	16,8 \pm 3,1	24,0 \pm 4,0	18,2 \pm 1,8	11,0 \pm 1,1	3,4 \pm 1,7
C	36,8 \pm 2,4	36,6 \pm 0,5	39,2 \pm 1,4	41,4 \pm 2,2	40,0 \pm 1,7	38,8 \pm 1,5	34,2 \pm 1,9
A	3,5 \pm 1,0	6,0 \pm 0,3	7,9 \pm 1,6	11,7 \pm 1,8	8,7 \pm 1,3	5,1 \pm 0,7	1,2 \pm 0,6
La Caldera							
V	10,2 \pm 2,4	19,2 \pm 3,5	20,8 \pm 2,8	26,4 \pm 4,6	20,8 \pm 3,0	27,2 \pm 1,3	8,0 \pm 2,8
C	42,1 \pm 1,0	41,5 \pm 0,7	40,6 \pm 0,7	39,8 \pm 1,7	42,8 \pm 1,7	41,2 \pm 2,0	41,0 \pm 2,2
A	5,2 \pm 1,3	9,5 \pm 1,8	10,0 \pm 1,5	12,8 \pm 0,9	13,3 \pm 2,2	9,9 \pm 1,1	4,2 \pm 1,6
C.Quijano							
V	7,8 \pm 2,0	9,6 \pm 1,7	14,6 \pm 1,2	22,8 \pm 0,9	18,0 \pm 2,4	11,2 \pm 1,7	10,0 \pm 1,5
C	32,6 \pm 4,4	37,0 \pm 1,3	38,8 \pm 2,0	39,2 \pm 0,4	40,0 \pm 3,6	34,8 \pm 1,4	26,6 \pm 4,2
A	0,3 \pm 0,1	3,9 \pm 0,7	6,7 \pm 0,8	10,5 \pm 0,4	8,8 \pm 1,6	4,6 \pm 0,9	2,3 \pm 0,5

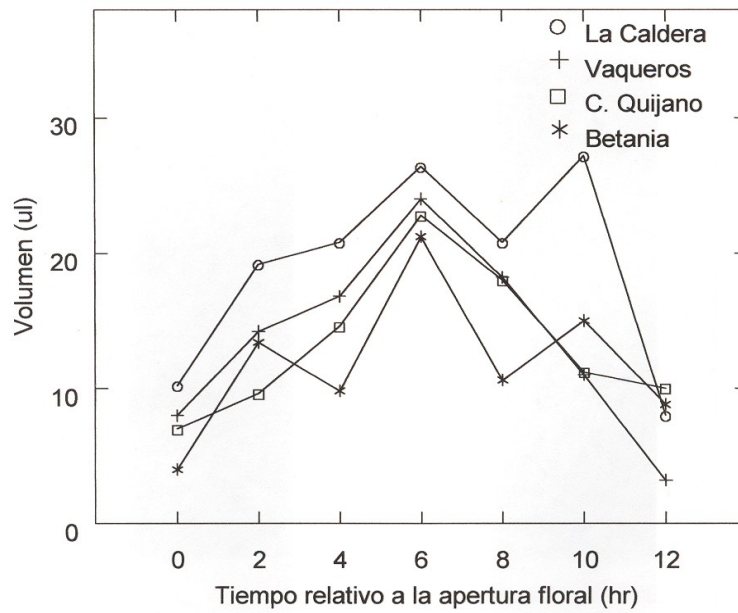


Figura 14. Volumen de néctar (μl) a lo largo del ciclo floral de *Vigna caracalla* en cuatro poblaciones de Salta.

En Betania, la secreción no es continua. El néctar es secretado con una periodicidad regular: se observan tres periodos de secreción alternados con tres periodos de reabsorción. Según Cruden *et al.* (1983), este patrón es inusual, y ha sido reportado para pocas especies, entre ellas, *Andira inermis* (Frankie *et al.* 1976). En *Ligaria cuneifolia* (Rivera *et al.* 1996) sucede algo similar, donde cada periodo de secreción es seguido por un periodo de cesación, pero en ambos casos, los respectivos autores no le atribuyen ninguna explicación.

Cruden *et al.* (*op. cit.*) señalaron que la reabsorción ocurre cuando es alcanzado un máximo en la producción de néctar y los polinizadores ya no están activos. De acuerdo a las visitas observadas en el presente estudio, esta hipótesis no se aplicaría, debido a que se producen visitas de polinizadores en el período de reabsorción de *V. caracalla*.

Aun cuando la reabsorción es un proceso costoso desde el punto de vista energético, el néctar puede ser reutilizado para propósitos alternativos, e.g., número de frutos maduros, semillas por fruto, calidad de semillas, etc. y de esa forma aumentar el éxito reproductivo de la planta (Búrquez y Corbet 1991, Pike 1991, Torres y Galetto 1998).

El análisis estadístico de las medias generales de volumen (Tabla 9) indica diferencias significativas entre poblaciones ($F= 4.84$, g.l. 3; $P = 0.003$), resultando La Caldera (1400 m), significativamente mayor que las otras poblaciones, las cuales no difieren entre si. Esta diferencia se podría explicar, al menos en parte, al hecho de la citada población presenta las flores de mayor tamaño, y si bien no se midió el tamaño del nectario, se podría esperar que también presente un volumen mayor con respecto a las otras poblaciones, y por lo tanto presente una capacidad secretora mayor. Otro factor podrían ser las precipitaciones. En los días previos se produjeron lluvias considerables en La Caldera y además, en el día de muestreo se produjeron lluvias locales de corta duración entre las horas de medición.

Tabla 9. Concentración, volumen y cantidad de azúcar por flor a lo largo del ciclo floral, en diferentes poblaciones de *V. caracalla* (media error estándar). En todos los casos, $N = 35$.

Población (msnm)	Concentración (%)	Volumen (μ l)	Cantidad de azúcar (mg)
C. Quijano(1570)	$35,57 \pm 1,24^a$	$13,31 \pm 1,03^a$	$5,74 \pm 0,57^a$
La Caldera (1400)	$41,29 \pm 0,59^b$	$18,94 \pm 1,58^b$	$9,47 \pm 0,81^b$
Vaqueros (1240)	$38,14 \pm 0,71^a$	$13,63 \pm 1,35^a$	$6,3 \pm 0,68^b$
Betania (980)	$40,01 \pm 0,96^b$	$11,83 \pm 1,13^a$	$5,83 \pm 0,62^b$
Valor del estadístico	$H=22,68, P<0,0001$	$F=4,84; P= 0,003$	$H=75,36; P<0,0001$
Promedio de todas las poblaciones	38,75	14,43	6,83

Las letras diferentes indican diferencias significativas, $P<0.05$.

En cuanto a la concentración, considerando Vaqueros (1240 m.) y Quijano (1570 m) (Fig. 15), se observa que sigue un mismo patrón que el observado para el volumen dichas poblaciones observándose valores máximos a las 13 hs. con 41.4% y a las 15 hs. con 40 % respectivamente, con una amplitud de 5-10 % con respecto al inicio y al final del ciclo floral. En Betania, también se observa un pico a las 13 hs. con 44%, el cual constituye el mayor valor observado en el presente estudio. Este hecho podría relacionarse con la menor humedad relativa registrada (52%); este resultado se relaciona con lo reportado por Bertsch (1983) en *Epilobium angustifolium*, quien demostró experimentalmente que la concentración de néctar es linealmente dependiente de la humedad ambiental, *i.e.*, a menor humedad, mayor concentración.

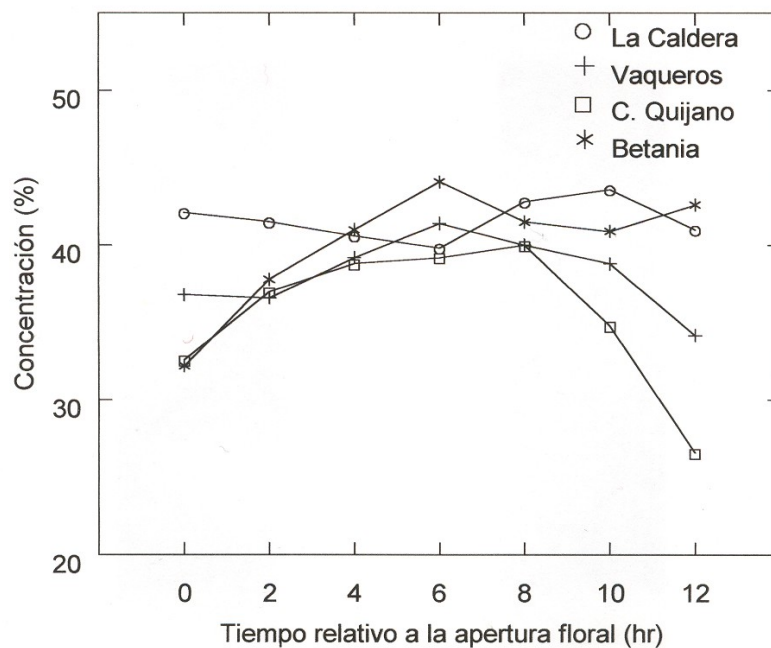


Figura 15. Concentración de azúcares totales (%) en el néctar secretado a lo largo del ciclo floral de *Vigna caracalla* en cuatro poblaciones de Salta.

Contrariamente a lo observado en las poblaciones anteriores, en La Caldera (1400 m) la concentración se mantiene más o menos constante a lo largo del ciclo floral. En general, la concentración del néctar puede aumentar o mantenerse constante en función de la edad floral, o mostrar cierta variabilidad (Galeto y Bernardello 1992).

El análisis estadístico de las medias generales de concentración (Tabla 9) indica diferencias significativas entre poblaciones ($H= 22.68$, g.l. 3; $P < 0.0001$), resultando Quijano (1570 m) y Vaqueros (1240 m) significativamente menores que La Caldera (1400 m) y Betania (700 m).

En términos de oferta energética (mg. de azúcar), los patrones observados son similares a los de volumen; la mayor cantidad de azúcar se produce a las 13 horas, excepto en La Caldera, con un pico a las 17 horas (ver Fig. 16).

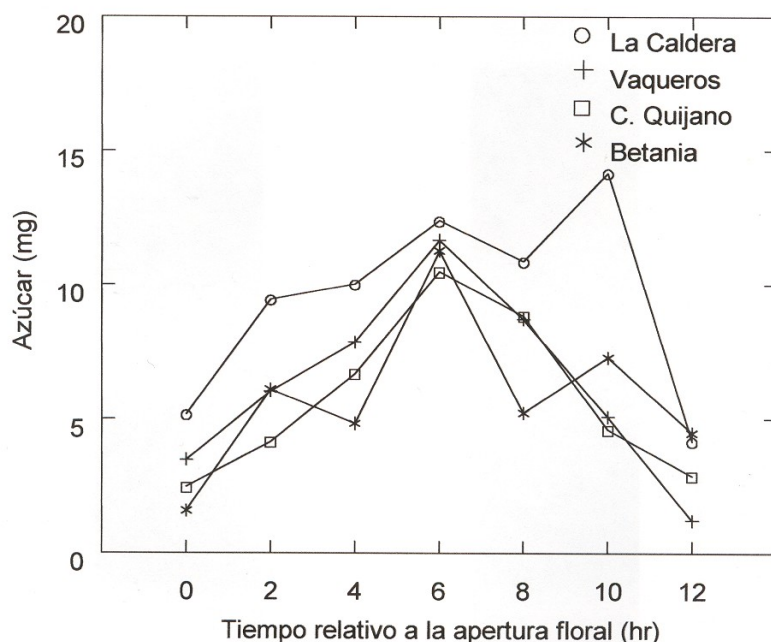


Figura 16. Peso del azúcar (mg) del néctar secretado a lo largo del ciclo floral de *Vigna caracalla* en cuatro poblaciones de Salta.

El análisis estadístico de los promedios generales de mg. de azúcar a lo largo del ciclo floral (Tabla 9), indica diferencias significativas entre poblaciones ($F= 75.36$, g.l. 3; $P = 0.000$). Campo Quijano, el sitio de mayor altitud, presentó significativamente menor cantidad de azúcar que las otras poblaciones, las cuales no difirieron entre sí. Búrquez (1979) obtuvo resultados similares en su estudio de la biología reproductiva de *Phaseolus coccineus* en un gradiente altitudinal, y consideró que ese resultado podía deberse a que en el sitio de mayor altitud la densidad de polinizadores era menor, lo cual reduciría la competencia por el néctar, por lo tanto la oferta energética sería menor. En el capítulo referente a visitantes, se analizará nuevamente este punto.

Efectos de remoción del néctar

La Tabla 10 muestra el volumen de néctar y la cantidad de azúcar producida por grupos sujetos a diferentes números de remoción en las dos poblaciones estudiadas, Vaqueros y La Caldera. En Betania y Quijano no se pudo completar esta parte debido a pérdidas de parte de las plantas por vandalismo y por predación de animales (vacas y caballos). En Calilegua no se pudo realizar por la altura a que estaban situadas las flores.

La remoción de néctar puede tener un efecto estimulante (Gill 1988, Galetto *et al.* 1994), un efecto inhibitor (Mc Dade y Kinsman 1980) o no tener ningún efecto (Feisinger 1978). El ANOVA indica que no existen diferencias significativas en la cantidad de azúcar producida entre el grupo control y los grupos sujetos a remoción en ambas poblaciones (La Caldera: $F = 2.063$, g.l. 5,24 $P = 0.106$; Vaqueros: $F = 1.285$, g.l.=3,16, $P= 0.31$). Cuando se compara concentración, cantidad de azúcar producida y volumen entre el grupo control y todos los grupos con remoción de

Tabla 10. Concentración del néctar (C, % de azúcar, masa/masa total), volumen del néctar (V, μL), y miligramos totales de azúcar (A) en dos poblaciones de *V. caracalla* (media error estándar). Los valores de la diagonal (primera medida de cada grupo) corresponden al patrón de producción de néctar de cada población. Los datos de Efectos de remoción corresponden al promedio del azúcar total producido por flor. Símbolos: * la concentración no se determinó debido a la ausencia de volumen de néctar. Los datos subrayados no fueron considerados para los análisis estadísticos dado que están influenciados por reabsorción activa. $N= 5$ en cada grupo.

Vaqueros

Grupo		7:00	9:00	11:00	13:00	15:00	17:00	19:00
1	C	36.8 ± 2.4	28.5 ± 3.5	27.0 ± 4.6	21.7 ± 1.1	*	*	*
	V	8.0 ± 1.9	4.5 ± 1.5	6.7 ± 3.5	2.7 ± 1.4	0	0	0
	A	3.5 ± 1.01	1.3 ± 0.4	2.5 ± 1.6	0.6 ± 0.3	0	0	0
2	C		36.6 ± 0.5	25.0 ± 5.1	23.2 ± 3.5	22.8 ± 9.6	*	*
	V		14.2 ± 0.6	2.2 ± 0.9	1.8 ± 0.7	0.5 ± 1.9	0	0
	A		6.04 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1	1.1 ± 0.6	0	0
3	C			39.2 ± 1.4	20.5 ± 0.3	20.7 ± 0.5	15.5 ± 5.2	*
	V			16.8 ± 3.1	3.7 ± 0.9	6.5 ± 4.5	3.0 ± 3.2	0
	A			7.9 ± 1.6	0.8 ± 0.2	1.4 ± 0.9	1.3 ± 0.6	0
4	C				41.4 ± 2.2	35.0 ± 3.5	37.2 ± 3.8	*
	V				24.0 ± 4.0	2.0 ± 1.0	3.2 ± 1.3	0
	A				11.7 ± 1.8	0.8 ± 0.4	1.5 ± 0.7	0
5	C					40.0 ± 1.7	40.0 ± 1.7	32.5 ± 5.4
	V					18.2 ± 1.8	18.3 ± 2.3	5.7 ± 0.4
	A					8.7 ± 1.3	8.7 ± 1.6	2.2 ± 0.4
6	C						38.8 ± 1.5	31.7 ± 4.8
	V						11.0 ± 1.1	8.7 ± 2.3
	A						5.1 ± 0.7	3.3 ± 1.2
7	C							34.2 ± 1.9
	V							3.2 ± 1.7

A

1.2 ± 0.7

Tabla 10. Continuación.

La Caldera

Grupo		7:00	9:00	11:00	13:00	15:00	17:00	19:00
1	C	42.1 ± 1.0	39.0 ± 1.0	21.5 ± 0.6	20.2 ± 0.2	*	*	*
	V	10.2 ± 2.4	4.7 ± 0.2	1.2 ± 0.5	1.0 ± 0.4	0	0	0
	A	5.2 ± 1.3	2.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0	0	0
2	C		41.5 ± 0.7	24.5 ± 6.0	33.0 ± 2.8	22.8 ± 9.6	*	*
	V		19.2 ± 3.5	5.5 ± 0.5	1.5 ± 0.3	0.5 ± 1.9	0	0
	A		9.5 ± 1.8	1.5 ± 0.4	0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.6	0	0
3	C			40.6 ± 0.7	32.5 ± 0.6	25.5 ± 8.9	19.0 ± 7.5	*
	V			20.8 ± 2.8	13.0 ± 5.4	6.5 ± 4.5	0.3 ± 0.2	0
	A			10.0 ± 1.5	4.8 ± 1.6	0.5 ± 0.2	0.11 ± 0.1	0
4	C				39.8 ± 1.7	40.0 ± 0.8	34.2 ± 2.5	25.0 ± 1.7
	V				26.4 ± 4.6	4.0 ± 2.1	1.2 ± 0.2	1.2 ± 0.2
	A				12.8 ± 0.8	1.9 ± 1.0	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.06
5	C					42.8 ± 1.7	21.2 ± 0.9	19.7 ± 6.6
	V					20.8 ± 3.0	3.5 ± 2.5	1.2 ± 0.6
	A					10.9 ± 1.8	0.9 ± 0.7	0.4 ± 0.2
6	C						41.2 ± 2.0	31.5 ± 4.9
	V						27.2 ± 1.3	15.2 ± 0.8
	A						14.2 ± 0.9	5.6 ± 1.05
7	C							41.0 ± 2.2
	V							8.0 ± 2.8
	A							4.2 ± 1.6

néctar (en forma conjunta), tampoco se encontraron diferencias significativas (Tablas 11 y 12). Resultados similares fueron reportados en un estudio multipoblacional de *Erythrinna crista-galli* (Galetto *et al.* 2000) en el cual la producción de néctar no era afectada por las remociones tanto en medios áridos o en medios húmedos. También se reportan en la literatura otros casos como *Pyrostegia venusta* (Galetto *et al.* 1994) y *Mellitis melisophyllum* (Guitián *et al.* 1995).

Los resultados muestran que las extracciones repetidas no suponen disminución ni aumento en el peso del azúcar secretado y que las flores producen una cantidad fija de néctar, independientemente del número de visitas que ellas reciban. Esto sugiere que la extracción del néctar por los insectos no disminuiría o incrementaría la producción total de azúcar y en este último caso, no representa un costo adicional frente a flores cuyo néctar ha sido extraído una sola vez.

Tabla 11. Promedios y error estándar de volumen del néctar (μl) y peso de azúcar (mg) producida por *V. caracalla* en grupos de flores extraídas (grupos 1-5) y en el control (grupo 6), en la Población de La Caldera, Salta. $N= 5$ en cada grupo.

	Grupos con remoción	Control
Volumen (μl)	29,28 \pm 2,12	27,20 \pm 0,58
$t = 0.43$, g.l.=28, $P=0.67$		
Peso de azúcar (mg)	12,57 \pm 0,98	14,18 \pm 0,45
$t = -0.718$, g.l.=28, $P=0.48$		

Tabla 12. Volumen del néctar (μl) y peso de azúcar (mg) producida por *V. caracalla* en grupos de flores extraídas (grupos 1-5) y en el control (grupo 6), en la Población de Vaqueros, Salta. $N= 5$ en cada grupo.

	Grupos con remoción	Control
Volumen (μl)	25,23 \pm 0,56	24,0 \pm 1,8
$t = 0.23$, g.l.=18, $P=0.82$		
Peso de azúcar (mg)	8,99 \pm 0,21	11,66 \pm 0,84
$t = -1.27$, g.l.=18, $P=0.22$		

Los valores generales de producción de néctar de *V. caracalla* obtenidos en el presente estudio, son superiores con respecto a otras Phaseoleae, e.g., *Phaseolus coccineus* (Búrquez 1979) y *P. augusti* (Hoc y Amela García 1998) tanto en concentración como en volumen y oferta energética del néctar, lo cual indicaría que *V. caracalla* es una gran productora de néctar.

Según Cruden *et al.* (1983), las especies polinizadas por Himenópteros, como *V. caracalla*, producen entre 6.5-8 μl de néctar por flor, con una concentración de 29-35% y 5-6 mg de azúcar. Los resultados obtenidos en el presente estudio superan los citados valores y ubicarían a esta especie dentro del rango superior, que correspondería a flores polinizadas por mariposas nocturnas, las cuales presentarían mayores requerimientos energéticos.

El incremento de temperatura parece desempeñar un papel importante en la secreción de néctar, dado que el máximo volumen se alcanza cuando la temperatura a lo largo del día es máxima (entre 13-17 hs.), esta correlación se observa en todas las poblaciones estudiadas.

Hocking (1968) cita que las flores polinizadas por abejas presentan mayor recompensa energética en poblaciones de elevadas altitudes con respecto a menores altitudes. Sin embargo, Cruden (1976) no detectó tal patrón en *Cuphea*

aequipetala, sino lo contrario, es decir una correlación negativa. En el presente estudio, también se observa una correlación negativa, al comparar los promedios generales de concentración en cada población con altitud de las mismas ($r = -0.4$ $P = 0.49$, $N=4$) pero esta diferencia no tiene significancia estadística; sin embargo, se debe considerar que el tamaño muestral es bajo.

La producción de néctar de *V. caracalla* varía en función de la edad de la flor, con un período de secreción seguido por un período de reabsorción. La flor produce néctar en la primera mitad (primeras seis horas) de su ciclo floral. Luego, en las seis horas siguientes se produce reabsorción de néctar. Según Cruden *et al.* (1983) *V. caracalla* resulta ser un productor lento, debido a que secreta un 11% por hora con respecto a su máxima acumulación, considerando las cuatro poblaciones en conjunto.

3.2. Visitantes florales

3.2.1. Elenco de visitantes

En coincidencia con lo predicho por Lindman (1902), los polinizadores de *V. caracalla* fueron grandes Himenópteros en todas las poblaciones estudiadas. Los ejemplares capturados (que siempre fueron hembras), y sus tamaños respectivos (longitud) se detallan en la Tabla 13. Las cuatro especies citadas en dicha resultaron visitantes legítimos (polinizadores), dado que eran capaces de desarrollar la fuerza requerida para acceder a la cámara de néctar, y exponer y contactar el estigma y el cepillo estilar. Esta aseveración se basa en las observaciones de campo de la conducta de forrajeo.

En el sitio de menor altura (Calilegua) se observó el mayor número de especies polinizadoras, *i.e.*, todas las citadas en la Tabla 13, mientras que el sitio de

mayor altura (Campo Quijano) presentó solo un polinizador (*B. morio* obreras). Esta observación coincide con la tendencia respecto de la diversidad de polinizadores en un gradiente altitudinal, señalada por Búrquez (1979) en su estudio de *Phaseolus coccineus*. En cuanto a la población de La Caldera estaban presentes *B. morio* obreras (Fig. 17), *X. eximia* y *C. bicolor* (Figs.18 a y b). También se registraron visitas de ladrones de polen: *Apis mellifera* y una especie de Meliponini (Fig. 19). Estos insectos forrajeaban polen del cepillo que había sido expuesto por un visitante legítimo previo, aprovechando la demora del mismo para realojarse dentro de la quilla pero sin contactar el estigma de la flor. Varias especies de Lepidópteros forrajeaban néctar de costado, sin exponer el estigma y estilo, por lo tanto se trata de ladrones de néctar. En Tabla 14 se consignan todos los visitantes de *V. caracalla* y se clasificó a los mismos según la terminología de Inouye (1980).

Tabla 13. Lista de polinizadores florales de *V. caracalla*. Se incluyen las medidas del cuerpo y de la proboscis. *N* = 4, excepto en *Bombus morio* obreras, *N* =7.

Polinizador	Longitud del cuerpo (mm)	Longitud de proboscis (mm)
<i>Bombus morio</i> Reina Swed.	24,62 ± 1,28	15,45 ± 0,22
<i>B. morio</i> obreras Swed.	18,96 ± 0,80	10,90 ± 0,35
<i>Centris bicolor</i> Lepeletier	14,87 ± 0,42	12,27 ± 0,16
<i>Eufriesea mariana</i> Móczary	18,31 ± 0,77	13,40 ± 0,57
<i>Xylocopa eximia</i> Pérez	24,50 ± 0,64	15,50 ± 0,29



Figura 17. *Bombus morio* obrera visitando la flor de *Vigna caracalla*. La flecha indica el contacto del cepillo estilar (cargado de polen) con el pronoto del insecto.

Figura 18. Polinizadores florales de *Vigna caracalla*. a) *Xylocopa eximia*. b) *Centris bicolor*.





Figura 19. Una especie de Meliponini actuando como ladrón de polen de *Vigna caracalla*.

Tabla 14. Lista de visitantes de flores e inflorescencias de *Vigna caracalla* en diferentes poblaciones de Salta y Jujuy , y actividad que realizan los mismos. Ref.: + = observado; - = no observado en la localidad.

Visitantes	C.Quijano 1.570 m	La Caldera 1400 m	Vaqueros 1240 m	Betania 980 m	Calilegua 700 m	Categoría
Thysanoptera Thrips	+	+	+	+	+	¿?
Lepidoptera Fam. Hesperidae	+	+	+	+	+	Ladrón de néctar
Hymenoptera						
<i>B. morio</i> obreras	+	+	+	+	+	Polinizador
<i>B. morio</i> Reina	-	-	-	-	+	Polinizador
<i>X. eximia</i>	-	+	+	+	+	Polinizador
<i>C. bicolor</i>	-	+	-	-	+	Polinizador
<i>E. mariana</i>	-	-	-	+	+	Polinizador
<i>Apis mellifera</i>	+	+	+	+	-	Ladrón de polen
Meliponini	-	+	-	-	-	Ladrón de polen
Formicidae						
Sp. 1	+	+	+	+	-	Visitante Nectario Extrafloral
Sp. 2	+	-	-	+	-	Depredador de Flores

Se observó en la mayoría de las poblaciones la presencia de hormigas forrajeando néctar en los nectarios extraflorales situados en los nudos de la inflorescencia (Fig. 20) durante la floración, hasta la formación de los frutos. En C. Quijano se observó la presencia de otra especie de hormiga que depredaba las flores.



Figura 20. Hormigas forrajeando néctar en los nectarios extraflorales situados en los nudos de la inflorescencia.

3.2.2. Número total de visitas, tasa y duración

El visitante más frecuente fue *B. morio* obreras, registrando entre 90-100% de las visitas en las cinco poblaciones, mientras que *B. morio* Reina, *X. eximia*, *C. bicolor* y *E. mariana* registraron el porcentaje restante (Tabla 15).

Tabla 15. Número total de visitas de polinizadores (*B. morio* obreras, *B. morio* Reina, *C. bicolor*, *E. mariana* y *X. eximia*), visitas de *B. morio* obreras por período y porcentaje de visitas de *B. morio* obreras con respecto a las visitas totales (incluyendo todos los polinizadores), en cinco poblaciones de *V. caracalla* en Salta y Jujuy. En la columna 2 se consigna entre paréntesis el número de períodos de observación realizados en cada población.

Población (msnm)	Número total de visitas de polinizadores (períodos)	Número de visitas de <i>B. morio</i> obreras por período (media \pm error estándar)	Porcentaje de visitas de <i>B. morio</i> obreras en relación a visitas
Campo Quijano (1570)	102 (12)	13,1 \pm 0,43	100
La Caldera (1400)	314 (33)	10,2 \pm 0,35	93,20
Vaqueros (1240)	115 (15)	5,2 \pm 0,25	91,67
Batania (980)	86 (8)	10,8 \pm 0,62	91,56
Calilegua (700)	151 (17)	8,8 \pm 0,34	95,56

Comparando la frecuencia de visitas en la mañana y en la tarde (Tabla 16), se observa que no hubo diferencias entre las mismas, excepto en Calilegua y Betania, donde se registraron más visitas durante la tarde. Retomando lo informado en la sección correspondiente a néctar, durante la tarde se produce la reabsorción del mismo, pero las flores reciben visitas aún cuando posiblemente ya fueron polinizadas durante la mañana. Una probable explicación estaría vinculada a la función paterna, dado que el polen es expuesto en dosis por el “cepillo estilar”, esas visitas quizás contribuyan a la dispersión de polen. Al analizar los datos de mañana y tarde en forma conjunta (Tabla 16), se concluye que la tasa de visitas fue superior en la población de mayor altura (C. Quijano) con respecto al resto de las

poblaciones, donde se observó la menor diversidad de polinizadores (sólo *B. morio* obreras). Esta diferencia no se ve reflejada en la producción de frutos y semillas en condiciones de polinización libre, dado que, contrariamente a lo esperado, la menor producción ocurrió en dicha población (estos datos se describen en la sección Producción de frutos).

Tabla 16. Promedios de frecuencias de visitas por flor en períodos de 15 minutos, de *Bombus morio* obreras y *Xylocopa eximia* en cinco poblaciones de *V. caracalla*, durante la mañana y la tarde (comparadas con el test Mann-Whitney). En la última columna se consignan los promedios totales, los que resultaron estadísticamente diferentes ($H= 13.48$, g.l.= 4, $P= 0.009$).

Población (msnm)	Visitas/flor/15 min. (<i>B. morio</i> + <i>X. eximia</i>)			Mañana +Tarde (Visitas/flor/15 min.)
	Mañana	Tarde	U, (Mann-Whitney)	
C. Quijano (1570)	0.36 ± 0.08 ^a	0.42 ± 0.10 ^a	17.5, $P=0.93$	0.38 ± 0.06 ^a
La Caldera (1400)	0.33 ± 0.03 ^a	0.37 ± 0.03 ^a	70.5, $P=0.32$	0.35 ± 0.02 ^{ab}
Vaqueros (1240)	0.46 ± 0.11 ^a	0.30 ± 0.05 ^a	36.0, $P=0.17$	0.35 ± 0.05 ^{ab}
Betania (980)	0.12 ± 0.02 ^a	0.43 ± 0.06 ^b	3.0, $P=0.001$	0.26 ± 0.04 ^{bc}
Calilegua (700)	0.13 ± 0.03 ^a	0.28 ± 0.04 ^b	14.0, $P=0.03$	0.21 ± 0.03 ^c

Letras diferentes indican diferencias significativas dentro de la misma población entre mañana y tarde, $P < 0.05$.

Según los datos de Tabla 16, habría un patrón clinal entre altitud y tasa de visitas, *i.e.*, las visitas aumentarían con la altitud ($r = 0.98$, $P= 0.004$), pero, no se observa ninguna correlación entre producción de néctar (mg. de azúcar) y tasa de visitas ($r = 0,043$, $P= 0,79$, $b= 7,11$). Contrariamente a lo esperado, la tasa de visitas por flor y por período es mayor en la población menos productora (C. Quijano).

La alta tasa de visitas por flor puede estar influenciada por abundancia de insectos o por baja disponibilidad de flores (McCall y Primack 1992). En C. Quijano (1570 m.s.n.m.) se observa la más alta tasa de visitas, lo cual se podría relacionar

con la baja cantidad de especies en floración en el sitio de muestreo, mientras que en Calilegua, se observa la tasa más baja lo cual indicaría que las plantas de *V. caracalla* competirían por polinizadores con las numerosas plantas en floración (recordar que la población de Calilegua se encuentra en una reserva biológica de 76.000 has.), y que la baja actividad de los mismos podría limitar su éxito reproductivo. Los polinizadores de *V. caracalla* visitan varias especies. A continuación se citan algunas especies de las poblaciones de La Caldera y Vaqueros visitadas por los siguientes polinizadores:

1. *Bombus morio*: *Crotalaria micans*, *C. incana*, *Macroptilium erythroloma*, *Centrosema virginianum*, *Solanum sisymbriifolium*, *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*.
2. *Xylocopa eximia*: *C. micans*.
3. *Centris bicolor*: *Solanum sisymbriifolium*, *Hyptis mutabilis*, *Phaseolus augustii*, *Serjania perulacea*.

La competencia por polinizadores se puede calificar como directa, debido al traslado interespecífico de polen (Hancock *et al.* 2003, Sánchez *et al.* 2004) o indirecta, debido a la mayor atracción de polinizadores a flores de otras especies (Rathcke 1983). El primer modo de competencia puede ocurrir aún cuando hay abundancia de polinizadores e implica reducción del éxito reproductivo paterno a través de pérdida de polen (depositado en flores heteroespecíficas (Campbell 1985) y también del éxito materno, dado por la recepción de polen heteroespecífico (Kwak y Jennersten 1991). En este sentido, es posible que *B. morio* este depositando polen heteroespecífico, lo cual puede estar ocasionando una interacción competitiva entre

polen de diferentes especies y, consecuentemente, su eficiencia como polinizador sería muy baja.

Además, se debe considerar que la tasa de visitas no es el único indicador de la producción de frutos y semillas resultante. McDade y Davidar (1984) informaron un índice de correlación de sólo 0,25 entre ambas variables en un estudio de *Pavonia dasypetala* (Malvaceae). Shemske y Horvitz (1984) y Horvitz y Schemske (1990) encontraron que el polinizador más abundante de *Calathea ovandensis*, *Euglossa* sp., no fue el más eficiente, concluyendo que la eficiencia de manipulación de la flor se relacionaba con la producción de frutos. Además, Thomson (1986) y Harder (1990) encontraron que la deposición y/o remoción de polen se incrementaban con la duración de las visitas. Comparando la duración de visitas (en segundos) entre *B. morio* obreras y *X. eximia* en una población (Vaqueros), se encontró que existen diferencias significativas entre las mismas ($18,72 \pm 1,63$ vs. $37,44 \pm 7,77$; $t = -2.35$, g.l.= 87, $P = 0,044$). En las cuatro poblaciones en las que *X. eximia* está presente se obtuvo el mayor éxito reproductivo. En contraste, en C. Quijano, *B. morio* es el único polinizador presente y el éxito reproductivo de *V. caracalla* fue el menor. De lo anterior, se podría hipotetizar que *X. eximia* es más eficiente en la deposición de polen que *B. morio*. Además, el tamaño corporal y de proboscis de *X. eximia* son mayores, por lo cual habría mayor superficie de contacto con las partes reproductivas de *V. caracalla*.

En consecuencia, se podría concluir que la presencia de *X. eximia* en el elenco de polinizadores es importante en el éxito reproductivo de *V. caracalla*. Sin embargo, no se puede descartar de manera definitiva el papel que *B. morio* tenga en el éxito reproductivo de la especie. En este sentido, Thomson y Pellmyr (1992) aseguran que en el caso de flores que reciben diversos co-polinizadores, el efecto

mutualista está tan disperso entre ellos y es tan variable a lo largo de la estación reproductiva, que es difícil asegurar cual es el mutualista más importante. Finalmente, no se deben descartar los factores ecológicos que puedan disminuir el éxito reproductivo postpolinización. Por ejemplo, Lee (1988) y Guitián *et al.* (1996), entre otros, citan factores como: predación, herbivoría y enfermedades; depresión por autogamia, cantidad de nutrientes y fotosintatos disponibles y los factores físicos del ambiente.

En la Tabla 17 se consigna la duración de las visitas de *B. morio* obreras a las flores de *V. caracalla*. Se observa que existen diferencias significativas entre las cinco poblaciones. Los mayores valores se observan en Betania y en Calilegua, el menor en La Caldera. En las otras poblaciones se registran valores intermedios. En general, son valores muy altos en comparación con lo informado con otros trabajos que estudiaron la duración de las visitas en el género *Bombus* a flores con néctar no expuesto; *Bombus diversus* visitando *Salvia nipponica*: 2,5 segundos (Ohashi 2002) *Bombus impatiens* visitando *Linaria vulgaris* 3 segundos (Gegear y Lavery 1995).

Tabla 17. Duración de las visitas de *Bombus morio* obreras, en segundos, a flores de *V. caracalla* en cinco poblaciones de Salta y Jujuy.

Población (msnm)	Duración de visitas de <i>B. morio</i> (seg.) Media \pm error estándar (N)
Campo Quijano (1570)	18,21 \pm 1,87 (92) ^{ab}
La Caldera (1400)	14,96 \pm 1,79 (130) ^a
Vaqueros (1240)	18,81 \pm 1,64 (98) ^{ab}
Betania (980)	19,32 \pm 2,67 (79) ^b
Calilegua (700)	21,23 \pm 1,88 (146) ^b
Todas las poblaciones	18,51 \pm 0,88, rango=1-125
Valor del estadístico <i>H</i> , Probabilidad	27,43, <i>P</i> < 0,0001

Letras diferentes indican diferencias significativas, *P*<0.05.

3.2.3. Interacción entre la flor y los visitantes

El mecanismo de polinización observado en *V. caracalla* implica una serie de acciones por parte de los polinizadores que se describen a continuación. Las abejas utilizan el ala izquierda (desde el punto de vista del visitante) como superficie de “aterrizaje”, valiéndose de las esculturaciones transversales que son utilizados como apoyo para las patas (ver Figs. 12 y 13). La quilla queda por encima del pronoto del insecto. Luego introducen la proboscis dentro del canal central del vexilo, con lo que la abeja se encuentra en una posición apropiada para efectuar la polinización.

Para acceder a la cámara nectarífera, la abejas deben aplicar fuerzas que superen la resistencia de las estructuras florales, pero sin llegar desarticular la flor: 1) empujan con la cabeza la base del vexilo (que tapa la entrada al néctar) y como consecuencia, éste se retrae, permitiendo el ingreso de la proboscis, y 2) aplican fuerzas sobre el ala izquierda (considerables a juzgar por las cicatrices de las patas en el pétalo, ver Fig. 6), que trae como consecuencia el descenso de dicha ala. Dado que el ala se halla fusionada a la quilla, ésta también se mueve, mientras que androceo y gineceo mantienen su ubicación en el espacio floral. El movimiento relativo resultante lleva a que el estigma y el cepillo estilar (ver Fig. 7B) se proyecten lentamente hacia afuera a través del orificio distal de la quilla. Este movimiento es facilitado por la lubricación interna de la quilla por medio de lípidos, que se observan como pequeñas gotas de color amarillo sobre la epidermis (reacción positiva con Sudán IV). El estigma y el estilo, cargado de polen, contactan la parte superior derecha del pronoto del insecto. De esa manera el estigma recibe polen depositado previamente por otras flores a la vez que el polen de la flor visitada es depositado en el mismo sitio. Cuando el insecto se retira, las partes florales vuelven rápidamente a

su posición original, excepto el estilo, que demora 1-20 minutos en recorrer las vueltas de la quilla. La parte distal del androceo, no se proyecta hacia afuera durante las visitas, dada la flexibilidad de la parte distal de los filamentos, se retrae y queda dentro de la quilla. El mecanismo de polinización puede ser activado varias veces.

En el presente estudio se encontraron diferencias en los movimientos del estilo durante las visitas: mientras Lindman (*op. cit.*) observó que el estilo abrazaba al insecto y el cepillo estilar contactaba al insecto en el dorso, en el presente estudio se observó que el estilo nunca rodeaba al insecto sino que se movía por encima del pronoto. En ambos casos la polinización se encuadra en el tipo nototribo. Este tipo de polinización fue también observada en otras especies de *Vigna*, como *V. vexillata* (Hedstrom y Thulin 1986) y *V. longifolia* (Hoc *et al.* 1993). Algunos autores sugirieron que la mayoría de las especies de *Vigna*, las cuales presentan flores simétricas y un corto pico de la quilla, aparentemente tienen polinización esternotribo, aunque muy pocos casos se hallan documentados, *e.g.*, *V. unguiculata* (Lindman 1902) y *V. luteola* (Agulló *et al.* 1993). Una excepción es *V. minima*, la que presenta una quilla espiralizada, pero la polinización es esternotribo (Gopinathan y Babu 1987).

Biomecánica floral

Experimentalmente se midió la fuerza requerida para producir la apertura floral en el centro de presión y ésta resultó de $0,053 \pm 0,006$ N (Newton). Tomando en consideración la distancia de $14,6 \pm 0,3$ mm (brazo de palanca) desde el centro de presión (punto de aplicación de la fuerza en ala izquierda) hasta el centro de rotación (punto de adnación ala-quilla), resultó un momento de rotación de $7,3 \pm 1,03 \times 10^{-4}$ N m (Newton x metro). Los pesos de las abejas fueron: *B. morio* obrera: $3,8 \times 10^{-3}$ N; *X. eximia*: $7,7 \times 10^{-3}$ N, con lo cual se concluye que el peso de las abejas no

resulta suficiente para operar el mecanismo de polinización de *V. caracalla*. La fuerza necesaria es 13 veces mayor que el peso de *B. morio* y 7 veces mayor que el peso de *X. eximia*. Estos insectos son capaces de desarrollar la fuerza requerida, pero no así *A. mellifera* o las especies de Lepidopteros.

El único trabajo que analiza estos aspectos fue realizado por Westerkamp (1993) en *Lathyrus latifolius*, cuya flor mide aproximadamente la mitad en comparación con *V. caracalla*, i.e., 22 mm. El valor del momento de rotación en *L. latifolius* (7×10^{-4} N m) resultó muy cercano al encontrado en *V. caracalla*, pero dado que el brazo de palanca es menor (7 mm), la fuerza requerida para acceder al néctar resultó el doble (0,1 N).

3.3. Sistema reproductivo

3.3.1. Proporciones Polen/ovulos, número de granos de polen por antera, número de óvulos por ovario.

En primer lugar se consideran las variables que integran la relación P/O, por separado para analizar la incidencia individual en dicha relación (Tablas 18 y 19). Del resultado obtenido, se observa que el número de granos de polen por flor presenta mayor variación que el número de óvulos, esto último estaría relacionado con el mayor costo energético en la producción de óvulos con respecto a la producción de polen. Analizando la producción de polen por flor, las cinco poblaciones son diferentes en cuanto a ésta variable ($F= 22.42$, g.l. = 4, 45; $P=0.000$). En las poblaciones de menor altura se observa una mayor producción de polen, indicando selección hacia altas probabilidades de cruzamiento, comparado

con la población de mayor altura, resultados que coinciden con los reportados por Búrquez (1979) para *Phaseolus coccineus*. El análisis de correlación entre el número de granos de polen y la altitud resultó significativa ($r= -0,94$, $P= 0,015$). En cuanto a número de óvulos por ovario, las cinco poblaciones son diferentes ($H= 11,40$; g.l. = 4; $P=0,018$). La producción de óvulos en La Caldera y en Calilegua son mayores, en Vaqueros se registra el menor valor, presentando Betania y Quijano valores intermedios

Las cinco poblaciones son diferentes en cuanto al índice P/O ($F= 21,93$; g.l. = 4, 45; $P=0,000$). Según el test de Tuckey, el P/O de Campo Quijano (población de mayor altura) es menor con respecto a las otras poblaciones, mientras que Calilegua, Betania y Vaqueros presentan los mayores valores. que resultarían estadísticamente similares. El análisis de correlación muestra que la relación P/O y la altitud es inversa y significativa ($r= -0,94$, $P= 0,015$).

Tabla 18. Número promedio de granos de polen por antera, número de granos de polen por flor, número de óvulos por ovario y proporciones P/O para las poblaciones estudiadas. $N= 10$, excepto C. Quijano $N=11$. Entre paréntesis, error estándar.

Población	C. Quijano (1570 m)	La Caldera (1400 m)	Vaqueros (1240 m)	Betania (980 m)	Calilegua (700 m)
Granos de polen por antera	910 (138) ^a	1810 (183) ^b	1905 (138) ^b	2831 (197) ^c	2906 (264) ^c
Granos de polen por flor	9100 (1382) ^a	18100 (1829) ^b	19050 (1383,33) ^b	28312 (1976) ^c	29062 (2643) ^c
Número de óvulos por ovario	16,7 (0,73) ^{ab}	18,02 (0,33) ^b	15,0 (0,86) ^a	17,1 (0,23) ^{ab}	17,9 (0,38) ^{ab}
Polen/Ovulos	532,72 (7033) ^a	1000,86 (104,34) ^b	1296,42 (106,52) ^{bc}	1661 (119,99) ^c	1625,05 (145,37) ^c

Ref.: Los supraíndices indican diferencias significativas entre poblaciones, $P < 0.005$.

Tabla 19. Número de óvulos, número de granos de polen por flor y razón P/O para todas las poblaciones de *V. caracalla* de Salta y Jujuy. (N = 50).

	Número de óvulos	Granos de polen por flor	P/O
Promedio	16,98	20,752	1.223,24
Error Estándar	0,29	1,331	76,91
Coefficiente de Variación	0,12	0,45	0,44

Del análisis de los índices P/O de dichas tablas se desprende que el sistema reproductivo estimado según el indicador de Cruden (1977) es la xenogamia facultativa para todas las poblaciones, dado que los valores obtenidos se encuentran dentro del rango establecido por dicho autor (244-2.588). Este sistema reproductivo es característico, según Cruden (*op. cit.*) de estadíos sucesionales tardíos, en los cuales la actividad de polinizadores es impredecible o inestable, debido a cambios estacionales que incluyen el cerramiento de la canopia o condiciones climáticas que excluyen o restringen la actividad de polinizadores. Por ejemplo, una planta que florece en épocas de lluvia pertenecería a esta categoría dado que las lluvias disminuyen la actividad de polinizadores, lo que traería aparejada una disminución en la fecundidad (Cruden 1972). En todas las poblaciones estudiadas se observó que la floración ocurre de fines de enero a mediados de marzo, época que coincide con la estación de lluvias, y además, todas ellas se encontraban en estadíos sucesionales tardíos.

Se observa que la población de mayor altitud (Campo Quijano) se segrega con respecto a granos de polen por antera, lo cual sugeriría diferencias genéticas respecto de las otras poblaciones. Resultados similares fueron observados por Búrquez (1979) en *Phaseolus coccineus*.

Charnov (1982) y Lloyd (1987) hipotetizaron que el destino de recursos a la formación de polen en plantas con flores monoclinas se reduce cuando aumenta el nivel de autocompatibilidad. Varios trabajos refuerzan dicha hipótesis, entre ellos los

de Morgan y Barrett (1989) e Inoue *et al.* (1996). Los resultados del presente trabajo presentan una tendencia en el mismo sentido (ver más adelante).

3.3.2. Ensayos de reproducción a campo

Esta parte del trabajo no se pudo realizar en Calilegua debido a la gran altitud en la que se encontraban las flores (10 m, ver fotografía), lo cual impidió la manipulación necesaria para realizar los tratamientos de polinización.

Los resultados de los ensayos de sistema reproductivo a campo están detalladas en la Tabla 20. Según los resultados obtenidos, se descarta la probabilidad de apomixis. Autopolinización automática sólo ocurrió en Campo Quijano. Los tres tratamientos restantes difirieron estadísticamente en cada una de las poblaciones (C. Quijano $x^2=7,64$, g.l.=2, $P=0,02$; La Caldera $x^2=13,13$; g.l.=2, $P=0,001$; Vaqueros $x^2=20,17$, g.l.=2, $P=0,000$; Betania $x^2=20,70$, g.l.=2, $P=0,000$).

En todas las poblaciones estudiadas, se observó la ocurrencia de autocompatibilidad, es decir se produjeron frutos como resultado de la autopolinización. Si bien, para que esto ocurra el estigma debe ser rozado para que de esta manera se produzca la ruptura de la membrana estigmática. Sin embargo, en la población de mayor altura, se observa un porcentaje de frutos provenientes de autopolinización automática (2,86 %). Además, en esta población se observó la menor separación entre estigma y anteras y la menor longitud de tricomas periestigmáticos y estilares, lo cual facilitaría el acceso del polen al estigma de la misma flor. Se realizaron observaciones similares en un estudio comparativo de once líneas de *Vicia faba* (Kambal *et al.* 1976) y se encontró que las líneas

autofértiles poseían un estilo más corto, y tricomas reducidos en el estilo, con respecto a las líneas autoestériles.

Tabla 20. Resultados de las experiencias de sistema reproductivo en las cuatro poblaciones de *V. caracalla* en Salta. Los valores obtenidos se refieren al porcentaje de frutos obtenidos con respecto a las flores tratadas, este último valor se halla entre paréntesis.

Tratamiento	C. Quijano	La Caldera	Vaqueros	Betania	χ^2
Autopolinización automática	2,86 (89)	0 (97)	0 (110)	0 (77)	
Autopolinización manual	26,66 (30)	20 (30)	13 (61)	15,4 (39)	11,43; g.l.=3; P=0,010
Apomixis	0 (30)	0 (38)	0 (32)	0 (31)	
Polinización libre	7,8 (77)	14,3 (49)	9,5 (63)	13,2 (83)	1,91; g.l.=3; P=0,59
Polinización cruzada manual	22,58 (31)	50 (30)	51 (35)	48 (35)	22,68; g.l.=3; P=0,00

Sin embargo, para que ocurra autopolinización automática, polen y estigma deben estar en contacto y coincidir en el tiempo de maduración (homogamia). Como se dijo, el día previo a la antesis ya se observan todas las anteras dehiscentes y el estigma está maduro, dado que presenta abundante secreción bajo la membrana cuticular. En la literatura se conocen algunos casos de leguminosas con membrana, donde se produce la ruptura espontáneamente, liberando la secreción estigmática y permitiendo de esa forma la hidratación y germinación de los granos de polen, e.g., *Vicia faba* (Lord y Heslop Harrison 1984) y *Medicago scutellata* (Kreiger y Sorensen 1985). Esta característica está relacionada con una disminución en el grosor de la membrana, y también, en alguna medida, con el contenido de agua de la planta: en condiciones de alta humedad, la secreción estigmática aumentaría y con ello se produciría la ruptura de dicha membrana. Según los datos climáticos C. Quijano presenta abundantes precipitaciones (ca. de 900 mm), con lo cual sería posible la ruptura espontánea de la membrana. En síntesis, en la población de mayor altura,

resultaría ventajoso presentar mecanismos de reaseguro reproductivo para la producción de semillas (Cruden y Lyon 1979), dado que presenta la menor diversidad de polinizadores y el menor éxito reproductivo.

A continuación se realizará el análisis en cada población para responder a la pregunta ¿existe limitación en el nivel de fructificación debido a un déficit en la actividad de los vectores que transfieren el polen al estigma?, para lo cual se comparan los porcentajes de fructificación obtenidos en los tratamientos polinización cruzada manual vs. polinización libre. Se observa en Tabla 21 que en todas las poblaciones existe limitación por polinizadores en condiciones naturales.

Tabla 21. Resultados de las comparaciones de tratamientos de polinización en cuatro poblaciones de *V. caracalla* (pruebas χ^2).

Población (msnm)	Polinización cruzada manual	Polinización cruzada vs.
	vs. Polinización libre	Autopolinización manual
Campo Quijano (1570)	4,56; g.l. = 1, $P = 0.03^*$	0,14; g.l. = 1, $P = 0.72$
La Caldera (1400)	14,4; g.l. = 1, $P = 0.00^*$	5,93; g.l. = 1, $P = 0.015^*$
Vaqueros (1240)	19,04; g.l. = 1, $P = 0.00^*$	14,19; g.l. = 1, $P = 0.00^*$
Betania (980)	16,79; g.l. = 1, $P = 0.00^*$	9,60; g.l. = 1, $P = 0.002^*$

*existen diferencias significativas al nivel $P < 0.05$

Otra pregunta es ¿hay diferencias en el nivel de fructificación entre el polen propio vs. el polen alógamo? Para responder a dicha pregunta se compara en cada población los resultados obtenidos en autopolinización manual vs. polinización cruzada. Se observa que en todas las poblaciones existen diferencias significativas, es decir el polen alógamo tiene mayor capacidad fecundante que el propio, excepto en Quijano, donde no hay diferencias significativas entre ambos tipos de polinizaciones (ver Tabla 21). Comparando los niveles de autocompatibilidad (ver

Tabla 22), se observa que Campo Quijano presenta el mayor valor, si bien los valores de todas las poblaciones se encuentran dentro de la categoría de Autocompatibilidad ($> 0,2$; Bawa 1974, Zapata y Arroyo 1978). Este resultado, sumado a las características florales relacionadas con la autogamia, incluyendo el bajo valor de P/O, se podrían interpretar como adaptaciones a la menor diversidad de polinizadores observada en dicha población y como resultado general, que la autogamia sería favorecida sobre la xenogamia.

Tabla 22. Índices de autocompatibilidad en cuatro poblaciones de *V. caracalla*.

Población (msnm)	Índice de autocompatibilidad	Nivel de autocompatibilidad
Campo Quijano (1570)	1.18	Autocompatible
La Caldera (1400)	0.4	Autocompatible
Vaqueros (1240)	0.26	Autocompatible
Betania (980)	0.32	Autocompatible

*Existen diferencias significativas al nivel $P < 0.05$

3.3.3. Exito reproductivo.

La producción de flores por inflorescencia, de frutos por inflorescencia, y la relación frutos formados en condiciones naturales con respecto a flores iniciales se describen en la Tabla 23. El número de flores por inflorescencia resultó significativamente diferente en todas las poblaciones ($F=14,65$; g.l.= 4, 147, $P=0,00$), siendo mayor en Betania (980 m) que en el resto de las poblaciones. En tanto que la producción de frutos por inflorescencia, también fue diferente ($H= 30,50$;

g.l.=4, $P<0.000$), resultando en Betania la mayor producción y en C. Quijano (1570 m) la menor producción.

Con respecto a la relación frutos obtenidos/flores iniciales, los valores obtenidos en La Caldera y Betania fueron mayores con respecto a Quijano mientras que en Vaqueros y en Calilegua se presentan valores intermedios.

Tabla 23. Número promedio de flores por inflorescencia, producción de frutos en condiciones naturales, relación fruto/flor (número de frutos/ número de flores x 100) en cinco poblaciones de *V. caracalla*.

Población (N)	Flores/Inflorescencia	Frutos/inflorescencia	Frutos obtenidos/flores iniciales
C. Quijano (44)	20,04 ± 0,93 ^a	1,52 ± 0,13 ^a	0,084 ± 0,008 ^a
La Caldera (32)	17,03 ± 1,39 ^a	2,12 ± 0,23 ^b	0,145 ± 0,017 ^b
Vaqueros (25)	15,9 ± 1,05 ^a	1,48 ± 0,13 ^{ab}	0,099 ± 0,010 ^{ab}
Betania (25)	29,87 ± 1,85 ^b	3,62 ± 0,33 ^c	0,136 ± 0,017 ^b
Calilegua (25)	20,75 ± 1,42 ^a	1,75 ± 0,14 ^{ab}	0,097 ± 0,011 ^{ab}
Total (151)			0,11 ± 0,006
CV			0,66

Letras diferentes indican diferencias significativas $P<0,05$

Cuando se analiza la producción de semillas por fruto y el índice de fertilización (Tabla 24), Betania y Quijano presentan el menor valor con respecto a las demás poblaciones.

El éxito reproductivo preemergente (ERP) fue obtenido en las cinco poblaciones separadamente y se calculó su valor en conjunto. En el primer caso se observaron diferencias significativas entre las mismas ($H= 22,16$; g.l.= 4, $P= 0.00$), resultando el menor valor de ERP el correspondiente a la población de mayor altura. No se encontró un patrón altitudinal en el ERP (ERP vs. altitud, $r^2 = 0,007$; $P = 0.89$, $b = - 0,001$). Cuando se considera el valor general de ERP (9,6 %), se observa que es mucho menor que el valor reportado por Wiens *et al.* (1984) para especies perennes herbáceas, xenógamas (22%), lo cual estaría relacionado con la limitación por polinizadores observada en la sección de Sistema Reproductivo. Las mismas

pueden ser resultado de visitas insuficientes o que las visitas proveen polen en baja cantidad y/o calidad genética o polen heteroespecífico. Otras Papilionoideas también mostraron limitación por polinizadores, e.g., *Lupinus nanus* (Karoly 1992).

Comparando el cociente Fruto/Flor de todas las poblaciones de *V. caracalla* (11%) con el valor promedio para plantas hermafroditas y autocompatibles reportado por Sutherland y Delph (1984) en su estudio de 445 especies de Angiospermas, el cual fue de 72,5 %, la diferencia es aun mayor. Si circunscribimos la comparación a otras Papilionoideae, la diferencia no es tan marcada, (e.g., *Lupinus nanus*: 22%, Karoly 1992; *L. argenteus*: 17,1%, Wiens et al. 1987).

Tabla 24. Número de semillas por fruto, índice de fertilización (semillas por fruto/ óvulos por fruto) y éxito reproductivo pre-emergente (ERP) en cinco poblaciones de *V. caracalla* de Salta y Jujuy.

Población (N)	Semillas/Fruto	Índice de fertilización	ERP
		(Semillas/óvulos)	(Fruto/Flor x Semilla/Ovulo)
C. Quijano (44)	13,35 ± 0,56 ^a	0,73 ± 0,03 ^a	0,06 ± 0,01 ^a
La Caldera (32)	15,19 ± 0,47 ^b	0,83 ± 0,02 ^b	0,13 ± 0,02 ^b
Vaqueros (25)	15,10 ± 0,53 ^b	0,94 ± 0,03 ^c	0,09 ± 0,01 ^b
Betania (25)	12,92 ± 0,39 ^a	0,73 ± 0,02 ^a	0,10 ± 0,01 ^b
Calilegua (25)	15,70 ± 0,43 ^b	0,89 ± 0,02 ^{bc}	0,09 ± 0,01 ^b
Total (151)		0,82 ± 0,011	0,096 ± 0,007
CV		0,16	0,87

Varias hipótesis, las cuales no son mutuamente excluyentes, se han propuesto para explicar este “exceso” en la producción de flores:

- i) mayor atracción de polinizadores, debido al mayor despliegue floral, la cual mejoraría la tasa de fertilización (Schemske 1980);

- ii) aborto selectivo de frutos de “baja” calidad genética (Stephenson y Winsor 1986);
- iii) función masculina, (si bien las flores son perfectas, actuarían como donantes de polen) (Bertin 1988);
- iv) aprovechamiento de condiciones favorables inesperadas en términos de disponibilidad de recursos (Stephenson 1981);
- v) reserva suplementaria de ovarios en casos de alta mortalidad (Ehrlén 1991);

Si bien ninguna de estas hipótesis fue probada en el presente estudio, los resultados obtenidos podrían proveer algún soporte para considerar algunas de ellas como responsables de la baja producción de frutos en *V. caracalla*.

Al analizar el funcionamiento de la flor de *V. caracalla* se observó que el polen es presentado a los polinizadores en dosis en los tricomas del estilo. Debido a esta causa se podría pensar que la selección natural podría incrementar el número de flores en función de la exportación de polen (función masculina).

Dado que existe limitación por polinizadores, se podría afirmar que la hipótesis de atracción también jugaría un papel importante.

Dado que la mayor parte de las visitas son efectuadas por *B. morio*, el cual sería un polinizador menos eficiente con respecto a *X. eximia*. Es probable que ocurra aborto selectivo de los frutos de baja calidad genética, que guarden relación con las visitas del primer polinizador.

Otra explicación probable para la producción de flores “extra” sería la de Ehrlén (1991), quien postula que ese exceso de flores constituiría una reserva de ovarios en el caso de mortalidad imprevisible de flores. En *C. Quijano* se observó la ocurrencia de predación de flores; este hecho podría dar soporte a esta hipótesis.

El valor promedio de S/O para todas las poblaciones (82%), resulta mayor que el reportado por Wiens *et al.* (1984) (52%) para plantas herbáceas, perennes y de reproducción cruzada. Si se compara con otras Papilionoideae, también es mayor, *e.g.*, *Lupinus nanus* (37%, Karoly 1992) o *L. argenteus* (49.6 %, Wiens *et al.* 1984). Este hecho indica que las abejas estarían depositando suficiente polen en los estigmas para fertilizar la mayoría de los óvulos. De acuerdo con Ornduff (1970), la deposición de suficiente polen en el estigma para fertilizar la mayoría de los óvulos puede ser interpretado como una medida de efectividad del sistema de polinización.

4. CONCLUSIONES

1. En general, la morfología de la flor, el gremio de visitantes florales y el mecanismo floral de polinización de *Vigna caracalla* son similares en las cinco poblaciones de Salta y Jujuy independientemente del gradiente altitudinal estudiado:

- a) En todas las poblaciones estudiadas se observó una especialización de la flor, tanto fenotípica como ecológica (*sensu* Ollerton 2005) hacia un grupo de grandes Himenópteros.
- b) El sistema reproductivo de *V. caracalla* es mixto, dado que produce frutos por autopolinización y polinización cruzada, pero depende obligadamente de polinizadores debido a la presencia de “membrana estigmática”.
- c) El mecanismo floral de polinización es activado por abejorros quienes son capaces de desarrollar una fuerza mínima de 0,053 N para operar esta elaborada construcción. En *V. vexillata*, *V. longifolia* y *V. luteola* también se observaron grandes Himenópteros, lo cual refuerza la hipótesis de que solo insectos de gran tamaño polinizan las flores asimétricas (Endress 1999, 2001). Varias características de *V. caracalla* están relacionadas con polinizadores de

gran tamaño, e.g., el grosor y forma de los sépalos y los pétalos, conexiones entre diferentes partes de la flor (alas y quilla; vexilo y androceo), esculturaciones de las alas y una mecánica floral que exige del desarrollo de fuerzas considerables para acceder al néctar.

2. Las revoluciones de la quilla presentaron variabilidad dentro y entre poblaciones, pero dicha variabilidad no afectó la capacidad de las flores de ser fecundadas y producir semillas. Lackey (1983) también encontró variabilidad este carácter en varias especies de *Phaseolus* (e.g.: 2,75-2,9 revoluciones en *P. ambylosepalus*, *P. galactioides*, *P. xanthotrichos* y *P. nelsonii*)

3. *Vigna caracalla* presentó ciertos caracteres florales típicos de las Papilionoideae (Lavin y Delgado 1990). Entre ellas se pueden mencionar el cepillo estilar, la asimetría de las flores, los pétalos rostrados de la quilla que están unidos en toda su extensión excepto en el ápice, los estilos engrosados distalmente (entasis) y las aberturas basales (fenestra) en el tubo estaminal. Todos estos caracteres fueron encontrados en *V. caracalla*. Lavin y Delgado (1990) remarcan la importancia de la identificación de dichos caracteres, dado que pueden ser utilizados como marcadores filogenéticos, y pueden ayudar a una mejor comprensión de los síndromes de polinización en Papilionoideas.

4. De acuerdo a la localización del nectario y la duración media de las visitas observadas, *V. caracalla* resultaría una flor compleja *sensu* Laverty (1994). Las ventajas que promoverían la evolución de flores complejas estarían relacionadas con los siguientes aspectos: 1) la mayor duración de visitas incrementan la deposición y exportación de polen (Harder 1990); 2) la mayor duración de visitas reduce la geitonogamia (Ohashi 2002); 3) las flores complejas excluyen a polinizadores ineficientes y ladrones de néctar (Thomson *et al.* 2000); 4) la complejidad floral

puede promover la constancia floral de los polinizadores (Lavery 1994). Si bien no se investigaron estos aspectos en forma directa, se podría decir que la primera hipótesis tendría sustento en el caso de *V. caracalla*, dado el alto índice de fertilización (razón semillas/óvulos) observado. Otro conjunto de evidencias muestran que las flores complejas producen mayor cantidad de néctar (Harder 1988, Harder y Cruzan 1990), lo cual está relacionado con el hecho de que poblaciones con este tipo de flores pueden estar sujetas a limitación por polinizadores, como es el caso de *V. caracalla*. Kunin e Iwasa (1996) hipotetizaron que si el éxito reproductivo está limitado por disponibilidad de polinizadores, las plantas con flores complejas incrementarán la recompensa. Como se detalla en el capítulo referido a néctar, *V. caracalla* presenta una alta producción, que la ubica por encima del rango informado por Cruden *et al.* (1983) para plantas polinizadas por Himenópteros.

5. En cuanto a la relación entre la altitud y las características reproductivas de *V. caracalla*, se remarca la relación inversa entre producción de polen y relación P/O con la altitud, *i.e.*, las flores presentan menor producción de polen y menor razón P/O a medida que aumenta la altitud, lo que sugiere una tendencia hacia un sistema reproductivo autógeno. Esto se respalda con los resultados encontrados en C. Quijano. En dicha localidad, se observó el mayor nivel de autocompatibilidad, la menor distancia anteras-estigma, la ocurrencia de autopolinización automática aunque en una baja proporción, el menor número de especies polinizadoras, y el menor éxito reproductivo (tanto en la relación fruto/flor, como en semilla/óvulo). *Bombus morio* (obreras) fue la única especie presente en dicha población. Si bien la frecuencia de visitas del mismo fue elevada, el éxito reproductivo fue el más bajo del gradiente, lo cual indicaría una baja eficiencia de polinización con respecto a las otras especies polinizadoras encontradas a menor altitud. Por todo lo expuesto, en la

citada población estaría ocurriendo una transición hacia la autogamia. La transición de xenogamia a autogamia es una de las tendencias evolutivas más comunes (Stebbins 1970, Wyatt 1986). Un factor significativo que contribuye a esta tendencia es la selección natural hacia el reaseguro reproductivo (Jain 1976, Lloyd, 1979, 1992). De acuerdo a esta hipótesis, la selección favorecerá el incremento de autopolinización en situaciones en que el servicio de polinizadores limite la reproducción (Baker 1955, Schoen *et al.* 1996).

Los resultados de este trabajo refuerzan la importancia de los estudios multipoblacionales dentro de un marco de variaciones geográficas y temporales para un mejor entendimiento de la ecología y evolución de los sistemas reproductivos en plantas.

Perspectivas futuras

El presente estudio tuvo como objetivo general describir la biología de la reproducción de *Vigna caracalla* en un contexto geográfico. Desde esta visión panorámica se vislumbran puntos interesantes que me llevan a plantear investigaciones futuras desde la experimentación, que sin dudas, es el método lógicamente correcto para investigar causas. Los estudios comparativos son equivalentes a experimentos, dado que las diferentes poblaciones han sido “manipuladas” por los distintos ambientes. Sin embargo, surgen preguntas focales que requieren de manipulación artificial para llegar a respuestas concluyentes. Por ejemplo, en el futuro sería imperativo analizar: a) el efecto de la complejidad floral removiendo la quilla y observando el comportamiento de los polinizadores; b) el efecto de la competencia por polinizadores con otras especies en parcelas experimentales (puras y mixtas); c) la influencia de la variación de los caracteres

florales en el éxito reproductivo paterno, entre otros; d) las tasas de cruzamiento a lo largo del mismo gradiente altitudinal, así como la adecuación (“fitness”) asociada a semillas producidas por xenogamia versus autogamia.

Referencias

- Agulló M.A., Brizuela M.M., Hoc. P., Di Stilio V., Palacios R., Genise J., Hazeldine P. 1993. Relación unidad de polinización-visistantes florales en *Vigna luteola* (Leguminosae, Phaseoleae). Bol. Soc. Argent. Bot. 29: 131-138.
- Arroyo M.T.K. 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. Pags. 723-769. En R.M. Polhill and P.H. Raven (eds), Advances in Legume Systematics, Part 2. Royal Botanic Garden, Kew.
- Arroyo M.T.K. y Uslar P. 1993. Breeding systems in a temperate mediterranean-type climate montane esclerophyllous forest in Central Chile. Bot. J. of the Linn. Soc. 111: 83-102.
- Baker H. G. 1955. Self-compatibility and establishment after “long-distance” dispersal. Evolution 9: 347-348.
- Baker H.G. 1959. Reproductive methods as factors in speciation in flowering plants. Quant. Biol. 24: 177-191.
- Barrett S.C.H., Eckert C. G. 1990. Variation and evolution of mating systems in seed plants. Pags: 229-254. En: Kawano S. (ed.): Biological approaches and evolutionary trends in plants. Academic Press.
- Barrett S.C.H., Harder L. D. 1996. Ecology and evolution of plant mating. Trends Ecol. Evol. 11: 73-79.
- Bawa K. 1974. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. Evolution 28: 85-92.
- Bawa K., Beach J. 1981. Evolution of sexual systems in flowerin plants. Ann. Missouri Bot. Gard. 68: 254-274.
- Bernardello L. , Galetto L., Rodríguez I. 1994. Reproductive biology, variability of nectar features and pollination of *Combretum fruticosum* (Combretaceae) in Argentina. Bot. J. Linn. Soc. 114: 293-308.
- Berg R. 1960. The ecological significance of correlation pleiades. Evolution 14: 171-180.
- Bertin R. I. 1988. Paternity in plants. Pags. 30-59. En: Lovett Doust J. y Lovett Doust L. (eds.): Plant reproductive Ecology. Oxford University Press, New York. New York, U.S.A.

- Bertin R. I., Newman C.M. 1993. Dichogamy in Angiosperms. *Bot. Rev.* 59: 112-152.
- Bertsch A. 1983. Nectar production of *Epilobium angustifolium* at different air humidities; nectar sugar in individual flowers and the optimal foraging theory. *Oecologia*: 59: 40-48.
- Bolten A.B, Feisinger P, Baker H., Baker I. 1979. On the calculation of sugar concentration in flower nectar. *Oecologia*: 41: 301-304.
- Burkart A. 1943. Las leguminosas argentinas silvestres y cultivadas. 1ra. edic. Acme Agency. Buenos Aires.
- Búrquez J.A: 1979. Biología floral de poblaciones silvestres y cultivadas de *Phaseolus coccineus* L. Tesis para obtener el título de Biólogo. Universidad Autónoma de México.
- Búrquez J.A. y Corbet S. 1991. Do flowers reabsorb nectar?. *Func. Ecol.* 5: 369-379.
- Búrquez J.A. y Sarukhán, J. 1984. Biología floral de poblaciones silvestres y cultivadas de *Phaseolus coccineus* L. II Sistemas reproductivos. *Bol. Soc. Bot. México* 46: 3-12
- Brizuela, M. M., Hoc, P. S., Di Stilio, V. S., Agullo, M. A., Palacios, R. A. 1993. Biología floral de *Macroptilium bracteatum* (Leguminosae, Phaseoleae). *Darwiniana* 32: 41 – 57.
- Brown A. 1990. Genetic characterization of plant mating systems. Pags. 145-162. En: Brown A., Clegg M. Kahler A, Weir B. (eds.): *Plant population genetics, breeding and genetic resources*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Cabrera A. 1976. Fitogeografía de la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. Vol. XIV, N° 1-2.
- Campbell D. 1985. Pollinator sharing and seed set of *Stellaria pubera*: competition for pollination. *Ecology* 66: 544-553.
- Campbell D. 1991. Effects of floral traits on sequential components of fitness in *Ipomopsis aggregata*. *American Naturalist* 137: 713-737.
- Campbell D., Motten A.F. 1985. The mechanism of the competition for pollination between two forest herbs. *Ecology* 66: 554-563.
- Campbell D., Waser N., Price M., Lynch E. Mitchell R. 1991. Components of phenotypic selection: pollen export and flower corolla width in *Ipomopsis aggregata*. *Evolution* 45: 1458-1467.
- Castro M. A., Agulló M. A. 1998. Anatomy of the stigma of *Vigna adenantha* (G.F. Meyer) Marechal, Mascherpa y Stainer (Leguminosae, Papilionoideae). *Biocell* 22: 9-18.
- Charnov E. 1982. *The theory of sex allocation*. Princeton Univ. Press, Princeton, N.J., USA.
- Cruden R. W. 1972. Pollinators in high elevation ecosystems: The relative effectiveness of birds and bees. *Science* 176: 1349-1440.

- Cruden R.W. 1976. Intraespecific variation in pollen-ovule ratios and nectar secretion: preliminary evidence of ecotypic adaptation. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 63: 277-289.
- Cruden R. W. 1977. Pollen-Ovule ratio: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31:32-46
- Cruden R., Hermann S., Peterson S. 1983. Patterns of nectar production and plant-pollinator coevolution. En : B. Bentley y J. Elias, *Biologie of Nectaries*. Columbia University Press.
- Cruden, R. W., Lyon D. L. 1989. Facultative xenogamy: Examination of a mixed mating system. In Bock J. H., Linhart Y. B. (eds.) *The evolutionary ecology of plants*. Westview Press, Boulder, Colorado, pp. 171–207.
- Dafni A., Giurfa M. 1999. The functional ecology of floral guides in relation to insect behaviour and vision. Pags. 1-22. En: S. P. Wasser (ed.): *Evolutionary theory and processes: Modern perspectives*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Delpino F. 1868/9. Ulteriori osservazioni e considerazioni sulla dicogamia nel regno vegetale. 1. *Atti Soc. Ital. Sci. Nat. Milano* 11: 265-332.
- Diggle P. 1992. Development and evolution of plant reproductive characters. Pags. 326-355. En: Wyatt R. (ed.): *Ecology and evolution of plant reproduction*. Chapman y Hall, New York.
- Dole J.A: 1992. Reproductive assurance mechanisms in three taxa of the *Mimulus guttatus* complex (Scrophulariaceae). *Am. J. Bot.* 79: 650-659.
- Drewes S.I., Hoc P.S. 2000. Morfología y desarrollo de flores cleistógamas en *Macroptilium fraternum* (Fabaceae). *Kurtziana* 28: 229-238.
- Ehrlen J. 1991. Why plants produce surplus flowers? A reserve-ovary model. *Am. Nat.* 138: 918- 933.
- Escalante A.M., Coello G., Eguiarte L., Piñeiro D. 1994. Genetic structure and mating systems in wild and cultivated populations of *Phaseolus coccineus* and *P. vulgaris*. *Am. J. Bot.* 81: 1096-1103.
- Etcheverry A.V. 2001a. Wing morphology in the flower of some American species of *Crotalaria* (Fabaceae: Papilionoideae). *Beitr. Biol. Pflanz.* 72: 215-228.
- Etcheverry A.V. 2001b. Role of staminal growth in delayed self-pollination of *Crotalaria stipularia* (Fabaceae: Papilionoideae). *Beitr. Biol. Pflanz.* 72:155-160.
- Etcheverry A.V., Protmastro J., Westerkamp C. 2003. Delayed self-pollination in the colonizer *Crotalaria micans* (Fabaceae: Papilionoideae). *Plant Syst. and Evol.* 239: 15-28.
- Etcheverry, A. V., Pérez de Bianchi, S. M., Martín Montiel de López, D. 1998. Fenología floral de *Macroptilium lathyroides* (L.) Urban (Fabaceae) y características reproductivas. *Aportes Botánicos de Salta. Ser. Misceláneas*. Herbario MCNS. Facultad de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Salta. Argentina. 1: 7 .
- Etcheverry, A. V., Pérez de Bianchi, S. M., Martín Montiel de López, D. 1999. Floral biology of *Macroptilium erythroloma* (L.) Urban (Fabaceae). *Beitr. Biol. Pflanz.* 71: 403-418.

- Etcheverry, A. V., Pérez de Bianchi, S. M., Martín Montiel de López, D. 2001. Reproductive biology in the amphicarpic legume *Macropitillium panduratum* (Fabaceae, Papilionoideae). *Beitr. Biol. Pflanz.* 72:181-197.
- Einsiedel B. 1976. Vergleichende Morphologieder asymmetrischen Schmetterlingsblüten. Tesis de maestría, Universidad de Berlín, Alemania.
- Endress P. K. 1999. Symmetry in flowers: diversity and evolution. *Int. J. Plant Sci.* 160: S3-S23.
- Endress P. K. 2001. Evolution of floral symmetry. *Current opinion in Plant Biology* 4: 86-91.
- Faegri K. and L. van der Pijl. 1971. The principles of pollination ecology. 2nd. edition. Pergamon Press, Oxford, England.
- Faegri K., van der Pijl L. 1979. The principles of pollination ecology. 3rd. edition. Pergamon Press, Oxford, England.
- Fausto J.A., Eckhart V., Gebber M.A. 2001. Reproductive assurance and the evolutionary ecology of self-pollination in *Clarkia xantiana* (Onagraceae). *Am. J. Bot.* 88: 1794-1800.
- Feinsinger P. 1978. Ecological interactions between plants and hummingbirds in a successional tropical community. *Ecological Monographs* 6:105-128.
- Feinsinger P. 1983 Coevolution and pollination. Pags. 282-310. En: Futuyma D. y Slatkin M. (eds.): *Coevolution*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Frankie W.G., Opler P., Bawa K. 1976. Foraging behaviour of solitary bees: Implications for outcrossing of a neotropical forest tree species. *J. Ecology* 64: 1049-1057.
- Free J. B. 1970. *Insect pollination of crops*. Academic Press, London.
- Futuyma D. 1986. *Evolutionary Biology*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Galen C. 1989. Measuring pollinator-mediated selection on morphometric floral traits: bumble bees and the alpine sky pilot, *Polemonium viscosum*: *Evolution* 43: 882-890.
- Galen C., Newport M. 1987. Bumble bee behaviour and selection on flower size in the sky pilot, *Polemonium viscosum*. *Oecologia* 74: 20-23.
- Galetto L., Bernardello G. 1992. Nectar secretion pattern and removal effects in six Argentinean Pitcairnioideae (Bromeliaceae). *Botanica Acta*: 105: 292-299.
- Galetto L., Bernardello L.M., Juliani H.R. 1994. Characteristics of secretion of nectar in *Pyrostegia venusta* (Ker-Gawl.) Miers (Bignoniaceae). *New Phytol.* 127: 465-471.
- Galetto, L., Bernardello G., Isele I.C., Vesprini J., Speroni G., Berduc A. 2000. Reproductive biology of *Erythrina crista-galli* (Fabaceae). *Ann. Missouri Bot. Gard.* 87: 127-145.

- Geegar Y., Lavery T. 1995. Effect of flower complexity on relearning flower-handling skills in bumble bees. *Can. J. Zool.* 73: 2052-2058.
- Gill F. B. 1988. Effects of nectar removal on nectar accumulation in flowers of *Heliconia imbricata* (Heliconiaceae). *Biotropica* 20: 169-171.
- Goodwillie 2001. Pollen limitation and the evolution of self-compatibility in *Linanthus* (Polemoniaceae). *Int. J. of Plant Sci.* 162: 1283-1292.
- Gopinathan M. C., Babu C. R. 1987. Breeding systems and pollination in *Vigna minima* (Leguminosae, Papilionoideae). *Plant Syst. Evol.* 156: 117-126.
- Gosh S., Shivanna K.R. 1982. Anatomical and cytochemical studies on the stigma and style in some legumes. *Bot. Gaz.* 143: 311-318.
- Gutián P, Gutián J., Navarro L. 1996. Fruit set, fruit reduction and fruiting strategy in *Cornus sanguina* (Cornaceae). *Am. J. Bot.* 83: 744—748.
- Gutián P, Navarro L., Gutián J. 1995. Efecto de la extracción en la producción de néctar en flores de *Melittis melisophyllum* (Labiatae). *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 52: 163-169.
- Gutián J, Navarro L., Gutián P., Sánchez J.M. 1997. Variation in floral morphology and reproductive success in *Petrocopis grandiflora* (Caryophyllacea). *Ann. Bot. Fennici* 34: 35-40
- Harder L. 1988. Choice of individual flowers by bumble bees: interaction of morphology, time and energy. *Behavior* 104: 60-77.
- Harder L. 1990. Pollen removal by bumble bees and its implications for pollen dispersal. *Ecology* 71: 1110-1125.
- Harder L, Cruzan M. 1990. An evaluation of the physiological and evolutionary influences of inflorescence size and flower depth on nectar production. *Func. Ecol.* 4: 559-572.
- Hancock C.N., Kondo K., Beecher B., McClure B. 2003. The S-locus and unilateral incompatibility. *Philos. Trans. R. Soc. Lon. B* 358: 1133-1140.
- Hedstrom I., Thulin M. 1986. Pollination by a hugging mechanism in *Vigna vexillata* (Leguminosae: Papilionoideae). *Pl. Syst. Evol.* 154: 275-283.
- Heinrich B. 1979. *Bumblebee economics*. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
- Herrera C.M. 1990. The adaptedness of the floral phenotype in a relic endemic hawkmoth-pollinated violet. 2. Patterns of variation among disjunct populations. *Biol. J. Linn. Soc.* 40: 275-291.
- Herrera C.M. 1993. Selection on floral morphology and environmental determinants of fecundity in a hawk-pollinated violet. *Ecol. Mon.* 63: 251-275.
- Heslop-Harrison J., Heslop-Harrison Y. 1983. Pollen-stigma interaction in the Leguminosae: The organization of the stigma of *Trifolium pratense*. *Ann. Bot.* 51 571-583.

- Heslop-Harrison J., Heslop-Harrison Y. 1984. Stigma organization and the control of fertilization in *Phaseolus*. Pags. 88-96. En: Reimann Philip R. (ed.): Proceedings of the Eucarpia meeting on *Phaseolus* bean breeding, Hamburg, July 1983.
- Hoc P., Di Stilio V., Agulló M., Brizuela M., Palacios R. 1993. Biología floral de *Vigna longifolia* (Legminosae, Phaseolae). *Darwiniana* 32: 27-39.
- Hoc P., Amela García M.T. 1998. Floral biology and reproductive system of *Phaseolus augusti* (Fabaceae). *Beitr. Biol. Pflanz.* 70: 121-140.
- Hoc P., Amela García M. T. 1999. Biología floral y sistema reproductivo de *Phaseolus vulgaris* var. *aborigeneus* (Fabaceae). *Rev. Biol. Trop.* 47: 59-67.
- Hoc P., Drewes S., Amela García M. T. 2003. Biología floral y sistema reproductivo y éxito reproductivo de *Macroptilium fraternum* (Fabaceae). *Rev. Biol. Trop.* 51: 369-380.
- Hocking B. 1968. Insect flowers associations in the high Arctic, with special reference to nectar. *Oikos* 19: 359-388.
- Holden J. H., Bond, D. A. 1960. Studies on the breeding system of the field bean, *Vicia faba*. *Heredity* 15: 175-192.
- Holsinger K.E. 1996. Pollination biology and the evolution of mating systems in flowering plants. *Evol. Biol.* 29: 107-147.
- Holtsford T.P., Ellstrand N.C. 1992. Genetic and enviromental variation in floral traits affecting outcrossing rate in *Clarkia tembloriensis* (Onagraceae). *Evolution.* 46: 216-225.
- Horovtiz A., Harding J. 1972. Genetics of *Lupinus*. V. Intraspecific variability for reproductive traits in *Lupinus nanus*. *Bot. Gaz.* 133: 155-165.
- Horvitz C., Schemske D. 1990. Spatiotemporal variation in insect mutualists of a neotropical herb. *Ecology* 71: 1085-1097.
- Hull-Sanders H., Eubanks M., Carr D. 2005. Inbreeding depression and selfing rate of *Ipomoea hederaceae* var. *integriuscula* (Convolvulaceae). *Am. J. Bot.* 92: 1871-1877.
- Ibrahim A., Coyne D. 1975. Genetics of stigma shape, cotyledon position and flower color in reciprocal crosses between *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 100: 622-626.
- Inoue K., Maki M., Masuda M. 1996. Evolution of *Campanula* flowers in relation to insect pollination on islands. Pags.: 377-400. En: Lloyd D.G., Barrett S.C.H. (eds.): *Floral biology. Studies on floral evolution in animal-pollinated plants.* Chapman y Hall, New York.
- Inouye D.W. 1980. The terminology of floral larceny. *Ecology* 61: 1251-1253.
- Jain S. K. 1976. The evolution of inbreeding in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 7: 469- 495.
- Jarne P., Charlesworth D. 1993. The evolution of thr selfing rate in functionally hermaphrodite plants and animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24: 441- 465.

- Jennersten O. 1988. Pollination in *Dianthus deltooides*: effects of habitat fragmentation on visitation and seed set. *Conservation Biology* 2: 359-366.
- Johnson S.G., Delph L.F., Elderkin C.L. 1995. The effects of petal size manipulations on pollen removal, seed set and insect visitor behavior in *Campanula americana*. *Oecologia* 102: 174-179.
- Johnston M. 1991. Natural selection on floral traits in two species of *Lobelia* with different pollinators. *Evolution* 45:1468-1479.
- Juncosa A. M., Webster B. D. 1989. Pollination in *Lupinus nanus* subsp. *latifolius* (Leguminosae). *Am. J. Bot.* 76: 59-66.
- Kalisz S., Vogler D.W. 2003. Benefits of autonomous selfing under unpredictable pollinator environments. *Ecology* 84: 2928-2942.
- Kalisz S., Vogler D., Falls B., Finer M., Shepard E., Herman T., Gonzalez R. 1999. The mechanism of delayed selfing in *Collinsia verna* (Scrophulariaceae). *Am. J. Bot.* 86: 1239-1247
- Kambal A.E., Bond D.A., Toynbee-Clarke G. 1976. A study on the pollination mechanism in field beans (*Vicia faba* L.). *J. Agric. Sci. Cam.* 87: 519-526.
- Karron J., Jackson R. Thumser L. Schlitch L. 1997. Outcrossing rates of individual *Mimulus ringes* genets are correlated with anter-stigma separation. *Heredity* 79: 365-370.
- Karoly K. 1992. Pollinator limitation in the facultatively autogamous annual, *Lupinus nanus* (Leguminosae). *Am. J. Bot.* 79: 49-56.
- Kasagi T., Kudo G. 2003. Variations in bumble bee preference and pollen limitation among neighboring populations: comparisons between *Phyllodoce caerulea* and *P. aleutica* (Ericaceae) along snowmelt gradients. *Am. J. Bot.* 90: 1321-1327.
- Kearns C.A., Inouye D.W. 1993. *Techniques for pollination biologists*. University Press of Colorado, Niwot, Colorado.
- Kevan P.G., Baker H.G. 1983. Insects as flower visitors and pollinators. *Ann. Rev. Entomol.* 28: 407-453.
- Kevan P. 1984. Pollination by animals and angiosperm biosystematics. En: Grant W. F. (ed.): *Plant Biosystematics*. Academic Press, Toronto.
- Kevan P. G., Lane, M. A. 1985. Flower petal microtexture is a tactile cue for bees. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 4750-4752.
- Kreitner G. L., Sorensen E.L. 1985. Stigma development and the stigmatic cuticle of *Medicago scutellata*. *Can. J. Bot.* 63: 813-818.
- Kunin W., Iwasa Y. 1996. Pollinator foraging strategies in mixed floral arrays: density effects and floral constancy. *Theor. Popul. Biol.* 49: 232-263.

- Kwak M.M., Jennersten O. 1991. Bumblebee visitation and seed set in *Melampyrum pratense* and *Viscaria vulgaris*: heterospecific pollen and pollen limitation. *Oecologia* 86: 99-104.
- Lackey, J. A. 1981. Phaseoleae. Pags. 301-327. En: R.M. Polhill and P.H. Raven (eds.): *Advances in Legume Systematics, Part 2*. Royal Botanic Garden, Kew.
- Lackey J. A. 1983. A review of generic concepts in American Phaseolinae (Fabaceae, Faboideae). *Iselya* 2: 21-64.
- Laverty T.M. 1980. The flower visiting behaviour of bumble bees: Floral complexity and learning. *Can. J. Zool.* 58: 1324-1355.
- Laverty T.M. 1994. Bumble bee learning and flower morphology. *Anim. Behav.* 47: 531-545.
- Lavin M., Delgado S.A. 1990. Pollen brush of Papilionoideae (Leguminosae): Morphological variation and systematic utility. *Am. J. Bot.* 77: 1294 - 1312.
- Lee T. H. 1988. Patterns of fruit and seed production. Pags. 179-202. En: Lovett Doust J., Lovett Doust L. (eds.): *Plant Reproductive Ecology*. Oxford University Press, Oxford.
- Leppik E.E. 1966. Floral evolution and evolution in Leguminosae. *Ann. Bot. Fennici* 3:299-308.
- Lindman C. A. M. 1902. Die Blüteneinrichtungen einiger südamerikanischer Pflanzen, Bihang Till K. Svenska Vetensk., Akad. Föerhandlingar Stockholm, 27 Afd. III N°14.
- Lloyd D.G. 1979. Some reproductive factors affecting the evolution of self-fertilization in plants. *Am. Nat.* 113: 77-79.
- Lloyd D.G. 1987. Allocations to pollen seeds and pollination mechanisms in self-fertilizing plants. *Func. Ecol.* 1: 83: 89.
- Lloyd D.G., Schoen D.J. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *Int. J. Plant Sci.* 153: 358-369.
- Lord E. 1981. Cleistogamy: A tool for the study of floral morphogenesis, function and evolution. *Bot. Rev.* 47: 421-449.
- Lord E., Heslop-Harrison Y. 1984. Pollen and stigma organization in Leguminosae: Stigma organization and the breeding system of *Vicia faba*. *Ann. Bot.* 54: 827-836.
- Lush W. M. 1979. Floral morphology of wild and cultivated cowpeas. *Economic Botany* 33: 442-447.
- Maréchal R., Mascherpa J., Stainer, F. 1978 Etude taxonomique d'un groupe complexe d'especies des genres *Phaseolus*, *Macroptilium* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de donnés morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique. *Boissiera* 28: 1-273.
- McCall C., Primack R.B. 1992. Influence of flower characteristics, weather, time of day, and season on insect visitation rates in three plant communities. *Am. J. Bot.*

- McDade L., Davidar P. 1984. Determinants of fruit set in *Pavonia dasypetala* (Malvaceae). *Oecologia* 64: 61-67.
- McDade L., Kinsman S. 1980. The impact of floral parasitism in two Neotropical hummingbird-pollinated plant species. *Evolution* 34: 944-958.
- Morgan M.T., Barrett S.C.H. 1989. Reproductive correlates of mating system variation in *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). *J. Evol. Biol.* 2: 183-203.
- Munsell Color Charts for plant tissues. 1977. Macbeth Division of Killmorgen Instruments Corporation. New Windsor, New York.
- Murcia C. 1990. Effect of floral morphology and temperature on pollen receipt and removal in *Ipomoea trichocarpa*. *Ecology* 71: 1098-1109.
- Nilsson L. 1988. The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature* 334: 147-149
- Ohashi K. 2002. Consequences of floral complexity for bumble bee-mediated geitonogamous self-pollination in *Salvia nipponica* (Labiatae). *Evol.* 56: 2414-2423.
- Ollerton J. 2005. Multiple meanings and modes on the many ways to be a generalist flower. XVII Int. Bot. Congress. Abstracts, p. 27.
- Ornduff R. 1970. Incompatibility and the pollen economy of *Jepsonia parryi*. *Am. J. Bot.* 57: 1036-1041.
- Polhill, R.M. 1976. Genisteeae and related tribes (Leguminosae). *Bot. Syst.* 1: 143-368.
- Prudkin, N. 1995. Expansión de la frontera agropecuaria y cambios ecológicos en el Sudeste Salteño. Instituto de Geografía de la Facultad de Filosofía y Letras de la UBA. Buenos Aires.
- Pyke G.H. 1991. What does it cost a plant to produce floral nectar? *Nature*: 350: 58-59.
- Rathcke B. 1983. Competition and facilitation among plants for pollination. Pags. 305-329. En: Real L. (ed.): *Pollination Biology*. Academic Press, Orlando.
- Rivera G., Galetto L., Bernardello L. 1996. Nectar secretion pattern, removal effects and breeding system of *Ligaria cuneifolia* (Loranthaceae). *Can. J. Bot.* 74: 1996-2001.
- Ruiz Zapata T., Arroyo M.T.K. 1978. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica* 10: 221-230.
- Sánchez A. M., Bosch M., Bots M., Newland J., Feron R., Mariani C. 2004. Pistil factors controlling pollination. *The Plant Cell* 16: S98-S106.
- Schemske D., Horvitz C. 1984. Variation among floral visitors in pollination ability: a precondition for mutualism specialization. *Science* 225: 519- 521
- Shivanna, K. R., Owens, S. J. 1989. Pollen pistil interactions (Papilionoideae). Pags. 157-182. En: Stirton, C.H. y Zarucchi J.L. (eds.): *Advances in legume biology* (Monogr. Syst. Bot. Gard. 29).

- Schoen D., Morgan M., Bataillon T. 1996. How does self-pollination evolve? Inferences from floral ecology and molecular genetic variation. Ph. Trans. Roy. Soc. Lon. B 351:1281-1290.
- Silva-Montellano A., Eguiarte L.E. 2003. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechugilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. I. Floral characteristics, visitors, and fecundity. Am. J. Bot. 90: 377-387.
- Spears E.E. 1987. Island and mainland of *Centrosema virginianum* and *Opuntia stricta*. J. of Ecol. 75: 351-362.
- Stanton M. L., Preston R.E. 1988. Ecological consequences and phenotypic correlates of petal size variation in wild radish, *Raphanus sativus* (Brassicaceae). Am. J. Bot. 72: 528-539.
- Stebbins G.L. 1957. Self-fertilization and population variability in the higher plants Am. Natur. 41:337-357.
- Stebbins G.L. 1970. Adaptive radiation in Angiosperms. I. Pollination mechanisms. Self-fertilization and population variability in the higher plants. Ann. Rev. Ecol. Syst. 1: 307-326.
- Stephenson A.G. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. Ann. Rev. Ecol. Syst. 12: 253-279.
- Stephenson A.G., Winsor J.A. 1986. *Lotus corniculatus* regulates offspring quality through selective fruit abortion. Evolution 40: 453-458.
- Stirton C.H. 1981. Petal sculpturing in papilionoid legumes. Pags. 771-788. En: Polhill R. M. y Raven P. H. (eds.): Advances in legume systematics, part 2. Royal Botanic Garden, Kew.
- Sutherland S., Delph L. 1984. On the importance of male fitness in plants: patterns of fruit set. Ecology 65: 1093-1104.
- Thomson J.D. 1986. Pollen transport and deposition by bumble bees in *Erythronium*: influences of floral nectar and bee grooming. J. Ecol. 74: 329-341.
- Thomson J.D., Stratton D.A. 1985. Floral morphology and cross pollination in *Erythronium grandiflorum* (Liliaceae). Am. J. Bot. 72: 433-437.
- Thomson J.D., Willson P., Valenzuela M., Malzone M. 2000. Pollen presentation and pollination syndromes, with special reference to *Penstemon*. Plant. Species Biol. 15: 11-29.
- Thomson J.N. 1994. The coevolutionary process. University of Chicago Press, Chicago, Ill.
- Thomson J. N. 1999. Specific hypothesis on the geographic mosaic of coevolution. Am. Nat. 153:S1-S13.
- Thomson J. N., Pellmyr O. 1992. Mutualism with pollinating seeds parasites amid co-pollinators: Constraints on specialization. Ecology 73: 1780-1791.
- Torres C., Galetto L. 1998. Patterns and implications of floral nectar secretion, chemical composition, removal effects and standing crop of *Mandevilla pentlandiana* (Apocynaceae). Bot. J. Linn. Soc. 127: 207-223.

- Totland O., Schulte–Herbrüggen B. 2003. Breeding systems insect flower visitation and floral traits of two alpine *Cerastium* species in Norway Arctic, Antarctic and Alpine Research 35: 242-247.
- Troll W. 1951. Über die Blüte von *Phaseolus caracalla* L. Pags. 37-48. Botanische Notizen II. Akad. Wiss. Lit. (Mainz) Abh. Mat. –natw.
- Tucker S.C. 1987. Pseudoracemes in Papilionoid legumes: their nature, development, and variation. Bot. J. Linnean Soc. 95: 181-206.
- Vogel S. 1963. Duftdrüsen im Dienst der Bestäubung. Über Bau und Funktion der Osmophoren. Akademie der Wissenschaften und der Literatur in Mainz. Abhandlungen der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Klasse 10: 598-763.
- Vogler D., Kalisz S. 2001. Sex among the flowers: The distribution of plant mating systems. Evolution 55: 202-204.
- Weberling F. 1992. Morphology of flowers and inflorescences. Cambridge University Press, Cambridge.
- Westerkamp C. 1993. The co-operation between the asymmetric flower of *Lathyrus latifolius* (Fabaceae – Viciaeae) and its visitors. Phytol. 33: 127 – 137.
- Westerkamp C. 1997. Keel Blossoms: Bee flowers with adaptations against bees. Flora. 192: 125-132.
- Wiens D. 1984. Ovule survivorship, brood size, life story, breeding systems and reproductive success in plants. Oecologia 64: 47-53.
- Wiens D., Calvin C.L., Willson C.A., Davern C.L., Franck D., Seavey S. 1987. Reproductive success, spontaneous embryo abortion, and genetic load in flowering plants. Oecologia 71: 501-509.
- Wilkinson L. 1986. SYSTAT: the system for statistics SYSTAT. Evanston, Illinois, USA.
- Willson P. 1995. Selection for pollination success and the mechanical fit of *Impatiens* flowers around bumblebee bodies. Bot. J. Linn. Soc. 55:355-383
- Willson P., Thomson J.D. 1996. How do flowers diverge?. Pags. 88-111. En: Lloyd D.G. y Barrett S.C.H. (eds.): Floral Biology. Chapman y Hall , New York.
- Winsor J.A., Davis L.E., Stephenson A.G. 1987. The relationship between pollen load and fruit maturation and the effect of pollen load on offspring vigor in *Cucurbita pepo*. Am. Naturalist 129: 643-656
- Wyatt R. 1983. Pollinator-plant interactions and the evolution of breeding systems. Pags.51-95. En: Real L. (ed.): Pollination biology. Academic Press, Orlando, Florida, USA.
- Wyatt R. 1986. Ecology and evolution of self-pollination in *Arenaria uniflora* (Caryophyllaceae). J. Ecology 74: 403-418.
- Yeo P. 1993. Secondary pollen presentation. Form, function and evolution. Springer-Verlag, New York.

Young H.J., Stanton M. 1990. Influences of floral variation on pollen removal and seed productin in wild radish. *Ecology* 71: 536-547