

DIFERENTE AROMA, MISMO COLOR FLORAL: EL CASO DE DOS ESPECIES DE *SALVIA* DE COROLA BLANCA

YESENIA MARTÍNEZ-DÍAZ¹, LEOPOLDO RAMÍREZ REYES¹, BRENDA BEDOLLA-GARCÍA² Y EDUARDO CUEVAS^{1*}

¹ Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.

² Instituto de Ecología, A.C., Centro Regional del Bajío, Michoacán, México.

*Autor de correspondencia: eduardo.cuevas@umich.mx

Resumen

Antecedentes: Las plantas emiten señales florales que resultan atractivas para los polinizadores. Los compuestos volátiles orgánicos florales (COVs), son considerados como una señal clave en la atracción de polinizadores. Sin embargo, ha sido escasamente explorado si las flores de especies del mismo género con el mismo color emiten el mismo aroma y atraen a los mismos visitantes florales.

Preguntas: ¿Las especies de *Salvia* con flores de corola blanca, emiten el mismo aroma floral y a su vez atraen a los mismos visitantes florales?

Especie de estudio: *Salvia assurgens* y *S. madrigalii*, dos especies de corola blanca pero con distinta morfología floral.

Sitio de estudio: Bosque templado al sureste de Morelia, Michoacán.

Métodos: El aroma floral se analizó por cromatografía de gases/masas y la observación de visitantes florales se realizó con cámaras de video.

Resultados: El perfil químico del aroma floral (composición y cantidad relativa de COVs) difirió significativamente entre *S. assurgens* y *S. madrigalii*. En *S. madrigalii* encontramos 16 COVs y fue visitada exclusivamente por el colibrí *Amazilia beryllina* y en *S. assurgens* encontramos 11 COVs y fue visitada por cuatro especies de insectos, siendo el más frecuente la mariposa *Thorybes dorantes*. El análisis de correspondencia canónica (ACC) mostró que los volátiles florales se correlacionaron significativamente con la frecuencia de visita de los visitantes florales.

Conclusiones: Nuestro estudio muestra evidencia que las flores blancas de *Salvia* de distintas especies con distinta morfología emiten diferente aroma floral y a su vez atrae a visitantes florales particulares.

Palabras clave: interacción, señales de atracción, visitante floral.

Abstract:

Background: Plants emit floral signals that are attractive to pollinators. Floral volatile organic compounds (VOCs) are considered a key signal in attracting pollinators. However, it has been scarcely explored whether flowers of the same color emit the same scent.

Questions: Do different species of *Salvia* with white corolla flowers emit the same floral scent and attract the same floral visitors?

Study species: *Salvia assurgens* and *Salvia madrigalii*, two species with white corolla but different floral morphology.

Study site: Temperate forest southeast of Morelia, Michoacán.

Methods: The floral scent was analyzed by gas/mass chromatography and floral visitor observations were carried out with video cameras.

Results: The chemical profile of floral scent (composition and relative quantity) differed between *S. assurgens* and *S. madrigalii*. In *S. madrigalii* we found 16 VOCs and it was visited exclusively by the hummingbird *Amazilia beryllina*, and in *S. assurgens* we found 11 VOCs and it was visited by four species of insects, being the butterfly *Thorybes dorantes* the most frequent visitor. Canonical correspondence analysis (CCA) showed that floral volatiles were significantly correlated with the visitation rate of floral visitors.

Conclusions: Our study shows evidence that *Salvia* species with white corolla flowers with different morphology emit different floral scents and attract particular floral visitors.

Keywords: attraction signals, floral visitors, interaction.

El género *Salvia* L. (Lamiaceae) ocupa uno de los primeros lugares en riqueza de especies a nivel mundial, con cerca de 1,000 especies (Harley *et al.* 2004) y en México, *Salvia* es uno de los géneros más diversos con alrededor de 306 especies y un alto porcentaje de endemismos y micro endemismos (Martínez-Gordillo *et al.* 2017). Este género presenta una gran diversidad floral, que de acuerdo al color, tamaño, recompensa y morfología se han asignado principalmente al síndrome de polinización ornitófilo (polinización por aves) y melitófilo (polinización por abejas) (Wester & Claßen-Bockhoff 2011). Los síndromes de polinización representan adaptaciones florales convergentes a grupos funcionales de polinizadores específicos (Fenster *et al.* 2004, Smith & Kriebel 2018, Dellinger *et al.* 2019), lo que ha servido para organizar la diversidad floral de las angiospermas y predecir los potenciales polinizadores a falta de observaciones empíricas (Machado & Lopes 2004, Knapp 2010, Lagomarsino *et al.* 2017). Las especies ornitófilas generalmente presentan corolas rojas con tubos florales largos y estrechos, mientras que las especies melitófilas, tienen flores de color azul-morado con tubos florales cortos, guías de néctar y el labio inferior ancho que sirve de plataforma a las abejas (Wester & Claßen-Bockhoff 2011). Aunque es sabido que el contenido de néctar y el aroma floral son importantes en la atracción de polinizadores, en el género *Salvia* estas características han sido escasamente exploradas (Giuliani *et al.* 2020). El néctar es la principal recompensa para los polinizadores y la variación en el volumen y la concentración de azúcar influye en la atracción de los visitantes florales. Por ejemplo, las flores polinizadas por insectos tienen un bajo contenido de néctar con altas concentraciones de azúcar, mientras que las flores polinizadas por aves tienen un alto contenido de néctar con bajas concentraciones de azúcar (Baker & Baker 1973, Johnson & Nicolson 2008).

El aroma floral es considerado como una de las señales principales en la atracción de polinizadores (Majetic *et al.* 2009, Wright & Schiestl 2009, Proffit *et al.* 2020), y se ha mostrado que estos compuestos cumplen funciones adicionales, como defender las flores contra herbívoros y patógenos (Boachon *et al.* 2019). La gran variabilidad de aromas florales se atribuye a los polinizadores como principal fuerza selectiva (Parachnowitsch *et al.* 2012, Farré-Armengol *et al.* 2015, Gervasi & Schiestl 2017, Chapurlat *et al.* 2019). En este sentido, las especies lejanamente emparentadas convergen en la producción de los COVs florales cuando comparten el mismo grupo de polinizadores (Knudsen & Tollsten 1995, Andersson *et al.* 2002) o pueden divergir entre poblaciones de la misma especie si interactúan con diferentes comunidades de polinizadores (Hetherington-Rauth & Ramírez 2016, Weber *et al.* 2018).

El aroma que emiten las flores es una mezcla compleja de compuestos volátiles orgánicos (COVs) constituida generalmente por decenas de compuestos en diferentes proporciones (Knudsen *et al.* 2006). La composición y abundancia de los COVs florales juegan un papel importante en la atracción de polinizadores (Proffit *et al.* 2020). Por ejemplo, las flores polinizadas por insectos emiten mayor número de COVs y en una mayor abundancia relativa (Steenhuisen *et al.* 2012, Farré-Armengol *et al.* 2015) respecto a las flores polinizadas por aves las cuales se pensaba que no emitían aromas florales pues se consideraba que las aves se guían principalmente por la vista para localizar flores con néctar y polen (Cronk & Ojeda 2008). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que los colibríes usan el olfato para evitar alimentarse de néctar que contiene compuestos químicos defensivos (Kim *et al.* 2021).

Salvia madrigalii Zamudio & Bedolla y *S. assurgens* Kunth, son dos especies con flores de corola blanca, característica muy poco común en el género en donde predominan las flores rojas-rosadas o azules-moradas en el 95 % de las especies en México. *Salvia madrigalii* es una especie micro endémica de Michoacán, la cual fue recientemente descrita (Zamudio & Bedolla-García 2017). Su flor presenta un tubo floral largo y estrecho (24-25 × 5-9 mm) y el labio inferior orientado verticalmente de forma antrorsa. Las características morfológicas florales de *S. madrigalii* concuerdan con las características de salvias ornitófilas, excepto por el color blanco de sus flores (Wester & Claßen-Bockhoff 2007, 2011). En poblaciones en cultivo de *S. madrigalii* se ha observado al colibrí *Cyananthus latirostris* como el único visitante floral (Zamudio & Bedolla-García 2017).

Salvia assurgens está restringida principalmente al estado de Michoacán (González-Gallegos & López-Enríquez. 2016, Zamudio & Bedolla-García 2017) y presenta un síndrome melitófilo (Wester & Claßen-Bockhoff 2011), lo que concuerda con las 17 especies de abejas reportadas como visitantes florales de esta especie (Cultid-Medina *et al.* 2021). Debido a que la presencia de flores blancas en el género *Salvia* es muy poco común y no existe información previa sobre la emisión de volátiles florales y contenido de néctar; en este trabajo nos planteamos las siguientes pre-

guntas: 1) ¿existe variación en el aroma floral, contenido de néctar y tamaño floral entre *S. assurgens* y *S. madrigalii*? 2) ¿cuáles son los visitantes florales de ambas especies? y 3) ¿existe correlación entre los volátiles emitidos y la tasa de visitas de los visitantes florales? Esperamos que exista diferenciación en la emisión de volátiles florales de *S. assurgens* y *S. madrigalii*, y que estos estén correlacionados con los visitantes florales particulares de cada especie. Además, esperamos que *Salvia madrigalii* (visitada por colibríes) emita menos CVOs florales comparada con *S. assurgens* (visitada principalmente por abejas).

Materiales y métodos

Especies de estudio. *Salvia assurgens* es una hierba perenne de 20 a 50 cm de altura, endémica de México que florece de mayo a noviembre (Cornejo-Tenorio & Ibarra-Manríquez 2011). Habita en bosques de encino y de pino-encino, entre los 2,100 y 2,650 m snm. Presenta inflorescencias terminales de 12 a 17 cm de largo, con 5-10 verticilastros y cada uno con 4-10 flores. Sus flores son blancas, de 6-8 mm de largo (Figura 1A). La distribución de las poblaciones de *S. assurgens* está restringida a la porción noroeste del Cinturón Volcánico Transmexicano y principalmente en el estado de Michoacán (González-Gallegos & López-Enríquez 2016).



Figura 1. Flores de *Salvia assurgens* (A) y de *Salvia madrigalii* (B).

Salvia madrigalii es una especie recientemente descrita (Zamudio & Bedolla-García 2017), micro endémica del estado de Michoacán y que florece de octubre a diciembre. Se distribuye en bosques de pino-encino perturbados y en la transición de éste con el bosque tropical caducifolio entre los 1,600 y 1,700 m snm (Zamudio & Bedolla-García 2017). Es un arbusto de 1 a 2 m de altura con inflorescencias en racimos terminales y axilares de 6 a 13 cm de largo, con dos flores por verticilo. Sus flores son blancas, con un tubo más o menos cilíndrico de 24-35 × 5-9 mm, el labio superior marcadamente galeado de 11 × 17 mm y labio inferior de 10-15 mm de largo (Figura 1B).

Sitio de estudio. El trabajo de campo se realizó de mayo a diciembre del 2019, durante el pico de floración de cada especie. La población de *Salvia assurgens* (150 a 200 individuos) se localiza al sureste de Morelia, Michoacán a dos kilómetros de la localidad de San Miguel del Monte (19° 36' 2'' N; 101° 07' 26'' O) a una altitud de 2,140 m snm. La zona se caracteriza por una vegetación de bosque de pino. La población de *Salvia madrigalii* (40 a 60 individuos) se localizó al sureste de Morelia, Michoacán, en la comunidad de Tumbisca (19° 34' 50'' N, 101° 04' 29'' O), a una

altitud de 1,705 m snm. El sitio se ubica en la vertiente orientada hacia el pacífico del Cinturón Volcánico Transmexicano y se caracteriza por ser una zona de transición entre el bosque de pino-encino y bosque tropical caducifolio.

Colecta y análisis del aroma floral. Para la colecta de volátiles florales se seleccionaron en total 11 parches de la población de *S. assurgens* y 12 plantas de la población de *S. madrigalii*. Debido a la complejidad para realizar la extracción de volátiles en campo, en cada parche o planta de ambas especies se cortaron ramas con inflorescencias e inmediatamente se colocaron en agua, y se trasladaron al laboratorio. Después de una hora de haber hecho el corte de las ramas se realizó la colecta de volátiles de acuerdo a Gervasi & Schiestl (2017) con modificaciones. Las inflorescencias de 8-15 flores se aislaron en un frasco de vidrio de borosilicato y fueron selladas con una placa de teflón. Los volátiles se capturaron en una trampa absorbente con 150 mg de Porapak Q (malla/tamaño 50/80, Supelco, USA), usando una bomba de vacío a un flujo de 200 mL/min. La extracción se realizó de 9:00 h a 13:00 h (5 horas), este periodo de tiempo corresponde al pico de actividad de los visitantes florales (L. Ramírez observación personal). Como control se extrajeron los volátiles de cinco muestras de frascos vacíos para descartar posibles contaminantes y fueron analizadas en las mismas condiciones cromatográficas. Los compuestos encontrados en las muestras control se descartaron de las muestras del aroma floral. Las trampas fueron eluidas con 2 mL de hexano grado HPLC y después se concentraron a 50 μ L con una corriente suave de nitrógeno gaseosos. Se realizaron inyecciones de 3 μ L y se analizaron en un cromatógrafo de gases (Agilent 6890) acoplado a espectrometría de masas (Agilent 5973N), usando inyecciones splitless a 240 °C, en una columna Equity TM-5 (Supelco 28089-U, 30 m 0.25 mm, 0.25 μ m). Se usó helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min⁻¹. Las condiciones de análisis se realizaron de acuerdo a Kantsa *et al.* (2017). La temperatura inicial del horno fue de 40 °C durante 3 min, seguido por un gradiente de temperatura de 10 a 250 °C durante 5 min. Para identificar los compuestos volátiles se usó la librería espectral de masas del Instituto Nacional de Estándar y Tecnología (NIST 11) y comparando los índices de retención Kovats calculado (mezcla de alcanos C8-C20, Sigma Aldrich, MO, USA) con los índices reportados por Adams (2007) y El-Sayed (2023). Algunos compuestos se verificaron usando estándares sintéticos (Sigma Aldrich, MO, USA). La concentración de los compuestos se calculó usando el área bajo la curva del pico de cada compuesto y la suma de las áreas de todos los picos de cada muestra se consideró como el 100 %.

Producción de néctar y morfología floral. Para medir el volumen de néctar en *S. madrigalii* se embolsaron 4 botones florales por planta de un total de cuatro plantas por día. Después de la anthesis floral se midió el volumen de néctar de cada flor con un microcapilar de 5 μ l durante tres días consecutivos utilizando las mismas flores (N = 48). A pesar de que las flores duran abiertas entre 4 y 5 días, no fue posible estimar el néctar en flores del cuarto o quinto día, pues eran muy frágiles y se desprendían fácilmente. En las flores antes señaladas, se estimó la concentración de azúcares utilizando un refractómetro manual ATAGO (Master-53M, Japón) con un rango de 0-40° Brix (equivalente al número de gramos de soluto por gramos de solución). En *S. assurgens*, no fue posible estimar el volumen debido a la poca cantidad de néctar en sus flores. Para la medición de las características florales se consideró el largo del tubo floral y el ancho del labio inferior, ya que estas características son las más importantes de acuerdo al síndrome de polinización de cada especie (Wester *et al.* 2020). De cada individuo se seleccionaron al menos tres flores (*S. madrigalii* N = 109; *S. assurgens* N = 42) y las mediciones (cm) se realizaron con un vernier digital (Stainless Hardened).

Observación de visitantes florales. En ambas especies se hicieron observaciones con cámaras de video (Sony Handycam DCR-SR20) y observaciones directas de 7:00 h a 13:00 h en días soleados. En *S. assurgens* se registró un total de 12 h y en *S. madrigalii* un total de 28 h. Se registró tanto el número de flores observadas, como el de flores visitadas y la identidad del polinizador para calcular la tasa de visita de cada especie por hora. Algunos visitantes florales (únicamente insectos) fueron capturados con una red entomológica y la identificación se realizó con claves para cada grupo taxonómico. Los especímenes fueron depositados en el laboratorio de Biología de la polinización de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. La identificación de los visitantes florales fue corroborada por especialistas de los diferentes grupos taxonómicos.

Análisis estadísticos. Para analizar las diferencias de la tasa de visitas entre *S. assurgens* y *S. madrigalii*, realizamos un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de una prueba Tukey (HDS) para comparar si los promedios difieren significativamente usando el programa JMP ver. 9.0 (SAS Institute, Tokio, Japón). Para explorar las diferencias del tamaño del tubo floral y el ancho del labio inferior entre especies realizamos un ANOVA de una vía, seguido de una prueba Tukey. El volumen y la concentración del néctar se evaluó por medio de una ANOVA donde se comparó si el promedio de dichas variables difería entre los tres días. Para analizar la disimilitud de los aromas florales entre especies, realizamos un análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS por sus siglas en inglés), utilizando la función meta MDS en el paquete “vegan” (Oksanen *et al.* 2013). Calculamos la proporción relativa de todos los compuestos emitidos por cada especie, transformamos y estandarizamos los datos con la raíz cuadrada utilizando una doble estandarización de Wisconsin para evitar que el NMDS se vea influenciado por los compuestos más abundantes. Se calculó una matriz de distancias por pares utilizando el índice de distancias de Bray-Curtis. Para probar si el patrón de agrupamiento observado era significativo, implementamos la prueba PERMANOVA con 999 permutaciones aleatorias utilizando la función “adonis” en el paquete “vegan”. Para explorar la correlación entre los compuestos volátiles florales (composición y abundancia relativa de los CVOs) y la tasa de visitas de visitantes florales, realizamos un análisis de correspondencia canónica (ACC) usando el software PAST, y la significancia del análisis se determinó usando 999 permutaciones de Monte Carlo. Antes del análisis, los datos de CVOs se transformaron con el arcoseno y los datos de la tasa de visita se transformaron con la raíz cuadrada para obtener una distribución normal de los datos.

Resultados

Aroma floral. En *S. assurgens* (visitada por insectos), contrario a lo que esperábamos encontramos un menor número de COVs florales (11 compuestos) comparada con *S. madrigalii* (visitada por colibríes), donde se identificaron 16 COVs. En el aroma floral de *S. assurgens* encontramos compuestos que incluyen bencenoides y terpenoides, siendo el 1,4-diclorobenceno el compuesto más abundante con aproximadamente el 78 % del aroma total (Tabla 1). En *S. madrigalii* encontramos terpenoides y bencenoides. El terpenoide humuleno fue el más abundante con aproximadamente 27 % del aroma total, seguido del compuesto m-etilacetofenona del grupo de los bencenoides con aproximadamente el 15 % del aroma total. *Salvia assurgens* y *S. madrigalii* emiten en común siete compuestos volátiles florales y también compuestos exclusivos de cada especie (Tabla 1). El análisis NMDS mostró que los compuestos volátiles florales difieren entre *S. assurgens* y *S. madrigalii* (stress = 0.047). Este resultado fue confirmado por la prueba de PERMANOVA, la cual mostró que el aroma floral difiere significativamente entre *S. assurgens* y *S. madrigalii* ($F = 48.002$, $P < 0.001$). Los individuos de *S. assurgens* se agruparon principalmente en el eje 1 negativo del NMDS y los individuos de *S. madrigalii* se agruparon en el eje 1 positivo del NMDS. De los 20 compuestos volátiles, 18 contribuyeron significativamente con la ordenación del NMDS (Figura 2).

Visitantes florales. En *Salvia assurgens* se observaron en total 1,512 flores de las cuales 523 fueron visitadas. Se registraron cuatro especies de visitantes florales, la mariposa *Thorybes dorantes* Stoll 1790, *Bombus ephippiatus* Say, *Xylocopa tabaniformis azteca* Cresson, y una mosca de la familia Tachinidae (Figura 3). La tasa de visita (hr/flor) más alta fue de *Thorybes dorantes* (0.371 ± 0.15), seguida de *Bombus ephippiatus* (0.194 ± 0.08), *Xylocopa tabaniformis azteca* (0.119 ± 0.04) y la mosca de la familia Tachinidae (0.026 ± 0.013). En *Salvia madrigalii* se observaron en total 1674 flores, de las cuales 784 fueron visitadas. El colibrí *Amazilia beryllina* fue el único visitante floral de *S. madrigalii* (Figura 4) con una tasa de visita de 0.574 ± 0.105 . En *S. assurgens* la tasa de visitas fue más alta (0.744 ± 0.18) comparada con la de *S. madrigalii* (0.574 ± 0.105) sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa ($F_{1,80} = 0.674$, $P = 0.41$).

El ACC mostró que los volátiles florales (composición y abundancia relativa) y la tasa de visita se correlacionaron significativamente (rastros = 0.738, $P = 0.001$). El eje 1 explica el 81.8 % y el eje 2 el 15.7 %, ambos explican el 97.5 % de la variación total. El CCA (Figura 5) muestra que la tasa de visitas de *A. beryllina* se correlacionó con

los volátiles del grupo de los sesquiterpenos, los cuales son exclusivos de las flores de *S. madrigalii*. Los visitantes florales de *S. assurgens* (*Bombus ephippiatus*, *Thorybes dorantes*, *Xylocopa tabaniformis* azteca, Tachinidae) se correlacionaron con monoterpenos, 1,4-diclorobenceno, alcohol fenilético y 2-fenoxietanol (Figura 5).

Producción de néctar y morfología floral. En *S. assurgens*, el largo del tubo floral fue más corto (1.84 ± 0.039) comparado con el de *S. madrigalii* (4.67 ± 0.055) de manera significativa ($F_{1,149} = 2347.4$, $P < 0.0001$), mientras que el

Tabla 1. Compuestos volátiles identificados en flores de *Salvia madrigalii* y *Salvia assurgens*.

Clase de compuesto	Nombre	IKc	IKt	Promedio (\pm error estándar)	
<i>Salvia assurgens</i> (N=11)					
Terpenoids/monoterpenos	α -Pino* Camfeno Limoneno*	939 953 1,033	932 946 1,024	1.3 \pm 0.41 0.56 \pm 0.29 2.58 \pm 0.70	
	Ocimeno	1,050	1,037	1.09 \pm 0.59	
	Terpenoids/sesquiterpenos	Cariofileno	1,438	1,417	1.82 \pm 1.12
Bencenoides/hidrocarburos	1,4-dimetil-benceno 1,2-dimetil-benceno	876 898	888 894	2.68 \pm 1.39 7.71 \pm 4.31	
	Bencenoides/chorado	1,018	1,014	77.77 \pm 6.06	
Bencenoides/alcohol	Alcohol fenilético	1,117	1,119	2.91 \pm 1.03	
	2-fenoxietanol	1,164	1,226	0.28 \pm 0.12	
Bencenoides/cetonas	1-(4-etilfenil)-etanona	1,237	1,290	1.3 \pm 0.68	
<i>Salvia madrigalii</i> (N=12)					
Terpenoides/monoterpenos	α -Pino* Camfeno Limoneno*	938 953 1,034	932 946 1,024	0.92 \pm 0.26 0.22 \pm 0.14 0.24 \pm 0.13	
	Terpenoides/sesquiterpenos	Copaeno	1,390	1,374	0.29 \pm 0.14
		Cubebeno	1,409	1,387	11.2 \pm 1.75
Gurjuneno		1,426	1,409	4.44 \pm 1.23	
Cariofileno		1,438	1,417	7.38 \pm 1.28	
Humuleno		1,472	1,456	26.61 \pm 3.68	
Germacreno		1,499	1,484	2.97 \pm 1.05	
Cadineno		1,532	1,522	1.72 \pm 0.64	
Bencenoides/ hidrocarburos	Muuroleno	1,554	1,500	3.08 \pm 1.16	
	Palustrol	1,590	1,567	2.62 \pm 1.05	
	1,4-dimetil-benceno 1,2-dimetil-benceno	873 896	888 894	8.76 \pm 2.35 5.77 \pm 2.00	
Bencenoides/cetonas	m-Etilacetophenona	1,272	1,271	15.25 \pm 3.19	
	1-(4-etilfenil)-etanona	1,291	1,290	8.53 \pm 2.71	

Los compuestos resaltados son compuestos comunes y los compuestos que no están resaltados son compuestos exclusivos de *S. assurgens* y *S. madrigalii*. * El asterisco indica los compuestos que fueron revisados con estándares sintéticos. IKc, indica los índices kovats calculados, IKt, indica los índices Kovats reportados en la literatura.

ancho del labio inferior fue más grande en *S. assurgens* (0.608 ± 0.45) comparado con *S. madrigalii* (0.396 ± 0.06 ; $F_{1,149} = 46.38.201$, $P < 0.0001$). En *S. madrigalii* tanto el volumen de néctar como su concentración disminuyeron conforme el día de vida de las flores. El volumen de néctar fue de 2.8 ± 0.7 ; 2.44 ± 0.8 y $1.8 \pm 1 \mu\text{L}$ en flores del primer al tercer día respectivamente y la concentración disminuyó de 28 ± 1.1 ; 20.5 ± 1.7 a $18.5 \pm 1.4^\circ$ Brix en flores del primer al tercer día respectivamente.

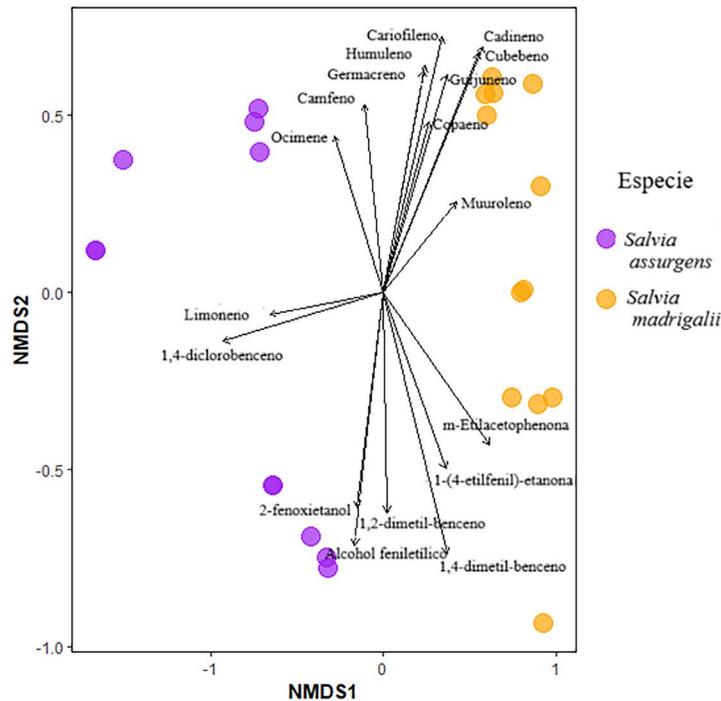


Figura 2. Análisis de escalamiento multidimensional no paramétrico (NMDS, por sus siglas en inglés) de los compuestos volátiles florales de *Salvia assurgens* y *S. madrigalii*, basado en la distancia Bray-Curtis, usando la abundancia relativa del aroma floral. Únicamente se muestran los vectores con $P < 0.05$.

Discusión

Nuestros resultados muestran que el perfil químico del aroma floral de *Salvia assurgens* y *S. madrigalii* difiere significativamente, además de que cada especie atrae a visitantes florales particulares. *Salvia madrigalii* fue visitada exclusivamente por el colibrí *Amazilia beryllina*, lo que constituye el primer reporte de los visitantes florales de esta especie en poblaciones naturales y difiere del colibrí reportado para la especie en cultivo (*Cyananthus latirostris*). *Salvia assurgens* fue visitada por insectos, siendo la mariposa *Thorybes dorantes* el principal visitante floral. Contrario a lo que esperábamos las flores de *S. madrigalii* emitieron un mayor número de COVs comparada con *S. assurgens* (16 y 11 compuestos respectivamente). De acuerdo al ACC la tasa de visita de los visitantes florales se correlacionó de manera significativa con la composición y abundancia relativa de los volátiles florales.

Salvia assurgens y *S. madrigalii* emiten algunos COVs florales en común y otros son exclusivos de cada especie (Tabla 1). Todos los compuestos volátiles encontrados en ambas especies son reportados comúnmente como COVs florales en varias especies de angiospermas (Knudsen *et al.* 2006). Algunos estudios sugieren que la variación en los COVs florales se atribuye a los polinizadores como principal fuerza selectiva (Parachnowitsch *et al.* 2012, Farré-Armengol *et al.* 2015, Gervasi & Schiestl 2017, Chapurlat *et al.* 2019). Por ejemplo, especies lejanamente emparentadas convergen en los CVOs florales cuando comparten el mismo grupo de polinizadores (Knudsen & Tollsten 1995, Andersson *et al.* 2002) o pueden divergir entre poblaciones de la misma especie si interactúan con diferentes comunidades de polinizadores (Hetherington-Rauth & Ramírez 2016, Weber *et al.* 2018). En este sentido, a pesar

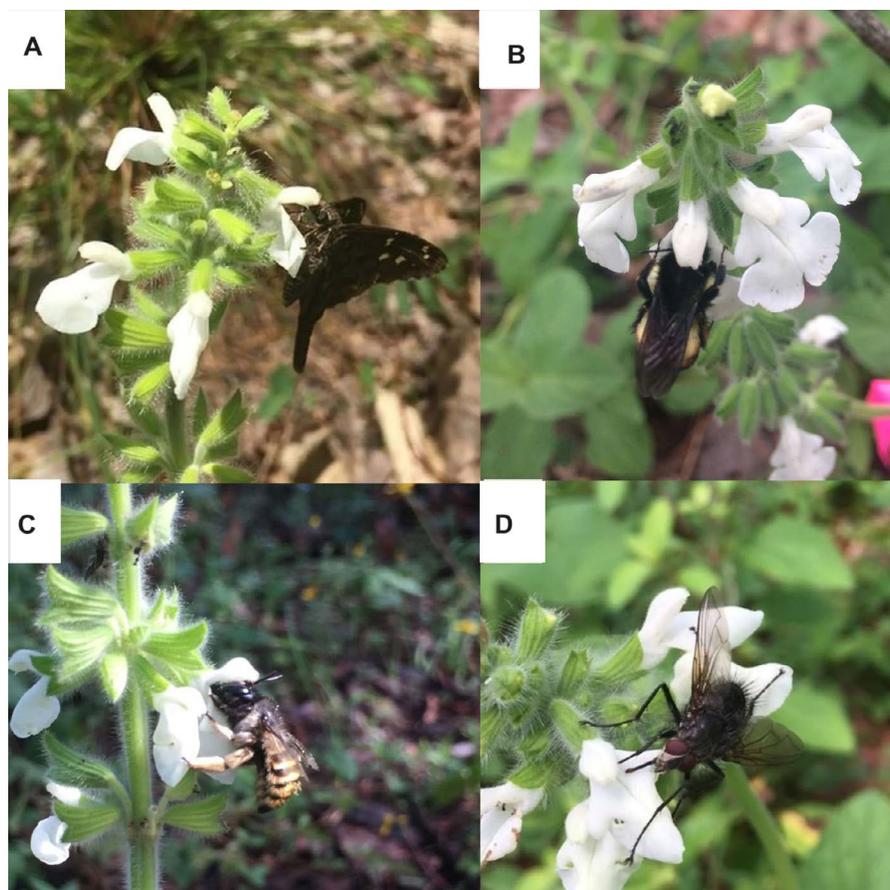


Figura 3. Visitantes florales de *Salvia assurgens*. (A) *Thorybes dorantes*, (B) *Bombus ephippiatus*, (C) *Xylocopa tabaniformis* azteca, (D) Mosca de la familia Tachinidae.

de que *S. assurgens* y *S. madrigalii* son del mismo género, difieren significativamente en el perfil químico de COVs florales (Figura 2), además de que estas especies no comparten visitantes florales. Desafortunadamente desconocemos qué tan cercanas filogenéticamente son estas dos especies, pues no se han incluido en las recientes filogenias del subgénero *Callosphaceae* (Fragoso-Martínez *et al.* 2018).

Generalmente es aceptado que las especies polinizadas por insectos emiten mayor diversidad y concentración de COVs comparada con las especies polinizadas por aves (Knudsen *et al.* 2004, Steenhuisen *et al.* 2012, Farré-Armengol *et al.* 2015). En este estudio mostramos que el aroma floral de *S. assurgens*, polinizada por insectos, emite un menor número de COVs florales comparada con *S. madrigalii* (visitada por colibríes) (Tabla 1). Se ha propuesto que las especies de *Salvia* de flores blancas podrían ser potencialmente polinizadas por polillas nocturnas (Rama-moorthy 1984, Reith & Zona 2016); sin embargo, en observaciones crepusculares de *S. assurgens* y *S. madrigalii* no se observó a ningún visitante floral en ambas especies (L. Ramírez observación personal).

De acuerdo al ACC se mostró que la tasa de visitas de *A. beryllina* se asoció con los compuestos volátiles del grupo de los sesquiterpenos (copaeno, palustrol, cubebeno, gurjuneno, humuleno, muuroleno y germacreno) emitidos por las flores de *S. madrigalii* (Figura 5). Los aromas florales en los que dominan los sesquiterpenos, son comunes entre las plantas polinizadas por abejas (Dobson 2006, Larue *et al.* 2016). Específicamente los compuestos humuleno y cariofileno estimulan la respuesta antenal de mariposas (Dobson 2006), y el germacreno estimula la respuesta antenal de la *Musca domestica* (Zito *et al.* 2015). Kim *et al.* (2021) sugiere que los colibríes usan el sentido del olfato para localizar su alimento. En este contexto, los sesquiterpenos son exclusivos del aroma floral de *S. madrigalii* (excepto el cariofileno) y posiblemente juegan un papel importante en la atracción de *A. beryllina*, el

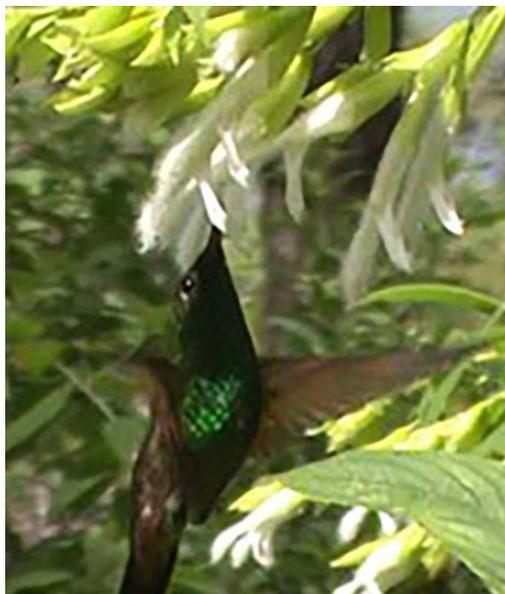


Figura 4. *Amazilia beryllina*, el único visitante floral observado en *Salvia madrigalii*.

único visitante floral observado, por lo que estudios posteriores son necesarios para probar esta idea. Por otra parte, se ha propuesto que las flores polinizadas por colibríes producen entre 10-30 μL de néctar con una concentración del 15 al 25 % (Johnson & Nicolson 2008). En nuestro estudio el volumen de néctar de las flores de *S. madrigalii* fue bajo para ser una especie polinizada por colibríes (2.8 μL) en flores del primer día de vida y disminuyó conforme la edad de las flores. De manera similar, la concentración de azúcares en el néctar de *S. madrigalii* disminuyó de 28 a 18 ° Brix en flores del primer al tercer día. Sin embargo, estas concentraciones concuerdan con lo reportado para especies visitadas por colibríes (Johnson & Nicolson 2008). En *S. assurgens* el aroma floral estuvo dominado por 1,4-diclorobenceno (78 % del aroma total), el cual se ha reportado como compuesto dominante en el aroma floral de la planta carnívora *Pinguicula moranensis* donde la mariposa *Thorybes dorantes* fue el principal visitante floral (Cuevas *et al.* 2023). En *S. assurgens*, *T. dorantes* fue el visitante floral principal; sin embargo, es poco probable que las mariposas activen el mecanismo de palanca, esencial en la polinización (Hedström 1985, Espino-Espino *et al.* 2014, Reith & Zona 2016), por lo que se les considera como ladrones de néctar. Se requieren estudios específicos para evaluar la eficiencia de *T. dorantes*, principal visitante floral de *S. assurgens*. Otros de los visitantes florales observados en *S. assurgens* fueron dos especies de abejas (*Bombus ephippiatus* y *Xylocopa tabaniformis* azteca); mientras Cultid-Medina *et al.* en 2021, reportaron 17 especies de abejas que visitan las flores de esta especie. Las mediciones realizadas de la morfología floral concuerdan con el síndrome esperado y observado en ambas especies, mientras que en otros casos como en *Salvia leucantha* (flores blancas y pequeñas) es visitada por colibríes al igual que *S. plurispicata* con flores melitófilas (Espino-Espino *et al.* 2014). El ACC mostró que el 1,4-diclorobenceno y los monoterpenos (α -pineno, camfeno, limoneno y ocimeno) se correlacionaron con la tasa de visitas de los visitantes florales de *S. assurgens* (*T. dorantes*, *B. ephippiatus*, *X. tabaniformis* azteca y una mosca de la familia Tachinidae; [Figura 5](#)). Los monoterpenos son compuestos comunes en el aroma floral de varias especies de angiospermas y se han asociado con la atracción de mariposas, abejas y moscas (Andersson *et al.* 2002, Dobson 2006, Byers *et al.* 2014).

Nuestro estudio aporta evidencia de que el aroma floral de *S. assurgens* y *S. madrigalii* difiere significativamente y de que la tasa de visita de los visitantes florales se asoció de manera significativa con los volátiles florales. Posteriores estudios de bioensayos de preferencia olfativa son necesarios para probar si realmente los volátiles particulares de cada especie (*S. assurgens* y *S. madrigalii*) resultan atractivos para sus visitantes florales.

- Cronk Q, Ojeda I. 2008. Bird-pollinated flowers in an evolutionary and molecular context. *Journal of Experimental Botany* **59**: 715-727. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/ern009>
- Dellinger AS, Chartier M, Fernández-Fernández D, Penneys DS, Alvear M, Ameda F, Michalangeli FA, Staedler Y, Armbruster WS, Schönenberger J. 2019. Beyond buzz-pollination departures from an adaptive plateau lead to new pollination syndromes. *New Phytologist* **221**: 1136-1149. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.15468>
- Dobson HEM. 2006. Relationship between floral fragrance composition and type of pollinator. In: *Biology of floral scent*. Boca Raton: CRC Press, pp. 147-198. ISBN 978-0-42912-666-6
- El-Sayed AM. 2023. The Pherobase: Database of pheromones and semiochemicals. <http://www.pherobase.com> (accessed September 9, 2023).
- Espino-Espino J, Rosas F, Cuevas E. 2014. Variación temporal de visitantes florales en dos especies simpátricas de *Salvia* con floración simultánea y síndrome de polinización contrastante. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **85**: 161-166. DOI: <https://doi.org/10.7550/rmb.35248>
- Farré-Armengol G, Filella I, Llusà J, Peñuelas J. 2015. Pollination mode determines floral scent. *Biochemical Systematic and Ecology* **61**: 44-53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.05.007>
- Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR, Thomson JD. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **35**: 375-403. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132347>
- Fragoso-Martínez I, Martínez-Gordillo M, Salazar GA, Sazatornil F, Jenks A, García Peña MD R, & Granados Mendoza C. 2018. Phylogeny of the Neotropical sages (*Salvia* subg. Calosphace; Lamiaceae) and insights into pollinator and area shifts. *Plant Systematics and Evolution*, **304**: 43-55. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00606-017-1445-4>
- Gervasi D, Schiestl F. 2017. Real-time divergent evolution in plants driven by pollinators. *Nature Communication* **8**: 1469. DOI: <https://doi.org/10.1038/ncomms14691>
- Giuliani C, Giovanetti M, Lupi D, Mesiano MP, Barilli R, Ascriczzi R, Flamini G, Fico G. 2020. Tools to tie: Flower characteristics, VOC emission profile, and glandular trichomes of two Mexican salvia species to attract bees. *Plants* **9**: 1645. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9121645>
- González-Gallegos JG, López-Enríquez IL. 2016. *Salvia wixarika* (Lamiaceae), a new species from Jalisco, Mexico, and novelties on Mexican *Salvia* with white corollas. *Phytotaxa* **260**: 176-184. DOI: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.260.2.7>
- Harley RMS, Atkins AL, Budantsev PD, Cantino BJ, Conn R, Grayer MM, Harley R, De Kok T, Krestovskaja R, Morales AJ, Paton O, Ryding Y, Upson T. 2004. Labiatae. In: *The families and genera of vascular plants*. New York: Springer Verlag, pp. 167-275. ISBN: 3-540-40593-3
- Hedström I. 1985. Nattaktiva bin som pollinatörer av en tropisk *Salvia*. *Fauna Flora*. **80**: 101-110.
- Hetherington-Rauth MC, Ramírez SR. 2016. Evolution and diversity of floral scent chemistry in the euglossine bee-pollinated orchid genus *Gongora*. *Annals of Botany* **118**: 135-148. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mew072>
- Johnson SD, Nicolson SW. 2008. Evolutionary associations between nectar properties and specificity in bird pollination systems. *Biology Letters* **4**: 49-52. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0496>
- Kantsa A, Raguso RA, Dyer AG, Sgardelis SP, Olesen JM, Petanidou T. 2017. Community-wide integration of floral colour and scent in a Mediterranean scrubland. *Nature Ecology and Evolution* **1**: 1502-1510. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0298-0>
- Kim A, Rankin D, Rankin E. 2021. What is that smell? Hummingbirds avoid foraging on resources with defensive insect compounds. *Behavioral Ecology Sociobiology*. **75**: 132. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00265-021-03067-4>
- Knapp S. 2010. On 'various contrivances': pollination, phylogeny and flower form in the Solanaceae. *Philosophical Transactions of the Royal Society. Lond. Ser. B: Biological. Science* **365**: 449-460. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0236>
- Knudsen JT, Eriksson R, Gershenzon J, Ståhl B. 2006. Diversity and distribution of floral scent. *Botanical Review* **72**: 1-20. DOI: [https://doi.org/10.1663/0006-8101\(2006\)72\[1:DADOF5\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0006-8101(2006)72[1:DADOF5]2.0.CO;2)

- Knudsen JT, Tollsten L. 1995. Floral scent in bat-pollinated plants: a case of convergent evolution, *Botanical Journal of the Linnean Society* **119**: 45-57. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1995.tb00728.x>
- Knudsen JT, Tollsten L, Groth I, Bergström G, Raguso RA. 2004. Trends in floral scent chemistry in pollination syndromes: floral scent composition in hummingbird-pollinated taxa. *Botanical Journal of the Linnean Society* **146**: 191-199. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2004.00329.x>
- Lagomarsino LP, Forrestel EJ, Muchhala N, Davis CC. 2017. Repeated evolution of vertebrate pollination syndromes in a recently diverged Andean plant clade. *Evolution* **71**: 1970-1985. DOI: <https://doi.org/10.1111/evo.13297>
- Larue AAC, Raguso RA, Junker RR. 2016. Experimental manipulation of floral scent bouquets restructures flower-visitor interactions in the field. *Journal of Animal Ecology* **85**: 396-408. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12441>
- Machado IC, Lopes AV. 2004. Floral traits and pollination systems in the Caatinga, a Brazilian tropical dry forest. *Annals of Botany* **94**: 365-376. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mch152>
- Majetic CJ, Raguso RA, Ashman TL. 2009. The sweet smell of success: floral scent affects pollinator attraction and seed fitness in *Hesperis matronalis*. *Functional Ecology* **23**: 480-487. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01517.x>
- Martínez-Gordillo MJ, Bedolla-García B, Cornejo-Tenorio G, Fragoso-Martínez I, García-Peña M. del R, González-Gallegos JG, Lara-Cabrera SI, Zamudio S. 2017. Lamiaceae of México. *Botanical Sciences* **95**: 780-806. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsci.1871>
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'hara RB, Oksanen MJ. 2013. Package 'vegan'. Community ecology package. <https://CRAN.Rproject.org/package=vegan> (accessed October 10, 2023).
- Parachnowitsch AL, Raguso RA, Kessler A. 2012. Phenotypic selection to increase floral scent emission, but not flower size or colour in bee-pollinated *Penstemon digitalis*. *New Phytologist* **195**: 667-675. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04188.x>
- Proffitt M, Lapeyre B, Buatois B, Deng X, Arnal P, Gouzerh F, Carrasco D, Hossaert-McKey M. 2020. Chemical signal is in the blend: Bases of plant-pollinator encounter in a highly specialized interaction. *Scientific Report* **10**: 10071. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66655-w>
- Ramamoorthy TP. 1984. Typifications in *Salvia* (Lamiaceae). *Taxon* **68**: 322-324.
- Reith M, Zona S. 2016. Nocturnal flowering and pollination of a rare Caribbean sage, *Salvia arborescens* (Lamiaceae). *Neotropical Biodiversity* **2**: 115-123. DOI: <https://doi.org/10.1080/23766808.2016.1230461>
- Smith SD, Kriebel R. 2018. Convergent evolution of floral shape tied to pollinator shifts in Iochrominae (Solanaeae). *Evolution* **72**: 688-697. DOI: <https://doi.org/10.1111/evo.13416>
- Steenhuisen SL, Raguso RA, Johnson SD. 2012. Floral scent in bird- and beetle-pollinated *Protea* species (Proteaceae): chemistry, emission rates and function. *Phytochemistry* **84**: 78-87. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.08.012>
- Weber MG, Cacho NI, Phan MJQ, Disbrow C, Ramirez SR, Strauss SY. 2018. The evolution of floral signals in relation to range overlap in a clade of California jewelflowers (*Streptanthus* s.l.). *Evolution* **72**: 798-807. DOI: <https://doi.org/10.1111/evo.13456>
- Wester P, Claßen-Bockhoff R. 2006. Hummingbird pollination in *Salvia haenkei* (Lamiaceae) lacking the typical lever mechanism. *Plant Systematics and Evolution* **257**: 133-146. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00606-005-0366-9>
- Wester P, Claßen-Bockhoff R. 2007. Floral diversity and pollen transfer mechanisms in bird-pollinated *Salvia* species. *Annals of Botany* **100**: 401-421. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcm264>
- Wester P, Claßen-Bockhoff R. 2011. Pollination syndromes of new world *Salvia* species with special reference to bird pollination. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **98**: 101-156. DOI: <https://doi.org/10.3417/2007035>
- Wester P, Cairampoma L, Haag S, Schramme J, Neumeyer C, Claßen-Bockhoff R. 2020. Bee exclusion in bird-pollinated *Salvia* flowers: The role of flower color versus flower construction. *International Journal of Plant Sciences* **181**: 770-786. DOI: <https://doi.org/10.1086/709132>
- Wright GA, Schiestl FP. 2009. The evolution of floral scent: The influence of olfactory learning by insect pollinators

on the honest signaling of floral rewards. *Functional Ecology* **23**: 841-851. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01627.x>

Zamudio S, Bedolla-García BY. 2017. *Salvia madrigalii* (Lamiaceae), una especie nueva de Michoacán, México. *Brittonia* **70**: 76-83. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12228-017-9491-3>

Zito P, Dötterl S, Sajeve M. 2015. Floral volatiles in a sapromyiophilous plant and their importance in attracting house fly pollinators. *Journal of Chemical Ecology* **41**: 340-349. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10886-015-0568-8>

Editor de sección: Pedro Luis Valverde

Contribuciones de los autores: YMD y ECG concibieron y diseñaron el estudio. LRR y YMD realizaron los análisis por cromatografía de gases. LRR realizó las observaciones de los visitantes florales. YMD, BBG y ECG analizaron los datos y escribieron el manuscrito.

Conflicto de intereses: Los autores declaramos que no existe ningún conflicto de intereses financieros, personales ni en cuanto a la presentación de la información y resultados de este artículo.

Entidades Financiadoras: YMD agradece a CONAHCYT por la beca posdoctoral (No. de beca 769349). EC agradece el apoyo otorgado por la CIC, UMSNH y al ICTI por el proyecto PICIR 013-2022.