



Tesina de Grado - Carrera de Ciencias Biológicas

**Desarrollo comparado de flores de *Salvia guaranitica* A.
St. -Hill. ex Benth. y *Salvia stachydifolia* Benth.**

(Lamiaceae):

**Mecanismos ontogenéticos de diferenciación en especies
con diferentes polinizadores**

Tesinista: Agustín Davies

Firma:

Director: Dr. Santiago Benitez-Vieyra

Firma:



I M B I V

Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (CONICET - UNC) - Laboratorio de
Ecología Evolutiva y Biología Floral

Córdoba, 2022

**Desarrollo comparado de flores de *Salvia guaranitica* A. St. -Hill. ex Benth. y
Salvia stachydifolia Benth. (Lamiaceae): Mecanismos ontogenéticos de
diferenciación en especies con diferentes polinizadores**



Tribunal examinador

Dra. Laura Beatriz Stiefkens

Investigadora UNC
Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal
Profesora Titular
Cátedra de Morfología Vegetal - FCEfYN - UNC

Firma:

Dra. Marcela Moré

Investigadora Adjunta CONICET
Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal

Firma:

Dra. Ana Pía Wiemer

Profesional Adjunta CONICET
Museo Botánico de Córdoba - Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal
Profesora Asistente
Cátedra de Morfología Vegetal - FCEfYN - UNC

Firma:

Calificación final: 10

Fecha: 29/07/2022

“A mi querida abuela, Iris.”

“Evolution is so creative. That’s how we got giraffes.”

Kurt Vonnegut – *A Man Without a Country* (2005)

ÍNDICE

Agradecimientos	1
Resumen	2
1 Introducción	3
2 Objetivos	6
2.1 Objetivo general.....	6
2.2 Objetivos particulares	6
3 Materiales y métodos	6
3.1 Sistema de estudio	6
3.2 Registro de polinizadores	9
3.3 Caracterización de las trayectorias ontogenéticas	9
3.4 Patrones de proliferación celular	10
3.5 Patrones de crecimiento celular	11
4 Resultados	14
4.1 Determinación de los gremios de polinizadores.....	14
4.2 Análisis de la alometría ontogenética.....	15
4.3 Patrones de proliferación y crecimiento celular	16
4.3.1 Número de células.....	16
4.3.2 Tamaño y forma de las células.....	17
5 Discusión	20
6 Conclusiones	25
7 Bibliografía	26

AGRADECIMIENTOS

A Santiago, por brindarme todo el apoyo y acompañamiento necesario durante este proceso. Gracias por el tiempo, la paciencia y todo lo aprendido, pero sobre todo, por la buena onda.

A todo el equipo del Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral, por abrirme sus puertas y por su permanente predisposición para darme una mano. Agradezco especialmente a Matías Baranzelli, por su colaboración con los registros florales, y a Alejandra Trenchi, por su ayuda con la microscopía.

A mis viejos, Gladys y Jorge, por su constante e incansable apoyo. Gracias por todo lo que me han brindado para llegar acá, por su amor incondicional y por siempre creer en mí a pesar de todo.

A toda mi familia, especialmente a mis abuelos Rosa y Remigio, que hoy no están pero me acompañan.

A Karina, mi compañera y sostén para perseverar en este camino y luchar por mis sueños, nuestros sueños. Gracias por tu amor y por cada una de las innumerables cosas que has hecho por mí estos años para que pueda llegar acá.

A mis viejos y queridos amigos del sur, por estar ahí siempre, bancándome y apoyándome. Sus logros me han inspirado para nunca aflojar.

A mis amigos y compañeros en esta hermosa carrera. Por tantos momentos compartidos, de alegría y sufrimiento, y por las incontables veces que me han ayudado para seguir avanzando.

A mis profesores y todos aquellos que contribuyeron a mi formación como biólogo. En especial, a aquellos que generosamente me han abierto sus puertas en diferentes espacios para seguir aprendiendo y me han contagiado su pasión por la Botánica.

Al tribunal de tesina, por su tiempo y sus valiosos comentarios y correcciones.

A la Educación Pública de la Universidad Nacional de Córdoba y todos aquellos que forman parte de la misma.

RESUMEN

La selección mediada por polinizadores es un impulsor importante en la diversificación morfológica de las flores, no obstante, estas variaciones en los caracteres florales también pueden producirse por distintos mecanismos durante el desarrollo. En este trabajo, llevamos a cabo un análisis comparativo del desarrollo de las flores de dos especies cercanas filogenéticamente, pero con diferentes gremios de polinizadores y longitudes contrastantes de sus tubos corolinos: *Salvia guaranitica* A. St.-Hil. ex Benth. y *Salvia stachydifolia* Benth. Para ello, caracterizamos sus trayectorias ontogenéticas y examinamos los patrones de proliferación y crecimiento celular durante la morfogénesis floral. Nuestros resultados muestran que en ambas especies el tubo corolino crece más rápidamente en relación al labio superior de la corola. Por otro lado, las trayectorias ontogenéticas no difieren entre especies, excepto en su extensión. Encontramos que en ambas especies el crecimiento del tubo corolino es explicado por la proliferación celular en etapas tempranas y por el crecimiento anisotrópico de sus células durante todo el desarrollo. Asimismo, las diferencias entre las longitudes contrastantes de sus tubos corolinos son explicadas por el mayor número de células en *S. guaranitica*. Además, encontramos diferencias en el patrón de crecimiento anisotrópico entre las células basales, medias y distales del tubo corolino en ambas especies. Nuestros resultados sugieren que la diferenciación de estas dos especies habría ocurrido por escalamiento ontogenético, es decir, la extensión o reducción de las trayectorias ontogenéticas involucrando mecanismos similares de proliferación y crecimiento celular. En consecuencia, la divergencia adaptativa entre las flores de estas especies pudo haber ocurrido sin cambios significativos en los patrones básicos de desarrollo. Este trabajo pone en relieve los procesos de desarrollo en la evolución floral, y cómo las transiciones entre distintos síndromes florales pueden producirse a través de cambios relativamente simples durante el desarrollo.

Palabras clave: *Salvia*, polinizadores, desarrollo, proliferación celular, crecimiento anisotrópico.

1 | INTRODUCCIÓN

La selección mediada por polinizadores es considerada uno de los impulsores más importantes en la evolución y diversificación morfológica de las plantas con flores (van der Niet & Johnson 2012; Armbruster et al. 2014; van der Niet et al. 2014) y puede resultar en un conjunto de caracteres florales relacionados con grupos de polinizadores específicos, denominados síndromes de polinización (Fenster et al. 2004; Dellinger 2020). Estos caracteres florales especializados permiten establecer relaciones estrechas con ciertos polinizadores, favoreciendo el aislamiento reproductivo y la diversificación (Anderson et al. 2014; Serrano-Serrano 2017; Minnaar et al. 2019). A su vez, los cambios en la morfología de las flores se encuentran comúnmente asociados a transiciones entre grupos diferentes de polinizadores (Smith & Kriebel 2017; Mackin et al. 2021). Si bien los sistemas de polinización tienen una notable influencia en la evolución floral, los mecanismos ontogenéticos también son relevantes en los procesos evolutivos (Klingenberg 1998), dado que modificaciones relativamente simples durante las trayectorias de desarrollo pueden conducir a cambios significativos en la morfología de las flores (De Craene 2018). Por otro lado, también pueden limitar la evolución de ciertos fenotipos florales. De esta forma, el desarrollo floral puede facilitar o restringir las transiciones entre diferentes sistemas de polinización. A pesar de la importancia ecológica y evolutiva de los mecanismos de desarrollo, se conoce poco sobre los procesos que subyacen a los cambios morfológicos asociados a transiciones entre distintos polinizadores.

La evolución se encuentra estrechamente relacionada a la ontogenia, dado que los cambios que ocurren en los procesos de desarrollo pueden producir variaciones en los caracteres florales, y dichas variaciones representan la materia prima para que la evolución ocurra (Gould 1977; Klingenberg 1998). Por otra parte, los cambios vinculados con los procesos de desarrollo también pueden favorecer o restringir la evolución floral en distintas direcciones (Wessinger & Hileman 2016). Para estudiar la conexión entre el desarrollo y la evolución se han utilizado distintos marcos conceptuales. Uno de ellos es la heterocronía, que se define como los

cambios evolutivos en las tasas y tiempos de los procesos de desarrollo (Smith 2003; Buendía-Monreal & Gillmor 2018; De Craene 2018). En un sentido amplio, los cambios heterocrónicos durante el crecimiento de los órganos florales implican cambios en el tiempo relativo de iniciación o terminación de los procesos de desarrollo, y pueden constituir un factor subyacente importante en la diversidad fenotípica de distintos grupos de plantas y en la evolución asociada a la polinización (Kostyun et al. 2017; Chinga et al. 2021; Lovo et al. 2021). Por otro lado, cambios evolutivos en el tamaño y forma durante el desarrollo se manifiestan en los patrones de alometría ontogenética, es decir, la asociación entre tamaño y forma durante el desarrollo (Klingenberg 2016). La alometría difiere fundamentalmente de la heterocronía en que no incluye explícitamente la dimensión temporal en su análisis, y ambos marcos conceptuales se focalizan en los cambios en la ontogenia sin especificar los mecanismos exactos de desarrollo que producen dichos cambios (Klingenberg 2016).

Una vez que se inicia la formación de un órgano floral, comienza el proceso de morfogénesis, durante el cual experimenta cambios en su forma y tamaño a lo largo del tiempo. Los patrones de crecimiento durante este proceso determinan las dimensiones y la forma final de los distintos órganos florales (Shan et al. 2019). Entre los mecanismos celulares básicos que actúan durante la morfogénesis se encuentran la proliferación, expansión y diferenciación de células, y el establecimiento de polaridades en el órgano floral (Harashima & Schnittger 2010; Moyroud & Glover 2017). De todos ellos, la proliferación y expansión celular son considerados los más importantes en el crecimiento de los órganos florales (Walcher-Chevillet & Kramer 2016). Estos procesos y sus interrelaciones durante el crecimiento han sido estudiados en espolones nectaríferos, característicos de algunos géneros como *Pelargonium* (Geraniaceae; Tsai et al. 2018), *Aquilegia* (Ranunculaceae; Puzey et al. 2012; Zhou et al. 2019) y *Linaria* (Plantaginaceae; Cullen et al. 2018). Por otro lado, también se han examinado las variaciones en la longitud de tubos corolinos en *Petunia* (Solanaceae; Stuurman et al. 2004), *Saltugilia* (Polemoniaceae; Landis et al. 2016), *Pedicularis* (Orobanchaceae; Wang & Huang 2017) y más recientemente en *Mimulus* (Phrymaceae; Gurung et al. 2021).

En todos los casos, las contribuciones de cada proceso celular durante el desarrollo de las distintas estructuras florales varían considerablemente, y continúan siendo pocos los taxa donde se hayan evaluado los mecanismos ontogenéticos que subyacen a las variaciones en las longitudes de la corola.

Los linajes evolutivos más diversos y aquellos grupos que poseen caracteres florales especializados son importantes como modelos de estudio para investigar la diversificación floral (Shan et al. 2019). *Salvia* L. es el género más grande de Lamiaceae y uno de los más reconocibles entre las plantas con flores (Drew 2020). Comprende unas 1000 especies de distribución casi cosmopolita, que presentan una enorme diversidad floral, lo que lo convierte en un grupo ideal para poner a prueba hipótesis sobre la evolución de estas estructuras (Drew et al. 2017). Las flores en *Salvia* son vistosas y presentan pétalos fusionados en un espectro que va desde corolas tubulares angostas a corolas fuertemente bilabiadas y abiertas (Kriebel et al. 2020). Más de la mitad de las especies de *Salvia* pertenecen al subgénero *Calosphace*, endémico de América. Las especies dentro de este grupo son particularmente variables en cuanto a su morfología floral y coloración (González-Gallegos et al. 2020). Por otro lado, la mayor parte de las mismas son polinizadas por abejas y en menor medida colibríes, y esta diferencia de los principales grupos de polinizadores se refleja en la morfología floral (Fragoso-Martínez et al. 2018; Benitez-Vieyra et al. 2019; Kriebel et al. 2020).

En este trabajo examinamos dos especies del género con diferentes gremios de polinizadores y longitudes contrastantes de sus tubos corolinos: *Salvia guaranitica* A. St.-Hil. ex Benth. y *Salvia stachydifolia* Benth. Ambas especies pertenecen además al “Clado Sudamericano” dentro de *Calosphace* (Fragoso-Martínez et al. 2018). *Salvia guaranitica* presenta caracteres propios de la polinización por aves (ornitófilos), como tubos corolinos largos, con entradas angostas y sin plataformas (labios inferiores cortos o reflexos) mientras que *S. stachydifolia* presenta caracteres propios de la polinización por abejas (melitófilos), con un labio inferior prolongado que actúa de plataforma y un labio superior que esconde las anteras, junto a un tubo corolino de menor longitud (Wester & Claßen-

Bockhoff 2011; Barrionuevo et al. 2021). En este trabajo proponemos que las diferencias en las longitudes relativas de los tubos corolinos entre estas especies se deben a cambios alométricos en las trayectorias ontogenéticas, debidos a diferencias en los procesos de proliferación y/o crecimiento y elongación celular. Los objetivos son comparar dichas trayectorias e identificar los procesos subyacentes a las distintas morfologías entre *S. guaranítica* y *S. stachydifolia*, analizando el crecimiento del tubo corolino y los procesos celulares involucrados.

2 | OBJETIVOS

2.1 | Objetivo general

Comparar el desarrollo del tubo corolino de *S. guaranítica* y *S. stachydifolia*, dos especies con diferentes gremios de polinizadores.

2.2 | Objetivos particulares

- (1) Determinar los polinizadores de *S. guaranítica* y *S. stachydifolia* a través de bibliografía y el registro de visitas florales.
- (2) Caracterizar las trayectorias ontogenéticas, es decir, el tamaño relativo de los órganos florales en diferentes etapas de desarrollo.
- (3) Medir y comparar el tamaño de las células epidérmicas de los tubos corolinos de ambas especies.
- (4) Contabilizar y comparar la cantidad de células epidérmicas de los tubos corolinos.

3 | MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 | Sistema de estudio

Salvia guaranitica A. St.-Hil. ex Benth. es una especie nativa del sur de Brasil, Paraguay, Uruguay y Argentina. Son arbustos o sufrútices de hasta 2 m. de altura. Presentan flores pediceladas agrupadas en verticilastros de 6-10 flores, reunidos en pseudoracimos terminales laxos, de 10-20 cm. Las flores poseen corola color azul o violeta, de 35-50 mm., tubo corolino de 20-30 mm., pubescente en la mitad superior externa; labio superior de 10-20 mm., cóncavo, emarginado; labio inferior de 7-18 mm., trilobado (O'Leary & Moroni 2016; **Figura 1a**).

Salvia stachydifolia Benth. es una especie que se distribuye en Bolivia y el noroeste de la Argentina. Son sufrútices de hasta 2,5 m. de alto. Presentan flores pediceladas agrupadas en verticilastros de 6-12 flores reunidos en pseudoracimos terminales densos, de 15-20 cm. Poseen corola de color azul-violeta, de 13-25 mm., tubo giboso en el dorso, pubescente en la mitad superior dorsal, de 12 mm.; labio superior de 7 mm., cóncavo, emarginado, pubescente; labio inferior glabro de 9 mm., habitualmente con una mácula blanca (O'Leary & Moroni 2016; **Figura 1b**).

Para llevar a cabo este estudio, examinamos los pimpollos y flores en inflorescencias colectadas pertenecientes a 10 individuos de cada especie y conservadas en medios con etanol 70% y/o FAA (formol, alcohol etílico y ácido acético). Las muestras de flores y pimpollos de *S. stachydifolia* que utilizamos en este trabajo provienen originalmente de poblaciones silvestres localizadas en Tafí del Valle (Tucumán), que fueron cultivadas en el umbráculo del Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (Córdoba). Por su parte, las muestras de *S. guaranitica* provienen de cultivos en el mismo instituto y distintas poblaciones naturalizadas cercanas a la ciudad de Córdoba (Río Ceballos, La Calera y Agua de Oro). En todos los casos, se procuró que cada muestra proviniera de un individuo genéticamente diferente. En el caso de *S. stachydifolia*, los individuos pertenecen a diferentes familias clonales, las cuales a su vez provienen de diferentes individuos colectados en el campo. En el caso de *S. guaranitica*, debido a que esta especie puede multiplicarse de forma asexual mediante rizomas, las muestras fueron colectadas en diferentes poblaciones, o bien en individuos localizados al menos con 10 m de distancia, en el caso de provenir de la misma población.



Figura 1 | Sistema de estudio: a) *Salvia guaranitica* polinizada por *Heliomaster furcifer* (Shaw, 1812) (Río Ceballos, Córdoba); b) *Salvia stachydifolia* polinizada por *Anthophora paranaensis* (Holmberg, 1903) (Tafí del Valle, Tucumán) [Fotografías: S. Benitez-Vieyra].

3.2 | Registro de polinizadores

Para constatar la identidad de los gremios de polinizadores de ambas especies, llevamos a cabo una revisión bibliográfica exhaustiva y realizamos observaciones a campo en diferentes momentos de la época de floración. En el caso de *S. stachydifolia* contamos con datos aportados por observaciones realizadas en trabajos anteriores en la misma población de donde provienen las plantas cultivadas donde se colectó el material vegetal (Barrionuevo et al. 2021). Para *S. guaranítica*, si bien es considerada una planta polinizada por colibríes (Wester & Claßen-Bockhoff 2011), no cuenta con registros sistemáticos de sus polinizadores. Por ello, registramos la tasa de visitas (número de visitas · número de flores⁻¹ · minutos⁻¹) durante 21 períodos de media hora entre las 7:00 h. y las 19:00 h., durante el verano y el otoño 2021/2022 en poblaciones naturalizadas en las ciudades de Salsipuedes y Río Ceballos (Córdoba).

3.3 | Caracterización de las trayectorias ontogenéticas

Para analizar las trayectorias ontogenéticas colectamos 100 pimpollos de distintos tamaños y flores desplegadas por especie (diez por individuo; nueve pimpollos y una flor desplegada) que se conservaron en etanol 70% hasta su medición. En el caso de los pimpollos de *S. stachydifolia*, se conoce que experimentan un crecimiento explosivo antes de su apertura (C. Barrionuevo com. pers.) por lo que el muestreo que realizamos no incluyó pimpollos en esa etapa por la brevedad de su duración. Para llevar a cabo las mediciones y poder realizar las comparaciones entre los pimpollos y las flores, tomamos fotografías de los mismos junto a una escala de referencia, utilizando una lupa con cámara digital (Leica M420 con cámara Sony CCD Iris) y una cámara réflex (Nikon D90 con lente Micro Nikkor 105 mm) adosada a un soporte vertical para las muestras de mayor tamaño. En cada uno de los pimpollos y flores desplegadas, medimos las siguientes dimensiones: largo del tubo corolino (LTC) y largo del labio superior de la corola (LLS). Debido a que el labio inferior de la corola se encuentra replegado dentro del pimpollo, no se lograron tomar las dimensiones del mismo. Las mediciones se

realizaron sobre las fotografías digitales utilizando el software ImageJ 1.53e (Rasband 1997).

Las trayectorias ontogenéticas se estimaron como las rectas de regresión entre el logaritmo natural del largo del tubo corolino en función del logaritmo natural del largo del labio superior de la corola (Huxley 1932; Klingenberg 2016), obtenidas mediante modelos lineales mixtos a través de la función *lmer* del paquete *lme4* v.1.1-30 (Bates et al. 2015). En estos modelos, la especie se introdujo como factor fijo y el individuo como factor aleatorio. Se utilizó el criterio de información bayesiano (BIC) para elegir la mejor estructura aleatoria. Por otra parte, para determinar si las trayectorias ontogenéticas difieren entre *S. guaranítica* y *S. stachydifolia*, comparamos mediante una prueba de cociente de verosimilitudes un modelo con interacción entre la especie y las variables morfológicas y un modelo solo con términos aditivos. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en R (R Core Team 2022).

3.4 | Patrones de proliferación celular

Para analizar los patrones de proliferación celular durante el desarrollo del tubo corolino, colectamos cuatro pimpollos de diferentes tamaños y una flor desplegada en cinco individuos por especie (n=25 por especie) que se conservaron en FAA hasta su medición. Los pimpollos y las flores fueron disectados bajo lupa de tal manera que quedara expuesto el lado dorsal externo del tubo corolino para poder observar las células epidérmicas abaxiales. Se realizaron coloraciones simples aplicando safranina al 1% sobre el material disectado durante aproximadamente 1 minuto. Posteriormente se lavó el material con alcohol 70% y se montaron los preparados sobre portaobjetos utilizando glicerina. Las mediciones se llevaron a cabo sobre fotografías digitales tomadas con microscopio óptico (Zeiss Axiophot con cámara Leica DFC300 FX) utilizando el software ImageJ 1.53e (Rasband 1997) y fotografías de un portaobjetos graduado (divisiones de 0.01 mm) tomadas a diferentes aumentos como escala de referencia. Para poder medir la longitud aproximada del tubo corolino y contar el número de células en toda su extensión, se tomaron series de fotografías superpuestas a lo largo de los preparados

histológicos que fueron ensambladas empleando el software GIMP 2.10.28 (The GIMP Development Team 2019) para obtener las imágenes panorámicas de los pimpollos y flores desplegadas que fueron utilizadas para examinar los procesos celulares (**Figura 3: a y b**).

Para determinar el número de células (NC) a lo largo de los tubos corolinos, seleccionamos para cada uno de los pimpollos y flores desplegadas una fila de células epidérmicas ubicadas sobre el haz vascular del filamento del estambre, que se encuentra inserto en la corola y se ubica próximo a la comisura entre el labio superior e inferior de la misma (**Figura 2; Figura 3: a y b**). Las células fueron contabilizadas utilizando el plug-in “Cell Counter” de Image J, siguiendo la fila desde la base del tubo corolino hasta la sitio de inserción del estambre en la corola. La longitud base-inserción del estambre (LBI) fue utilizada como medida estandarizada del tamaño de los pimpollos y flores desplegadas. Esta fue determinada utilizando como referencia el haz vascular desde la base de la corola hasta el sitio donde el filamento del estambre se separa de la corola (**Figura 3: a y b**). Para caracterizar los patrones de proliferación celular estimamos la relación entre el número de células y el logaritmo de la longitud base-inserción del estambre utilizando modelos aditivos generalizados mixtos utilizando el paquete de R *gamm4* (Wood et al. 2017), donde la especie se introdujo como factor fijo y el individuo como factor aleatorio. Se utilizó estructura de errores Poisson, ya que la variable respuesta era un conteo. Se consideró como mejor modelo aquel con menor valor del criterio de selección de suavidad, obtenido mediante validación cruzada (“*minimized value of the smoothness selection criterion*” utilizando el paquete *gamm4* 4 v.0.2-6).

3.5 | Patrones de crecimiento celular

En las mismas muestras utilizadas en la sección anterior, examinamos el tamaño de las células durante el desarrollo del tubo corolino. Para ello, seleccionamos al azar en cada pimpollo y en las flores desplegadas 15 células epidérmicas ubicadas sobre el haz vascular del filamento del estambre (375 células en total por especie). Las 15 réplicas fueron medidas sobre las regiones basal,

media y distal del tubo corolino (cinco células contiguas por cada región) (**Figura 2**). Para cada célula medimos el largo (L) y ancho (W). El largo de las células fue medido como la distancia entre las paredes celulares paralela al eje longitudinal del haz vascular del filamento del estambre, mientras que el ancho se midió como la distancia perpendicular al eje longitudinal. Además, caracterizamos visualmente la forma de las células para detectar aquellas con formas de “puzzle” (como las observadas en Landis et al. 2016). Para caracterizar los patrones de crecimiento celular estimamos las relaciones entre el logaritmo de la longitud base-inserción del estambre y a) el largo de las células; b) el ancho de las células y c) la razón largo/ancho de las células. Se utilizaron modelos aditivos generales mixtos utilizando el paquete de R *gamm4* v.0.2-6 (Wood et al. 2017), donde la especie y la región se introdujeron como factores fijos y el individuo como factor aleatorio. Se consideró como mejor modelo aquel con menor valor del criterio de selección de suavidad (“*minimized value of the smoothness selection criterion*” en *gamm4*). Los gráficos para las trayectorias de desarrollo y los procesos celulares fueron generados con el paquete de R *ggplot2* v.3.2.1 (Wickham et al. 2016).

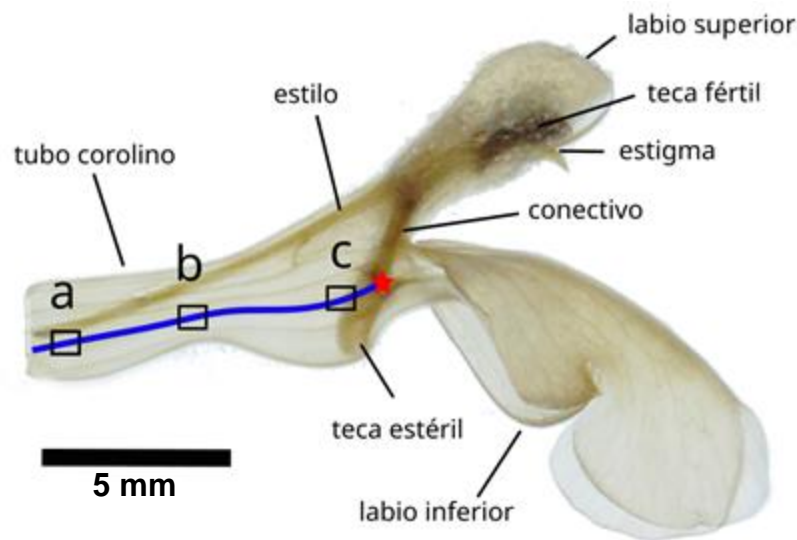


Figura 2 | Esquema de las partes de una flor desplegada de *S. stachydifolia*. La línea azul representa la ubicación del haz vascular del filamento del estambre. La estrella roja es el sitio de inserción del filamento del estambre en la corola. Los cuadrados a, b y c representan los sitios donde se midieron las células de las regiones basal, media y distal, respectivamente.

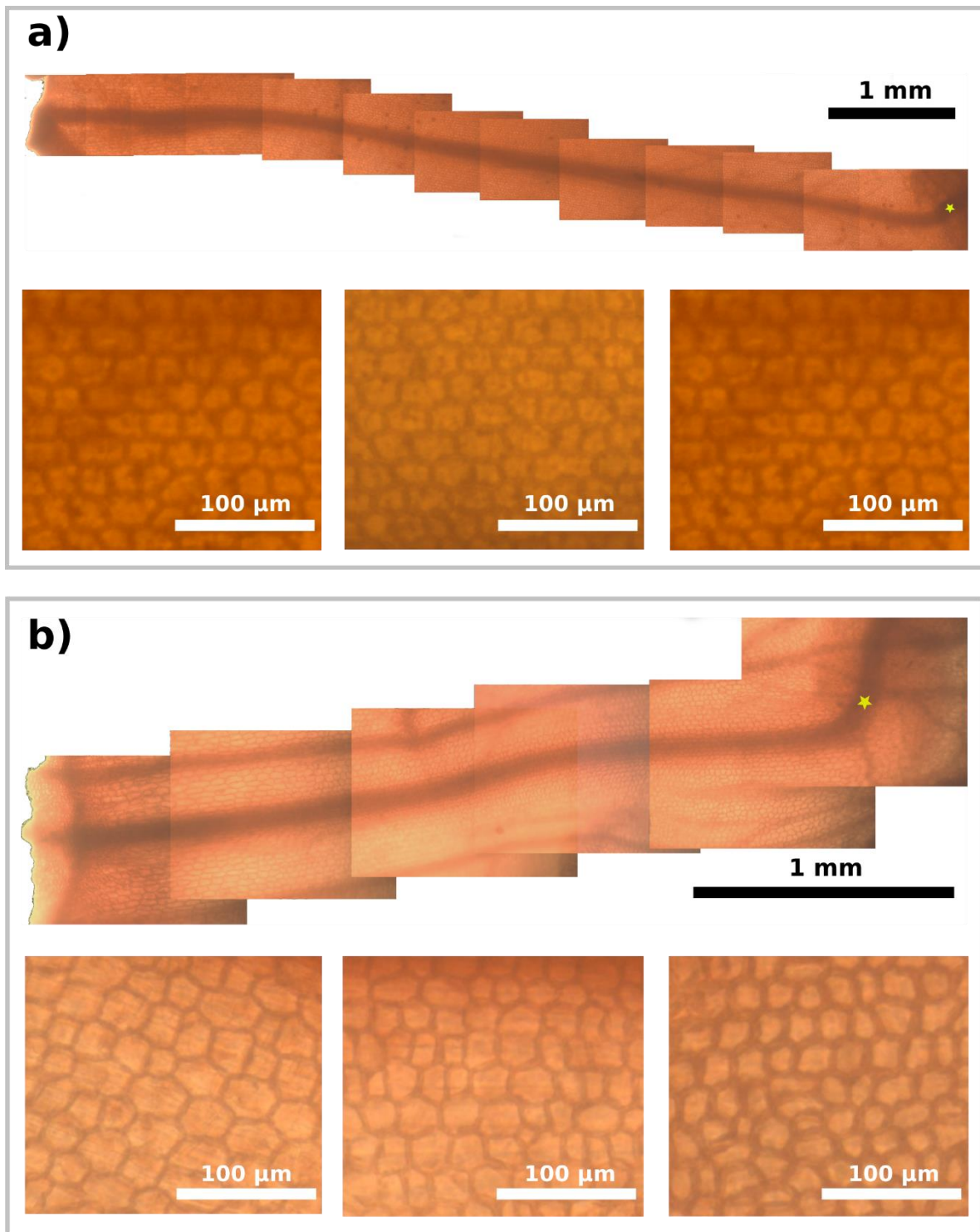


Figura 3 | Células epidérmicas del tubo corolino en pimpollos de a) *S. guaranitica* y b) *S. stachydifolia*. La imagen superior de cada panel es la imagen panorámica de los tubos corolinos. La estrella amarilla marca el sitio de inserción del estambre en la corola. Las imágenes inferiores izquierda, centro y derecha en cada panel representan las células en las regiones basal, media y distal de los tubos corolinos, respectivamente.

4 | RESULTADOS

4.1 | Determinación de los gremios de polinizadores

Los trabajos realizados sobre polinización en distintas especies de *Salvia* y, particularmente en *S. guaranítica*, indican que la especie es polinizada principalmente por colibríes, en base a sus caracteres florales (Wester & Claßen-Bockhoff 2007, 2011), pero estas autoras no proveen registros sistemáticos de visitantes florales para esta especie. Nuestros resultados muestran que *S. guaranítica* es polinizada exclusivamente por distintas especies de colibríes en poblaciones naturalizadas de la provincia de Córdoba, y que las especies de polinizadores varían en su presencia en distintas épocas de floración (**Figura 1a; Tabla 1**). *Salvia stachydifolia* posee características propias de la polinización por abejas (Wester & Claßen-Bockhoff 2011). Trabajos más recientes también indican que la especie es polinizada principalmente por este gremio en la población de donde proviene el material colectado (Barrionuevo et al. 2021), siendo los principales polinizadores *Bombus opifex* y *Anthophora paranaensis* (**Figura 1b**), aunque también se registraron visitas del colibrí *Sappho sparganura*.

Visitantes florales	Verano 2021/2022		Otoño 2022	
	Visitas · flor ⁻¹ · h ⁻¹ (± D.E.)	Porcentaje de visitas	Visitas · flor ⁻¹ · h ⁻¹ (± D.E.)	Porcentaje de visitas
<i>Sappho sparganura</i>	0	0	0,191 ± 0,378	67,98%
<i>Chlorostilbon lucidus</i>	0,182 ± 0,445	17,79%	0,007 ± 0,280	2,56%
<i>Heliomaster furcifer</i>	0,840 ± 0,437	82,21%	0,083 ± 0,221	29,46%

Tabla 1 | Tasas de visitas florales de tres especies de colibríes en poblaciones naturalizadas de *S. guaranítica* en Río Ceballos y Salsipuedes (Córdoba).

4.2 | Análisis de la alometría ontogenética

En la madurez, la longitud total del tubo corolino y el labio superior de la corola (\pm d.e, $n = 10$) de *S. guaranitica* fue de $25,179 \pm 2,716$ mm y $15,253 \pm 1,781$ mm, respectivamente. Para *S. stachydifolia* estas longitudes fueron de $9,682 \pm 0,617$ mm y $6,086 \pm 0,367$ mm ($n = 10$), respectivamente. Encontramos que tanto la pendiente como la ordenada al origen de las trayectorias ontogenéticas no difieren significativamente entre las especies (test de cociente de verosimilitud; $\chi^2 = 0,604$; $P = 0,437$; **Figura 4**), lo que indica que los patrones encontrados para el crecimiento del tubo corolino y el labio superior de la corola son esencialmente idénticos entre las dos especies. A su vez, observamos que la pendiente de la trayectoria ontogenética de ambas especies presenta un valor mayor a 1 ($\beta_1 \pm$ e.e. = $1,050 \pm 0,013$), lo que indica que las tasas de crecimiento del tubo corolino son ligeramente mayores que la del labio superior de la corola. Por otra parte, encontramos que la trayectoria ontogenética de *S. guaranitica* se prolonga en relación a la trayectoria de *S. stachydifolia* (**Figura 4**).

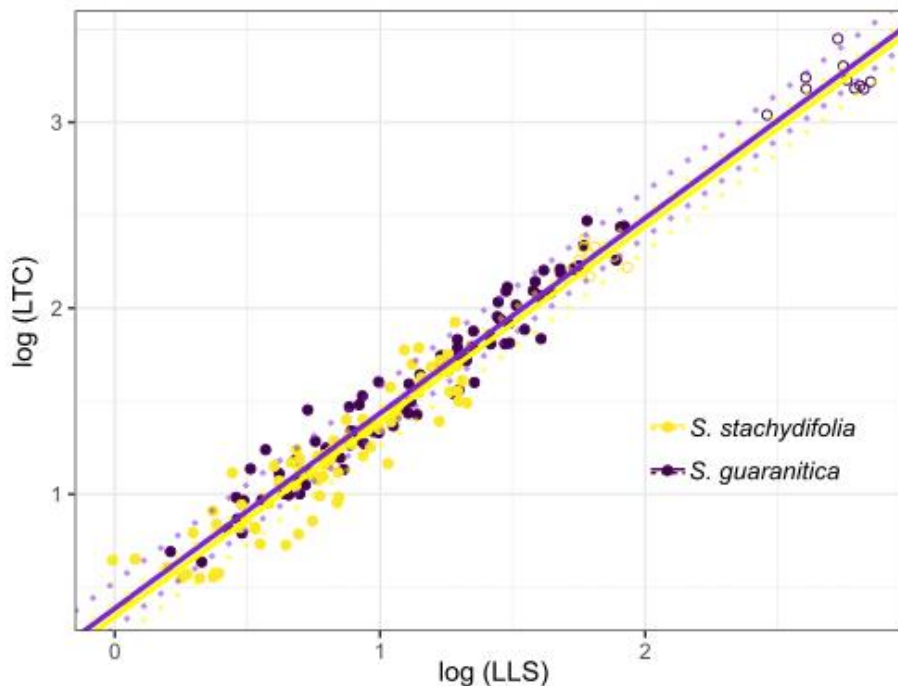


Figura 4 | Alometría bivariada entre el logaritmo natural del largo del tubo corolino (LTC) y el logaritmo natural del largo del labio superior de la corola (LLS) en *S. guaranitica* y *S. stachydifolia*. Los círculos rellenos indican mediciones sobre pimpollos y los vacíos mediciones sobre flores desplegadas. Las líneas continuas indican las rectas de regresión obtenidas mediante un modelo lineal general mixto. Las líneas punteadas corresponden a los valores máximos y mínimos de los efectos aleatorios sobre las rectas de regresión.

4.3 | Patrones de proliferación y crecimiento celular

4.3.1 | Número de células

Encontramos marcadas diferencias en el número de células epidérmicas de los tubos corolinos entre las especies. Por un lado, el número de células en *S. guaranítica* fue siempre mayor al número de células presentes en *S. stachydifolia* en todos los estadios de desarrollo de los tubos corolinos. En las flores desplegadas, el número promedio de células presentes en *S. guaranítica* fue de $253,8 \pm 21,6$, mientras que en *S. stachydifolia* fue de $107,8 \pm 6,9$ células. Por otra parte, el incremento en el número de células durante el desarrollo es significativamente mayor en *S. guaranítica*, donde encontramos un aumento de hasta aproximadamente 100 células entre los pimpollos de estadios tempranos y las flores desplegadas, mientras que en *S. stachydifolia* este aumento fue de hasta aproximadamente 40 células. En ambas especies se observa que el incremento en

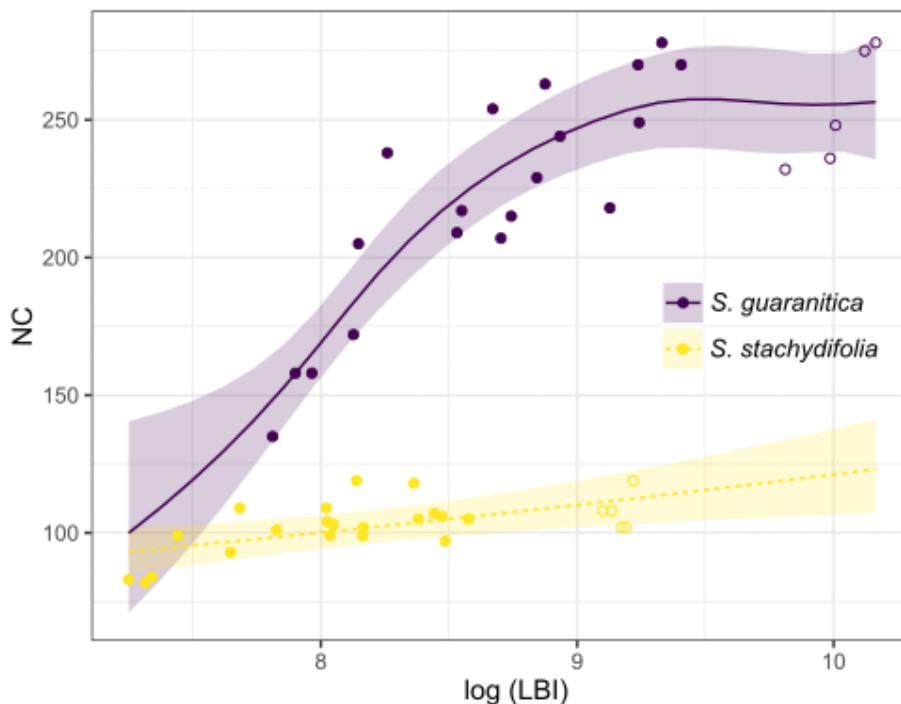


Figura 5 | Número de células (NC) en relación al logaritmo de la longitud base-inserción (LBI) del estambre en el tubo corolino en *Salvia guaranítica* y *S. stachydifolia*. Los círculos rellenos indican mediciones sobre pimpollos y los vacíos mediciones sobre flores desplegadas. Las líneas indican las curvas ajustadas mediante modelos aditivos generalizados mixtos con estructura de errores Poisson. Las áreas sombreadas corresponden a ± 1 E. E. Bayesiano.

el número de células se produce principalmente durante los estadios tempranos, deteniéndose hacia los estadios finales. Sin embargo, en *S. guaranitica* se observa proliferación hasta que se alcanza aproximadamente la mitad de la longitud final del tubo corolino, mientras que en *S. stachydifolia* este proceso se detiene a una longitud menor (**Figura 5**).

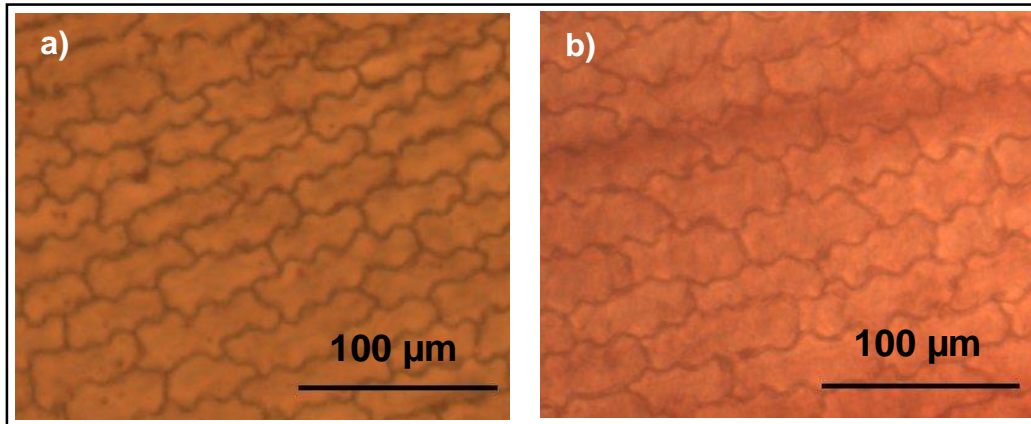


Figura 6 | Células epidérmicas en forma de “puzzle” en a) *S. stachydifolia* y b) *S. guaranitica*.

4.3.2 | Tamaño y forma de las células

Observamos en ambas especies la presencia de células en forma de “puzzle”, principalmente en los capullos más avanzados y las flores desplegadas. Además, estas células se encontraron ubicadas predominantemente en la región distal del tubo corolino (**Figura 6**). Por otra parte, encontramos diferencias en la longitud de las células entre las especies y entre las distintas regiones del tubo corolino en cada especie. Por un lado, observamos que las células basales, medias y distales presentan una mayor longitud en *S. stachydifolia* en comparación con las células en *S. guaranitica* durante la mayor parte del desarrollo. Asimismo, en las flores desplegadas la longitud de las células de las distintas regiones es similar entre las especies. En *S. stachydifolia* las células basales presentan una mayor longitud que las células medias y distales durante todo el desarrollo. Por otro lado, los patrones encontrados para el incremento en longitud son similares entre las células de las distintas regiones del tubo corolino. En *S. guaranitica*, se observa el mismo

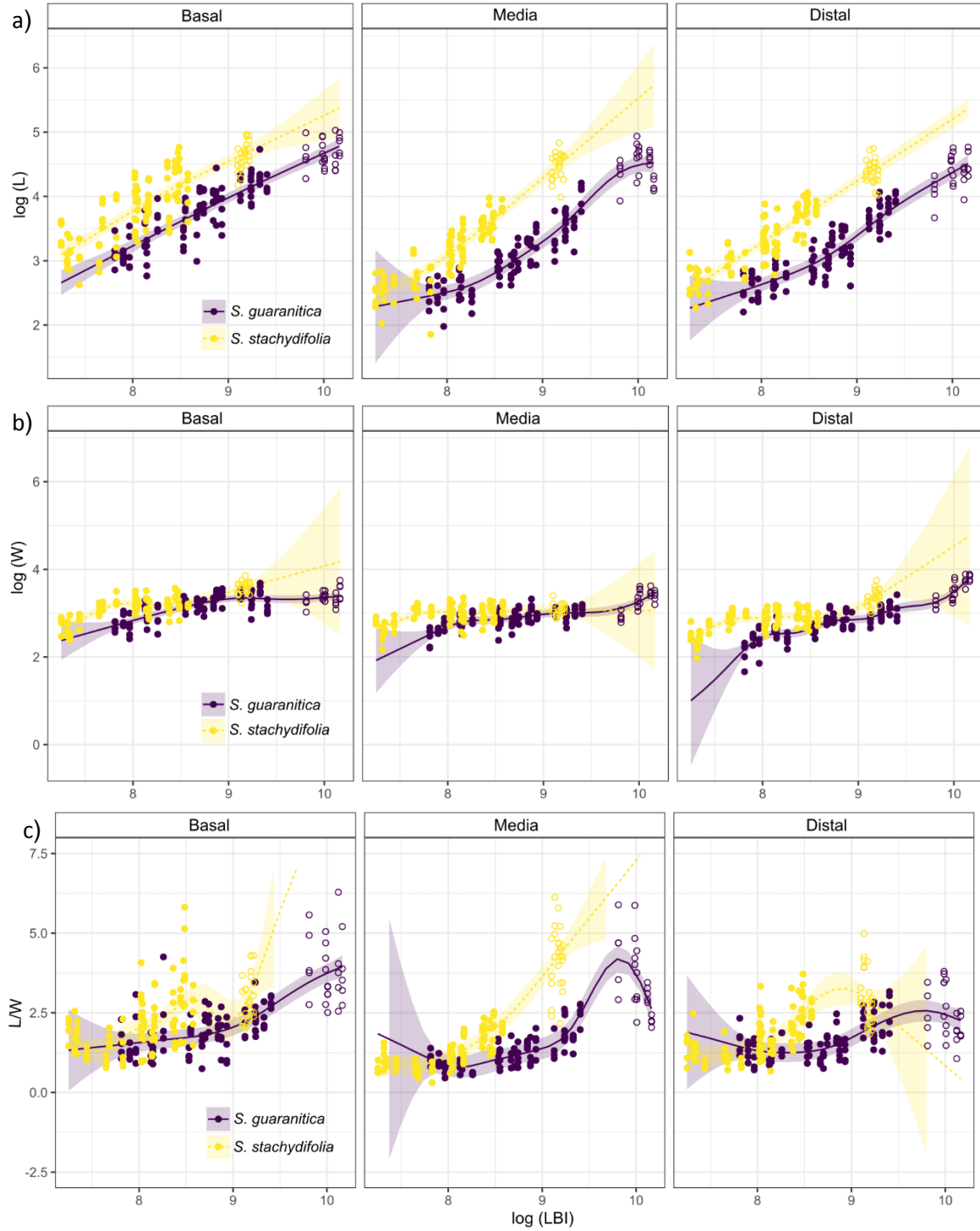


Figura 7 | Relación entre el logaritmo del a) largo (L), b) ancho (W), y c) proporción largo/ancho (L/W) de las células epidérmicas y el logaritmo de la longitud base-inserción (LBI) en las regiones basal, media y distal del tubo corolino de *S. guaranitica* y *S. stachydifolia*. Los círculos rellenos indican mediciones sobre pimpollos y los vacíos mediciones sobre flores desplegadas. Las líneas indican las curvas ajustadas mediante modelos aditivos generales mixtos. Las áreas sombreadas corresponden a ± 1 E. Bayesiano.

patrón, donde las células basales tienen una longitud mayor que las células medias y distales durante todo desarrollo. Por otro lado, el incremento en longitud de las células basales es constante durante el crecimiento, mientras que las células medias y distales, se elongan más lentamente en los primeros estadios que en los estadios medios y finales (**Figura 7a**).

Con respecto al ancho de las células, observamos en ambas especies que el incremento de esta dimensión durante el desarrollo es considerablemente menor al crecimiento en longitud. Asimismo, encontramos diferencias en el ancho de las células entre las especies y entre las distintas regiones del tubo corolino en cada especie. Observamos que las células basales, medias y distales en *S. stachydifolia* son más anchas en comparación a las células de *S. guaranitica* durante la mayor parte del desarrollo. En *S. stachydifolia*, observamos un incremento en el ancho de las células de todas las regiones en los estadios tempranos, que se detiene en estadios intermedios y se reanuda hacia el final del desarrollo excepto en las células de la región media. En *S. guaranitica*, el patrón de incremento en ancho es similar entre las regiones, excepto en las células distales, donde hay un incremento casi continuo y más pronunciado hacia el final (**Figura 7b**).

La relación entre el largo y ancho de las células epidérmicas (L/W) permite determinar tanto la variación en la forma como la anisotropía, es decir, el crecimiento desigual de estas dimensiones celulares. En general en ambas especies encontramos un incremento de la anisotropía a lo largo de la trayectoria ontogenética, a partir de células casi isotrópicas (relación largo/ancho cercana a 1) y culminando en células anisotrópicas notablemente elongadas (relación largo/ancho > 1). Encontramos diferencias en el crecimiento anisotrópico entre las especies y entre las distintas regiones en cada especie. Durante la mayor parte del desarrollo, la elongación celular en *S. stachydifolia* es mayor que en *S. guaranitica*. En *S. stachydifolia*, no observamos cambios en la forma celular en las distintas regiones del tubo corolino durante los primeros estadios de desarrollo. A partir de estadios intermedios y tardíos observamos una marcada elongación anisotrópica de las células. Hacia el final del desarrollo, las células distales cesaron su elongación,

mientras que en las flores desplegadas las células medias obtuvieron formas más elongadas que las células basales y distales. En *S. guaranítica*, observamos que las células medias y distales presentaron un acortamiento durante los primeros estadios de desarrollo, mientras que las basales se elongaron. En estadios intermedios y tardíos las células de las distintas regiones comienzan a elongarse, y hacia el final las células distales se acortan y las células medias cesan su elongación. En las flores desplegadas, las células basales resultaron más elongadas que las células medias y distales (**Figura 7c**).

5 | DISCUSIÓN

Salvia subg. *Calosphace* ha generado un considerable interés biológico por su importancia medicinal (Jenks & Kim 2013; Ortiz-Mendoza et al. 2022), su riqueza y distribución (González-Gallego et al. 2020), su compleja taxonomía y sus distintos sistemas de polinización y las transiciones evolutivas entre ellos (Wester & Claßen-Bockhoff 2011; Benitez-Vieyra et al. 2014, 2019; Fragoso-Martínez et al. 2017, 2018; Strelin et al. 2017; Kriebel et al. 2019, 2020; Olvera-Mendoza et al. 2020; Lara-Cabrera et al. 2021). Especialmente, existe en este grupo una importante diversidad floral (Kriebel et al. 2019, 2020) que hasta ahora no había sido abordada desde una perspectiva ontogenética. En este estudio, utilizamos por primera vez un enfoque evo-devo comparativo para analizar el desarrollo de las flores de dos especies con diferentes síndromes de polinización y los procesos celulares involucrados en el mismo. Encontramos que las flores de *S. guaranítica* y *S. stachydifolia* poseen un patrón de desarrollo común, dado que las trayectorias ontogenéticas no difieren entre sí, excepto en su extensión. Es decir, las diferencias entre sus trayectorias corresponden a un escalamiento ontogenético (Klingenberg 1998). Por otra parte, las diferencias contrastantes en la longitud de sus tubos corolinos se explican principalmente por una mayor proliferación celular en *S. guaranítica*, mientras que el crecimiento anisotrópico contribuye en mayor medida a la longitud final de estas estructuras, particularmente en *S. stachydifolia*. Estos

resultados sugieren que cambios sencillos en los mecanismos de desarrollo tienen un gran impacto en la morfología floral adulta y en la diferenciación entre distintos síndromes florales asociados a cambios entre polinizadores.

Al examinar las trayectorias ontogenéticas de *S. guaranitica* y *S. stachydifolia*, las pendientes observadas en el análisis de alometría comparada se encontraron levemente por sobre el valor de uno. Este patrón de crecimiento alométrico indica que las proporciones relativas entre la longitud del tubo corolino y la longitud del labio superior de la corola cambian a medida que aumenta el tamaño de la flor. Esta pequeña diferencia en la tasa de crecimiento del tubo corolino determina su mayor longitud observada en las flores desplegadas con respecto al labio superior de la corola. Asimismo, la comparación de las trayectorias ontogenéticas de *S. guaranitica* y *S. stachydifolia* puede reflejar cambios evolutivos entre estos linajes, ya que estas especies son cercanas filogenéticamente (Fragoso-Martínez et al. 2018), perteneciendo al “Clado Sudamericano”, caracterizado por incluir tanto especies polinizadas por insectos como especies polinizadas por colibríes, y algunas de polinización mixta. Nuestros resultados sugieren que la evolución y transición entre los distintos síndromes presentes en estas especies podría ocurrir por escalamiento ontogenético, un mecanismo que involucra la extensión o truncamiento de las trayectorias ancestrales, manteniendo las asociaciones ancestrales entre los caracteres medidos (Klingenberg 1998, 2016). En este sentido, la divergencia adaptativa entre las flores de estas especies pudo haber ocurrido sin cambios significativos en los patrones básicos de desarrollo a través de este mecanismo.

Por otra parte, cuando analizamos las trayectorias ontogenéticas y los patrones de división y elongación celular, encontramos en nuestros resultados vacíos en los datos, que correspondían a estadios de las etapas finales de desarrollo del tubo corolino para ambas especies. Sobre la base de observaciones realizadas en *S. stachydifolia* por Barrionuevo C. (Comun. Pers.) hipotetizamos que *S. guaranitica* también presenta un crecimiento explosivo previo a la apertura de la flor, de forma que no fue posible coleccionar pimpollos que representaran estos

estadios. Asimismo, en relación a los caracteres macroscópicos medidos, creemos que puede ser importante en otros estudios la consideración del labio inferior de la corola, dado que su expansión puede estar relacionada a la polinización por abejas en las flores bilabiadas (Fenster et al. 2004; Westerkamp & Claßen-Bockhoff 2007), y que existen diferencias marcadas en la longitud y forma del labio inferior de la corola entre *S. guaranitica* y *S. stachydifolia*, que no fueron abordadas en este estudio.

Típicamente, el desarrollo de la corola presenta un patrón de crecimiento en dos fases: una primera etapa de proliferación celular (acoplado a crecimiento celular) seguido de un proceso de expansión celular (sin división celular) en etapas posteriores (Hepworth & Leonard 2014). Este patrón de crecimiento se ha observado, por ejemplo, en estructuras corolinas como los espolones nectaríferos presentes en *Centranthus ruber* (Mack & Davis 2015) y *Aquilegia* (Puzey et al. 2012; Han et al. 2022). Nuestros resultados indican que tanto la proliferación como la elongación celular por crecimiento anisotrópico están involucrados en la extensión de los tubos corolinos de *S. guaranitica* y *S. stachydifolia*, y que sus contribuciones varían durante del desarrollo siguiendo el patrón mencionado. En ambas especies, la ocurrencia de proliferación celular es predominante en las primeras etapas, mientras que el crecimiento anisotrópico y la consecuente elongación celular son prácticamente constantes durante todo el desarrollo, pero se acentúan en las etapas finales de crecimiento, cuando la proliferación celular cesa. No obstante, las contribuciones de cada proceso celular en las variaciones interespecíficas en la longitud de distintas estructuras corolinas pueden diferir entre diferentes linajes. En espolones nectaríferos de *Pedicularis* (Wang & Huang 2017) y *Pelargonium* (Tsai et al. 2017), corolas de *Saltugilia* (Landis et al. 2016) y tubos corolinos en *Mimulus* (Gurung et al. 2021) ambos procesos de proliferación y elongación celular contribuyen a las diferencias presentes entre las especies. En este sentido, dado que la longitud de las células y sus patrones crecimiento anisotrópico no difieren significativamente entre las especies, mientras que el número de células en *S. guaranitica* es siempre mayor durante el desarrollo y casi el doble en las flores desplegadas que en *S. stachydifolia*, nuestros resultados sugieren que las

diferencias en la longitud de los tubos corolinos es atribuible principalmente al proceso de proliferación celular. Incluso, en *S. stachydifolia* las células presentaron un mayor tamaño durante la mayor parte del desarrollo en comparación con *S. guaranítica*. Además, la proliferación celular observada en *S. guaranítica* se produce hasta alcanzar aproximadamente la mitad de la longitud final del tubo corolino, mientras que en *S. stachydifolia* cesa bastante antes de alcanzar la mitad de su tamaño final. Por lo tanto, el cambio evolutivo más significativo que puede explicar las contrastantes longitudes de los tubos corolinos entre estas especies es la extensión de la fase de proliferación celular en *S. guaranítica*. Estos resultados coinciden con los encontrados en *Linaria* (Cullen et al. 2018) donde este proceso explica las diferencias contrastantes en la longitud de espolones entre dos especies cercanas filogenéticamente. Por otro lado, nuestras observaciones también sugieren que las diferencias interespecíficas en el número de células parecen surgir tempranamente en el desarrollo, dado que todos los capullos de menor tamaño de *S. guaranítica* tienen un número mayor de células que *S. stachydifolia*, incluso si se comparan capullos de las especies con el mismo tamaño, y por otro lado, porque el proceso de proliferación celular es evidente durante las primeras etapas de crecimiento. Como ya mencionamos, la proliferación celular en *S. guaranítica* se extiende hasta alcanzar aproximadamente la mitad de la longitud final del tubo corolino, lo cual sugiere también que este proceso puede tener una mayor duración en esta especie con respecto a *S. stachydifolia*. No obstante, nuestros resultados no incorporan la dimensión temporal por lo que, en este sentido, se necesitan incorporar mediciones diarias durante el crecimiento para poder explorar y detectar cambios heterocrónicos en estas especies.

Si bien las diferencias en el número de células parecen explicar las diferencias interespecíficas, en *S. stachydifolia* la extensión del tubo corolino se consigue principalmente por elongación celular, mientras que en *S. guaranítica* este proceso es importante en las etapas finales de su desarrollo. Por un lado, el incremento observado en la longitud de las células epidérmicas fue mucho más significativo que el incremento en el ancho para las dos especies, que se hace evidente en los patrones de crecimiento anisotrópico celular obtenidos. Además, la

elongación celular se manifiesta durante todo el crecimiento, especialmente donde se observa un mayor incremento en la longitud de los tubos corolinos, particularmente en *S. stachydifolia*. Estos resultados coinciden con los patrones encontrados en espolones de *Aquilegia* (Puzey et al. 2012) y *Linaria vulgaris* (Box et al. 2011), o también en tubos corolinos de *Pedicularis* (Wang & Huang 2017), donde la mayor parte de la longitud final de estas estructuras se consigue por crecimiento anisotrópico. Por otro lado, la rápida extensión de los tubos corolinos observada en ambas especies sobre el final de su desarrollo, es consecuencia de un rápido evento de elongación celular, puesto que la proliferación celular cesa bastante antes de alcanzar esta etapa. Además, encontramos que las células basales presentan una mayor longitud que las células medias y distales en ambas especies. Estos resultados coinciden con los observados en *Petunia* (Stuurman et al. 2004) donde también encuentran un mayor tamaño celular en la base de la corola.

Las células en forma de “puzzle” se encuentran en tubos corolinos de muchas familias de angiospermas (Kay 1981) y también se han encontrado en estudios similares sobre el desarrollo de estructuras corolinas en *Aquilegia* (Puzey et al. 2012) y *Centranthus ruber* (Mack & Davis 2015). Detectamos en ambas especies la presencia de este tipo de células en la epidermis del tubo corolino, principalmente en los pimpollos de mayor tamaño y las flores maduras, y ubicadas predominantemente en la región distal. Estas observaciones son similares a las realizadas en *Saltugilia* (Landis et al. 2016) donde se encontraron estas células predominantemente en las flores desplegadas. Según Landis (2016) estas células pueden ser importantes para la expansión rápida de los pétalos. En nuestros resultados, la aparición de este tipo de células coincide con los últimos estadios de desarrollo y el crecimiento explosivo encontrado en esta etapa, por lo que también podrían cumplir un rol importante en este último proceso de rápida extensión de los tubos corolinos.

Se han reportado numerosas transiciones entre estrategias de polinización en distintos grupos de angiospermas. La transición más frecuente en las Américas

es la que involucra la evolución desde la polinización por himenópteros hacia la polinización por colibríes (van der Niet & Johnson, 2012; Rosas-Guerrero et al. 2014). Estas transiciones implican generalmente cambios morfológicos en la corola, desde más anchas y cortas hacia corolas más alargadas y angostas. En *Salvia*, la polinización por colibríes y la exclusión de abejas por las flores, es lograda limitando el acceso al néctar y aumentando la distancia operativa (entre las piezas fértiles y el néctar), esencialmente por el incremento en la longitud del tubo corolino, la rama anterior del conectivo de la antera, o la combinación de ambos (Wester & Claßen-Bockhoff 2007; Wester et al. 2020). Particularmente en *Salvia* subg. *Calosphace*, la transición a la polinización por colibríes ha sido asociada a cambios en la corola (Kriebel et al. 2022) con un claro patrón de incremento en el tamaño de la flores (Benitez-Vieyra et al. 2019). Asimismo, se ha encontrado que en el clado sudamericano de *Calosphace*, que incluye a las especies analizadas, la tasa de evolución de la longitud de la corola es significativamente más alta que en otros clados del grupo, y que la misma representa un carácter adaptativo muy importante que pudo haber permitido una radiación adaptativa y la consecuente diversificación en este clado (Moein et al. 2021).

6 | CONCLUSIONES

En este estudio se compararon las trayectorias ontogenéticas de las flores de *S. guaranítica* y *S. stachydifolia* y se analizaron los procesos celulares involucrados en su desarrollo. Encontramos que estas especies presentan trayectorias ontogenéticas prácticamente idénticas, indicando un patrón de desarrollo común. A su vez, la extensión y/o truncamiento de estas trayectorias sugiere la conservación de asociaciones ancestrales entre los caracteres medidos por un mecanismo de escalamiento ontogenético. Por otra parte, las diferencias en las longitudes de los tubos corolinos se explican por una mayor proliferación celular en *S. guaranítica*. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la transición evolutiva entre los diferentes síndromes presentes en estas especies cercanas

filogenéticamente, parece haberse dado a través de cambios relativamente simples durante el desarrollo, que involucran modificaciones en los procesos celulares conservando el mismo patrón de desarrollo.

Este trabajo amplía los hallazgos encontrados en estructuras consideradas innovaciones clave en otros grupos de angiospermas, como lo son los tubos corolinos, y provee nuevas evidencias acerca de los procesos de desarrollo en flores de *Salvia* y sus posibles implicaciones en las transiciones entre polinizadores en este grupo. Finalmente, pone también de relieve el potencial de este grupo como sistema de estudio para investigaciones evo-devo de los rasgos florales asociados a los polinizadores.

7 | BIBLIOGRAFÍA

Anderson B, Ros P, Wiese TJ & Ellis AG (2014) Intraspecific divergence and convergence of floral tube length in specialized pollination interactions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281: 20141420.

Armbruster WS (2014) Floral specialization and angiosperm diversity: phenotypic divergence, fitness trade-offs and realized pollination accuracy. *Annals of Botany Plants*, 6: plu003.

Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using *lme4*. *Journal of Statistical Software*, 67: 1-48.

Barrionuevo C, Benítez-Vieyra S & Sazatornil F (2021) Floral biology of *Salvia stachydifolia*, a species visited by bees and birds connecting sexual phases, nectar dynamics and breeding system to visitors behaviour. *Journal of Plant Ecology*, 14: 580-590.

Benitez-Vieyra S, Fornoni J, Pérez-Alquicira J, Boege K & Domínguez CA (2014) The evolution of signal–reward correlations in bee-and hummingbird-

- pollinated species of *Salvia*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281: 20132934.
- Benitez-Vieyra S, Pérez-Alquicira J, Sazatornil FD, Domínguez CA, Boege K, Pérez-Ishiwara R & Fornoni J (2019) Evolutionary transition between bee pollination and hummingbird pollination in *Salvia*: Comparing means, variances and covariances of corolla traits. *Journal of Evolutionary Biology*, 32: 783-793.
- Box MS, Dodsworth S, Rudall PJ, Bateman RM, & Glover BJ (2011) Characterization of *Linaria* KNOX genes suggests a role in petal-spur development. *The Plant Journal*, 68: 703-714.
- Buendía-Monreal M, & Gillmor CS (2018) The times they are a-changin': heterochrony in plant development and evolution. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1349.
- Chinga J, Pérez MF, & Claßen-Bockhoff R (2021) The role of heterochrony in *Schizanthus* flower evolution-a quantitative analysis. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 49: 125591.
- Cullen E, Fernández-Mazuecos M & Glover BJ (2018) Evolution of nectar spur length in a clade of *Linaria* reflects changes in cell division rather than in cell expansion. *Annals of Botany*, 122: 801-809.
- De Craene LR (2018) Understanding the role of floral development in the evolution of angiosperm flowers: clarifications from a historical and physico-dynamic perspective. *Journal of Plant Research*, 131: 367-393.
- Dellinger AS (2020) Pollination syndromes in the 21st century: where do we stand and where may we go? *New Phytologist*, 228: 1193-1213.
- Drew BT (2020) Evolution, pollination biology, and species richness of *Salvia* (Lamiaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 181: 767-769.

- Drew BT, González-Gallegos JG, Xiang C, Kriebel R, Drummond CP, Walker JB & Sytsma KJ (2017) *Salvia* united: The greatest good for the greatest number. *Taxon*, 66: 133-145.
- Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR & Thomson JD (2004) Pollination syndromes and floral specialisation. *Annual Review of Ecology, Evolution & Systematics*, 35: 375-403.
- Fragoso-Martínez I, Martínez-Gordillo M, Salazar GA, Sazatornil F, Jenks AA, García Peña MR, Barrera-Aveleida G, Benítez-Vieyra S, Magallón S, Cornejo-Tenorio G & 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.
- Fragoso-Martínez I, Salazar GA, Martínez-Gordillo M, Magallón S, Sánchez-Reyes L, Lemmon EM, Lemmon AR, Sazatornil F & Mendoza CG (2017) A pilot study applying the plant Anchored Hybrid Enrichment method to New World sages (*Salvia* subgenus *Calosphace*; Lamiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 117: 124-134.
- González-Gallegos JG, Bedolla-García BY, Cornejo-Tenorio G, Fernández-Alonso JL, Fragoso-Martínez I, García Peña MR, Harley RM, Klitgaard B, Martínez-Gordillo MJ, Wood JRI, Zamudio S, Zona S & Xifreda C (2020) Richness and distribution of *Salvia* subg. *Calosphace* (Lamiaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 181: 831-856.
- Gould SJ (1977) *Ontogeny and Phylogeny*. Cambridge, MA: Harvard University Press.
- Gurung V, Yao-Wu Y & Diggle PK (2021) Comparative analysis of corolla tube development across three closely related *Mimulus* species with different pollination syndromes. *Evolution & Development*, 23: 244-255.

- Han M, Zhu QQ, Sun L, Niu CY, Li Y, Wang N, Zhang XH & Ren Y (2022) Petal ontogeny, structure, and pollination system of four *Aquilegia* species in Midwest China. *Flora*, 286: 151987.
- Harashima H & Schnittger A (2010) The integration of cell division, growth and differentiation. *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 66-74.
- Hepworth J, & Lenhard M (2014) Regulation of plant lateral-organ growth by modulating cell number and size. *Current Opinion in Plant Biology*, 17: 36-42.
- Huxley JS (1932) Problems of relative growth. London, UK: Methuen & Company Ld.
- Jenks AA & Kim SC (2013) Medicinal plant complexes of *Salvia* subgenus *Calosphace*: an ethnobotanical study of new world sages. *Journal of ethnopharmacology*, 146: 214-224.
- Kay QON, Daoud HS, & Stirton CH (1981) Pigment distribution, light reflection and cell structure in petals. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 83: 57-83.
- Klingenberg CP (1998) Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biological Reviews*, 73: 79-123.
- Klingenberg CP (2016) Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. *Development Genes and Evolution*, 226: 113-137.
- Kostyun JL, Preston JC & Moyle LC (2017) Heterochronic developmental shifts underlie floral diversity within *Jaltomata* (Solanaceae). *EvoDevo*, 8: 17.
- Kriebel R, Drew BT, Drummond CP, González-Gallegos JG, Celep F, Mahdjoub MM, Rose JP, Xiang CL, Walker JB, Lemmon EM, Lemmon AR & Sytsma KJ (2019) Tracking temporal shifts in area, biomes, and pollinators in the radiation of *Salvia* (sages) across continents: leveraging anchored hybrid

- enrichment and targeted sequence data. *American Journal of Botany*, 106: 573-597.
- Kriebel R, Drew BT, González-Gallegos JG, Celep F, Antar GM, Pastore JFB, Uría R & Sytsma KJ (2022) Stigma shape shifting in sages (*Salvia*: Lamiaceae): hummingbirds guided the evolution of New World floral features. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 199: 428-448.
- Kriebel R, Drew B, González-Gallegos JG, Celep F, Heeg L, Mahdjoub MM & Sytsma KJ (2020) Pollinator shifts, contingent evolution, and evolutionary constraint drive floral disparity in *Salvia* (Lamiaceae): Evidence from morphometrics and phylogenetic comparative methods. *Evolution*, 74: 1335-1355.
- Landis JB, O'Toole RD, Ventura KL, Gitzendanner MA, Oppenheimer DG, Soltis DE & Soltis PS (2016) The phenotypic and genetic underpinnings of flower size in Polemoniaceae. *Frontiers in Plant Science*, 6: 1144.
- Lara-Cabrera SI, de la Luz Perez-Garcia M, Maya-Lastra CA, Montero-Castro JC, Godden GT, Cibrian-Jaramillo A, Fisher AE & Porter JM (2021) Phylogenomics of *Salvia* L. subgenus *Calosphace* (Lamiaceae). *Frontiers in plant science*, 12.
- Lovo J, Alcantara S, Vasconcelos, TN, Sajo MDG, Rudall, PJ, Prenner G, Aguiar AJC & Mello-Silva R (2021) Evolutionary lability in floral ontogeny affects pollination biology in Trimezieae. *American Journal of Botany*, 108: 828-843.
- Mack JLK & Davis AR (2015). The relationship between cell division and elongation during development of the nectar-yielding petal spur in *Centranthus ruber* (Valerianaceae). *Annals of Botany*, 115: 641-649.

- Mackin CR, Peña JF, Blanco MA, Balfour NJ & Castellanos MC (2021) Rapid evolution of a floral trait following acquisition of novel pollinators. *Journal of Ecology*, 109: 2234-2246.
- Minnaar C, de Jager ML & Anderson L (2019) Intraspecific divergence in floral-tube length promotes asymmetric pollen movement and reproductive isolation. *New Phytologist*, 224: 1160-1170.
- Moein F, Jamzad Z, Rahiminejad M, Landis, J. B., Mirtadzadini M, Soltis DE, & Soltis PS. (2021) Towards a global perspective for *Salvia* L: Phylogeny, diversification, and floral evolution. *bioRxiv* 2021.12.16.473009
- Moyroud E & Glover BJ (2017) The evolution of diverse floral morphologies. *Current Biology*, 27: 941-951.
- van der Niet T & Johnson, SD (2012) Phylogenetic evidence for pollinator driven diversification of angiosperms. *Trends in Ecology & Evolution*, 27: 353-361.
- van der Niet T, Peakall R & Johnson SD (2014) Pollination-driven ecological speciation in plants: new evidence and future perspectives. *Annals of Botany*, 113: 199-211.
- O'Leary N & Moroni P (2016) Las especies de *Salvia* (Lamiaceae) para Argentina. *Darwiniana*, 4: 91-131.
- Olvera-Mendoza EI, Godden GT, Montero-Castro JC, Porter JM, & Lara-Cabrera, SI (2020) Chloroplast and nuclear ribosomal cistron phylogenomics in a group of closely related sections in *Salvia* subg. *Calosphace*. *Brazilian Journal of Botany* 43: 177-191.
- Ortiz-Mendoza N, Aguirre-Hernández E, Fragoso-Martínez I, González-Trujano M, Basurto-Peña F & Martínez-Gordillo M (2022) A Review on the Ethnopharmacology and Phytochemistry of the Neotropical Sages (*Salvia* Subgenus *Calosphace*; Lamiaceae) Emphasizing Mexican Species. *Frontiers in Pharmacology*, 13.

- Puzey JR, Gerbode SJ, Hodges SA, Kramer EM & Mahadevan L (2012) Evolution of spur-length diversity in *Aquilegia* petals is achieved solely through cell-shape anisotropy. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279: 1640-1645.
- R Core Team (2022) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.r-project.org/>
- Rasband WS, ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Mariland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.
- Rosas-Guerrero V, Aguilar R, Martén-Rodríguez S, Ashworth L, Lopezaraiza-Mikel M, Bastida JM & Quesada M (2014) A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators? *Ecology Letters* 17: 388-400.
- Serrano-Serrano ML, Rolland J, Clark JL, Salamin N, & Perret M (2017) Hummingbird pollination and the diversification of angiosperms: an old and successful association in Gesneriaceae. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284: 20162816.
- Shan H, Cheng J, Zhang R, Yao X & Kong H (2019) Developmental mechanisms involved in the diversification of flowers. *Nature Plants*, 5: 917-923.
- Smith KK (2003) Time's arrow: heterochrony and the evolution of development. *International Journal of Developmental Biology*, 47: 613-621.
- Smith SD & Kriebel R (2017) Convergent evolution of floral shape tied to pollinator shifts in Iochrominae (Solanaceae). *Evolution*, 72: 688-697.
- Strelin MM, Sazatornil F, Benitez-Vieyra S, & Ordano M (2017) Bee, hummingbird, or mixed-pollinated *Salvia* species mirror pathways to pollination optimization: a morphometric analysis based on the Pareto front concept. *Botany*, 95: 139-146.

Stuurman J, Hoballah ME, Broger L, Moore J, Basten C & Kuhlemeier C (2004) Dissection of floral pollination syndromes in *Petunia*. *Genetics*, 168: 1585-1599.

The GIMP Development Team (2019) *GIMP*. URL: <https://www.gimp.org>

Tsai T, Diggle PK, Frye HA & Jones CS (2018) Contrasting lengths of *Pelargonium* floral nectar tubes result from late differences in rate and duration of growth. *Annals of Botany*, 121: 549-560.

Walcher-Chevillet CL & Kramer EM (2016) Breaking the mold: understanding the evolution and development of lateral organs in diverse plant models. *Current Opinion in Genetics & Development*, 39: 79-84.

Wang XP & Huang SQ (2017) Interspecific and intraspecific variation in corolla tube length in *Pedicularis* species achieved by both cell anisotropy and division. *Journal of Systematics and Evolution*, 55: 208-214.

Wessinger CA & Hileman LC (2016) Accessibility, constraint, and repetition in adaptative floral evolution. *Developmental Biology*, 419: 175-183.

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.

Wester P & Claßen-Bockhoff R (2007) Floral diversity and pollen transfer mechanisms in bird-pollinated *Salvia* species. *Annals of Botany*, 100: 401-421.

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: 101-155.

Westerkamp C & Claßen-Bockhoff R (2007) Bilabiate flowers: the ultimate response to bees? *Annals of Botany*, 100: 361-374.

Wickham H, Chang W, & Wickham MH (2016) Package 'ggplot2'. *Create elegant data visualisations using the grammar of graphics. Version 3.2.1*, 2: 1-189.

Wood S, Scheipl F & Wood MS (2017) Package 'gamm4'. *Am Stat*, 45: 0-2.

Zhou Z, Duan YW, Luo Y, Yang YP & Zhang ZQ (2019) Cell number explains intraspecific spur-length variation in *Aquilegia* species. *Plant Diversity*, 41: 307-314.