

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA



TESIS DOCTORAL

**POLINIZACIÓN Y REPRODUCCIÓN
EN ESPECIES DE *SCROPHULARIA* DE FLORES
GRANDES Y VISTOSAS DEL VIEJO MUNDO.
PERSPECTIVAS ECOLÓGICAS Y MOLECULARES**

MARÍA LUISA NAVARRO PÉREZ



DPTO. DE BIOLOGÍA VEGETAL, ECOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA TIERRA

2014



TESIS DOCTORAL

**Polinización y reproducción en especies
de *Scrophularia* de flores grandes y
vistosas del Viejo Mundo. Perspectivas
ecológicas y moleculares**

María Luisa Navarro Pérez

DPTO. DE BIOLOGÍA VEGETAL, ECOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA TIERRA

Conformidad las Directoras:

Fdo.: Ana Ortega Olivencia

Fdo.: Josefa López Martínez

2014

ANA ORTEGA OLIVENCIA, Catedrática de Botánica y **JOSEFA LÓPEZ MARTÍNEZ**, Profesora Contratado Doctor en el Área de Botánica, Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra de la Universidad de Extremadura

CERTIFICAN: que la presente Memoria titulada **“Polinización y reproducción en especies de *Scrophularia* de flores grandes y vistosas del Viejo Mundo. Perspectivas ecológicas y moleculares”**, que presenta la Licenciada D^a. María Luisa Navarro Pérez para optar al Título de Doctor ha sido realizada bajo su dirección en el área de Botánica, y que constituye sin lugar a dudas un trabajo de Tesis que cumple con los requisitos requeridos para optar a dicho título por la Universidad de Extremadura, por lo que autorizan su presentación a la Comisión de Doctorado de esta Universidad.

Y para que conste, expedimos el presente certificado en Badajoz a 30 de septiembre de 2014.

Fdo.: Ana Ortega Olivencia
Directora

Fdo.: Josefa López Martínez
Directora

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Ana Ortega, por confiar en mí para el desarrollo de esta investigación, por su constante seguimiento y asistencia compartiendo su tiempo de manera generosa. Por sus apreciados y relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias. A mi otra directora, Josefa López, por sus comentarios, motivación y refuerzo positivo, su paciencia para enseñarme las técnicas de laboratorio y cualquier otra duda que haya surgido y por guiarme siempre que lo he necesitado.

Junto a ellas, el resto de compañeros del grupo de investigación han sido mi segunda familia durante estos años y quiero agradecerles su incondicional apoyo y compañía tanto en los viajes y experimentos de campo como en los ratitos de descanso en la facultad. Concretamente, a Tomás Rodríguez por poder contar con su eficacia en la resolución de problemas y por su ayuda con los análisis estadísticos de este trabajo y los largos ratos de discusión de los mismos. A José Luís Pérez por su importante colaboración en la determinación de insectos y por enseñarme qué no debo olvidar nunca cuando voy al campo. A Paco Valtueña, un ejemplo de superación y lucha, por cederme sus magníficas fotografías de forma desinteresada para ilustrar esta memoria. A Marta Espinosa por brindarme tantos buenos momentos de distensión y empatía. A Carlos Mayo por todas esas conversaciones interesantes y por su generosidad. A Juan Álvarez, por su inagotable buen humor y su capacidad para animarme. Es un lujo poder contar con todos ellos siempre que lo necesito.

Al resto de compañeros del área de Botánica, a Trinidad Ruiz por proporcionarme aquel primer contrato en el herbario de la UEx y la estancia en Kew Garden que me ayudaron a ir encontrando mi camino actual. A, Eva, Gloria y Victoria, las compañeras que en aquel momento tuve la suerte de conocer y de las que aprendí tantas cosas. A Rafael Tormo, Santi Fernández, José María Maya y Maricruz por haber sido siempre tan amables y afectuosos conmigo.

También quisiera agradecer a mi tío Ciro Pérez por transmitirme su serenidad, por su apoyo moral y eficacia en resolver todas las dudas que le consulté. A Emilia Botello por su cariño y alegría. Y a María, del pueblo de Rabaçal, por su amabilidad y hospitalidad.

De mi estancia en el Real Jardín Botánico de Madrid en primer lugar deseo agradecer a Pablo Vargas por acogerme en su grupo de investigación; su motivación, comentarios y consejos desembocaron en la publicación del capítulo 5 y la preparación para la publicación del capítulo 6 de esta memoria de tesis. A Mario Fernández por estar siempre que lo he necesitado, que han sido muchas veces, por su paciencia y claridad para enseñarme todo lo relacionado con los análisis moleculares y ayudarme a resolver el sin fin de problemas que estos generan, y por todas sus correcciones y comentarios en los capítulos 5 y 6. A Emilio Cano por su profesionalidad, su asistencia en el laboratorio y su capacidad de hacerte sentir como en casa. A Isabel Liberal, con quien también pude aprender y discutir no sólo sobre asuntos académicos sino también personales, su generosidad y hospitalidad hicieron mi estancia mucho más agradable. A Irene Villas por compartir su habitación y su tiempo. A las dos, gracias por esas noches de costura. A José Luis Blanco por hacernos ver siempre la vida más sencilla. A Beatriz Guzmán por enseñarme los análisis para la reconstrucción de caracteres. Al resto de miembros del Real Jardín Botánico Juan Carlos, Pedro, Mario, Arantxa, José, Andrea, Vladimir, etc. con quienes compartí muchos buenos momentos.

De mi estancia en Cerdeña quiero agradecer al profesor Guianluigi Bacchetta todas las facilidades y confianza que depositó en mí, su entusiasmo y motivación. En su equipo de trabajo también tuve la suerte de conocer a personas estupendas como Eva, Alba, Ana, Giuseppe, Silvia, Donatella, etc. con las que compartí muchos buenos momentos. A mis “padrinos” sardos Carlos y Carla que tanto me cuidaron. A mis compañeros de piso Ángel, Dario y Francesco, por hacerme sentir como en casa, por cuidarme como a una hermana y por todos los buenos momentos que vivimos juntos. A mi hermana Castillo por su impagable ayuda en las largas jornadas de campo.

A mis amigos, por esas gastrojornadas que tanto bien me han hecho.

A mi familia política, Maripi, Felipe, Patri y Mario, agradecerles haberme hecho la vida tan agradable durante el poco tiempo que he podido compartir con ellos.

Mis últimos agradecimientos quiero que sean para las personas a las que más necesito, mis padres, Carmeli y Manolo, y hermanas, Castillo y Carmen, sin ellos no me habría planteado esta meta ni la hubiera llegado a alcanzar, ellos me han enseñado con su ejemplo a esforzarme y sacrificarme sin olvidar ser feliz; quiero agradecerles también su ayuda en los momentos más difíciles y siempre que lo he necesitado, sin vosotros creo que aun estaría contando semillas; soy consciente de la suerte que tengo por formar parte de esta familia. Y Borja, por su ayuda, comprensión y cariño a pesar de mis altibajos, por encontrar siempre la forma de hacerme sentir viva y orgullosa con todas las aventuras que me has hecho vivir, por despertarme tantas ilusiones, la más importante, caminar a tu lado.

AGRADECIMIENTOS A INSTITUCIONES, ENTIDADES Y COLABORADORES

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada a través de una beca predoctoral FPI (referencia: BES-2009-011957), concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación, a su vez asociada con el proyecto titulado “Análisis de la posible existencia de ornitofilia en *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae)” (CGL2008-00123) y, posteriormente, con otro titulado “Biología floral y filogeografía en especies ibéricas de *Scrophularia* (Scrophulariaceae)” (CGL2011-24140), ambos concedidos por el Ministerio de Ciencia e Innovación y cofinanciados por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Algunos fondos han sido también parcialmente sufragados por la Consejería de Economía, Comercio e Innovación de Extremadura (CCV004).

Gracias a la beca FPI se han realizado dos estancias breves, una en el Real Jardín Botánico de Madrid (EEBB-2011-43919) desde el 10 de enero hasta el 11 de marzo de 2011 y otra en el Centro de Conservazione della Biodiversità de la Universidad de Cagliari, Cerdeña (EEBB-I-13-06058) desde el 26 de marzo hasta el 30 de julio del año 2013. Ambas estancias fueron concedidas igualmente por el Ministerio de Ciencia e Innovación y el Ministerio de Economía y Competitividad.

La Consejería de Medio Ambiente de Andalucía y la del Gobierno de Portugal concedieron los permisos necesarios para la captura de aves en las poblaciones de *S. sambucifolia* y *S. grandiflora*, respectivamente, y la Consejería de Medio Ambiente de las Islas Canarias permitió el estudio de las poblaciones naturales de *S. calliantha* en la isla de Gran Canaria.

Agradecimientos especiales van dirigidos a los pueblos de Rabaçal y Pombalinho (Portugal) por su respeto hacia nuestros experimentos.

Los herbarios COA, E, MA, MJG, MO, SALA, UNEX y UPOS nos dieron permiso para la extracción de ADN a partir de muestras de herbario y M. Kintgen (Denver Bot. Gard.), A. Krämer (Bot. Gärt. Univ. Bonn), J. Terry (Kew, Roy. Bot. Gard.), A. Amini Rad (Iranian Res. Inst. Pl. Protection) y M. Sequeira (Univ. Madeira) amablemente nos enviaron muestras de algunas especies de *Scrophularia*.

El Dr. A. Marzal (área de Zoología, UEx) prestó su tiempo y ayuda en la identificación de algunas aves, los Drs. L. Castro y F.J. Ortiz (Univ. de Almería) en la determinación de algunos insectos, el Prof. Dr. P. Sosa (Univ. de Las Palmas) proporcionó información sobre las poblaciones de Canarias, los Drs. C. McDonald y R. Sivinski enviaron información sobre la especie neomexicana *S. macrantha*; los Drs. M. González y M. Mota (área de Estadística, UEx) ayudaron en la realización e interpretación de algunos análisis estadísticos; y, finalmente, el Prof. Dr. M. Ramírez y R. Velázquez (área de Microbiología, UEx) colaboraron en el desarrollo de la metodología de la extracción del ADN de las colonias de levaduras.

Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo en el área de Botánica (Departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra) de la Universidad de Extremadura.

Índice

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
BIOLOGÍA FLORAL	4
SISTEMAS DE POLINIZACIÓN	8
SISTEMAS DE REPRODUCCIÓN	10
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	11
ESTRUCTURACIÓN DE LA MEMORIA DE TESIS	13
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14

CAPÍTULO 1 - INSECTOS, AVES Y LAGARTOS COMO POLINIZADORES DE LAS ESPECIES CON FLORES GRANDES Y VISTOSAS DE *SCROPHULARIA* EN EUROPA Y MACARONESIA

RESUMEN	19
ABSTRACT	19
INTRODUCCIÓN	20
MATERIAL Y MÉTODOS	23
ESPECIES ESTUDIADAS	23
POBLACIONES ESTUDIADAS	25
CENSOS Y COMPORTAMIENTO DE LOS VISITADORES Y/O POLINIZADORES	26
EFICACIA DE LOS VISITADORES EN LA POLINIZACIÓN	27
Carga polínica transportada y depositada por los insectos en el estigma	27
Carga polínica transportada por aves y reptiles	28
Estudio cualitativo y cuantitativo de las características de las plantas	28
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
RESULTADOS	31
CENSOS Y COMPORTAMIENTO DE LOS VISITADORES Y/O POLINIZADORES	31
Censos de insectos	31
Censos de aves	34
Censos de reptiles	35
EFICACIA DE LOS VISITADORES EN LA POLINIZACIÓN	35
Carga polínica transportada por los animales en el cuerpo	35
Carga polínica depositada por los insectos en el estigma	38
Estudio cualitativo y cuantitativo de las características de las plantas	39
DISCUSIÓN	41

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
MATERIAL SUPLEMENTARIO	53

CAPÍTULO 2 - SISTEMA DE REPRODUCCIÓN EN POBLACIONES NATURALES DE *SCROPHULARIA SAMBUCIFOLIA* Y *S. GRANDIFLORA*

RESUMEN	57
ABSTRACT	57
INTRODUCCIÓN	58
MATERIAL Y MÉTODOS	61
ESPECIES ESTUDIADAS	61
POBLACIONES ESTUDIADAS	64
SISTEMA DE REPRODUCCIÓN	67
VARIACIÓN ESPACIAL DE LA PRODUCCIÓN DE SEMILLAS EN LA INFLORESCENCIA ...	69
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	69
RESULTADOS	70
SISTEMA DE REPRODUCCIÓN	70
VARIACIÓN ESPACIAL DE LA PRODUCCIÓN DE SEMILLAS EN LA INFLORESCENCIA ...	76
DISCUSIÓN	77
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

CAPÍTULO 3 - SISTEMAS DE POLINIZACIÓN Y REPRODUCCIÓN EN POBLACIONES SARDAS DE *SCROPHULARIA TRIFOLIATA*

RESUMEN	87
ABSTRACT	87
INTRODUCCIÓN	88
MATERIAL Y MÉTODOS	91
ESPECIE ESTUDIADA	92
POBLACIONES ESTUDIADAS	93
CENSOS Y COMPORTAMIENTO DE LOS VISITADORES/POLINIZADORES	94
ESTUDIO DE LAS MÁCULAS COROLINAS	95
Máculas como guías de néctar	95
<u>Comportamiento de los polinizadores y éxito reproductivo</u>	96
Estudio histológico de las máculas	96
SISTEMA DE REPRODUCCIÓN	97
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	98

RESULTADOS	100
CENSOS Y COMPORTAMIENTO DE LOS VISITADORES/POLINIZADORES	100
ESTUDIO DE LAS MÁCULAS COROLINAS	104
Máculas como guías de néctar	104
<u>Comportamiento de los polinizadores y éxito reproductivo</u>	104
Estudio histológico de las máculas	106
SISTEMA DE REPRODUCCIÓN	107
DISCUSIÓN	109
CENSOS Y COMPORTAMIENTO DE LOS VISITADORES/POLINIZADORES	109
ESTUDIO DE LAS MÁCULAS COROLINAS	113
Máculas como guías de néctar	113
<u>Comportamiento de los polinizadores y éxito reproductivo</u>	113
Estudio histológico de las máculas	115
SISTEMA DE REPRODUCCIÓN	116
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118
CAPÍTULO 4 - COMPOSICIÓN DE AZÚCARES Y ANÁLISIS DE LA EXISTENCIA DE LEVADURAS EN EL NÉCTAR DE <i>SCROPHULARIA</i>	
RESUMEN	123
ABSTRACT	123
INTRODUCCIÓN	124
MATERIAL Y MÉTODOS	128
ESPECIES Y POBLACIONES ESTUDIADAS	128
MÉTODOS DE CAMPO Y DE LABORATORIO	131
COMPOSICIÓN DE AZÚCARES DEL NÉCTAR	132
ANÁLISIS MICROBIANO DEL NÉCTAR	133
Densidad estimada de células de levaduras	134
Diversidad de levaduras	135
Composición de azúcares en el néctar de flores visitadas	137
Observación de visitantes florales	138
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	138
RESULTADOS	139
COMPOSICIÓN DE AZÚCARES DEL NÉCTAR	139
ANÁLISIS MICROBIANO DEL NÉCTAR	141
Densidad estimada de células de levaduras	143
Diversidad de levaduras	145

Composición de azúcares en el néctar de las flores visitadas	147
DISCUSIÓN	149
COMPOSICIÓN DE AZÚCARES DEL NÉCTAR	149
ANÁLISIS MICROBIANO DEL NÉCTAR	151
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157
MATERIAL SUPLEMENTARIO	162

**CAPÍTULO 5 - THE ROLE OF BIRDS AND INSECTS IN POLLINATION
SHIFTS OF *SCROPHULARIA* (SCROPHULARIACEAE)**

ABSTRACT	167
RESUMEN	167
INTRODUCTION	168
MATERIAL AND METHODS	172
STUDY TAXA	172
TAXA SAMPLING AND DNA SEQUENCING	173
PHYLOGENETIC ANALYSES	175
ESTIMATION OF DIVERGENCE TIMES	175
INFERENCE OF POLLINATION SYSTEMS	176
ANCESTRAL STATE RECONSTRUCTIONS	178
RESULTS	178
PHYLOGENETIC ANALYSES	178
DIVERGENCE TIMES ESTIMATION	183
ANCESTRAL RECONSTRUCTION OF POLLINATION SYSTEM	185
DISCUSSION	188
SYSTEMATICS OF <i>SCROPHULARIA</i>	188
RECENT EVOLUTION OF BIRD-MEDIATED POLLINATION	190
IS BIRD POLLINATION AN EVOLUTIONARY DEAD END?	191
CONCLUSIONS	192
ACKNOWLEDGEMENTS	193
REFERENCES	193
SUPPLEMENTARY MATERIAL	200

**CAPÍTULO 6 - MULTIPLE WINDOWS OF COLONIZATION TO
MACARONESIA SINCE LATE MIOCENE BY THE DISPERSAL-
UNSPECIALIZED *SCROPHULARIA***

ABSTRACT	209
----------------	-----

RESUMEN	209
INTRODUCTION	210
MATERIAL AND METHODS	212
TAXON SAMPLING	213
DNA EXTRACTION AND SEQUENCING	213
PHYLOGENETIC RECONSTRUCTION AND DIVERGENCE TIME ESTIMATION	214
BIOGEOGRAPHICAL RECONSTRUCTION	215
RESULTS	219
PHYLOGENETIC ANALYSES AND DIVERGENCE TIME ESTIMATION	219
BIOGEOGRAPHIC RECONSTRUCTION	220
MULTIPLE COLONIZATIONS OF MACARONESIA	223
DISCUSSION	223
MULTIPLE COLONIZATIONS OF MACARONESIA	225
LONG-DISTANCE DISPERSAL DESPITE UNSPECIALISED SYNDROMES	228
ACKNOWLEDGEMENTS	229
REFERENCES	230
SUPPLEMENTARY MATERIAL	236
CONCLUSIONES	241
CONCLUSIONS	245

Introducción General

INTRODUCCIÓN

La familia Scrophulariaceae en su sentido tradicional incluía géneros muy dispares con caracteres transicionales cuya clasificación resultaba confusa. Dicha familia de eudicotiledóneas agrupaba unos 275 géneros y más de 5.000 especies (Mabberley, 1997), pero los estudios moleculares indicaron que no eran una entidad monofilética. En los últimos años, los análisis filogenéticos han desintegrado esta familia en su sentido clásico y la han dividido en varios grupos monofiléticos dentro del orden Lamiales (Olmstead & Reeves, 1995; Olmstead & al., 2001; Oxelman & al., 2005; Schäferhoff & al., 2010). Concretamente, Olmstead & Reeves (1995), basándose en análisis comparativos de secuencias cloroplastidiales de ADN, identificaron dos clados monofiléticos, Scroph I y Scroph II, el primero de los cuales se correspondería con las Scrophulariaceae s.str. (Olmstead & al., 2001) y el segundo agruparía a géneros, como *Antirrhinum*, *Digitalis* o *Veronica* pero también a *Plantago* o *Callitriche*. El primer clado, que incluye al género tipo, ha sido corroborado posteriormente por otros autores (Albach & al., 2005; Oxelman & al., 2005; Rahmzadeh & al., 2005; APG III, 2009). Las Scrophulariaceae s.str. predominan en el Hemisferio Sur (revisión en Tank & al., 2006; Olmstead, 2007) y en su seno se consideran actualmente al menos 8 linajes principales reconocidos como tribus: Aptosimeae, Buddlejaceae, Hemimerideae, Leucophylleae, Limoselleae, Myoporeae, Scrophularieae y Teedieae (Oxelman & al., 2005), con una estimación de unas 1.800 especies (Stevens, 2001).

La tribu Scrophularieae Dumort forma un clado fuertemente apoyado que se compone de 4 géneros y 564 especies: *Antherothamnus* (1 especie del C y S de África), *Oreosolen* (3 especies del Himalaya), *Verbascum* (360 especies de Eurasia y E de África) y *Scrophularia* (revisión en Tank & al., 2006; Olmstead, 2007), este último objeto de esta Tesis Doctoral. A pesar de la turbulenta historia taxonómica de la familia Scrophulariaceae s.l. y su difícil circunscripción, al menos la adscripción del género tipo, *Scrophularia*, no supone ninguna controversia.

El género *Scrophularia* L. cuenta con unas 270 especies y subespecies (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a), con distribución mayoritariamente holártica y representada tanto en el Viejo como en el Nuevo Mundo; realmente, los límites holárticos son traspasados por la especie anual *S. arguta* Aiton que llega hasta el cuerno de África (Ortega-Olivencia, 2009) y por unas pocas especies de C América y del Caribe (v.g. *S. minutiflora* Pennell). Se trata de un género constituido por plantas

sufruticosas y herbáceas, a veces de gran tamaño, con hojas generalmente opuestas, indivisas o compuestas y con limbo muy variado. Las inflorescencias son racemosas o paniculadas y se componen de dicasios, normalmente compuestos, rara vez simples (v.g. *S. peregrina* L.) y bracteados, con flores típicamente pentámeras y hermafroditas. El cáliz, compuesto de 5 sépalos soldados en la base, normalmente posee un margen escarioso, cuyo tamaño y forma suele poseer importancia taxonómica. La corola, zigomorfa, presenta 5 pétalos soldados en un tubo más o menos globoso u urceolado que remata superiormente en dos labios conspicuos. El androceo, didínamo, posee los 4 estambres adnatos a la base del labio inferior de la corola y en la mayoría de las especies aparece un estaminodio soldado al tubo corolino, cuyo tamaño y forma suele poseer importancia en la discriminación taxonómica. El aparato sexual femenino consta de un ovario bicarpelar con largo estilo y un estigma generalmente bilobado o globoso. Tras la fecundación y maduración se originan frutos de tipo cápsula septicida, globosa, ovoidea o subcónica, normalmente apiculada, de naturaleza coriácea, aunque a veces notablemente lignificada en la madurez en algunos táxones. Dichos frutos albergan numerosas semillas, ovoideas o elípticas, alveoladas transversalmente (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a; Ortega-Olivencia, 2009).

La primera revisión monográfica del género la abordó Wydler (1828), reconociendo unas 46 especies, si bien el primer intento de segregación en secciones se debe a Don (1837-1838), que atendió fundamentalmente al tipo de estaminodio (revisión en Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a).

El tratamiento más amplio del género se debe a Stiefelhagen (1910), quien realizó un estudio sistemático-geográfico reconociendo 143 especies (con muchos táxones infraespecíficos) distribuidas en dos secciones: (A) sect. *Anastomosanthes* Stiefelh. (= sect. *Scrophularia*) y (B) sect. *Tomiophyllum* Benth. (= sect. *Caninae* G. Don). La sect. *Scrophularia* está formada por plantas en general herbáceas, de abundante desarrollo foliar y nervios claramente anastomosados, mientras que la sect. *Caninae* se compone de plantas generalmente sufruticosas y xerófilas, con escaso desarrollo foliar y nervios foliares nada o poco anastomosados. En la primera sección distinguió dos subsecciones: (i) *Vernales* Stiefelh. (9 especies), con los lóbulos de la corola semejantes entre sí, y (ii) *Scorodonia* G. Don (= subsect. *Scrophularia*; 66 especies), donde los lóbulos del labio superior de la corola son mayores que los del inferior. En la sect. *Caninae* distinguió tres subsecciones: (i) *Farinosa* Stiefelh. (1 especie), con el tubo de la corola estrecho, cilíndrico y tres veces mayor que el cáliz, (ii)

Orientalis Stiefelh. (3 especies), con el tubo de la corola panzudo y lóbulos semejantes, y (iii) *Lucidae* Stiefelh. (= subsect. *Caninae*, 62 especies), con el tubo de la corola panzudo y los lóbulos superiores de la misma más largos que los demás.

Desde 1910 no se ha realizado ninguna otra clasificación infragenérica a nivel mundial. Si bien Gorshkova (1955) sigue dicha delimitación e incluso la sistematiza aún más en la flora de la antigua U.R.S.S., otros autores, como Grau (1981), Lall & Mill (1978) o Richardson (1972) optan por no realizar segregación alguna en secciones o subsecciones. En cualquier caso, el reconocimiento o no de dichas secciones y subsecciones puede ser tomada como una hipótesis de trabajo sobre la que ensayar mediante estudios de tipo morfológico, molecular o ambos. Ortega-Olivencia & Devesa (1993a), tras una revisión de las distintas floras holárticas y de las publicaciones de nuevas especies, estimaron, utilizando criterios taxonómicos, que la sect. *Scrophularia* poseía unos 128 táxones propios de las regiones septentrionales del Globo y la sect. *Caninae* c. 138 del Viejo Mundo.

Stiefelhagen (1910) consideró que el centro de diversificación del género se hallaba en la zona comprendida entre Asia Menor y el Himalaya, donde abundan sobre todo especies de la sect. *Caninae*, algo posteriormente apoyado por Ortega-Olivencia & Devesa (1993a) en su revisión. En Europa con c. 30 táxones (Richardson, 1972) es la Península Ibérica el centro más importante de diversificación, con casi la mitad endémicos, e íntimamente relacionado con el del N de Marruecos y Macaronesia (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a), donde una gran mayoría son también endémicos. En la Península Ibérica la mayor parte de las especies pertenecen a la sect. *Scrophularia*, que comprende hierbas perennes y anuales con un alto nivel de poliploidía ($2n \geq 36$; Ortega-Olivencia & Devesa, 1990); en esta misma sección se incluyen también todas las especies autóctonas de América (Shaw, 1962) y las de Macaronesia (Dalgaard, 1979).

Bajo perspectivas no filogenéticas De-Yuan (1983) consideró a *Scrophularia* como un género disyunto a ambos lados del Pacífico y del Atlántico sugiriendo que sus especies podrían haber emigrado desde Eurasia hasta N América, aunque sin concretar si la ruta seguida pudo ser el estrecho de Bering. Hasta la fecha sólo existen tres estudios de sistemática molecular en el género *Scrophularia*, principalmente centrados en determinadas regiones geográficas, como Irán (Attar & al., 2011), N y C de América (Scheunert & Heubl, 2011) y el W de la región Mediterránea y Macaronesia (Scheuner

& Heubl, 2014), que muestran los primeros puntos de vista filogenéticos y biogeográficos en dicho género. Attar & al. (2011) ponen de manifiesto la existencia de un clado euroasiático ancestral a partir del cual divergieron linajes iranoturánicos que a su vez englobaban a representantes saharoarábicos. Respecto al N y C de América, Scheunert & Heubl (2011) proponen una o varias migraciones durante el Mioceno desde el E asiático hasta el Nuevo Mundo a través del Estrecho de Bering. En el Nuevo Mundo los ancestros se diversificaron en tres linajes geográficamente bien definidos, al parecer apoyados por caracteres morfológicos. Más tarde, Scheuner & Heubl (2014) indican que la compleja topografía de la Península Ibérica habría promovido los procesos de divergencia e hibridación que han dado origen a los táxones de *Scrophularia* presentes en la misma. El W de la región Mediterránea ha actuado como un refugio glacial preservando tanto linajes recientes como ancestrales, los cuales habrían colonizado en varias ocasiones la región Macaronésica.

Dado que la Península Ibérica constituye el centro de diversificación del género más importante en Europa, a su vez relacionado con el del NW de África y Macaronesia (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a), uno de los objetivos de esta memoria tratará de estimar los tiempos de divergencia entre los linajes de Macaronesia y los de tierra firme, así como establecer las relaciones entre dichos clados.

En los siguientes apartados se revisarán los antecedentes sobre la biología floral, polinización y reproducción del género *Scrophularia*, proporcionando así un marco de referencia para la investigación presentada en los subsiguientes capítulos de esta memoria. En esta revisión cobrará mayor importancia lo referente a la sección *Scrophularia* por ser el grupo en el que se encuadran nuestras principales especies focales, caracterizadas por tener flores grandes y vistosamente coloreadas, en contraposición a lo que es usual en el resto del género (medianas o pequeñas y de colores en general apagados o monótonos).

ANTECEDENTES

BIOLOGÍA FLORAL

En *Scrophularia* las flores son casmógamas, aunque las de *S. arguta* y *S. lowei* Dalgaard también presentan flores cleistógamas (Dalgaard, 1979), hermafroditas,

zigomorfas y pentámeras. Se reúnen en cimas dicasiales y generalmente son las flores centrales de los dicasios inferiores las que se abren en primer lugar, en tanto que las laterales lo hacen a continuación coincidiendo con las flores centrales de los dicasios superiores, y así sucesivamente se va repitiendo la misma secuencia de apertura (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b).

Aunque la corola es más o menos tubular-urceolada y bilabiada, en raras ocasiones puede ser subactinomorfa por presentar los lóbulos semejantes (*S. vernalis* L.) e incluso subrotácea (*S. calliantha* Webb & Berthel.). La típica corola bilabiada del género consta de un labio superior con dos lóbulos ligeramente superpuestos, bien erectos o dirigidos hacia atrás (*S. xanthoglossa* Boiss.) o adelante (*S. macrantha* Stiefelh.), y uno inferior constituido por dos lóbulos laterales iguales entre sí más uno central generalmente reflejo. Respecto a su tamaño, los táxones con las corolas más pequeñas suelen pertenecer a la sect. *Caninae*, con c. 3-5,5(6) mm de tamaño medio en las especies peninsulares, pero de menor tamaño en otras extrapeninsulares (v.g. *S. hypericifolia* Wydler). En la sect. *Scrophularia* existe una mayor variedad ya que aunque la mayor parte de sus táxones poseen tamaños corolinos comprendidos entre 6-8 mm de longitud media, algunas especies alcanzan los 15-17 mm (v.g. *S. sambucifolia* L. y *S. grandiflora* DC.) o los 4-6 mm (v.g. *S. peregrina* y *S. arguta*) (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a).

Si importante es el tamaño, no menos lo es su coloración. A diferencia de lo que ocurre en flores con simetría radial, donde no parece importar en qué dirección entra el polinizador, la simetría bilateral conlleva un comportamiento más específico de los polinizadores para asegurar la eficacia en su contacto con el estigma y las anteras (Neal & al., 1998), por lo que la coloración juega un papel esencial en la atracción (Lunau & Maier, 1995; Chittka & Raine, 2006). Por ello, además de la forma y el tamaño, el color de las flores en el género *Scrophularia* posee interés y, aunque es extremadamente variable, se podría indicar que no suele ser uniforme en cada corola, sino que varía de la cara ventral a la dorsal del tubo, y en una mayoría de los casos los lóbulos del labio superior presentan tonalidades purpúreas. A pesar de esta variabilidad, en lo que respecta a la flora española básicamente podríamos establecer 3 grupos: (a) corolas más o menos violáceas (v.g. *S. canina* L.), (b) corolas de colores monótonos o apagados, con tonalidades combinadas entre el verdoso, parduzco, purpúreo (v.g. *S. lyrata* Willd.), amarillento o rojizo, (c) corolas de color muy llamativo, rojizas o anaranjado-rojizas (*S.*

sambucifolia), amarillento-anaranjadas o amarillento-rojizas (*S. calliantha*), etc. Dentro de las señales ópticas involucradas en la atracción de los polinizadores, normalmente es importante el patrón de contraste de la luz UV, algo observado en *S. umbrosa* Dumort. y que ha sido interpretado como un mecanismo que contribuye a detectar mejor sus flores (Brodmann & al., 2012 y referencias).

En muchos casos los visitantes florales se ayudan de patrones de coloración, para localizar con mayor facilidad la recompensa floral, ya sea polen o néctar (Lunau & al., 2006 y referencias). Las primeras teorías sobre la funcionalidad de dichos patrones se remontan a finales del siglo XVIII cuando Sprengel (1793) los definió como “guías de néctar”. En plantas nectaríferas dichas guías son más frecuentes y están mejor definidas cuando sus flores son polinizadas por insectos (Richards, 1986; Proctor & al., 1996). En el género *Scrophularia* no se han estudiado este tipo de guías porque aparentemente no las poseen, sin embargo, como se estudiará en el capítulo dedicado a *S. trifoliata* L., las corolas de esta especie poseen dos grandes manchas en su base interna que contrastan en gran medida con el color general de la misma y que podrían considerarse guías de néctar. Por lo que se sabe, no existe ninguna otra especie en el género con tales guías (A. Ortega-Olivencia, obs. pers.).

El androceo está formado por cuatro estambres unidos a la base del labio inferior de la corola, al principio con los filamentos enrollados pero posteriormente llegan a estar exertos y con maduración secuencial. Constan de anteras reniformes con dehiscencia transversal (Ortega-Olivencia, 2009) y producen grandes cantidades de polen. En general, la mayor producción polínica ocurre en las especies de la sect. *Scrophularia*, donde como media pueden presentar valores mayores de 400.000 granos/flor e incluso superar el millón. Las menores cantidades de polen se producen en la sección *Caninae*, con menos de 350.000 granos de media/flor. Estas diferencias se explican por la correlación demostrada entre la producción de polen y el tamaño de la antera y de la corola (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b).

En la mayoría de las especies aparece, como reminiscencia de un quinto estambre, un estaminodio que generalmente se sitúa en la parte superior del tubo de la corola y cuya función, si existe, es de momento desconocida (Faegri & van der Pijl 1979); no obstante, experimentos en marcha por parte del equipo de investigación al que pertenezco podrían arrojar luz en este asunto.

El gineceo es bicarpelar y consta de un largo estilo que acaba en un estigma que

madura típicamente antes que el androceo y, una vez polinizado, se curva sobre el lóbulo central del labio inferior de la corola, desplegándose en ese momento los estambres. Como resultado de la desigual maduración en el tiempo de los órganos sexuales, las flores se comportan como funcionalmente unisexuales, siendo normalmente más longeva la función masculina (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b). Se trata, por tanto, de flores dicógamas, más concretamente proterógamas, al madurar primero el gineceo y luego el androceo. Este mecanismo floral fue dado a conocer en el género por Sprengel (1793) y posteriormente comprobado en diversas ocasiones para *S. nodosa* L. (Gray, 1871; Ricca, 1871; Wilson, 1878; Trelease, 1881; Müller, 1883; Stiefelhagen, 1910), *S. canina* (Gray, 1876), diversas especies del W de N América (Shaw, 1962), de Macaronesia (Dalgaard, 1979), de la Península Ibérica y Baleares (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b) y del N de Marruecos (Ortega-Olivencia & Devesa, 1998).

Aunque políniferas, la principal recompensa floral ofertada a los polinizadores es el néctar, un líquido azucarado que se produce a partir de un nectario anular y carnoso situado en la base del ovario. Su producción por flor y día, en volumen y peso de azúcares, se correlaciona con el tamaño de la corola, por lo que en las especies ibero baleáricas es mayor en la sect. *Scrophularia* que en la sect. *Caninae* (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b).

En la mayoría de las angiospermas los principales azúcares del néctar son el disacárido sacarosa y los monosacáridos glucosa y fructosa, que se producen en proporciones variables dependiendo de numerosos factores. Sin embargo, este aspecto de la biología del néctar en *Scrophularia* está aún en su infancia, ya que son muy escasos los estudios llevados a cabo en el mismo. Concretamente, se ha investigado la composición de azúcares del néctar floral en sólo once especies, con distintos tamaños florales: *S. nodosa*, *S. vernalis* (Percival, 1961), *S. smithii* Hornem. (Dupont & al., 2004), *S. umbrosa* (Brodmann & al., 2012), *S. canina*, *S. frutescens* L., *S. lyrata*, *S. scorodonia* L., *S. sambucifolia*, *S. grandiflora*, *S. trifoliata* y *S. calliantha* (Rodríguez-Riaño & al., 2014). Excepto en la última, endémica de la isla de Gran Canaria, cuyo néctar posee porcentajes similares de sacarosa y de hexosas, para el resto de especies el néctar es rico en sacarosa. Rodríguez-Riaño & al. (2014) han indicado que la casi uniformidad en la composición de azúcares podría considerarse como un carácter taxonómico conservativo. Además, dichos autores observaron que de los dos

monosacáridos estudiados, el porcentaje de fructosa era mayor que el de glucosa, que prácticamente era cero o cercano a dicho valor. Este reparto no estequiométrico podría ser una consecuencia de la presencia de microorganismos habitando en el néctar (Canto & al., 2008, 2011; Herrera & al., 2008; Pozo & al., 2009; Vannette & al., 2013).

Para otras pocas angiospermas se sabe que las levaduras pueden reducir la concentración total de los azúcares del néctar y alterar el cociente sacarosa/hexosas (Herrera & al., 2008; Pozo & al., 2009). La mayoría de los trabajos publicados muestran una alta concentración de levaduras pero una baja diversidad de las mismas (Brysch-Herzberg, 2004; de Vega & al., 2009; Herrera & al., 2009), siendo *Metschnikowia reuhausii* Pitt & Mill. y *M. gruessi* Gim.-Jurado las especies más frecuentes en las plantas europeas estudiadas hasta ahora (Brysch-Herzberg, 2004; Herrera & al., 2010; Pozo & al., 2011 y referencias). Para ser transportados hasta las flores, tales microorganismos necesitan un vector que puede ser o no el polinizador de las mismas. Entre los grupos de animales que podrían actuar como vectores se han señalado coleópteros, dípteros, lepidópteros, aves y mamíferos (Canto & al., 2008; Wiens & al., 2008; de Vega & al., 2009; Herrera & al., 2009), aunque son principalmente himenópteros los insectos más frecuentes y, dentro de estos, los abejorros del género *Bombus*. Sin embargo, existen muy pocos casos conocidos de plantas nectaríferas visitadas por avispa donde estas actúen como vectores de levaduras o en los que se hayan aislado levaduras de dichos animales (v.g. Ehlers & Olesen, 1997; Stratford & al., 2002; Ganter, 2006).

En la bibliografía científica revisada hasta ahora no se ha encontrado referencia a la presencia y acción de los microorganismos nectarívoros en las flores de *Scrophularia*, a pesar de que buena parte de sus especies son altamente nectaríferas. Este aspecto será objeto de estudio en uno de los capítulos de esta memoria.

SISTEMAS DE POLINIZACIÓN

Para la mayoría de las especies de *Scrophularia* sect. *Scrophularia* diversos estudios realizados hasta la fecha señalan que sus principales polinizadores son avispa (Vespidae) (Sprengel, 1793; Müller, 1883; Shaw, 1962; Faegri & van der Pijl, 1979), aunque otra serie de insectos con menor frecuencia o importancia pueden actuar también como tales (de Vos, 1983; Hoffmann & Kwak, 2005; Schremmer, 1959, entre otros). Efectivamente, suele ser frecuente observarlas visitando flores de coloración

apagada, más o menos monótona y tamaños en general medianos en especies de dicha sección (v.g. *S. lyrata*, *S. nodosa*). En las especies de la sect. *Caninae*, con flores de coloración violácea y tamaño más pequeño son más frecuentes los sírfidos (Schremmer, 1959; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b; Valtueña & al., 2013; Rodríguez-Riaño & al., 2014). Con respecto a especies de flores grandes y coloración muy llamativa (anaranjada, rojiza, rojizo-anaranjada o amarillento-rojiza), también encuadradas en la sect. *Scrophularia*, se tiene constancia de lo siguiente: (1) se había indicado polinización por colibríes en la neomexicana *S. macrantha* (Shaw, 1962; Grant, 1994), probablemente sobre la base del síndrome típico de ornitofilia que posee, aunque no existe trabajo alguno donde se demuestren observaciones y experimentos; (2) para la especie canaria *S. calliantha* se sugirió que podría ser polinizada por aves nectarívoras, y ciertamente posee síndrome de ornitofilia (Vogel & al., 1984) e incluso Valido & al. (2004) la indicaron como potencialmente polinizada por aves o quizás por un sistema mixto aves-insectos; (3) de las especies mediterráneas no existía información sobre los polinizadores de *S. trifoliata* y para *S. sambucifolia* y *S. grandiflora* (ambas presentes en la flora peninsular) no se habían llevado a cabo estudios en poblaciones naturales; tan solo observaciones puntuales cuando estuvieron cultivadas en el jardín experimental del Campus Universitario de Badajoz (Universidad de Extremadura) y para las que Ortega-Olivencia & Devesa (1993b) mostraron que algunos Apidae visitaban sus flores. Otro de los objetivos de esta memoria se centrará en conocer el sistema de polinización presente en las especies mediterráneo-macaronésicas con flores grandes y vistosas.

Tras la revisión de distintas floras holárticas parece concluirse que las especies de *Scrophularia* con morfotipos florales grandes y llamativos que recuerdan al síndrome de ornitofilia se concentran en el Mediterráneo centro-occidental (Islas de Córcega y Cerdeña, W y S de la Península Ibérica y NW de África), Macaronesia (isla de Gran Canaria) y S de EEUU (Nuevo México). En Europa la polinización por aves sólo ha sido experimentalmente demostrada en una especie autóctona, el altramuz hediondo (*Anagyris foetida* L.) (Ortega-Olivencia & al., 2005), mientras que en Macaronesia con mayor número de especies supuestamente ornitófilas (Vogel & al., 1984), se ha demostrado sólo en *Isoplexis canariensis* (L.) J. W. Loudon, *Canarina canariensis* (L.) Vatke y *Lotus berthelotii* Masf. (Rodríguez-Rodríguez & Valido, 2008; Ollerton & al., 2009). En el continente europeo la evidencia de nectarivoría por parte de aves es relativamente común en especies cuyas flores no muestran adaptaciones especiales (v.g.

Brassica sp., *Ferula communis* L., *Citrus sp.* y *Eucalyptus sp.*, Cecere & al., 2011 y referencias), y en todo caso muchas no son autóctonas. Dichas adaptaciones especiales tampoco aparecen en las aves que las visitan, que generalmente son especies de paseriformes oportunistas (Rodríguez-Rodríguez & Valido, 2008).

Dado que el espectro de polinizadores que visitan a una especie puede variar entre períodos y poblaciones (Herrera, 2005), la información predictiva obtenida a partir de los caracteres fenotípicos florales en los que se basan los síndromes de polinización únicamente nos ayudaría a establecer hipótesis que posteriormente deben ser contrastadas (Pellmyr, 2002). Por ello, para poder demostrar experimentalmente que un animal es polinizador de una planta son necesarias observaciones cuantitativas de campo, así como la confirmación de la eficiencia del polinizador (Johnson & Steiner, 2000; Ne'eman & al., 2010); para esto último se debe comprobar que además de transportar y depositar polen en el estigma, la ausencia de los mismos reduce o anula la reproducción sexual en las flores. Uniendo esta información experimental con la proporcionada a partir de los síndromes de polinización es posible realizar inferencias sobre los mecanismos florales de diversificación en un contexto filogenético (Fenster & al., 2004 y referencias) y de este modo conocer el papel que juegan los polinizadores en la evolución y diversificación floral (Smith, 2010). Otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral se centrará en la evolución del sistema de polinización en el género, con especial énfasis en las especies focales de flores grandes y vistosas.

SISTEMAS DE REPRODUCCIÓN

En las especies polinizadas por animales, cada combinación de topología, geometría y fenología en las inflorescencias, permite obtener una particular eficacia de la función reproductiva (Harder & Prusinkiewicz, 2013). Los estudios de biología de la reproducción publicados hasta ahora en el género *Scrophularia* sugieren una predominancia de la alogamia en el género, como consecuencia de que sus especies presentan proteroginia (Sprengel, 1793; Müller, 1883; Shaw, 1962; Dalgaard, 1979; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b). Efectivamente, dicho mecanismo floral parece en principio favorecer la polinización cruzada e impedir la autopolinización en la mayoría de las especies estudiadas (Stiefelbogen, 1910; Dalgaard, 1979; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993c; Hoffmann & Kwak, 2005). No obstante, en algunos táxones su eficacia para evitar la autopolinización ha sido cuestionada (v.g. *S. nodosa*, *S. peregrina*; Müller,

1883; Shaw, 1962; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993c) pues, en ausencia de polinizadores, el estilo no se curva y el estigma queda receptivo hasta que se despliegan los estambres, que pueden depositarle parte de su polen.

La mayor parte de los táxones analizados son autocompatibles (Shaw, 1962; Dalgaard, 1979; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993c), por lo que este mecanismo reproductivo junto con el comportamiento de los polinizadores al visitar flores sucesivas de una misma inflorescencia o de inflorescencias distintas de un mismo individuo, propiciarían la polinización geitonógama. Tal autocompatibilidad se ha demostrado tanto en especies americanas (Shaw, 1962) como macaronésicas (Dalgaard, 1979) o del W del Mediterráneo (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993c), aunque en ninguno de estos casos los estudios experimentales se llevaron a cabo en las poblaciones naturales de los táxones. Realmente, sólo se conoce un caso de autoincompatibilidad, concretamente de tipo gametofítico, en la especie rifeña *S. fontqueri* Ortega Oliv. & Devesa (Ortega-Olivencia & Devesa, 1998). Otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral tratará de estudiar el sistema de reproducción en el seno de poblaciones naturales de tres de las especies con flores grandes y vistosas endémicas del C (*S. trifoliata*) y W de la Región Mediterránea (*S. sambucifolia* y *S. grandiflora*).

A la autogamia s.str. comprobada en unas pocas especies (v.g. *S. peregrina*) hay que añadir la existencia de anficarpia en la especie anual *S. arguta*, un fenómeno que consiste en la producción de frutos tanto aéreos como subterráneos o basales originados a partir de flores casmógamas y cleistógamas, respectivamente (Cheplick, 1987). Hasta ahora esta es la única especie del género que posee anficarpia pues *S. lowei*, endémica de Macaronesia y muy relacionada con ella, posee flores cleistógamas aéreas, pero no basales o subterráneas (Dalgaard, 1979).

Desde el punto de vista genético la tasa de autogamia sólo se ha averiguado en *S. nodosa* por medio de isoenzimas (Koniuszek & al., 1986).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El principal objetivo de esta tesis ha sido el de avanzar en el conocimiento de la biología floral, polinización y reproducción en diversas especies del género *Scrophularia* que muestran su centro de diversificación en el CW de la región Mediterránea y en la región Macaronésica, enlazando dichos aspectos con estudios filogenéticos y biogeográficos,

tan escasos en el género. En relación con la biología floral se realiza un inicio en la investigación del papel de las comunidades microbianas del néctar mediante una selección de especies con flores de diferentes fenotipos y tamaños. Respecto a la polinización se indaga en el papel de los polinizadores, tanto invertebrados como vertebrados en las especies de flores grandes y llamativas del género, intentando comprobar si la polinización mediante avispa es casi un dogma o por el contrario existen más variantes. Este estudio es seguido de un análisis del sistema de reproducción de dichas especies en el seno de poblaciones naturales. Por otro lado, mediante metodologías moleculares se investigan las relaciones filogenéticas y biogeográficas de un conjunto de especies, mayoritariamente mediterráneo-macaronésicas, ahondando en la evolución de los sistemas de polinización y en las rutas de migración de las mismas, especialmente en nuestras especies focales (v.g. las que poseen fenotipos florales grandes y vistosos). Con este fin se ha muestreado el mayor número posible de poblaciones y especies, de cara a obtener la filogenia del género más actualizada y completa, proporcionando estimaciones de las edades de diversificación de sus principales clados.

Con dichos antecedentes, los objetivos específicos perseguidos en esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

1. Estudiar la existencia de polinización por aves, exclusiva o mixta con insectos, en *Scrophularia sambucifolia* (endemismo iberonorteafriano), *S. grandiflora* (endemismo del CW Portugal), *S. trifoliata* (endémica de las islas del mar Tirreno) y *S. calliantha* (isla de Gran Canaria), cuatro especies mediterráneo-macaronésicas con caracteres florales ornitófilos.
2. Evaluar la importancia de los polinizadores en la reproducción de *S. sambucifolia*, *S. grandiflora* y *S. trifoliata* bajo condiciones de polinización natural y polinización impedida, y averiguar experimentalmente si dichas especies se tipifican como autocompatibles o autoincompatibles. Además, en el caso concreto de *S. trifoliata*, se pretende conocer el papel de las manchas corolinas como guías de néctar, ya que es la única del género que las presenta.
3. Estudiar la composición de azúcares del néctar floral en las especies de flores grandes y llamativas y su comparación con la de otras que las poseen de menor tamaño y menos vistosas (*S. lyrata*, *S. scorodonia* y *S. canina*), analizando si dicha composición varía en función de los polinizadores como posible respuesta a dietas diferentes de los mismos.

A la vez se pretende investigar si en el néctar de dichas especies se desarrollan microorganismos (v.g. levaduras) que pudieran estar involucrados en el metabolismo de los azúcares y cuáles podrían ser los vectores transportadores de los mismos.

4. Reconstruir y cuantificar los cambios en los sistemas de polinización en el curso de la evolución de *Scrophularia* en un contexto filogenético, mediante estudios moleculares de ADN nuclear y plastidial.

5. A partir de los datos moleculares, realizar un estudio biogeográfico de algunos clados, especialmente los representados en la región Mediterránea occidental y en la Macaronésica.

ESTRUCTURACIÓN DE LA MEMORIA DE TESIS

Para conseguir los objetivos propuestos, esta memoria se ha estructurado en seis capítulos con formato de artículos científicos, por lo que cada uno de ellos se presenta con sus correspondientes apartados de introducción, material y métodos, resultados y discusión, precedidos por un resumen en español e inglés. Por ello, al utilizar este formato, algunas características referidas a las especies, poblaciones o antecedentes pueden resultar a veces reiterativas. Dos de los capítulos se muestran en inglés por estar ya publicados (Capítulo 5) o en fase de publicación (Capítulo 6). La mayor parte del primer capítulo fue publicado hace dos años (Ortega-Olivencia & al., 2012), pero dado que sobre él gravita mayoritariamente el resto de la Tesis, se ha optado por redactarlo en nuestro idioma al tiempo que se incluyen algunas actualizaciones. A continuación se enumeran los capítulos de esta memoria:

Capítulo 1. Insectos, aves y lagartos como polinizadores de las especies con flores grandes y vistosas de *Scrophularia* en Europa y Macaronesia.

Capítulo 2. Sistema de reproducción en poblaciones naturales de *Scrophularia sambucifolia* y *S. grandiflora*.

Capítulo 3. Sistemas de polinización y reproducción en poblaciones sardas de *Scrophularia trifoliata*.

Capítulo 4. Composición de azúcares y análisis de la existencia de levaduras en el néctar de *Scrophularia*.

Capítulo 5. The role of birds and insects in pollination shifts of *Scrophularia* (Scrophulariaceae).

Capítulo 6. Multiple windows of colonization to Macaronesia since Late Miocene by the dispersal-unspecialized *Scrophularia*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albach D., H. Meudt & B. Oxelman** (2005) Piecing together the “new” Plantaginaceae. *American Journal of Botany* 92: 297-315.
- APG III: Bremer B., K. Bremer, M. Chase, M. Fay, J. Reveal, D. Soltis, P. Soltis & P. Stevens** (2009) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105-121.
- Attar F., M. Riahi, F. Daemi & F. Aghabeigi** (2011) Preliminary molecular phylogeny of Eurasian *Scrophularia* (Scrophulariaceae) based on DNA sequence data from *trnS-trnG* and ITS regions. *Plant Biosystems* 145: 857-865.
- Brodmann J., D. Emer & M. Ayasse** (2012) Pollinator attraction of the wasp-flower *Scrophularia umbrosa* (Scrophulariaceae). *Plant Biology* 14: 500-505.
- Brysch-Herzberg M.** (2004) Ecology of yeasts in plant-bumblebee mutualism in Central Europe. *FEMS Microbiology Ecology* 50: 87-100.
- Canto A., C.M. Herrera, I.M. García, R. Pérez & M. Vaz** (2011) Intraplant variation in nectar traits in *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae) as related to floral phase, environmental conditions and pollinator exposure. *Flora* 206: 668-675.
- Canto A., C.M. Herrera, M. Medrano, R. Pérez & I.M. García** (2008) Pollinator foraging modifies nectar sugar composition in *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae): an experimental test. *American Journal of Botany* 95: 315-320.
- Cecere J.G., L. Cornara, S. Mezzetta, A. Ferri, F. Spina & L. Boitani** (2011) Pollen couriers across the Mediterranean: the case of migrating warblers. *Ardea* 99: 33-42.
- Cheplick G.P.** (1987) The ecology of amphicarpic plants. *Tree* 2: 97-101.
- Chittka L. & N.E. Raine** (2006) Recognition of flowers by pollinators. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 428-435.
- Dalgaard V.** (1979) Biosystematics of the Macaronesian species of *Scrophularia*. *Opera Botanica* 51: 3-64.
- de Vega C., C.M. Herrera & S.D. Johnson** (2009) Yeasts in floral nectar of some South African plants: quantification and associations with pollinator type and sugar concentration. *South African Journal of Botany* 75: 798-806.
- de Vos O.C.** (1983) *Scrophularia nodosa*, adapted to wasp pollination? *Acta Botanica Neerlandica* 32: 345.
- De-Yuan H.** (1983) The distribution of Scrophulariaceae in the Holarctic with special reference to the floristic relationships between Eastern Asia and Eastern North America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 70: 701-712.
- Don G.** (1837-38) *A general system of gardening and botany* 4. London.
- Dupont Y.L., D.M. Hansen, J.T. Rasmussen & J.M. Olesen** (2004) Evolutionary changes in nectar sugar composition associated with switches between bird and insect pollination: the Canarian bird-flower element revisited. *Functional Ecology* 18: 670-676.
- Ehlers B.K. & J.M. Olesen** (1997) The fruit-wasp route to toxic nectar in *Epipactis* orchids?

Flora 192: 223-229.

- Faegri K. & L. van der Pijl** (1979) *The principles of pollination ecology*. Pergamon. Oxford.
- Fenster C.B., W.S. Armbruster, P. Wilson, M.R. Dudash & J.D. Thomson** (2004) Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35: 375-403.
- Ganter P.F.** (2006) Yeast and invertebrate associations. In: Rosa C. & G. Peter (Eds.) *Biodiversity and ecophysiology of yeasts*, pp. 303-370. Springer. Heidelberg.
- Gorshkova S.G.** (1955) *Scrophularia*. In: Shishkin B.K. & E.G. Bobrov (Eds.) *Flora of the USSR* 12: 264-349. Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR. Moskva-Leningrad. [Traducido al inglés en 1994, Bishen Singh Mahendra Pal Singh and Koeltz Scientifica Books].
- Grant V.** (1994) Historical development of ornithophily in the western North American flora. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 10407-10411.
- Grau J.** (1981) *Scrophularia* L. In: Rechinger K.H. (Ed.) *Flora Iranica* 147: 213-284. Akademische Druck- u. Verlagsanstalt. Graz.
- Gray A.** (1871) Arrangement for cross fertilization of the flowers of *Scrophularia nodosa*. *American Journal of Science and Arts* 2: 150-151.
- Gray A.** (1876) Fertilization of flowers by insect agency. *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia* 28: 110-112.
- Harder L.D. & P. Prusinkiewicz** (2013) The interplay between inflorescence development and function as the crucible of architectural diversity. *Annals of Botany* 112: 1477-1493.
- Herrera C.M.** (2005) Plant generalization on pollinators: Species property or local phenomenon? *American Journal of Botany* 92: 13-20.
- Herrera C.M., A. Canto, M.I. Pozo & P. Bazaga** (2010) Inhospitable sweetness: nectar filtering of pollinator-borne inocula leads to impoverished, phylogenetically clustered yeast communities. *Proceedings of the Royal Society B* 277: 747-754.
- Herrera C.M., C. de Vega, A. Canto & M.I. Pozo** (2009) Yeasts in floral nectar: a quantitative survey. *Annals of Botany* 103: 1415-1423.
- Herrera C.M., I.M. García & R. Pérez** (2008) Invisible floral larcenies: microbial communities degrade floral nectar of bumble bee-pollinated plants. *Ecology* 89: 2369-2376.
- Hoffmann F. & M.M. Kwak** (2005) The vulnerability to pollinator species loss of plant species with various pollination syndromes and degrees of specialisation. In: Hoffmann F. (Ed.) *Biodiversity and pollination*, pp. 93-116. University of Groningen. Haren.
- Johnson S.D. & K.E. Steiner** (2000) Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 140-143.
- Koniuszek J., W. Bast-Cramer, R. Guerlings & J. Verkleij** (1986) Estimation of selfing rate in a natural population of *Scrophularia nodosa* L. using allozymes. *Acta Botanica Neerlandica* 35: 393-403.
- Lall S.S. & R.R. Mill** (1978) *Scrophularia* L. In: Davis P.H. (Ed.) *Flora of Turkey* 6: 603-647. Edinburgh University Press. Edinburgh.
- Lunau K., G. Fieselmann, B. Heuschen & A. van de Loo** (2006) Visual targeting of components of floral colour patterns in flower-naive bumblebees (*Bombus terrestris*; Apidae). *Naturwissenschaften* 93: 325-328.
- Lunau K. & E.J. Maier** (1995) Innate colour preferences of flower visitors. *Journal of Comparative Physiology A* 177: 1-19.

- Mabberley D.J.** (1997) *The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Müller H.** (1883) *The fertilization of flowers*. Macmillan and Co. London.
- Neal P.R., A. Dafni & M. Giurfa** (1998) Floral symmetry and its role in plant-pollinator systems: terminology, distribution, and hypotheses. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 345-373.
- Ne'eman G., A. Jürgens, L. Newstrom-Lloyd, S.G. Potts & A. Dafni** (2010) A framework for comparing pollinator performance: effectiveness and efficiency. *Biological Reviews* 85: 435-451.
- Ollerton J., L. Cranmer, R.J. Stelzer, S. Sullivan & L. Chittka** (2009) Bird pollination of Canary Island endemic plants. *Naturwissenschaften* 96: 221-232.
- Olmstead R.G.** (2007) *Lamiales*. Vers. 2. <http://depts.washington.edu/phylo/classifications/Lamiales.html>. [Fecha de consulta: 28/07/2014].
- Olmstead R.G., C.W. Depamphilis, A.D. Wolfe, N.D. Young, W.J. Elisons & P.A. Reeves** (2001) Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany* 88: 348-361.
- Olmstead R.G. & P.A. Reeves** (1995) Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 176-193.
- Ortega-Olivencia A.** (2009) *Scrophularia* L. In: Benedí C., E. Rico, J. Güemes & A. Herrero (Eds.) *Flora iberica* 13: 97-122. Real Jardín Botánico. CSIC. Madrid.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1990) Contribución al estudio cariológico del género *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae) en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Lagascalia* 16: 171-198.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993a) Revisión del género *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae) en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Ruizia* 11: 1-157. Monografías del Real Jardín Botánico de Madrid. CSIC. Madrid.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993b) Floral rewards in some *Scrophularia* species (Scrophulariaceae) from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *Plant Systematics and Evolution* 184: 139-158.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993c) Sexual reproduction in some *Scrophularia* species (Scrophulariaceae) from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *Plant Systematics and Evolution* 184: 159-174.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1998) Taxonomy and breeding system in a new species of *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae) from Morocco. *Botanical Journal of the Linnean Society* 128: 185-202.
- Ortega-Olivencia A., T. Rodríguez-Riño, J.L. Pérez-Bote, J. López, C. Mayo, F.J. Valtueña & M. Navarro-Pérez** (2012) Insects, birds and lizards as pollinators of the largest-flowered *Scrophularia* of Europe and Macaronesia. *Annals of Botany* 109: 153-167.
- Ortega-Olivencia A., T. Rodríguez-Riño, F.J. Valtueña, J. López & J.A. Devesa** (2005) First confirmation of a native bird-pollinated plant in Europe. *Oikos* 110: 578-590.
- Oxelman B., P. Kornhall, R.G. Olmstead & B. Bremer** (2005) Further disintegration of Scrophulariaceae. *Taxon* 54: 411-425.
- Pellmyr O.** (2002) Pollination by animals. In: Herrera C.M. & O. Pellmyr (Eds.) *Plant-animal interactions: an evolutionary approach*, pp. 157-184. Blackwell Science. Oxford.

- Percival M.S.** (1961) Types of nectar in angiosperms. *New Phytologist* 60: 235-281.
- Pozo M.I., C. de Vega, A. Canto & C.M. Herrera** (2009) Presence of yeasts in floral nectar is consistent with the hypothesis of microbial-mediated signaling in plant-pollinator interactions. *Plant Signaling & Behavior* 4: 1102-1104.
- Pozo M.I., C. Herrera & P. Bazaga** (2011) Species richness of yeast communities in floral nectar of Southern Spanish plants. *Microbial Ecology* 61: 82-91.
- Proctor M., P. Yeo & A. Lack** (1996) *The natural history of pollination*. HarperCollins Publishers. London.
- Rahmanzadeh R., K. Müller, E. Fischer, D. Bartels & T. Borsch** (2005) The Linderniaceae and Gratiolaceae are further lineages distinct from the Scrophulariaceae (Lamiales). *Plant Biology* 7: 67-78.
- Ricca L.** (1871) Alcune osservazioni relative alla dicogamia nei vegetali fatte sulle Alpi di Val Camonica nell'anno 1879. *Atti della Società Italiana di Scienze Naturali* 13: 254-263.
- Richards A.J.** (1986) *Plant breeding systems*. Unwin Hyman. London.
- Richardson I.B.K.** (1972) *Scrophularia* L. In: Tutin T.G., V.H. Heywood, N.A. Burges, D.H. Valentine, S.M. Walters & D.A. Webb (Eds.) *Flora Europaea* 3: 216-221. Cambridge University Press. Cambridge.
- Rodríguez-Riaño T., A. Ortega-Olivencia, J. López, J.L. Pérez-Bote & M.L. Navarro-Pérez** (2014) Main sugar composition of floral nectar in three species groups of *Scrophularia* (Scrophulariaceae) with different principal pollinators. *Plant Biology*, doi:10.1111/plb.12159.
- Rodríguez-Rodríguez M.C. & A. Valido** (2008) Opportunistic nectar-feeding birds are effective pollinators of bird-flowers from Canary Islands: experimental evidence from *Isoplexis canariensis* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany* 95: 1408-1415.
- Schäferhoff B., A. Fleischmann, E. Fischer, D.C. Albach, T. Borsch, G. Heubl & K.F. Müller** (2010) Towards resolving Lamiales relationships: insights from rapidly evolving chloroplast sequences. *BMC Evolutionary Biology* 10: 352.
- Scheunert A. & G. Heubl** (2011) Phylogenetic relationships among New World *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae): new insights inferred from DNA sequence data. *Plant Systematics and Evolution* 291: 69-89.
- Scheunert A. & G. Heubl** (2014) Diversification of *Scrophularia* (Scrophulariaceae) in the Western Mediterranean and Macaronesia - Phylogenetic relationships, reticulate evolution and biogeographic patterns. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 70: 296-313.
- Schremmer F.** (1959) Die bestäuber der Blüten von *Scrophularia canina* L. und Beobachtungen über postflorale Nektarabsonderung. *Oesterreichische Botanische Zeitschrift* 106: 187-193.
- Shaw J.** (1962) The biosystematics of *Scrophularia* in Western North America. *Aliso* 5: 147-178.
- Smith S.D.** (2010) Using phylogenetics to detect pollinator-mediated floral evolution. *New Phytologist* 188: 354-363.
- Sprengel C.K.** (1793) Discovery of the secret of nature in the structure and fertilization of flowers. In: Lloyd D.G. & S.C. Barrett (Eds.) *Floral Biology*, pp. 3-43. Chapman and Hall. New York. [Traducido al inglés by P. Haase en 1996].
- Stevens P.F.** (2001 onwards) *Angiosperm Phylogeny Website*. Version 12, July 2012 [and more or less continuously updated since]. www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb.

- Stiefelhagen H.** (1910) Systematische und pflanzengeographische Studien zur Kenntnis der Gattung *Scrophularia*. Vorarbeiten zu einer Monographie. *Botanische Jahrbuecher fuer Systematik* 44: 406-496.
- Stratford M., C.J. Bond, S.A. James, I.N. Roberts & H. Steels** (2002) *Candida davenportii* sp. nov., a potential soft-drinks spoilage yeast isolated from a wasp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1369-1375.
- Tank D.C., P.M. Beardsley, S.A. Kelchner & R.G. Olmstead** (2006) Review of the systematics of Scrophulariaceae s.l. and their current disposition. *Australian Systematic Botany* 19: 289-307.
- Trelease W.** (1881) The fertilization of *Scrophularia*. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 8: 133-140.
- Valido A., Y.L. Dupont & J.M. Olesen** (2004) Bird-flower interactions in the Macaronesian islands. *Journal of Biogeography* 31: 1945-1953.
- Valtueña F.J., A. Ortega-Olivencia, T. Rodríguez-Riaño, J.L. Pérez-Bote & C. Mayo** (2013) Behaviour of pollinator insects within inflorescences of *Scrophularia* species from Iberian Peninsula. *Plant Biology* 15: 328-334.
- Vannette R.L., M.P.L. Gauthier & T. Fukami** (2013) Nectar bacteria, but not yeast, weaken a plant-pollinator mutualism. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 20122601.
- Vogel S., C. Westerkamp, B. Thiel & K. Gessner** (1984) Ornithophily on the Canary Islands. *Plant Systematics and Evolution* 146: 225-248.
- Wiens F., A. Zitzmann, M.A. Lachance, M. Yegles, F. Pragst, F.M. Wurst, D. von Holst, S. Len Guan & R. Spanagel** (2008) Chronic intake of fermented floral nectar by wild treeshrews. *PNAS* 105: 10426-10431.
- Wilson A.S.** (1878) On the association of an inconspicuous corolla with proterogynous dichogamy in insect-fertilised flowers. *Report of the Annual Meeting of British Association for the Advancement of Science* 1878: 564-567.
- Wydler H.** (1828) Essai monographique sur le genre *Scrophularia*. *Mémoires de la Société de Physique et d'Histoire Naturelle de Genève* 4: 121-170.

Capítulo 1

Insectos, aves y lagartos como polinizadores de las especies con flores grandes y vistosas de *Scrophularia* en Europa y Macaronesia

Una versión de este capítulo ha sido publicada en *Annals of Botany*:

Ortega-Olivencia A., T. Rodríguez-Riaño, J.L. Pérez-Bote, J. López, C. Mayo, F.J. Valtueña & M.L. Navarro-Pérez (2012) Insects, birds and lizards as pollinators of the largest-flowered *Scrophularia* of Europe and Macaronesia. *Annals of Botany* 109: 153-167.

RESUMEN

Tradicionalmente se ha considerado que las flores de *Scrophularia* son principalmente polinizadas por avispas. En este capítulo se estudia el sistema de polinización de las cuatro especies de Europa y Macaronesia que destacan por sus flores grandes y vistosas: *S. sambucifolia* y *S. grandiflora* (endémicas de la región Mediterránea occidental), *S. trifoliata* (endémica de las islas del Mar Tirreno) y *S. calliantha* (endémica de las Islas Canarias). El principal objetivo fue verificar si estas especies eran polinizadas por aves o mostraban un sistema de polinización mixto entre insectos y aves. Para ello se realizaron censos, así como capturas de los insectos y las aves que las visitaban de cara a obtener la carga de polen transportado y depositado sobre los estigmas. Además, se llevó a cabo un análisis cualitativo y cuantitativo de las flores e inflorescencias. Los resultados mostraron que las flores de esas plantas eran visitadas tanto por himenópteros como por aves paseriformes. La especie canaria recibió el mayor número de visitas por parte de las aves, especialmente por *Phylloscopus canariensis*, y también accedieron a sus flores individuos juveniles del lagarto canario *Gallotia stehlini*. Las aves más importantes de las otras tres especies fueron las currucas *Sylvia melanocephala* y *S. atricapilla*. Los grupos funcionales de insectos principales en el sistema de polinización mixto fueron los siguientes: abejas y avispas en *S. sambucifolia*; abejorros y avispas en *S. grandiflora*; avispas en *S. trifoliata* y una abejilla en *S. calliantha*. En definitiva, se demuestra que las especies estudiadas muestran un sistema de polinización mixto entre insectos y aves paseriformes. En *S. calliantha* participa, además, un tercer agente (individuos juveniles de *Gallotia stehlini*). La participación de las aves en este sistema mixto de polinización presenta distintos grados de importancia, ya que, mientras que en *S. calliantha* son los principales polinizadores, en las otras especies interactúan complementándose con los insectos que son los polinizadores más importantes. Una revisión de diferentes floras holárticas muestra que los morfotipos florales grandes y vistosos de *Scrophularia* se concentran en la región occidental y central del Mediterráneo, Macaronesia y EE.UU. (Nuevo México).

ABSTRACT

It has traditionally been considered that the flowers of *Scrophularia* are mainly pollinated by wasps. In this chapter, the pollination system of four species which stand out for their large and showy flowers: *S. sambucifolia* and *S. grandiflora* (endemics of the western Mediterranean region), *S. trifoliata* (an endemic of the Tyrrhenian islands) and *S. calliantha* (an endemic of the Canary Islands) is studied. Our principal aim was to test whether these species were pollinated by birds or showed a mixed pollination system between insects and birds. Censuses and captures of insects and birds were performed to obtain pollen load transported and deposited on

the stigmas. Also, a qualitative and quantitative analysis of the flowers and inflorescences was carried out. Flowers were visited by Hymenoptera and by passerine birds. The Canarian species was the most visited by birds, especially by *Phylloscopus canariensis*, and its flowers were also accessed by juveniles of the Canarian lizard *Gallotia stehlini*. The most important birds in the other three species were *Sylvia melanocephala* and *S. atricapilla*. The main insect-functional groups in the mixed pollination system were: honey-bees and wasps in *S. sambucifolia*; bumblebees and wasps in *S. grandiflora*; wasps in *S. trifoliata*; and a small bee in *S. calliantha*. In short, the species studied show a mixed pollination system between insects and passerine birds. In *S. calliantha* there is, in addition, a third agent (juveniles of *Gallotia stehlini*). The participation of birds in this mixed pollination system presents varying degrees of importance because, while in *S. calliantha* they are the main pollinators, in the other species they interact to complement the insects which are the main pollinators. A review of different floras showed that the large showy floral morphotypes of *Scrophularia* are concentrated in the western and central Mediterranean region, Macaronesia and USA (New Mexico).

INTRODUCCIÓN

Se ha indicado que aproximadamente el 87,5 % de las angiospermas son polinizadas por animales (Ollerton & al., 2011), tanto vertebrados como invertebrados, aunque sin duda los insectos son los más importantes (Proctor & al., 1996). Mientras que los vertebrados están presentes en muchas regiones (América, Australasia, África central y meridional, Asia tropical e Islas del Pacífico; Stiles, 1981; Proctor & al., 1996; Pellmyr, 2002), son muy escasas las publicaciones sobre la polinización por parte de vertebrados en Europa. En este continente no existe polinización por mamíferos, la llevada a cabo por reptiles sólo se conoce en las Islas Baleares (Traveset & al., 2009) y se ha demostrado que la polinización por aves involucra a especies exóticas cuyas flores presentan interacciones con ellas en sus países de origen (revisión en Ford, 1985; Búrquez, 1989). Sin embargo, existen observaciones sobre el consumo de néctar por aves insectívoras en algunas especies nativas, v.g. *Rhamnus alaternus*, *Acer sp.*, *Crataegus sp.*, *Salix sp.*, *Ribes sp.*, etc. (Ford, 1985; Kay, 1985; Calvario & al., 1989; revisión en da Silva & al., 2014) e incluso se ha demostrado en algunos casos (v.g. *Ferula communis*, *Brassica fruticulosa*) que este consumo puede ser un importante recurso alimenticio durante las escalas migratorias mediterráneas de algunas paseriformes (Schwilch & al., 2001; Cecere & al., 2010, 2011).

Hasta la fecha, el único caso experimentalmente documentado de polinización por aves en una especie nativa europea corresponde a *Anagyris foetida*, una leguminosa mediterránea cuyos polinizadores principales son el mosquitero común (*Phylloscopus collybita*), la curruca capirotada (*Sylvia atricapilla*) y la curruca cabecinegra (*S. melanocephala*) (Ortega-Olivencia & al., 2005). Además, en la región Mediterránea oriental, se indicó que *Loranthus accaciae* era polinizada por *Nectarinia osea* (Vogel & al., 1984). Del mismo modo, en la Macaronesia hay una gran cohorte de plantas con síndrome de ornitofilia (Vogel & al., 1984; Olesen, 1985) y este tipo de polinización ha sido demostrado recientemente en varios endemismos canarios, como *Isoplexis canariensis*, *Canarina canariensis* y *Lotus berthelotii*, especialmente por *Phylloscopus canariensis* (Rodríguez-Rodríguez & Valido, 2008; Ollerton & al., 2009b; Olesen & al., 2012) y por *Sylvia atricapilla* en dos especies endémicas de Madeira (*Isoplexis spectrum* y *Musschia wollastonii*, Olesen & Valido, 2003a; Olesen & al., 2012). También existen casos documentados de saurofilia en Macaronesia (Olesen & Valido, 2003b), como por ejemplo el de *Azorina vidalii* en Azores o el de *Musschia aurea* en Madeira (Olesen & al., 2012).

La recompensa que generalmente buscan estos polinizadores en las flores es el néctar cuya composición de azúcares, en algunos casos, se considera un carácter conservado que simplemente refleja las relaciones taxonómicas entre ciertos grupos de plantas (véase revisión de Nicolson & Thornburg, 2007), con lo cual, el gremio de visitantes florales está determinado por la relación filogenética entre las plantas (Galletto & Bernardello, 2004). Los factores climáticos o la distribución geográfica también podrían ser la causa de dicha composición (Galletto & Bernardello, 2003; Petanidou, 2005; Nepi & al., 2010), aunque en este sentido debe tenerse en cuenta que el tipo de hábitat podría tener un impacto en el tipo de visitantes (Nocentini & al., 2013). En otros casos se ha demostrado que las características del néctar tienden a ser similares entre plantas que presentan el mismo síndrome de polinización (Baker & Baker, 1983, 1990; Dupont & al., 2004; Schmidt-Lebuhn & al., 2007; Krömer & al., 2008). No obstante, muchos autores han advertido en contra de dar demasiado peso a los denominados síndromes de polinización cuando se realizan inferencias sobre los polinizadores más probables y, aunque los caracteres florales pueden ser indicativos, dichos síndromes necesitan estar respaldados por observaciones de campo cuantitativas (Johnson & Steiner, 2000; Ollerton & Watts, 2000; Ollerton & al., 2009a). Para valorar

la especificidad en los sistemas de polinización se debe distinguir entre visitantes y polinizadores (Johnson & Steiner, 2000). Una buena manera de cuantificar la especialización floral es a través de las diferencias en las tasas de visitas y la efectividad entre los polinizadores, generalmente mediante la observación directa de su comportamiento y la identificación de las cargas de polen. Más elegante, pero también más laborioso, es exponer las flores vírgenes a una sola visita y medir la eficiencia de la polinización en términos de deposición de polen en el estigma y de producción de semillas. En algunos casos, los polinizadores realmente eficaces sólo comprenden una pequeña fracción del total de visitantes florales (Johnson & Steiner, 2000).

Vogel & al. (1984) proporcionaron una lista de especies con síndrome de ornitofilia para el archipiélago canario, incluyendo a *Scrophularia calliantha*, endémica de la isla de Gran Canaria. Las observaciones en esta especie se realizaron en individuos cultivados en el Jardín Botánico de Mainz (Alemania) basando su pretendida ornitofilia en una serie de caracteres, como tamaño floral grande, ausencia de olor floral, gran producción de néctar, consistencia y color de la corola, disposición de las flores en la inflorescencia, etc. No obstante, no observaron aves visitando sus flores. Más tarde, Valido & al. (2004) la sugieren como potencialmente polinizada por aves o quizás por un sistema mixto aves-insectos. Además, Vogel & al. (1984) citan como posibles especies con “imperfecta” ornitofilia a otras *Scrophularia* europeas con flores grandes: *S. grandiflora*, *S. sambucifolia* y *S. trifoliata*. Para las dos primeras, endémicas de la región Mediterránea occidental, Ortega-Olivencia & Devesa (1993a) mostraron, en plantas cultivadas en un jardín experimental, que algunos Apidae visitaban sus flores. Para la última especie, *S. trifoliata*, endémica de las islas del Mar Tirreno, nada se sabe sobre sus polinizadores ni sobre su producción de néctar. Aparte de *S. macrantha*, endémica del SW de los EE.UU, estas cuatro especies son las que tienen las flores más grandes en *Scrophularia*, un género con unos 270 táxones de distribución principalmente Holártica (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b).

Dado este contexto, los objetivos que se persiguieron en este capítulo fueron los siguientes:

1. Desentrañar si en las dos especies ibéricas (*S. sambucifolia* y *S. grandiflora*) y en las dos insulares (*S. calliantha* y *S. trifoliata*) existe polinización por aves, sola o en conjunción con insectos, a partir de observaciones y experimentos de campo cuantitativos durante dos temporadas de floración (2009 y 2010).

2. Determinar cuál podría ser el carácter con mayor peso en el supuesto síndrome de ornitofilia citado para esas especies mediante un análisis de caracteres cualitativos y cuantitativos potencialmente relacionados con las flores, las inflorescencias y los tipos de polinizadores que las visitan.

MATERIAL Y MÉTODOS

ESPECIES ESTUDIADAS

Las cuatro especies estudiadas en este capítulo son hierbas perennes. Sus flores son proteróginas, zigomorfas y bilabiadas, con cuatro estambres y un estaminodio desarrollado. El gineceo es bicarpelar y la principal recompensa de sus flores es el néctar, que es secretado por un nectario anular situado en la base del ovario. *Scrophularia sambucifolia* habita en el SW de la Península Ibérica y el NW de África, en suelos profundos de naturaleza margo-caliza, desde los 0 a los 1.300 m (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b; Ortega-Olivencia, 2009). Es una planta glabra o glabrescente, con tallos columnares hasta de 190 cm de altura, rematados en inflorescencias terminales constituidas por cimas compuestas. La corola es glabra, externamente rojiza o rojizo-anaranjada, con el labio superior bilobulado más o menos erguido y el inferior trilobulado (los dos lóbulos laterales erectos y el central reflejo en la madurez); el tubo es más o menos subgloboso (Fig. 1A, B). *S. grandiflora* se distribuye por el CW de Portugal, donde habita en herbazales, márgenes de caminos y carreteras, y sobre paredes y muros. Esta especie es glanduloso-pubescente, alcanza los 180 cm de altura, tiene una corola glabra, externamente rojiza o rosado cárneo (Fig. 1C, D) y el resto de características florales y vegetativas similares a la especie anterior (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b; Ortega-Olivencia, 2009).

S. trifoliata, endémica de las islas del mar Tirreno (Córcega, Cerdeña e isla de Gorgona), vive en lugares abrigados y húmedos de áreas montanas y submontanas (Valsecchi, 1979). Es una planta glabra, hasta de 200 cm de altura, con corola de color rojizo-púrpura o amarillento-verdoso provista externamente de glándulas diminutas, y con el resto de características similares a la primera especie (Valsecchi, 1979; A. Ortega-Olivencia, obs. pers.), aunque el lóbulo central del labio inferior no es completamente reflejo en la madurez. A diferencia de las otras tres especies, *S. trifoliata* tiene dos grandes máculas (hasta de 7 × 6 mm) a modo de guías de néctar en la mitad

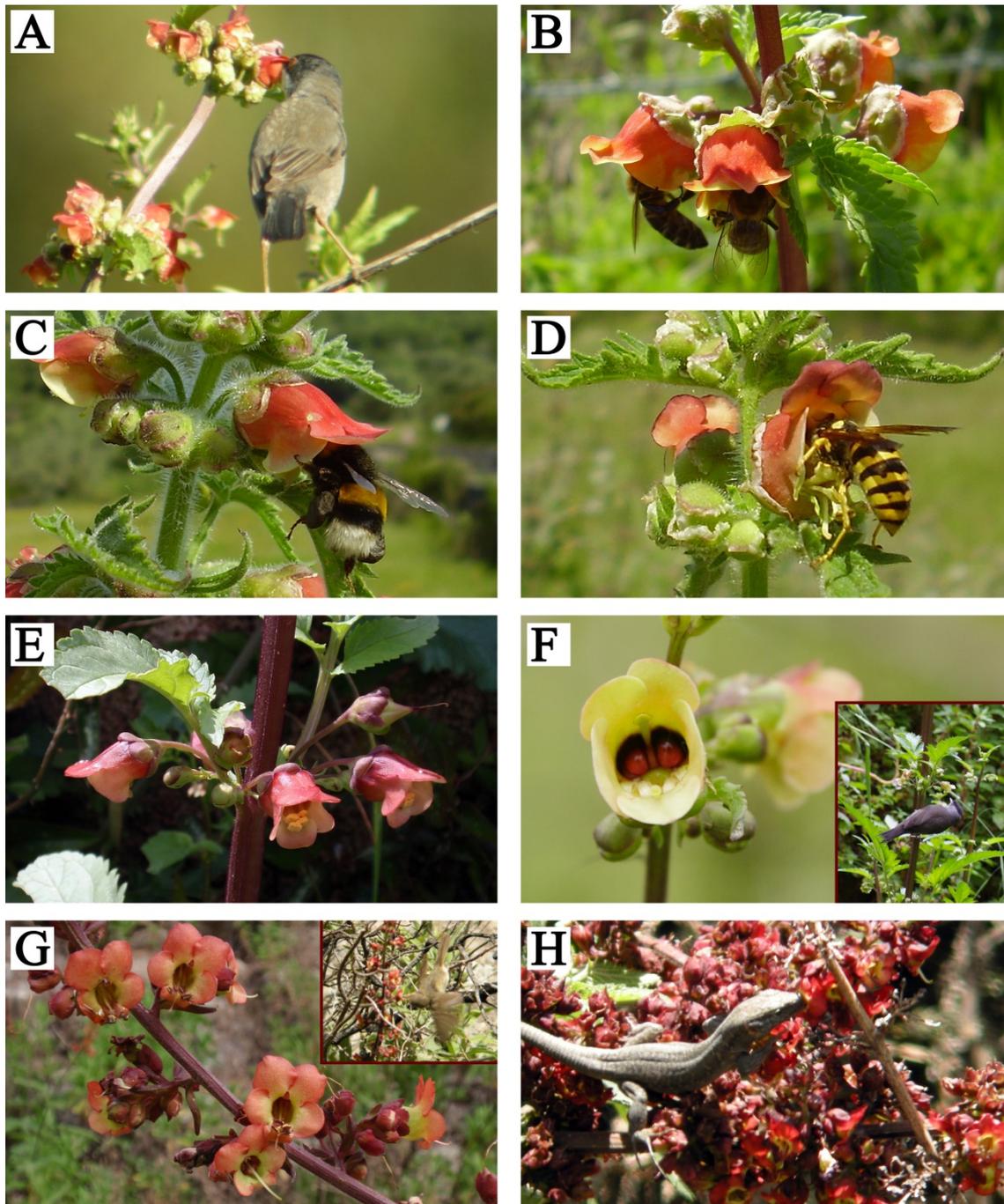


Figura 1. Detalles de las flores de las especies de *Scrophularia* estudiadas y sus polinizadores: *S. sambucifolia* visitada por *Sylvia melanocephala* (A) y por *Apis mellifera* (B); *S. grandiflora* visitada por *Bombus terrestris lusitanicus* (C) y por *Vespula germanica* (D); morfotipo floral rojizo (E) y verdoso-amarillento (F) de *S. trifoliata* (imagen insertada: flores visitadas por *S. melanocephala*); flores de *S. calliantha* (G) visitadas por *Phylloscopus canariensis* (recuadro interno) y por un individuo juvenil de *Gallotia stehlini* (H).

inferior del interior del tubo de la corola, justo debajo del estaminodio. Estas máculas son de color rojizo o rojo-purpúreo y están rodeadas por una banda negra (A. Ortega-Olivencia, obs. pers.; Fig. 1E, F). *S. calliantha*, endémica de la isla de Gran

Canaria (Macaronesia), vive en paredes húmedas, por lo general, colonizando grietas o fondos de barrancos de poca profundidad, con humedad más o menos permanente, desde los 600 a los 1.600 m (Navarro & al., 2004). Esta especie es a veces sufruticosa en la base, glandulosa y alcanza hasta los 200 cm de longitud (Dalgaard, 1979) pero, a diferencia de las otras tres, arquea sus tallos hacia arriba cuando jóvenes y es decumbente en la madurez (A. Ortega-Olivencia, obs. pers.). La corola tiene el tubo de color amarillento y los lóbulos rojizos, con pequeñas glándulas en la cara interna de los mismos y, aunque bilabiada, todos los lóbulos son más o menos perpendiculares al tubo (en ángulos de casi 90°) asemejándose a una corola rotácea (Fig. 1G, H).

POBLACIONES ESTUDIADAS

Se han estudiado cuatro poblaciones de la Península Ibérica (Fig. 2), dos por cada especie y varias en las islas de Gran Canaria y Cerdeña. Las correspondientes a *S. sambucifolia* se ubican en Andalucía (provincias de Sevilla y de Cádiz), distanciándose entre sí unos 58 km y a unos 300 km de Badajoz. Las seleccionadas para *S. grandiflora* se localizan en el distrito de Coimbra, dentro de los concejos de Soure y Penela, a 2 km de distancia entre ellas y a unos 250 km de Badajoz.

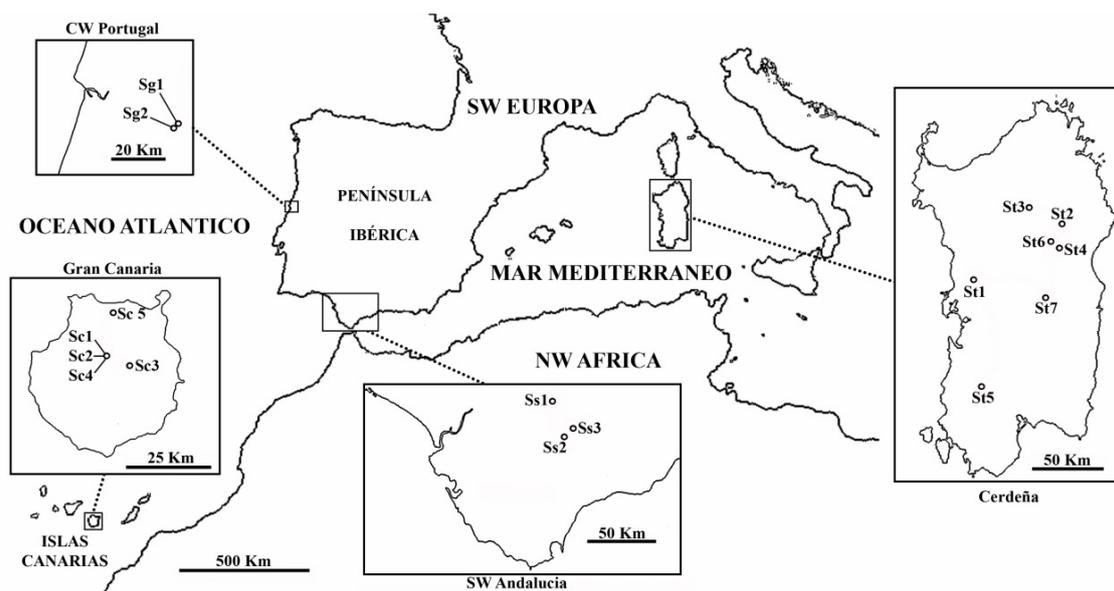


Figura 2. Poblaciones de las especies estudiadas de *Scrophularia*. *S. calliantha*: Sc1, Presa de Hornos; Sc2, Canal de la Mina; Sc3, Rincón de Tenteniguada; Sc4, Barranquillo de Juan Francés; Sc5, Tilos de Moya. *S. grandiflora*: Sg1, Rabaçal; Sg2, Pombalinho. *S. sambucifolia*: Ss1, Morón; Ss2, El Gastor; Ss3, Olvera. *S. trifoliata*: St1, Santu Lussurgiu; St2, Bitti; St3, Pattada; St4, Monte Ortobene; St5, Riu Leui; St6, Nuraghe di Orizzanne; St7, Desulo.

S. sambucifolia. De las dos poblaciones seleccionadas, la primera (en adelante, Morón) se encuentra a 7 km de Morón de la Frontera (Sevilla), en el margen de una zona de olivares, tierras de cultivo de cereales y matorral dominado por *Retama sphaerocarpa*, en sustrato margo-calizo. La segunda, El Gastor, se sitúa a 4 km de Algodonales (Cádiz) en la cuneta de una carretera junto al margen de un terreno de cultivo cerealista mezclado con restos de matorral mediterráneo sobre sustrato calizo. También se realizaron observaciones de polinizadores de menor intensidad en una tercera población, Olvera (Cádiz), situada entre las dos anteriores y con características ecológicas similares (Fig. 2).

S. grandiflora. La primera población, Rabaçal, se localiza en un herbazal antropizado rodeado por setos de *Rubus ulmifolius* y matorral típicamente mediterráneo, sobre sustrato margo-calizo. La segunda, Pombalinho, está dentro de un terreno privado de uso pastoril junto a herbazales salpicados de olivos (Fig. 2).

S. calliantha. Las principales poblaciones de estudio son la Presa de Hornos y el Canal de la Mina (CN de la isla de Gran Canaria). La primera población, dominada principalmente por matorrales de *Pterocephalus dumetorum* y rodeada por un bosque de pino canario (*Pinus canariensis*), se sitúa sobre riolitas y traquitas antiguas. La segunda se localiza en un sustrato similar al de la primera y está dominado por un bosque de sauces y matorrales de genisteas. También se han realizado observaciones adicionales de visitantes florales en el Rincón de Tenteniguada, en el Barranquillo de Juan Francés y en los Tilos de Moya (Fig. 2).

S. trifoliata. Las principales poblaciones investigadas son Santu Lussurgiu y Bitti (Cerdeña, Italia). La primera se encuentra al W de la isla, en una fresneda en las inmediaciones del río Ses Molins, asentándose los individuos en muros, vallas y en márgenes de huertas. La segunda se localiza en el NE de la isla, en el borde de un bosque mixto de robles y encinas, cerca de una ribera, sobre muros y márgenes de carreteras. Se han realizado observaciones adicionales en Pattada, Monte Ortobene, Riu Leui, Nuraghe di Orizzanne y Desulo (Cerdeña) (Fig. 2).

CENSOS Y COMPORTAMIENTO DE LOS VISITADORES Y/O POLINIZADORES

En el caso de *S. sambucifolia* y *S. grandiflora*, los censos e identificación de los diferentes visitantes florales se efectuaron en 2009 (desde el 12 de marzo hasta el 15

de mayo y del 12 de marzo al 29 de mayo, respectivamente) y en 2010 (del 11 de marzo hasta el 12 de mayo y del 8 de abril al 1 de junio, respectivamente). La mayoría de las veces, los censos consistieron en períodos de observación de 10 minutos en el caso de los insectos y de 20 en el de las aves, a lo largo de todo el día, a una distancia de las plantas de 0,5 m en el caso de los insectos y de 1,5-5 m en el de las aves. Se tenía en cuenta, siempre que era posible, el número de flores e inflorescencias visitadas por vuelo. Para las aves, también se anotaba la forma de acceder a las flores (revoloteando vs posándose en perchas). Los censos se realizaron semanalmente desde el amanecer hasta el anochecer, en todas las condiciones meteorológicas posibles y durante todo el período fenológico. Cualquier animal que en su visita contactara con ambos órganos sexuales de la flor se consideró como un verdadero polinizador, frente a aquellos que al buscar polen o néctar, rozaban únicamente uno de los dos órganos y, por lo tanto, se consideraron como “ladrones” (Ollerton & al., 2009b). Estas observaciones directas eran complementadas con vídeos y fotos.

Los censos de las poblaciones de las dos especies insulares se llevaron a cabo durante el año 2010: desde el 29 de abril hasta el 5 de mayo (*S. calliantha*) y del 10 al 16 de mayo (*S. trifoliata*). El procedimiento fue el mismo que para las dos especies anteriores. Dadas las características especiales de la especie canaria (generalmente decumbente cuando madura), también se fijaron periodos de observación para reptiles.

EFICACIA DE LOS VISITADORES EN LA POLINIZACIÓN

Carga polínica transportada y depositada por los insectos en el estigma

Para determinar la efectividad polinizadora de los insectos, se midió la carga de polen que llevaban en su cuerpo y la transferida al estigma. En el primer caso, se capturaban varios insectos cada día usando trampas entomológicas. Tras retirar, cuando era necesario, la carga de polen corbicular, dichos insectos se depositaron en viales con una cantidad conocida de alcohol al 70 %. Para determinar la carga polínica, se agitaba el vial mecánicamente c. 2 minutos, después se depositaban 10 ml de la solución sobre un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol de cara a facilitar el recuento bajo el microscopio óptico (MO), y finalmente el recuento efectuado de polen se multiplicaba por el factor de dilución apropiado. El polen de *Scrophularia* (en adelante efectivo) fue distinguido del polen foráneo correspondiente a otras especies.

Para estimar la carga polínica transferida al estigma por el insecto se embolsaron botones florales próximos a la antesis. Una vez abiertos (fase funcionalmente femenina), se retiraba la bolsa de nylon hasta que la flor recibía una sola visita y posteriormente se embolsaban de nuevo. A continuación se anotaban el visitador y el tiempo de visita. Aproximadamente 1 hora más tarde (tiempo suficiente no sólo para la adhesión del polen al estigma, sino incluso para su germinación), el gineceo se recolectaba y se depositaba en un vial con 1 ml de alcohol al 70 % para el recuento posterior de la carga de polen (efectivo y foráneo) bajo el MO (n = 89 flores en *S. sambucifolia* y n = 170 en *S. grandiflora*).

Carga polínica transportada por aves y reptiles

En el caso de las aves, este parámetro se estimó, semanalmente durante 2010 y solo en las especies peninsulares, mediante su captura con redes japonesas colocadas durante todo el día y situadas en puntos estratégicos. Al mismo tiempo y, aprovechando el estrés de las aves durante su captura, se tomaron muestras de sus heces para averiguar si habían ingerido polen durante sus visitas. Los animales no eran dañados durante su captura y se ponían en libertad tras la extracción de las muestras. El recuento de polen en ambos casos se llevó a cabo utilizando el método descrito en Ortega-Olivencia & al. (2005). Para el caso de las dos especies insulares no fue posible capturar aves y reptiles debido a la falta de permiso de las autoridades de Medio Ambiente, pero sí se inspeccionó la presencia de polen en su cuerpo con ayuda de telescopio, prismáticos y cámara de vídeo. Tampoco se pudo determinar la cantidad de polen transferido al estigma por dichos vertebrados para ninguna de las cuatro especies debido a la coincidencia de la floración primaveral con el pico de visita de los insectos. Sin embargo, con la ayuda de los instrumentos de visualización mencionados anteriormente, se comprobó y anotó a partir de observaciones si estos realmente contactaban con los estambres y el estigma.

Estudio cualitativo y cuantitativo de las características de las plantas

En el caso de las dos especies peninsulares, se recolectaron semanalmente flores en las dos fases sexuales (n = 4-10 flores/fase). Estas se conservaban en botes de centelleo y se transportaban en frío hasta el laboratorio. De este modo, se pudieron determinar siete variables cualitativas (color de la corola; color del estaminodio; reflexión o no del

lóbulo central del labio inferior de la corola; si los lóbulos laterales de ese mismo labio inferior eran patentes o no; ausencia o presencia de guías de néctar; existencia o no de pequeñas glándulas en la superficie externa o interna de la corola) y siete grupos de variables cuantitativas (véase Fig. 3). Además, se tuvieron en cuenta otras variables relacionadas con: (a) las inflorescencias (presencia o ausencia de inflorescencias decumbentes; distancia entre cimas florales consecutivas durante el pico de floración, número de flores abiertas/inflorescencia) y (b) los polinizadores observados: avispas, abejas, abejorros, abejas y pequeñas avispas, aves (*Sylvia*, *Phylloscopus* y *Parus*) y lagartos. En el caso de los polinizadores, se distinguieron las siguientes categorías de acuerdo con su tasa de visita (V_r), es decir, con el número de flores visitadas por inflorescencia y por minuto: ausente ($V_r = 0$); casi nula ($0 < V_r \leq 0,01$); muy escasa ($0,01 < V_r \leq 0,1$); escasa ($0,1 < V_r \leq 0,3$); abundante ($0,3 < V_r \leq 0,5$); muy abundante ($V_r > 0,5$).

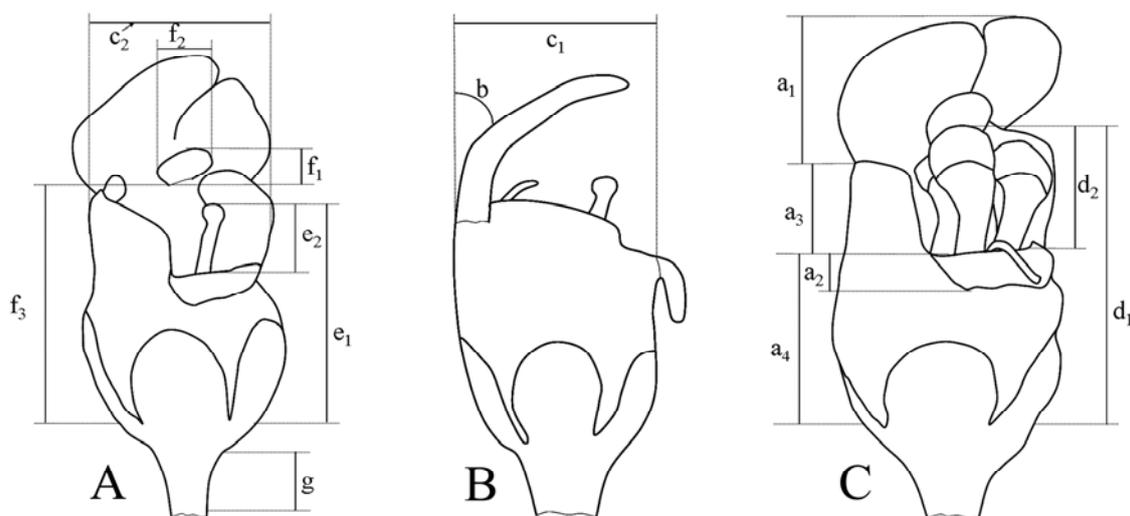


Figura 3. Diagrama floral mostrando los caracteres florales analizados: (A) fase femenina (visión subfrontal); (B) fase femenina (visión lateral); (C) fase masculina (visión subfrontal). Clave: a_1 – a_3 y a_4 , tamaño de los lóbulos y del tubo de la corola; b , ángulo de divergencia o reflexión del labio superior de la corola respecto al eje principal de la flor; c_1 , c_2 , diámetro mayor y menor de la parte superior del tubo de la corola y cociente entre los dos; d – e , longitud de los órganos reproductores [estambres en fase masculina (d_1) y estilo en fase femenina (e_1)] y grado de exertion respecto a la parte superior del tubo de la corola (d_2 y e_2 , respectivamente); f_1 – f_2 , tamaño del estaminodio y f_3 , altura de su adhesión al tubo de la corola; g , longitud del pedicelo de la flor.

Para las dos especies de las islas (*S. calliantha* y *S. trifoliata*), las flores se conservaron en botes con alcohol al 70 % de cara a su posterior estudio en el

laboratorio. El resto de parámetros, incluyendo el color, se tomaron *in situ*.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 15.0.1 (SPSS, 2006). En primer lugar, se comprobó la normalidad y homocedasticidad de los datos. El número de inflorescencias visitadas, el número de flores visitadas/inflorescencia y la tasa de visita se analizaron mediante modelos lineales generalizados, ajustándose a una distribución binomial negativa con una función de enlace logarítmica. Para las dos últimas variables, los logaritmos del número de inflorescencias visitadas por el polinizador y del tiempo de censo se utilizaron como variables de compensación, respectivamente.

En *S. sambucifolia* y *S. grandiflora*, de cara a comparar la efectividad de los diferentes grupos de insectos polinizadores, la carga polínica efectiva transportada y la depositada en el estigma se sometió a un ANOVA factorial considerando la población y el tipo de polinizador como factores principales. En ambos casos, cuando los efectos de las interacciones que se estaban estudiando no eran significativos, se repetía el modelo sin dichas interacciones. Las comparaciones post hoc se realizaron mediante la prueba HSD de Tukey en el caso de datos homocedásticos o mediante la prueba de Games-Howell en caso contrario. Para llevar a cabo estos análisis estadísticos se asumió que el comportamiento de los diferentes grupos de polinizadores no difería de un año para otro. En el caso de la carga de polen transportada por las aves, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis (más de dos variables independientes) o la prueba de Mann-Whitney (dos variables independientes). La relación entre la carga efectiva de polen depositada en el estigma y el tiempo dedicado a las flores por los insectos, normalizado como el $\log_{10}(\text{tiempo} + 1)$, se evaluó con el coeficiente de correlación de Pearson.

Para determinar qué tienen en común y en qué se distinguen las cuatro especies de *Scrophularia* estudiadas, las variables cualitativas (tipo nominal múltiple o simple) y cuantitativas relacionadas con las flores, las inflorescencias y los tipos de polinizadores se sometieron a un análisis categórico de componentes principales (CATPCA) (Pérez, 2009).

RESULTADOS

CENSOS Y COMPORTAMIENTO DE LOS VISITADORES Y/O POLINIZADORES

Los tiempos totales de censo y el número de censos realizados se detallan en la tabla 1.

Censos de insectos

De todos los insectos observados, en relación a su comportamiento y a la recompensa que buscaban (véanse datos suplementarios en la Tabla S1), los considerados polinizadores se correspondieron con cuatro tipos funcionales de Hymenoptera: (1) avispas (Vespinae), (2) abejas melíferas (Apinae), (3) abejorros (Apinae) y (4) abejas pequeñas (en adelante, abejillas) (Halictidae, Andrenidae, Eumeninae). El primer grupo incluyó exclusivamente a las avispas sociales, mientras que en el cuarto grupo, debido a su pequeño tamaño y a su similar comportamiento en las flores de *Scrophularia*, se incluyó tanto a las pequeñas avispas (Eumeninae) como a las abejas pequeñas. El segundo grupo sólo lo formó *Apis mellifera*. Los abejorros se clasificaron por separado en el tercer grupo dado que su comportamiento era diferente: solían visitar las flores incluso con tiempo frío, lluvioso o nublado y eran más selectivos en nuestras poblaciones de estudio, visitando muchas menos especies de plantas que las *Apis* (que de hecho, visitaban prácticamente cualquier especie entomófila).

En función de las especies de plantas, poblaciones y años, los polinizadores y su comportamiento fueron los siguientes:

Scrophularia sambucifolia. La cohorte de insectos polinizadores fue muy homogénea (véanse datos suplementarios en la Tabla S1 y Tabla 1), tanto entre poblaciones (Morón y El Gastor) como entre años (2009 y 2010). Sin embargo, no hubo abejorros en Morón en ninguno de los dos años. Después de *Apis*, los polinizadores más abundantes en ambas poblaciones fueron avispas, especialmente del género *Polistes*. En la población de Olvera, estudiada de forma menos exhaustiva, se detectaron los mismos grupos que en El Gastor (datos no mostrados). El número de inflorescencias visitadas y el de flores visitadas/inflorescencia (Fig. 4), tanto a nivel de población como a nivel de especies, se vieron afectados principalmente por el tipo de polinizador (véanse datos suplementarios en la Tabla S2). En El Gastor, aunque *Apis* visitó menos flores/inflorescencia, su mayor presencia significaba que su tasa de visita era casi el doble que la de *Bombus* (Fig. 4).

Tabla 1. Número de individuos censados de los diferentes polinizadores en las poblaciones estudiadas de *Scrophularia sambucifolia* y *S. grandiflora* durante los dos años de estudio y de *S. calliantha* y *S. trifoliata* durante el año 2010, tiempo total de los censos (en minutos) y número de censos realizados.

		<i>S. sambucifolia</i>				<i>S. grandiflora</i>				<i>S. calliantha</i>					<i>S. trifoliata</i>			
		El Gastor		Morón		Rabaçal		Pombalinho		R	H	M	T	B	RI	St	Bt	Ot
		2009	2010	2009	2010	2009	2010	2009	2010	2010					2010			
Avp	<i>Vespula germanica</i> , <i>V. vulgaris</i>	8	6	6	12	103	30	134	15						2	20	4	2
	<i>V. crabro</i>								7									
	<i>Dolichovespula sylvestris</i> , <i>D. media</i>						16	4										
	<i>Polistes nimpha</i> , <i>P. gallicus</i>	86	20	28	12	88	64	58	18									
	<i>P. bischoffi</i>														6			
	Vespinae									2	3	-						
Total Avp		94	26	34	24	191	110	196	40	2	3	-		2	26	4	2	
Abm	<i>Apis mellifera</i>	104	69	366	248	125	67	5	12									
Abj	<i>Bombus terrestris lusitanicus</i>	51	6			465	363	575	317									
	<i>B. pascuorum</i>					11	4	17										
	<i>B. canariensis</i>									2		-						
	<i>B. terrestris sassaricus</i>																	2
Total Abj		51	6			476	367	592	317	2		-						2
Paa	<i>Lasioglossum interruptum</i>	17	7	18	4	27	89	48	9									
	<i>L. viride</i>									97	45	-	6					
	<i>Andrena sp.</i>		16															
	<i>Alastor atropos</i>			1	6													
	<i>Symmorphus gracilis</i>	1	1															
Total Paa		18	24	19	10	27	89	48	9	97	45	-	6					
Total de insectos		267	125	419	282	819	633	841	378	101	48	-	6	2	26	4	4	
Tiempo total de censos		3092,5	1325	2877	1245	4501,5	2408	2449	1375	10	631	380	0	64	10	190	140	70
(Número de censos)		(307)	(132)	(285)	(124)	(451)	(241)	(244)	(137)	(1)	(63)	(38)		(6)	(1)	(19)	(14)	(7)
Av	<i>Sylvia atricapilla</i> , <i>S. melanocephala</i>	51	23	33	7	75	2		1	2	2	45			2	1	-	
	<i>Phylloscopus collybita</i>	3		3														
	<i>P. canariensis</i>									2	72	111	24	14				
	<i>Parus caeruleus</i>									19	25	1	1					
Total Av		54	23	36	7	75	2		1	4	93	181	25	15		2	1	-
Re	<i>Gallotia stehlini</i>										14	15	1					
Tiempo total de censos		1539	1110	1567	705	1983	750	519	120	50	1542	1000	140	200	20	200	300	0
(Número de censos)		(79)	(55)	(79)	(35)	(97)	(37)	(26)	(6)	(3)	(76)	(50)	(7)	(10)	(1)	(10)	(15)	0
Total de polinizadores		321	148	455	289	894	635	841	379	4	208	244	25	22	2	28	5	4

Avp = Avispas; **Abm** = Abeja melífera; **Abj** = Abejorros; **Paa** = Abejillas y avispas pequeñas; **Av** = Aves; **Re** = reptil. Guión = sin censos realizados.
S. calliantha: **R** = Rincón de Tenteniguada; **H** = Presa de Hornos; **M** = Canal de la Mina; **T** = Tilos de Moya; **F** = Barranquillo de Juan Francés. **S. trifoliata**: **RI** = Riu Leui; **St** = Santu Lussurgiu; **Bt** = Bitti; **Ot** = Monte Ortobene. Otras poblaciones censadas con tiempos muy cortos y resultados negativos: Nuraghe di Orizzanne = 20 minutos de censos de aves; Desulo = 30 minutos de censos de insectos y 20 minutos de censos de aves.

En Morón, *Apis* fue el grupo más abundante y su tasa de visita también fue la mayor (Fig. 4). En esta población se registraron 11,24 polinizadores por hora, de los cuales casi el 88 % eran abejas. En la población de El Gastor, donde *Bombus* estaba presente, la supremacía de *Apis* se redujo a la mitad (44 %).

Scrophularia grandiflora. Al igual que en la especie anterior, los grupos de polinizadores de las dos poblaciones (Rabaçal y Pombalinho) durante los dos años de estudio, fueron muy homogéneos (datos suplementarios de la Tabla S1 y Tabla 1). Los abejorros, *Bombus terrestris lusitanicus* y *B. pascuorum*, constituyeron el grupo principal de polinizadores, especialmente el primero (datos suplementarios de la Tabla S1 y Tabla 1). En Rabaçal, casi el 64 % de los insectos polinizadores (17,75 por hora) correspondió a *Bombus*. En Pombalinho, este porcentaje fue aún mayor (74 %). El número de inflorescencias visitadas y de flores visitadas/inflorescencia, tanto a nivel de población como a nivel de especie, mostró un patrón casi idéntico al de *S. sambucifolia* (datos suplementarios de la Tabla S2 y Fig. 4). En ambas poblaciones, los abejorros y las abejas fueron los más activos. Como hubo mayor presencia de abejorros, su tasa de visita fue más alta (Fig. 4).

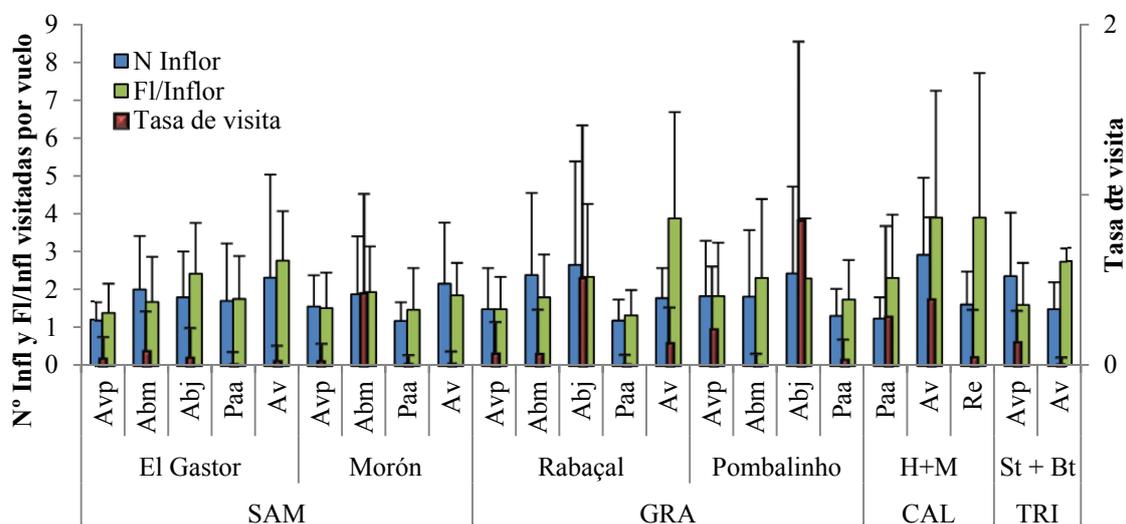


Figura 4. Número de inflorescencias y de flores por inflorescencia visitadas por vuelo y tasa de visita (número de flores visitadas por inflorescencia y por minuto) por los polinizadores en las diferentes poblaciones de *Scrophularia sambucifolia* (SAM) y *S. grandiflora* (GRA) durante los dos años de estudio (2009 y 2010), y de *S. calliantha* (CAL) y *S. trifoliata* (TRI) durante 2010. Para las dos últimas especies, las medias se calcularon a partir de los datos correspondientes a las dos poblaciones con más tiempos de censos realizados: Presa de Hornos (H) y el Canal de la Mina (M), y Santu Lussurgiu (St) y Bitti (Bt), respectivamente. Los valores representan la media \pm d.s. Clave para los polinizadores: Avp, avispas; Abm, abeja melífera; Abj, abejorros; Paa, abejillas y avispas pequeñas; Av, aves; Re, reptil.

Scrophularia calliantha. En algunas de las poblaciones en las que el esfuerzo de muestreo fue limitado (véase Tabla 1), se observaron muy pocos o ningún polinizador, en tanto que en las poblaciones estudiadas más exhaustivamente (Presa de Hornos y Canal de la Mina) hubo poca diversidad (datos suplementarios de la Tabla S1 y Tabla 1), siendo la abejilla *Lasioglossum viride* el polinizador más común y abundante (Tabla 1). Esta abejilla se acompañó sólo muy de vez en cuando por Vespinae (en ambas poblaciones) y por *Bombus canariensis* (Presa de Hornos). En esas dos poblaciones, *Lasioglossum* (véanse datos de actividad en Fig. 4) fue responsable de más del 90 % de las visitas observadas.

Scrophularia trifoliata. Muy pocos insectos visitaron esta especie (avispas y abejas; datos suplementarios de la Tabla S1 y Tabla 1). Probablemente esto se debió en parte a las condiciones meteorológicas adversas (frío, viento, lluvia, niebla), que también afectaron especialmente al tiempo empleado en los censos (Tabla 1). Las avispas (datos de actividad en Fig. 4) fueron el grupo más abundante, siendo los únicos visitantes observados en la mayoría de las poblaciones (en Monte Ortobene estuvieron acompañados por *Bombus*).

Censos de aves

Scrophularia sambucifolia. Se detectaron dos grupos de aves: *Sylvia* y *Phylloscopus* (datos suplementarios de la Tabla S1), siendo el primero el más abundante (Tabla 1). De hecho, durante 2010 no se observó *Phylloscopus* en ninguna de las dos poblaciones. Conjuntamente para los dos años se registraron un total de 74 y 40 individuos de *Sylvia* en El Gastor y en Morón, respectivamente. Los datos de la media de visitas se representan en la figura 4.

Scrophularia grandiflora. Sólo se observaron individuos de *Sylvia*, y en 2010 sólo en Pombalinho (datos suplementarios de la Tabla S1 y Tabla 1). En Rabaçal, *Sylvia* presentó los valores más altos de flores visitadas/inflorescencia, pero su tasa de visita fue menor que la de los abejorros (Fig. 4).

Scrophularia calliantha. Se visualizaron una especie de *Phylloscopus* (*P. canariensis*), dos de *Sylvia* (*S. melanocephala* y *S. atricapilla*) y una de *Parus* (*P. caeruleus*) (datos suplementarios de la Tabla S1 y Tabla 1), los cuales presentaron las mayores tasas de visita (Fig. 4). El más abundante fue *Phylloscopus* (Fig. 1G),

constituyendo en algunas poblaciones más del 95 % de las aves visitadoras.

Scrophularia trifoliata. Las especies de *Sylvia* fueron las únicas aves visitadoras que se observaron (datos suplementarios de la Tabla S1, Tabla 1 y Fig. 1F). Debido a su escasa presencia, su tasa de visita fue muy baja en comparación con la de las avispas.

Con respecto al comportamiento de las aves en las cuatro especies, estas visitaban flores en ambas fases sexuales, femenina y masculina, rozando los órganos reproductores, tanto con la garganta (el caso más frecuente) como con la frente. *Phylloscopus* (*P. collybita* y *P. canariensis*) buscaba alimento mediante revoloteo (Fig. 1G) y posándose en perchas, mientras que *Sylvia* (Fig. 1A, F) y *Parus* únicamente lo hacían posándose. En este último caso, el comportamiento consistía en mantenerse en los entrenudos de la inflorescencia o en la cima florífera inmediatamente por encima o por debajo de la que estaban a punto de visitar, o incluso en la propia cima. También se situaban en las ramas cercanas de otras plantas, tanto de la misma especie como de cualquier otra.

Censos de reptiles

Se visualizaron numerosos individuos juveniles de *Gallotia stehlini* en dos de las poblaciones censadas de *S. calliantha* (datos suplementarios de la Tabla S1, Tabla 1 y Fig. 1H), con c. 46 horas de observación. Este reptil estaba activo desde las 10:00 h de la mañana hasta las 18:00 h de la tarde, especialmente al mediodía (12:00-16:00 h) y accedía al interior de la flor en busca del néctar. Frecuentemente visitaba las inflorescencias decumbentes, pero en ocasiones también se subía a inflorescencias sostenidas por algún tipo de apoyo más o menos vertical (roca o arbusto). En general, los individuos visitaban varias flores por cima antes de pasar a la siguiente o saltar a otra inflorescencia. Se movían a lo largo del eje de la inflorescencia para entrar en las flores frontalmente o se torcían sobre sí mismos para acceder a las mismas, rozando el polen tanto con la parte superior como con la inferior del hocico. El número de individuos observados y sus tasas de visita para las dos poblaciones, Presa de Hornos y Canal de la Mina, se muestran en la tabla 1 y en la figura 4, respectivamente.

EFICACIA DE LOS VISITADORES EN LA POLINIZACIÓN

Carga polínica transportada por los animales en el cuerpo

Insectos. En *S. sambucifolia* se capturaron 81 individuos durante los dos años de estudio y en *S. grandiflora* 101 (Tabla 2). Para ambas especies, la carga efectiva de polen transportada sólo fue significativamente diferente entre los tipos de polinizadores (*S. sambucifolia* $F_{3, 72} = 4,03$, $P = 0,01$; *S. grandiflora* $F_{4, 91} = 2,56$, $P = 0,044$). En el caso de *S. sambucifolia*, los insectos que transportaban las mayores cargas eran las abejas (Tabla 2), pero con una diferencia estadísticamente significativa (prueba post hoc) sólo con los insectos que se consideraron visitantes ocasionales. En *S. grandiflora*, las mayores cargas las transportaron los abejorros (generalmente *Bombus terrestris lusitanicus*) (Tabla 2), pero de nuevo, sólo fueron significativamente diferentes (prueba post hoc) al considerar a los insectos visitantes ocasionales.

En *S. trifoliata*, únicamente se capturaron un abejorro y cinco avispas cuyas cargas no difirieron significativamente de las transportadas por las avispas peninsulares ($F_{2, 40} = 2,73$, $P = 0,078$). En *S. calliantha*, se apresaron 16 individuos de la abeja *Lasioglossum viride* que transportaban cargas que tampoco difirieron significativamente de las de las abejas peninsulares ($F_{2, 58} = 0,76$, $P = 0,471$).

Aves. De las aves capturadas en las poblaciones de *S. sambucifolia*, las únicas especies dignas de mención fueron *Sylvia melanocephala* (ambos sexos) y *S. atricapilla* (ambos sexos) (Tabla 2). La carga polínica transportada en el cuerpo difirió significativamente cuando el análisis distinguía entre si se llevaba sobre la garganta ($H = 12,31$, $P = 0,02$) o en la frente ($H = 15,58$, $P = 0,001$). Esta diferencia se debió a la mayor carga de polen transportada por *Sylvia* en relación a *Phylloscopus* ($U_{garganta} = 30,00$, $P = 0,001$; $U_{frente} = 21,00$, $P < 0,001$). El resto de las aves capturadas nunca se observaron visitando flores. En el caso de *S. grandiflora*, se capturaron tanto individuos de *Sylvia* como de *Phylloscopus*, aunque estos últimos no transportaban granos de polen (Tabla 2).

No disponemos de datos para las dos especies de las islas, ya que no se nos permitió capturar aves. Sin embargo, se debe mencionar, especialmente para *S. calliantha*, la visualización de áreas de color amarillento tanto en la garganta como en la frente, que sin duda representaban cargas de polen. Tampoco fue posible hacerse con los reptiles que frecuentaban las flores de *S. calliantha* durante las horas de sol, pero de nuevo, se observó la presencia de manchas en su frente y la garganta, indicativo de su papel como portadores de polen de esta especie.

Con respecto a la carga polínica en las heces de las aves, se recogieron 21 muestras

Tabla 2. Carga efectiva de polen (media \pm d.s.) transportada sobre el cuerpo de los polinizadores y/o visitantes en *Scrophularia sambucifolia* y *S. grandiflora* (tamaño de la muestra entre paréntesis). Guión = sin datos.

		<i>S. sambucifolia</i>			<i>S. grandiflora</i>		
		Morón	El Gaster	Total	Rabaçal	Pombalinho	Total
INSECTOS							
Abejas		6 457,86 \pm 6 827,46 (7)	375,00 \pm 106,07 (2)	5 106,11 \pm 6 492,82 (9)	12 525,00 \pm 21 384,57 (8)	65 450,00 \pm 88 787,63 (3)	26 959,09 \pm 50 078,92 (11)
Abejorros		-	36 000,00 (1)	36 000,00 (1)	60 343,75 \pm 79 502,54 (16)	102 266,67 \pm 20 4057,43 (15)	80 629,03 \pm 151 807,84 (31)
Avispas		3 623,08 \pm 9 572,00 (13)	1 388,89 \pm 1 538,31 (9)	2 709,09 \pm 7 383,88 (22)	15 941,67 \pm 16 608,92 (12)	15 247,06 \pm 16 657,72 (17)	15 534,48 \pm 16 341,76 (29)
Abejillas y avispas pequeñas		41 993,50 \pm 115 498,07 (10)	58 900,00 \pm 105 975,80 (9)	50 001,84 \pm 108 335,67 (19)	22 596,67 \pm 24 259,29 (15)	39 000,00 \pm 4 8361,19 (8)	28 302,17 \pm 34 387,27 (23)
Otros		2 705,36 \pm 6 673,83 (14)	11 631,25 \pm 31 958,42 (16)	7 465,83 \pm 23 848,67 (30)	4 141,67 \pm 5 590,48 (6)	2 800,00 (1)	3 950,00 \pm 5 128,52 (7)
AVES							
Sylvia	Garganta	470,33 \pm 950,12 (15)	10 705,00 \pm 16 108,19 (4)	2 625,00 \pm 7 894,60 (19)	225,67 \pm 275,74 (6)	-	225,67 \pm 275,74 (6)
	Frente	30,67 \pm 55,98 (15)	1 040,50 \pm 1 392,69 (4)	243,26 \pm 710,36 (19)	76,00 \pm 67,10 (6)	-	76,00 \pm 67,10 (6)
Phylloscopus	Garganta	5,18 \pm 8,98 (11)	8,50 \pm 10,63 (4)	6,07 \pm 9,17 (15)	0,00 \pm 0,00 (2)	-	0,00 \pm 0,00 (2)
	Frente	4,36 \pm 6,27 (11)	1,75 \pm 2,36 (4)	3,67 \pm 5,54 (15)	0,00 \pm 0,00 (2)	-	0,00 \pm 0,00 (2)
Otros	Garganta	1,13 \pm 2,80 (8)	19,50 \pm 18,41 (4)	7,25 \pm 13,39 (12)	-	-	-
	Frente	2,75 \pm 4,98 (8)	14,75 \pm 17,04 (4)	6,75 \pm 11,40 (12)	-	-	-

***S. sambucifolia*:** Abejas = *Apis mellifera*. Abejorros = *Bombus terrestris lusitanicus*. Avispas = *Polistes nimpha*, *P. gallicus*, *P. dominula*, *Vespula germanica*. Abejillas y avispas pequeñas = *Andrena sp.*, *Alastor atropos*, *Symmorphus gracilis*, *Lasioglossum interruptum*. Otros = *Altica sp.*, *Oedemera sp.*, *Oxythraea funesta*, *Camponotus cruentatus*, *Formica subrufa*, *Myrmica sp.* *Sylvia* = *S. melanocephala* (ambos sexos) y *S. atricapilla* (ambos sexos). *Phylloscopus* = *P. collybita*. Otras aves = *Phylloscopus trochilus*, *Cettia cetti*, *Passer domesticus*.

***S. grandiflora*:** Abejas = *Apis mellifera*. Abejorros = *Bombus terrestris lusitanicus*, *B. pascuorum*. Avispas = *Polistes nimpha*, *P. gallicus*, *P. dominula*, *Vespa cabro*, *Vespula germanica*, *V. vulgaris*, *Dolichovespula sylvestris*, *D. media*. Abejillas y avispas pequeñas = *Lasioglossum interruptum*, *Alastor atropos*. Otros = *Oxythraea funesta*, *Cionus scrophulariae*. *Sylvia* = *S. melanocephala* (ambos sexos) y *S. atricapilla* (ambos sexos). *Phylloscopus* = *P. collybita*.

(Morón n = 14; El Gastor n = 3; Rabaçal n = 4) que correspondían a ocho individuos de *Sylvia melanocephala*, seis de *Phylloscopus collybita*, una de *S. atricapilla* y otras seis de aves no consideradas polinizadoras. En tres de las muestras, se detectaron 1.350, 1.575 y 75 granos de polen de *S. sambucifolia*. Estos granos estaban perfectamente conformados y completos, una señal de que no se habían digerido. No obstante, estos también podrían ser debidos a una contaminación involuntaria en el momento del muestreo.

Carga polínica depositada por los insectos en el estigma

En *S. sambucifolia* la carga de polen efectiva transferida al estigma (Tabla 3) difirió significativamente entre los polinizadores ($F_{2,84} = 4,04$, $P = 0,02$), en concreto, entre las avispas y *Apis*, pero no entre las poblaciones ($F_{1,84} = 2,05$, $P = 0,156$). Tampoco se correlacionó con el tiempo dedicado en la visita de la flor, tanto teniendo en cuenta a todos los polinizadores ($r = 0,13$, $P = 0,23$) como sólo a *Apis* ($r = 0,08$, $P = 0,53$), que

Tabla 3. Carga efectiva de polen (media \pm d.s.) transferida al estigma por los insectos polinizadores en *Scrophularia sambucifolia* y *S. grandiflora* (tamaño de la muestra entre paréntesis). Guión = sin datos.

<i>S. sambucifolia</i>			
	Morón	El Gastor	Total
Abejas	239,38 \pm 294,24 (63)	317,20 \pm 550,78 (5)	245,10 \pm 314,08(68)
Abejorros	-	-	-
Avispas	14,60 \pm 17,04 (5)	114,69 \pm 190,15 (13)	86,89 \pm 166,49 (18)
Abejillas	74,67 \pm 122,42 (3)	-	74,67 \pm 122,42 (3)
<i>S. grandiflora</i>			
	Rabaçal	Pombalinho	Total
Abejas	279,53 \pm 319,04 (15)	174,00 (1)	272,94 \pm 309,35 (16)
Abejorros	168,37 \pm 212,31 (70)	172,11 \pm 310,88 (55)	170,02 \pm 259,18 (125)
Avispas	292,78 \pm 359,25 (9)	501,00 \pm 656,23 (16)	426,04 \pm 567,96 (25)
Abejillas	42,50 \pm 50,21 (2)	167,50 \pm 95,46 (2)	105,00 \pm 95,32 (4)

S. sambucifolia: Abejas = *Apis mellifera*. Abejorros = *Bombus terrestris lusitanicus*. Avispas = *Polistes nimpha*, *P. gallicus*. Abejillas y avispas pequeñas = *Lasioglossum interruptum*.

S. grandiflora: Abejas = *Apis mellifera*. Abejorros = *Bombus terrestris lusitanicus*. Avispas = *Polistes nimpha*, *P. gallicus*, *Vespula germanica*, *Vespa cabro*. Abejillas y avispas pequeñas = *Lasioglossum interruptum*, *Alastor atropos*.

fue el más abundante. En *S. grandiflora*, esta carga (Tabla 3) no dependió significativamente de ninguno de los factores analizados (polinizador: $F_{3,162} = 2,04$, $P = 0,11$; población: $F_{1,162} = 0,95$, $P = 0,33$), pero mostró una correlación significativamente positiva con el tiempo dedicado a la visita de la flor ($r = 0,173$, $P = 0,02$). Diferenciando

entre tipos de polinizadores, sólo hubo una clara correlación en el caso de los abejorros ($r = 0,259$, $P = 0,003$). Comparando las dos especies peninsulares, en general, no hubo diferencias en la cantidad de polen depositado en el estigma por las abejas, abejorros y avispas.

Estudio cualitativo y cuantitativo de las características de las plantas

Durante el pico de floración de las cuatro especies se hallaron diferencias significativas entre ellas para cada uno de los parámetros estudiados (longitud de la inflorescencia, distancia entre cimas florales consecutivas y número de flores abiertas por inflorescencia) (véanse datos suplementarios de la Tabla S3 y Fig. 5). La inflorescencia más pequeña y las distancias más cortas entre cimas se encontraron en *S. calliantha* (Fig. 5A, B), siendo la primera el único parámetro que difirió entre las poblaciones de *S. grandiflora* y *S. trifoliata* (Fig. 5A). El mayor número de flores abiertas por inflorescencia correspondió a *S. grandiflora* y el menor a *S. sambucifolia* y *S. trifoliata* (Fig. 5C).

En el estudio CATPCA de las variables cualitativas y cuantitativas potencialmente relacionados con el síndrome de polinización, las dos primeras componentes ($C1 = 36,27$ % y $C2 = 21,58$ % de la varianza total) claramente diferenciaron a las dos especies insulares (*S. calliantha* y *S. trifoliata*) entre sí y respecto a las peninsulares (*S. grandiflora* y *S. sambucifolia*) (véanse datos suplementarios de la Tabla S4 y Fig. 6). La tercera componente ($C3 = 14,88$ % de la varianza total) sólo diferenció escasamente a las especies peninsulares. Los caracteres con mayores valores en la componente 1 fueron el color de la corola en su parte ventral, el lóbulo central del labio inferior (si estaba reflejo o no), los lóbulos laterales patentes o erectos, la presencia de glándulas en la superficie interna de la corola, la relación entre el diámetro mayor y menor del tubo de la corola, el ángulo entre los lóbulos superiores de la corola y el tubo, la presencia de inflorescencias erectas o decumbentes y el tipo de polinizador (excepto *Bombus*, abejas y *Sylvia*) (datos suplementarios de la Tabla S4). La componente 2 se definió principalmente por el color de la corola en su parte dorsal, el color del estaminodio, la presencia de guías de néctar y de glándulas en la superficie externa de la corola, la distancia entre cimas florales, y las abejas como polinizadores. Finalmente, la componente 3 se definió principalmente por el tamaño de los lóbulos y el del tubo de la corola, el diámetro de este y la longitud de los órganos reproductores y del pedicelo de la flor (datos suplementarios de la Tabla S4).

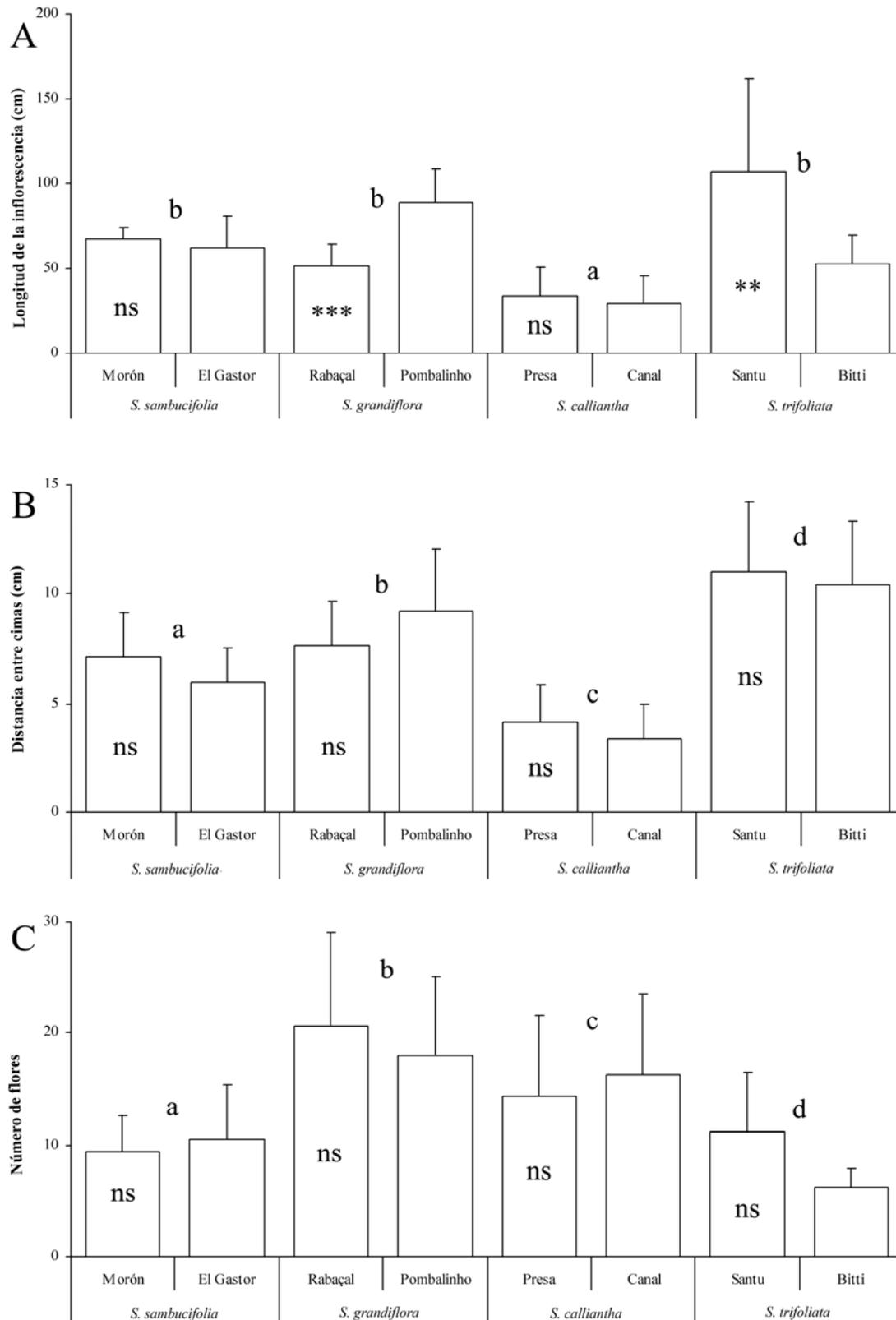


Figura 5. (A) Longitud de las inflorescencias, (B) distancia entre cimas y (C) número de flores abiertas por inflorescencia (media \pm d.s.) en las cuatro especies de *Scrophularia* estudiadas durante el pico de floración. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias significativas entre especies y los asteriscos dentro de las barras expresan diferencias significativas entre las poblaciones de una especie dada (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ns, no significativo). Presa, Presa de Hornos; Canal, Canal de la Mina; Santu, Santu Lussurgiu.

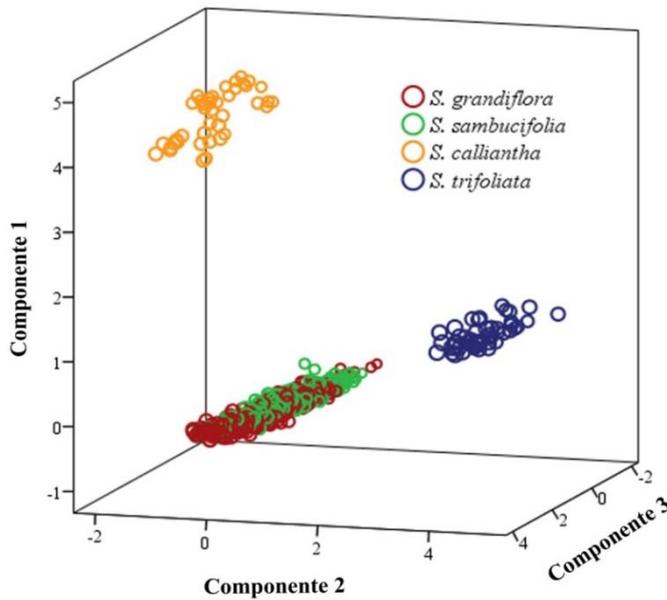


Figura 6. Gráfica tridimensional basada en 19 variables cualitativas y 16 cuantitativas estudiadas en *Scrophularia*. Las componentes C1, C2 y C3 representaron el 36,27 %, 21,58 % y el 14,88 % de la varianza, respectivamente.

DISCUSIÓN

Este estudio presenta dos importantes novedades. En primer lugar, la existencia de un sistema de polinización mixto entre himenópteros y aves paseriformes en las cuatro especies con las flores más grandes y llamativas del género *Scrophularia* en Europa y Macaronesia (*S. sambucifolia*, *S. grandiflora*, *S. trifoliata* y *S. calliantha*). En segundo lugar, se demuestra la participación de un tercer agente en el sistema de polinización mixto de la especie endémica canaria (*S. calliantha*) por medio de individuos juveniles del lagarto canario, *Gallotia stehlini*.

Aunque el síndrome de ornitofilia fue indicado en algunas especies de la región Macaronésica (Vogel & al., 1984; Olesen, 1985), en realidad sólo se había demostrado experimentalmente en *Isoplexis canariensis*, *Canarina canariensis* y *Lotus berthelotii* (Rodríguez-Rodríguez & Valido, 2008; Ollerton & al., 2009b), particularmente por medio del mosquitero canario, *Phylloscopus canariensis*. Para la región Mediterránea europea, la polinización por aves sólo se había demostrado en la leguminosa autóctona *Anagyris foetida* (Ortega-Olivencia & al., 2005), aunque existían numerosas observaciones sobre el consumo de néctar por parte de paseriformes en algunas especies nativas (v.g. *Rhamnus alaternus*, *Ferula communis*, *Brassica fruticulosa*, *Acer sp.*, *Crataegus sp.*, *Salix sp.*, *Ribes sp.*, etc.). Sin embargo, no se habían realizado experimentos para verificar que dichas aves actuaban como polinizadoras ni sus

caracteres florales se ajustan realmente al síndrome tradicional típico de ornitofilia (por ejemplo, colores llamativos, con tonos rojizos dominantes en muchos casos, pérdida de labios florales o curvados hacia atrás, flores tubulares y/o péndulas, ausencia de olor, néctar abundante, etc; Faegri & van der Pijl, 1979; Proctor & al., 1996). Es posible que estas aves, que no son nectarívoras especialistas (sus picos son muy cortos) accedan, por un lado, a flores poco profundas con el néctar expuesto (el caso de la mayoría de los ejemplos mencionados más arriba) y, por otro, a flores de corolas tubulares de gran consistencia y con néctar fácilmente accesible en su interior. Este último caso sería el correspondiente a las especies de *Scrophularia* estudiadas aquí.

Este sistema mixto de polinización por aves e insectos en Europa y Macaronesia recuerda en algunos aspectos al existente en Australasia, donde las aves principales que se alimentan de néctar son los pájaros chupamieles (Meliphagidae). Estos tienen picos cortos y visitan flores no restrictivas, fácilmente accesibles, que pueden ser visitadas por diferentes tipos de polinizadores (aves, murciélagos, insectos) (Fleming & Muchhala, 2008 y referencias). Los sistemas mixtos de polinización son más difíciles de encontrar en los trópicos del Nuevo Mundo, donde los vertebrados (colibríes, murciélagos) en su mayoría están especializados en alimentarse de néctar; las flores, con corolas más o menos estrechas y tubulares, contribuyen a una relativamente alta especificidad (longitud del pico y de la corola), lo que dificulta el acceso de otros polinizadores (Fleming & Muchhala, 2008). Estos autores consideran que, con la presencia predominante de los pájaros de sol (Nectariniidae), fenotípica y ecológicamente más especializados que los chupamieles de Australasia, la región de África presentaría una situación intermedia entre Australasia y el Nuevo Mundo.

En el presente trabajo, la demostración del sistema de polinización mixto vertebrados-insectos se basa en un total de 32.753 minutos de censos de polinizadores (13.640,5 en *S. sambucifolia*, 14.105,5 en *S. grandiflora*, 4.017 en *S. calliantha* y 990 en *S. trifoliata*). Ollerton & Cranmer (2002) consideraron improbable que 10 días o menos de observación fueran suficientes para identificar todos los polinizadores de una especie. En nuestro caso, el tiempo de observación dedicado a *S. trifoliata* fue menor debido a las malas condiciones meteorológicas que se produjeron durante la semana de estudio dedicada a la misma, de manera que los resultados relativos a esta especie deberían tomarse con cautela (véase más adelante el capítulo dedicado a esta especie).

Los insectos polinizadores pertenecen a cuatro tipos funcionales de

Hymenoptera: avispas, abejas sociales (únicamente *Apis mellifera*), abejorros y abejillas. Además de ellos, existen dos grupos de vertebrados, aves en las cuatro especies y reptiles sólo en la especie canaria. *Scrophularia calliantha* fue la que mostró una mayor interacción con las aves y dicha interacción afectó a cuatro especies (*Phylloscopus canariensis*, *Sylvia atricapilla*, *S. melanocephala* y *Parus caeruleus*). De ellas, la más importante fue *P. canariensis*, ya que mostró una tasa de visita de 0,22 flores por inflorescencia y por minuto (13,2 visitas/hora). En *Isoplexis canariensis*, los individuos de *P. canariensis* visitaban una planta cada 30 minutos (Vogel & al., 1984) y Ollerton & al. (2009b) mostraron para tres endemismos canarios típicamente ornitófilos, tasas de visita de 0 a 0,2 visitas/inflorescencia/minuto en *Canarina canariensis* (c. una visita cada 5,5 horas), de 0 a 0,01 en *Isoplexis canariensis* (c. una visita cada 16 horas) y de 0 a 0,0002 en *Lotus berthelotii* (c. una visita cada 7 días). Por tanto, parece que *P. canariensis* visita *S. calliantha* con más regularidad que a las otras tres especies de plantas mencionadas. Ollerton & al. (2009b) obtuvieron correlaciones positivas entre las tasas de visita y la secreción de néctar, siendo *Canarina canariensis* la más productiva (c. 110 µl) y la más visitada. La producción de néctar de *S. calliantha* es similar a la de *Isoplexis*, pero su tasa de visita es incluso mayor que la dada para *Canarina*, una diferencia que, según lo observado por Ollerton & al. (2009b), podría deberse a un distinto comportamiento de los polinizadores al visitar las diferentes especies. En el caso de *S. calliantha*, el polinizador puede visitar hasta 40 flores/vuelo (hasta 15 flores/inflorescencia), valores que son mucho mayores que los indicados para las especies de plantas mencionadas anteriormente (un máximo de dos o tres flores/inflorescencia). Para la africana *Impatiens sakeriana*, polinizada igualmente por aves, Janeček & al. (2010) obtuvieron tasas de 0,66 visitas/flor/hora (c. 0,01 por minuto) por parte de *Cyanomitra oritis* y de 0,31 visitas/hora (c. 0,005 por minuto) por *Cinnyris reichenowi* (dos especies de pájaros de sol cameruneses). Estos valores también son claramente inferiores a los encontrados para *S. calliantha*.

Además de las aves, los individuos juveniles del lagarto canario *Gallotia stehlini* también mostraron una importante presencia en las dos poblaciones muestreadas de *S. calliantha*. La tasa de visita de dicho reptil fue notablemente menor (0,05 flores/inflorescencia/minuto = 3 visitas por hora) que la del mosquitero canario *P. canariensis*, pero lo suficiente como para representar un valor añadido al complementar la polinización de las flores de esta especie. La saurofilia es un fenómeno poco

frecuente, ya que sólo se conocen unas 40 especies de reptiles que participan en la visita de flores y/o la polinización de las plantas. La mayoría de ellos son especies de islas: Nueva Zelanda (Whitaker, 1987), Islas Baleares (Pérez-Mellado & Casas, 1997; Traveset & Sáez, 1997; Pérez-Mellado & al., 2000), archipiélago de Fernando de Noronha (NE de Brasil; Sazima & al., 2005), Islas Canarias (Rodríguez-Rodríguez & Valido, 2008), Madeira (Olesen & Valido, 2004), Mauricio (Nyhagen & al., 2001) y Tasmania (Olsson & al., 2000). Sólo hay dos casos continentales: Baja California y Florida (revisión en Olesen & Valido, 2003b). Olesen & Valido (2003b) señalaron que la saurofilia está especialmente vinculada a los ecosistemas insulares debido a que los lagartos de las islas alcanzan altas densidades y corren un menor riesgo de depredación, y de este modo pueden ampliar su dieta para incluir néctar y frutos. Tal interacción era desconocida hasta ahora para cualquier especie del género *Scrophularia* y tampoco se había documentado que *Gallotia stehlini*, endémica de la isla de Gran Canaria, consumiera néctar floral (Salvador, 2009). Realmente no se conocen síndromes o conjuntos de caracteres que permitan inferir a priori si una especie puede o no presentar polinización por reptiles (revisión en Traveset & al., 2009) pero, el estudio *in situ* de las poblaciones de *S. calliantha* en las Islas Canarias con su sistema de inflorescencias decumbentes o arqueadas, nos permitió inferir que pudieran ser visitadas por lagartos.

El sistema de polinización de *S. calliantha* se completó con una abeja, *Lasioglossum viride*, raramente acompañada de avispa. *Bombus canariensis* sólo se observó en una de las poblaciones (Presa de Hornos) en la cual actuó como un ladrón de néctar. La tasa de visita de *Lasioglossum viride* (0,29 flores/inflorescencia/minuto) fue similar a la del mosquitero canario (*P. canariensis*) pero inferior a la correspondiente al total de las aves y, sin duda, dicha abeja puede considerarse un buen polinizador ya que no sólo contactaba con las anteras en busca de polen (su principal recompensa), sino que también aterrizaba directamente sobre el estigma, transfiriendo así grandes dosis de polen. En cualquier caso, como ya se ha documentado para otras plantas insulares (revisión en Traveset & al., 2009), la especie canaria *S. calliantha* posee pocos insectos polinizadores disponibles.

Con respecto a la otra especie de las islas, *S. trifoliata*, se observaron especies de *Sylvia*, pero con una baja tasa de visita (0,61 visitas/hora). Los polinizadores más comunes de esta planta eran avispa (*Vespula germanica* y *Polistes bischoffi*) y, de hecho, fueron los únicos polinizadores observados en la mayoría de las poblaciones, con

una tasa de visitas 10 veces mayor que la de *Sylvia*.

En las dos especies peninsulares, *S. sambucifolia* y *S. grandiflora*, las currucas cabecinegra (*Sylvia melanocephala*) y la capirotada (*Sylvia atricapilla*) fueron las aves polinizadoras más importantes, mientras que el mosquitero común (*Phylloscopus collybita*) fue sólo ocasional. Las tasas de visitas en *S. sambucifolia* (c. 3,0 visitas/hora) y *S. grandiflora* (c. 4,2 visitas/hora), mucho más bajas que las correspondientes a *S. calliantha* (23,4 visitas/hora), podrían reflejar que las características florales de esta última especie son, aparentemente, más adecuadas para estas aves (véase más adelante).

En general, para las cuatro especies de *Scrophularia*, *Sylvia* siempre se alimentaba posándose, mientras que *Phylloscopus* mostró un comportamiento mixto, a veces se posaba pero, por lo general, revoloteaba en sus visitas. Este comportamiento coincide con el patrón ya observado en *Anagyris foetida* (Ortega-Olivencia & al., 2005). Aunque los colibríes mantienen el vuelo durante tiempos más largos, parece claro que el hábito de revolotear no es exclusivo de América, sino que también se extiende al Viejo Mundo. Este hecho fue resaltado recientemente por Janeček & al. (2010), que aconsejó abandonar el dogma de que los colibríes revolotean mientras que los pájaros de sol únicamente visitan las flores posándose (véase también Geerts & Paul, 2009). El interés de las aves en las flores de las cuatro especies de *Scrophularia* simplemente refleja la abundancia de néctar disponible, ya que el análisis de sus heces mostró que ellas no tenían interés en alimentarse de polen.

Los polinizadores más importantes de las dos especies peninsulares fueron los insectos, no sólo a causa de su mayor presencia, sino debido a las cargas de polen que transportaban. Hubo diferentes grupos de polinizadores principales en las dos especies: abejas en *S. sambucifolia* y abejorros en *S. grandiflora*. En el caso de *S. sambucifolia*, la presencia de abejas fue casi 4 veces mayor en Morón que en El Gastor, debido a la existencia de colmenas a unos 500 m de distancia (M. Navarro-Pérez, observ. pers.) y esto coincidía con la ausencia de abejorros y un número reducido de avispa (casi la mitad que en El Gastor). En general, la proximidad de las colmenas de abejas melíferas introducidas pudo ser la causa de la ausencia o disminución de polinizadores nativos, ya que esta proximidad se correlaciona negativamente con la presencia media de abejorros (Thomson, 2006).

Con respecto a la carga de polen de los polinizadores, se tiende a asumir que esta puede estar positivamente correlacionada con el tamaño del cuerpo, ya que con un

cuerpo más grande, v.g. con un área de superficie mayor, se puede depositar y recoger más polen (Pacini & al., 2003). Sin embargo, esta relación no parece cumplirse en las dos especies peninsulares tanto si se comparan los insectos en general como cuando se comparan estos con las aves. Las aves que fueron capturadas transportaban, de media, cantidades más pequeñas de polen que los insectos polinizadores y, de los dos géneros de aves consideradas, *Sylvia* transportaba más. Este parámetro no se pudo medir para las dos especies de las islas, pero, al menos para la especie canaria, dada la regularidad de sus visitas a las flores y el color amarillento en sus gargantas, sus cargas de polen pueden haber sido mucho mayores que las determinadas en las especies peninsulares.

Sin embargo, la efectividad del polinizador se indica mejor por medio de la cantidad de polen transferida al estigma (aunque no tenemos datos disponibles para todos los polinizadores). En *S. sambucifolia*, el animal que transfirió más polen por visita fue *Apis mellifera*, seguido por las avispa y las abejas. En *S. grandiflora*, el orden fue avispa seguido de *A. mellifera*, abejorros y abejas. Las avispa, que tradicionalmente han sido clasificadas como los típicos polinizadores del género *Scrophularia*, transfirieron menores cargas de polen que las indicadas por de Vos (1983) en *S. nodosa*. Este resultado parece indicar que, al menos en el sistema de polinización mixto de las especies de *Scrophularia* con flores grandes, las avispa no son los polinizadores más importantes. Cualquiera de los polinizadores observados es potencialmente capaz de promover la geitonogamia ya que, aunque la protoginia favorece la polinización cruzada en la mayoría de las especies del género que han sido estudiadas, las cuatro analizadas aquí presentan un gran número de flores abiertas por inflorescencia al mismo tiempo, tanto en fase femenina como en masculina, y son autocompatibles (Dalgaard, 1979; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993c).

Respecto a la atracción de las cuatro especies en su pico de la floración, podrían considerarse diversos caracteres relacionados con las inflorescencias como atrayentes para las aves. Por ejemplo, *S. calliantha* es la que tiene las inflorescencias más cortas y también la que presenta la menor distancia entre cimas floríferas. Este acortamiento de los entrenudos de la inflorescencia puede estar relacionado con el hecho de que sean visitadas regularmente por reptiles, que por ende tienen que cubrir menos distancia para visitar las cimas sucesivas de una inflorescencia dada. Por otra parte, al tener las cimas más juntas, la apariencia general de la inflorescencia es más espiciforme y, junto con el tamaño y el color de las flores, hacen a la planta más atractiva para las aves, como se

refleja en los niveles de sus visitas en comparación con las otras tres especies de *Scrophularia*. A estos caracteres, hay que añadir el número total de flores abiertas por inflorescencia, que fue significativamente mayor en la especie canaria (también en *S. grandiflora*).

¿Qué otros caracteres analizados tienen probablemente una relación más estrecha con el síndrome de polinización por aves en este género? El CATPCA distinguió claramente las especies de las islas (*S. calliantha* y *S. trifoliata*) entre sí y respecto de las peninsulares (*S. grandiflora* y *S. sambucifolia*). Dado que el mayor nivel de visitas de las aves se produjo en *S. calliantha* y el más bajo en *S. trifoliata*, parece que los caracteres que más contribuyen al síndrome en este género están relacionados con el color de la corola y del estaminodio, la existencia de lóbulos patentes sobre el tubo de la corola, la forma del tubo de la corola (con estrechamiento lateral), la ausencia de guías de néctar y la presencia de inflorescencias con cimas floríferas comprimidas de un color rojizo y amarillento. La especial arquitectura floral de la especie canaria, con una corola que parece subrotácea, es quizás la más desviante del género, ya que no tiene la típica apariencia bilabiada y recuerda a una corola actinomorfa. Estos caracteres florales tienen que haber influido en la clara separación de esta especie respecto de las otras, mientras que la discriminación de la especie de Cerdeña debe haber sido particularmente influenciada por la existencia de guías de néctar (ausente en el resto de especies de *Scrophularia*) y por su fenotipo floral con dos coloraciones, individuos con flores más o menos rojizo-purpúreas y otros cuyas flores son amarillento-verdosas.

La escasa separación entre las dos especies peninsulares parece lógica ya que tienen un fenotipo floral similar. Mientras *S. grandiflora* puede presentar una coloración tanto rosado-cárnea como rojiza, *S. sambucifolia* muestra colores rojizo-anaranjados o rojo puro. Otros caracteres florales, tales como el grado de ejerción de los órganos reproductores en relación al tubo de la corola, no resultaron importantes en la discriminación de las cuatro especies. En otras plantas ornitófilas se ha demostrado que el grado de ejerción de los estambres y el estigma pueden ser una adaptación para incrementar la transferencia de polen a las aves o para evitar el contacto con las abejas ladronas de néctar (Wilson & al., 2004).

Tras una revisión de las floras Holárticas se deduce que las especies de *Scrophularia* con flores grandes y llamativas se concentran en el W y C de la región Mediterránea (islas de Córcega y Cerdeña, W y S de la Península Ibérica y NW de

África), Macaronesia y el SW de Estados Unidos (Nuevo México). Para *S. macrantha*, endémica de Nuevo México, Shaw (1962) indicó que podría ser polinizada por colibríes dada su característica corola grande, rosada a rojo brillante y tubular, lo que coincide con una pigmentación y una forma similar a la de otras flores típicamente ornitófilas del SW de Estados Unidos. Grant (1994, sub *S. coccinea*) y Lightfoot & Sivinski (1994) subsecuentemente tipificaron a la especie como ornitófila. Sus flores difieren de las estudiadas en este trabajo principalmente en la convergencia de todos los lóbulos de la corola, además de que el tubo corolino es estrecho y cerrado, lo cual le da a la corola un aspecto más delgado y tubular.

Como podrá comprobarse en el capítulo 5, tras mapear los caracteres florales y de polinización en la filogenia del género se ha obtenido que cada una de estas especies de flores grandes adquirió su sistema de polinización de forma independiente a partir de un ancestro común entomófilo (Navarro-Pérez & al., 2013). Las relaciones filogenéticas muestran un claro patrón geográfico en el que las cuatro especies con sistema de polinización mixto vertebrados-insectos aparecen dentro de un grupo monofilético principalmente mediterráneo en el cual el linaje de la canaria, *S. calliantha*, se muestra divergente al clado que incluye a las otras tres especies. Al mismo tiempo estas especies euromacaronésicas no presentan parentesco directo con *S. macrantha*, ya que esta está estrechamente relacionada con otras especies norteamericanas (Navarro-Pérez & al., 2013).

Debe añadirse que la producción de néctar, una variable no analizada en este capítulo, es muy abundante en las cuatro especies estudiadas: $27,4 \pm 21,9$ $\mu\text{l}/\text{flor}$ en *S. sambucifolia*, $47,21 \pm 22,4$ $\mu\text{l}/\text{flor}$ en *S. grandiflora*, $17,35 \pm 12,28$ $\mu\text{l}/\text{flor}$ en *S. calliantha* y $18,99 \pm 6,52$ $\mu\text{l}/\text{flor}$ en *S. trifoliata* (Rodríguez-Riaño & al., 2014). Se sabe que dicha producción generalmente es más alta en especies polinizadas por aves (Olesen, 1985; Proctor & al., 1996; Ortega-Olivencia & al., 2005; Ollerton & al., 2009b), algo que se ha corroborado en este grupo de especies euromacaronésicas de *Scrophularia* (Rodríguez-Riaño & al., 2014). Rodríguez-Riaño & al. (2014) han demostrado que de los caracteres del néctar, sólo el volumen está claramente correlacionado con el tamaño de la flor y con el del cuerpo del polinizador, pero además, el análisis sobre la composición de los principales tipos de azúcares ha revelado que *S. calliantha* es la única especie de entre todas las estudiadas que muestra un néctar balanceado (similares porcentajes de sacarosa y de hexosas), lo que podría asociarse con

la alta tasa de interacción que tiene con las aves paseriformes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baker H.G. & I. Baker** (1983) Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: Jones C.E. & R.J. Little (Eds.) *The handbook of experimental pollination biology*, pp. 117-141. Scientific & Academic Editions. New York.
- Baker H.G. & I. Baker** (1990) The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator types. *Israel Journal of Botany* 39: 157-166.
- Búrquez A.** (1989) Blue tits, *Parus caeruleus*, as pollinators of the crown imperial, *Fritillaria imperialis*, in Britain. *Oikos* 55: 335-340.
- Calvario E., F. Fraticelli, M. Gustin, S. Sarrocco & A. Sorace** (1989) The Blackcap *Sylvia atricapilla* and the Garden Warbler *Sylvia borin* as pollinators of *Rhamnus alaternus* (Rhamnaceae). *Avocetta* 13: 53-55.
- Cecere J., C. Matricardi, B. Frank, S. Imperio, F. Spina, G. Gargallo, C. Barboutis & L. Boitani** (2010) Nectar exploitation by songbirds at mediterranean stopover sites. *Ardeola* 57: 143-157.
- Cecere J., F. Spina, S. Jenni-Eiermann & L. Boitani** (2011) Nectar: an energy drink used by European songbirds during spring migration. *Journal of Ornithology* 152: 923-931.
- Dalgaard V.** (1979) Biosystematics of the Macaronesian species of *Scrophularia*. *Opera Botanica* 51: 1-64.
- da Silva L.P., J.A. Ramos, J.M. Olesen, A. Traveset & R.H. Heleno** (2014) Flower visitation by birds in Europe. *Oikos*, doi: 10.1111/oik.01347.
- de Vos O.C.** (1983) *Scrophularia nodosa*, adapted to wasp pollination? *Acta Botanica Neerlandica* 32: 345.
- Dupont Y.L., D.M. Hansen, J.T. Rasmussen & J.M. Olesen** (2004) Evolutionary changes in nectar sugar composition associated with switches between bird and insect pollination: the Canarian bird-flower element revisited. *Functional Ecology* 18: 670-676.
- Faegri K. & L. van der Pijl** (1979) *The principles of pollination ecology*. Pergamon Press. Oxford.
- Fleming T.H. & N. Muchhala** (2008) Nectar-feeding bird and bat niches in two worlds: pantropical comparisons of vertebrate pollination systems. *Journal of Biogeography* 35: 764-780.
- Ford H.A.** (1985) Nectarivory and pollination by birds in southern Australia and Europe. *Oikos* 44: 127-131.
- Galetto L. & G. Bernardello** (2003) Nectar sugar composition in angiosperms from Chaco and Patagonia (Argentina): an animal visitor's matter? *Plant Systematics and Evolution* 238: 69-86.
- Galetto L. & G. Bernardello** (2004) Floral nectaries, nectar production dynamics and chemical composition in six *Ipomoea* species (Convolvulaceae) in relation to pollinators. *Annals of Botany* 94: 269-280.
- Geerts S. & A. Pauw** (2009) African sunbirds hover to pollinate an invasive hummingbird-pollinated plant. *Oikos* 118: 573-579.
- Grant V.** (1994) Historical development of ornithophily in the western North American flora.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91: 10407-10411.

- Janeček Š., E. Patáčová, M. Bartoš, E. Padyšáková, L. Spitzer & R. Tropek** (2010) Hovering sunbirds in the Old World: occasional behaviour or evolutionary trend? *Oikos* 120: 178-183.
- Johnson S.D. & K.E. Steiner** (2000) Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 140-143.
- Kay Q.O.N.** (1985) Nectar from willow catkins as a food source for Blue Tits. *Bird Study* 32: 40-44.
- Krömer T., M. Kessler, G. Lohaus & A.N. Schmidt-Lebuhn** (2008) Nectar sugar composition and concentration in relation to pollination syndromes in Bromeliaceae. *Plant Biology* 10: 502-511.
- Lightfoot K. & R. Sivinski** (1994) Status report on *Scrophularia macrantha* Greene ex Stiefelhagen. New Mexico State Forestry and Resources Conservation Division. Santa Fe.
- Navarro J., B. Navarro & J. Naranjo** (2004) *Scrophularia calliantha* Webb & Bertel. In: Bañares A., G. Blanca, J. Güemes, J.C. Moreno & S. Ortiz (Eds.) *Atlas y libro rojo de la flora vascular amenazada de España: taxones prioritarios*, pp. 480-481. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.
- Navarro-Pérez M.L., J. López, M. Fernández-Mazuecos, T. Rodríguez-Riaño, P. Vargas & A. Ortega-Olivencia** (2013) The role of birds and insects in pollination shifts of *Scrophularia* (Scrophulariaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 239-254.
- Nepi M., F. Selvi & E. Pacini** (2010) Variation in nectar-sugar profile of *Anchusa* and allied genera (Boraginaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 162: 616-627.
- Nicolson S.W. & R.W. Thornburg** (2007) Nectar chemistry. In: Nicolson S.W., M. Nepi & E. Pacini (Eds.) *Nectaries and nectar*, pp. 215-263. Springer. Dordrecht.
- Nocentini D., E. Pacini, M. Guarnieri, D. Martelli & M. Nepi** (2013) Intrapopulation heterogeneity in floral nectar attributes and foraging insects of an ecotonal Mediterranean species. *Plant Ecology* 214: 799-809.
- Nyhagen D.F., C. Kragelund, J.M. Olesen & C. Jones** (2001) Insular interactions between lizards and flowers: flower visitation by an endemic Mauritian gecko. *Journal of Tropical Ecology* 17: 755-761.
- Olesen J.M.** (1985) The Macaronesian bird-flower element and its relation to bird and bee opportunists. *Botanical Journal of the Linnean Society* 91: 395-414.
- Olesen J.M., M. Alarcón, B.K. Ehlers, J.J. Aldasoro & C. Roquet** (2012) Pollination, biogeography and phylogeny of oceanic island bellflowers (Campanulaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 14: 169-182.
- Olesen J.M. & A. Valido** (2003a) Bird pollination in Madeira island. *Ardeola* 50: 65-67.
- Olesen J.M. & A. Valido** (2003b) Lizards as pollinators and seed dispersers: an island phenomenon. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 177-181.
- Olesen J.M. & A. Valido** (2004) Lizards and birds as generalized pollinators and seed dispersers of islands plants. In: Fernández-Palacios J.M. & C. Morici (Eds.) *Ecología insular [Island ecology]*, pp. 229-249. AEET-Cabildo Insular de La Palma. La Palma.
- Ollerton J., R. Alarcón, N.M. Waser, M.V. Price, S. Watts, L. Cranmer, A. Hingston, C.I. Peter & J. Rotenberry** (2009a) A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany* 103: 1471-1480.
- Ollerton J. & L. Cranmer** (2002) Latitudinal trends in plant-pollinator interactions: are

- tropical plants more specialised? *Oikos* 98: 340-350.
- Ollerton J., L. Cranmer, R.J. Stelzer, S. Sullivan & L. Chittka** (2009b) Bird pollination of Canary Island endemic plants. *Naturwissenschaften* 96: 221-232.
- Ollerton J. & S. Watts** (2000) Phenotype space and floral typology: towards an objective assessment of pollination syndromes. *Det Norske Videnskaps-Akademi. I. Matematisk Naturvidenskapelige Klasse, Skrifter, Ny Serie* 39: 149-159.
- Ollerton J., R. Winfree & S. Tarrant** (2011) How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120: 321-326.
- Olsson M., R. Shine & E. Ba’k-Olsson** (2000) Lizards as a plant’s ‘hired help’: letting pollinators in and seeds out. *Biological Journal of the Linnean Society* 71: 191-202.
- Ortega-Olivencia A.** (2009) *Scrophularia* L. In: Benedí C., E. Rico, J. Güemes & A. Herrero (Eds.) *Flora iberica* 13: 97-122. Real Jardín Botánico de Madrid. CSIC. Madrid.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993a) Floral rewards in some *Scrophularia* species (Scrophulariaceae) from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *Plant Systematics and Evolution* 184: 139-158.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993b) Revisión del género *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae) en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Ruizia* 11: 1-157. Monografías del Real Jardín Botánico de Madrid. CSIC. Madrid.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993c) Sexual reproduction in some *Scrophularia* species (Scrophulariaceae) from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *Plant Systematics and Evolution* 184: 159-174.
- Ortega-Olivencia A., T. Rodríguez-Riaño, F.J. Valtueña, J. López & J.A. Devesa** (2005) First confirmation of a native bird-pollinated plant in Europe. *Oikos* 110: 578-590.
- Pacini E., M. Nepi & J.L. Vesprini** (2003) Nectar biodiversity: a short review. *Plant Systematics and Evolution* 238: 7-21.
- Pellmyr O.** (2002) Pollination by animals. In: Herrera C.M. & O. Pellmyr (Eds.) *Plant-animal interactions: an evolutionary approach*, pp. 157-184. Blackwell Science. Oxford.
- Pérez C.** (2009) *Técnicas estadísticas multivariantes con SPSS*. Ibergarceta. Madrid.
- Pérez-Mellado V. & J.L. Casas** (1997) Pollination by a lizard on a Mediterranean island. *Copeia*: 593-595.
- Pérez-Mellado V., F. Ortega, S. Martín-García, A. Perera & G. Cortázar** (2000) Pollen load and transport by the insular lizard, *Podarcis lilfordi* (Squamata, Lacertidae) in coastal islets of Menorca (Balearic Islands, Spain). *Israel Journal of Zoology* 46: 193-200.
- Petanidou T.** (2005) Sugars in Mediterranean floral nectars: An ecological and evolutionary approach. *Journal of Chemical Ecology* 31: 1065-1088.
- Proctor M., P. Yeo & A. Lack** (1996) *The natural history of pollination*. Harper Collins Publishers. London.
- Rodríguez-Riaño T., A. Ortega-Olivencia, J. López, J.L. Pérez-Bote & M.L. Navarro-Pérez** (2014) Main sugar composition of floral nectar in three species groups of *Scrophularia* (Scrophulariaceae) with different principal pollinators. *Plant Biology*, doi:10.1111/plb.12159.
- Rodríguez-Rodríguez M.C. & A. Valido** (2008) Opportunistic nectar-feeding birds are effective pollinators of bird-flowers from Canary Islands: experimental evidence from *Isoplexis canariensis* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany* 95: 1408-1415.
- Salvador A.** (2009) Lagarto gigante de Gran Canaria - *Gallotia stehlini*. In: Salvador A. & A.

- Marco (Eds.) *Enciclopedia virtual de los vertebrados españoles*. Museo Nacional de Ciencias Naturales. Madrid. <http://www.vertebradosibericos.org>.
- Sazima I., C. Sazima & M. Sazima** (2005) Little dragons prefer flowers to maidens: a lizard that laps nectar and pollinates trees. *Biota Neotropica* 5: 185-192.
- Schmidt-Lebuhn A.N., M. Schwerdtfeger, M. Kessler & G. Lohaus** (2007) Phylogenetic constraints vs. ecology in the nectar composition of Acanthaceae. *Flora* 202: 62-69.
- Schwilch R., R. Mantovani, F. Spina & L. Jenni** (2001) Nectar consumption of warblers after long-distance flights during spring migration. *Ibis* 143: 24-32.
- Shaw R.J.** (1962) The biosystematics of *Scrophularia* in western northern America. *Aliso* 5: 147-178.
- SPSS** (2006) *SPSS for windows*, release 15.0.1. IL: SPSS Inc. Chicago.
- Stiles F.G.** (1981) Geographical aspects of bird-flower coevolution, with particular reference to Central America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68: 323-351.
- Thomson D.M.** (2006) Detecting the effects of introduced species: a case study of competition between *Apis* and *Bombus*. *Oikos* 114: 407-418.
- Traveset A., M. Nogales & L. Navarro** (2009) Mutualismos planta-animal en islas: influencia en la evolución y mantenimiento de la biodiversidad. In: Medel R., M.A. Aizen & R. Zamora (Eds.) *Ecología y evolución de interacciones planta-animal*, pp. 157-180. Ed. Universitaria. Santiago de Chile.
- Traveset A. & E. Sáez** (1997) Pollination of *Euphorbia dendroides* by lizards and insects: spatio-temporal variation in patterns of flower visitation. *Oecologia* 111: 241-248.
- Valido A., Y.L. Dupont & J.M. Olesen** (2004) Bird-flower interactions in the Macaronesian islands. *Journal of Biogeography* 31: 1945-1953.
- Valsecchi F.** (1979) Observations sur quelques espèces du genre « *Scrophularia* » L. en Sardaigne. *Webbia* 34: 265-288.
- Vogel S., C. Westerkamp, B. Thiel & K. Gessner** (1984) Ornithophilie auf den Canarischen Inseln. *Plant Systematics and Evolution* 146: 225-248.
- Whitaker A.H.** (1987) The roles of lizards in New Zealand plant reproductive strategies. *New Zealand Journal of Botany* 25: 315-328.
- Wilson P., M.C. Castellanos, J.N. Hogue, J.D. Thompson & W.S. Armbruster** (2004) A multivariate search for pollination syndromes among penstemons. *Oikos* 104: 345-361.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Visitadores y polinizadores de las cuatro especies estudiadas. Peninsulares: *Scrophularia sambucifolia* y *S. grandiflora*. Insulares: *S. trifoliata* y *S. calliantha*.

Orden	Familia o subfamilia	Género/especie/subespecie	Presencia	Recompensa	Comportamiento	
Araneae	Thomisidae		1R, 2G, 2M, 4	-	Dr	
Coleoptera	Alticinae	<i>Altica sp.</i>	2G	-	Rf	
	Cetoniidae	<i>Oxythraea funesta</i>	1R, 2G, 2M	-	Rf	
	Curculionidea	<i>Cionus scrophulariae</i>	1R	-	Rf	
		<i>Cionus canariensis</i>	4	-	Rf	
	Oedemeridae	<i>Oedemera sp.</i>	1R, 2G	-	Rf	
Diptera	Tipulidae	<i>Nephrotoma sp.</i>	1R	-	Rf	
Hemiptera	Pentatomidae	<i>Eudolycoris alluaudi</i>	4	-	Rf	
Hymenoptera	Andrenidae	<i>Andrena sp.</i>	2M	P / N	P / L	
		Apinae	<i>Apis mellifera</i>	1P, 1R, 2G, 2M	P / N	P
	Bombinae	<i>Eucera elongata</i>	1R	P / N	P	
		<i>Bombus terrestris sassaricus</i>	3	P / N	P / L	
		<i>Bombus canariensis</i>	4	N	R	
		<i>Bombus terrestris lusitanicus</i>	1P, 1R, 2G	P / N	P	
		<i>Bombus pascuorum</i>	1P, 1R	P / N	P	
	Eumeninae	<i>Psithyrus vestalis</i>	1R	P / N	P / L	
		<i>Alastor atropos</i>	1P, 2G	P / N	P / L	
		<i>Symmorphus gracilis</i>	2G	P / N	P / L	
		Formicidae	<i>Camponotus cruentatus</i>	2G	N	L
			<i>Formica subrufa</i>	2G, 2M	N	L
	<i>Monomorium subopacum</i>		4	N	L	
	<i>Myrmica sp.</i>		2G, 2M	N	L	
	Halictidae	<i>Lasioglossum viride</i>	4	P / N	L	
		<i>Lasioglossum interruptum</i>	1P, 1R, 2G, 2M	P / N	P / L	
	Vespinae	<i>Dolichovespula sylvestris</i>	1R, 1P	N	P	
		<i>Dolichovespula media</i>	1R, 1P	N	P	
		<i>Polistes bischoffi</i>	3	N	P	
		<i>Polistes nimpha</i>	1R, 2G, 2M	N	P	
		<i>Polistes gallicus</i>	1R, 2G, 2M	N	P	
		<i>Polistes dominula</i>	1P, 1R, 2G, 2M	N	P	
		<i>Vespa crabro</i>	1P	N	P	
		<i>Vespula germanica</i>	1P, 1R, 2G, 3	N	P	
		<i>Vespula vulgaris</i>	1P	N	P	
		<i>Not identified</i>	4	N	P?	
	Paseriformes	Sylviidae	<i>Sylvia atricapilla</i>	1R, 2G, 2M, 3, 4	N	P
			<i>Sylvia melanocephala</i>	1R, 2G, 2M, 3, 4	N	P
			<i>Phylloscopus collybita</i>	2G, 2M	N	P
			<i>Phylloscopus canariensis</i>	4	N	P
Paridae		<i>Parus caeruleus</i>	4	N	P	
Squamata		Lacertidae	<i>Gallotia stehlini</i>	4	N	P

Presencia: 1 = *S. grandiflora* (P = Pombalinho, R = Rabaçal); 2 = *S. sambucifolia* (G = El Gastor, M = Morón); 3 = *S. trifoliata*; 4 = *S. calliantha*. **Recompensa:** P = polen; N = néctar; - = desconocido. **Comportamiento:** P = polinizador; Dr = depredador de insectos; Rf = refugio en la flor; L = ladrón.

Tabla S2. Modelos lineales generalizados (GLM) para examinar las siguientes variables: número de inflorescencias visitadas por vuelo (Inflor), número de flores visitadas por inflorescencia y por vuelo (Fl/Inflor) y tasa de visita (flores visitadas por inflorescencia y por tiempo) en las poblaciones de *Scrophularia sambucifolia* (pob 1 = El Gastor, pob 2 = Morón) y *S. grandiflora* (pob 1 = Rabaçal, pob 2 = Pombalinho). En negrita las diferencias significativas.

Variable	Pob/especie	Factor	<i>S. sambucifolia</i>			<i>S. grandiflora</i>		
			χ^2	Wald	g.l.	P	χ^2	Wald
Inflor	Pob 1	Polinizador	19,39	3	0,000	69,03	3	0,000
		Año	0,77	1	0,380	0,12	1	0,73
		Pol*año	3,54	3	0,315	5,99	3	0,11
	Pob 2	Polinizador	8,21	2	0,02	13,14	3	0,004
		Año	0,10	1	0,76	1,51	1	0,22
		Pol*año	1,28	2	0,53	1,20	2	0,55
	Especies	Polinizador	22,93	3	0,000	142,06	3	0,000
		Población	0,37	1	0,55	0,04	1	0,85
		Pol*Pob	6,70	2	0,04	16,60	3	0,001
Fl/Inflor	Pob 1	Polinizador	25,19	3	0,000	124,45	3	0,000
		Año	0,05	1	0,83	0,79	1	0,37
		Pol*año	1,48	3	0,69	13,25	3	0,004
	Pob 2	Polinizador	20,01	2	0,000	40,50	3	0,000
		Año	0,78	1	0,38	6,23	1	0,01
		Pol*año	2,15	2	0,34	4,04	2	0,13
	Especies	Polinizador	50,68	3	0,000	155,28	3	0,000
		Población	0,01	1	0,92	0,40	1	0,53
		Pol*Pob	6,22	2	0,05	18,66	3	0,000
Tasa de visita	Pob 1	Polinizador	13,91	3	0,003	131,24	3	0,000
		Año	0,23	1	0,635	0,53	1	0,469
		Pol*año	7,47	3	0,058	20,275	3	0,000
	Pob 2	Polinizador	131,56	2	0,000	184,75	3	0,000
		Año	0,04	1	0,835	7,89	1	0,005
		Pol*año	0,61	2	0,737	3,97	3	0,264
	Especies	Polinizador	85,76	2	0,000	347,05	3	0,000
		Población	0,58	1	0,446	2,04	1	0,154
		Pol*Pob	31,531	2	0,000	34,73	3	0,000

Tabla S3. ANOVA anidado para las variables longitud de la inflorescencia, distancia entre cimas consecutivas y número de flores abiertas por inflorescencia durante el pico de floración de las cuatro especies de *Scrophularia* estudiadas. En negrita las diferencias significativas.

	Suma de cuadrados	g.l.	Media cuadrada	F	P
Longitud de la inflorescencia					
Especies	25918,08	3	8639,36	14,48	0,000
Pob (esp)	23580,65	4	5895,16	9,88	0,000
Error	44137,82	74	596,46		
Distancia entre cimas					
Especies	524,44	3	174,81	31,74	0,000
Pob (esp)	25,58	4	6,40	1,16	0,335
Error	413,07	75	5,51		
Número de flores abiertas por inflorescencia					
Especies	417,38	3	139,13	4,83	0,004
Pob (esp)	164,95	4	41,24	1,43	0,232
Error	2161,83	75	28,82		

Tabla S4. Valores de las tres primeras componentes del análisis de componentes principales categórico (CATPCA).

Tipo	Caracteres	Valores		
		C1	C2	C3
QVM	Color dorsal de la corola	0,396	0,904	0,249
QVM	Color ventral de la corola	0,937	-0,334	-0,026
QVM	Color del estaminodio	0,374	0,911	0,256
QVS	Lóbulo central del labio inferior de la corola reflejo o patente	-0,870	-0,478	-0,177
QVS	Lóbulos laterales del labio inferior de la corola patentes o erectos	0,937	-0,334	-0,026
QVS	Inflorescencia erecta vs decumbente	-0,937	0,334	0,026
QVS	Guías de néctar dentro de la corola	0,283	0,943	0,258
QVS	Glándulas en la zona externa del tubo de la corola	0,283	0,943	0,258
QVS	Glándulas en la zona interna del tubo de la corola	0,937	-0,334	-0,026
Quant	Longitud del labio superior de la corola (L)	0,351	-0,403	0,662
Quant	Longitud de los lóbulos laterales (labio inferior) de la corola	0,409	-0,240	0,662
Quant	Longitud del lóbulo central (labio inferior) de la corola	-0,212	-0,338	0,699
Quant	Longitud del tubo de la corola (T)	0,122	-0,154	0,813
Quant	Cociente L/T	-0,337	0,281	0,057
Quant	Diámetro mayor del tubo de la corola (D)	-0,150	-0,102	0,788
Quant	Diámetro menor del tubo de la corola (d)	-0,425	0,006	0,724
Quant	Cociente D/d	0,920	-0,324	-0,034
Quant	Ángulo del labio superior de la corola	-0,893	0,313	0,025
Quant	Longitud de los órganos reproductores	0,117	-0,323	0,713
Quant	Exerción de los órganos reproductores	0,157	-0,424	-0,055
Quant	Longitud del estaminodio	-0,313	-0,525	0,248
Quant	Anchura del estaminodio	-0,368	-0,327	0,265
Quant	Altura de adhesión del estaminodio en el tubo de la corola (E)	-0,425	-0,330	0,633
Quant	E menos T	-0,784	-0,178	-0,068
Quant	Longitud del pedicelo floral	-0,201	0,006	0,704
QVO	Distancia entre cimas florales consecutivas	0,281	0,936	0,260
Polinizadores				
QVO	Lagartos	0,814	-0,308	-0,033
QVO	Avispas	-0,874	0,052	-0,046
QVO	Abejas	-0,868	-0,377	-0,127
QVO	Abejorros	-0,396	-0,260	0,206
QVO	Abejillas y avispas pequeñas	-0,433	-0,715	-0,185
QVO	Aves	0,741	-0,301	-0,027
QVO	<i>Sylvia sp.</i>	0,014	0,180	-0,162
QVO	<i>Phylloscopus sp.</i>	0,860	-0,289	-0,048
QVO	<i>Parus sp.</i>	0,814	-0,308	-0,033
% del total de la varianza		36,27	21,58	14,88
% acumulado del total de la varianza			57,85	72,73

QVM = variable cualitativa con varias categorías. QVS = variable cualitativa con dos categorías (presencia o ausencia). Quant = variable cuantitativa. QVO = variable cualitativa con categorías ordenadas. Los valores significativos se destacan en negrita.

Capítulo 2

Sistema de reproducción en poblaciones naturales
de *Scrophularia sambucifolia* y *S. grandiflora*

RESUMEN

Se ha realizado un estudio del sistema de reproducción en poblaciones naturales de *Scrophularia sambucifolia* y *S. grandiflora*, dos especies herbáceas perennes de flores vivamente coloreadas que presentan proteroginia, la primera endémica del SW de la Península Ibérica y NW de África y la segunda del CW de Portugal. Se han llevado a cabo dos experimentos de polinización: (1) autopolinización espontánea y (2) geitonogamia manual, que se han comparado con un control (polinización natural). Los resultados del primer test demuestran la eficacia de la proteroginia floral reduciendo al mínimo la autogamia en sentido estricto y, además, ponen de manifiesto la necesidad del concurso de los polinizadores de cara a una reproducción sexual exitosa. El segundo test refleja que ambas especies son autocompatibles, con mayores niveles en el caso de *S. grandiflora*. En las dos especies se calcula que el potencial de geitonogamia discurre a lo largo de todo el período de floración, aunque disminuye con la edad de la inflorescencia, y no se relaciona con el tamaño de la misma, es decir, el porcentaje de visitas por los polinizadores no es mayor en las inflorescencias grandes que en las pequeñas, como cabía esperar. El bajo nivel de formación de semillas/fruto en los controles, que rara vez supera el 60 %, puede ser una consecuencia del nivel de consanguinidad que entraña la geitonogamia. Finalmente, en ambas especies la producción de semillas/fruto es similar en todos los verticilos de la inflorescencia, algo que podría deberse a la arquitectura de la misma por el patrón de floración acrópeto a lo largo de los racimos de dicasios.

ABSTRACT

A study of the reproductive system has been performed in natural populations of *Scrophularia sambucifolia* and *S. grandiflora*, two perennial herbaceous species with showy and protogynous flowers, the first endemic to SW Iberian Peninsula and NW Africa and the second to CW Portugal. Two pollination treatments have been carried out: (1) spontaneous self-pollination and (2) hand-geitonogamy, which were compared with a control (natural pollination). The results of the first test demonstrated the effectiveness of floral protogyny reducing autogamy s.str. to minimum and also revealed the necessity of animal visits in the pollination of both species for a successful sexual reproduction. The second test showed that both species are self-compatible, with higher levels in *S. grandiflora*. For the two species is estimated that the potential for geitonogamy runs throughout the flowering season, but decreases with inflorescence age, and it is not related to its size, that is, the percentage of visits by pollinators is not greater in large inflorescences than on small ones, as could be expected. The low level of seed production per fruit in controls, which rarely exceeds 60 %, may be a consequence of the level of inbreeding that involves the geitonogamy. Finally, the seed production by fruit was similar in all

inflorescence whorls of the two species, which could be due to inflorescence architecture with an acropetal pattern of flowering along the racemes of dichasia.

INTRODUCCIÓN

El diseño floral (estructura, color, olor y recompensas) y la arquitectura de las inflorescencias representan un paso importante en una reproducción sexual exitosa, ya que de ellos depende en gran medida una polinización eficaz. En las especies zoófilas, la polinización tiene lugar por breves interacciones con los polinizadores cuando el polen se importa y exporta a las flores (Barrett, 2003). Que la dispersión de polen sea efectiva depende en gran medida de los tipos de polinizadores que visitan las flores y de su comportamiento pecoreador en las mismas, pero también del número de flores abiertas al mismo tiempo y de su disposición en las inflorescencias (Barrett, 2003). A los aspectos inherentes a la planta y al polinizador habría que añadir otros, como las características de las poblaciones ya que la polinización se puede ver limitada si estas están fragmentadas (Knight & al., 2005), o sometidas a ciertos factores ambientales adversos, como las bajas temperaturas, la presencia de viento o de lluvia que podrían disminuir o impedir el movimiento de diferentes polinizadores (Pacini & Franchi, 1984).

Tras una polinización efectiva y dependiendo de si el polen transferido es polen propio vs polen xenógamo se producirá una autogamia o geitonogamia vs una xenogamia, respectivamente, fenómenos que en términos generales en angiospermas parecen estar relacionados con el hábito de las plantas. Así, las especies anuales suelen ser autocompatibles y autógamas, mientras que muchas herbáceas perennes y leñosas tienden a ser xenógamas y autoincompatibles (Stebbins, 1974), aunque hay numerosas excepciones a esta regla (v.g. Arroyo, 1981; Webb & Shand, 1985; Rymer & al., 2002; Busch, 2005; Valtueña & al., 2008) por sesgo y falta de muestreo (Morales & Galetto, 2003; Igc & al., 2008) y un gran gradiente de transiciones entre unos y otros sistemas de reproducción (Busch, 2005; Goodwillie & al., 2005).

En especies que exhiben un gran número de flores abiertas al mismo tiempo por planta, la fecundación por autogamia (dentro de la misma flor) o por geitonogamia (entre flores de la misma planta) podría ser negativa debido a depresión endogámica y/o la pérdida de exportación de polen a otros individuos. Es por ello que la dicogamia, al

separar temporalmente la maduración de los órganos sexuales de la flor, sería un mecanismo que podría evitar dichos efectos negativos (Barrett, 2003; Routley & Husband, 2006). En cualquier caso, esta estrategia sólo puede ser apreciada cuando el papel de la dicogamia se analiza desde la perspectiva de la inflorescencia completa (Harder & al., 2004; Harder & Prusinkiewicz, 2013) ya que, como se demostró en *Aquilegia canadensis*, la protoginia floral (maduración del gineceo antes que el androceo) no redujo la autofecundación de las flores (Griffin & al., 2000); esto podría interpretarse como una adaptación para asegurar el éxito reproductivo cuando la polinización cruzada falla (autopolinización retrasada en el sentido de Lloyd & Schoen, 1992). Además, en el éxito reproductivo están involucrados otros muchos factores, independientemente de que el polen que se transfiera sea o no de la propia planta. Así, la reproducción puede estar limitada por la disponibilidad de polen (Burd, 1994; Knight & al., 2005), cuya magnitud puede variar dentro de una misma planta, entre los individuos de una población, las poblaciones o los años de estudio (Knight & al., 2005), o de los recursos, las características genéticas de los individuos (v.g. poblaciones genéticamente empobrecidas, Wilcock & Neiland, 2002), o las limitaciones arquitecturales intrínsecas de la inflorescencia (Diggle, 1995, 1997).

El presente capítulo se centra en el estudio del sistema de reproducción en poblaciones naturales de dos especies del género *Scrophularia*, *S. sambucifolia* (endemismo iberonorteafricano) y *S. grandiflora* (endémica del centro-oeste de Portugal). En dicho género las especies poseen inflorescencias racemosas o paniculadas formadas por cimas dicasiales de flores hermafroditas, pentámeras y zigomorfas (muy rara vez subactinomorfas, v.g. *S. vernalis*; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a), que presentan proteroginia, un tipo de dicogamia dada a conocer en el género por Sprengel (1793) y comprobada después por muchos otros autores (Müller, 1883; Shaw, 1962; Dalgaard, 1979; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b, entre otros). Como resultado de la desigual maduración en el tiempo de los órganos sexuales las flores se comportan como funcionalmente unisexuales, siendo normalmente más longeva la función masculina, que tiene una maduración secuencial de los estambres (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b).

Aunque la proteroginia previene la autopolinización (Faegri & van der Pijl, 1979; revisión en Bertin & Newman, 1993), en algunos táxones del género dicha eficacia fue cuestionada (v.g. *S. nodosa*, *S. peregrina*; Müller, 1883; Shaw, 1962;

Ortega-Olivencia & Devesa, 1993c) pues, en ausencia de polinizadores, el estigma queda receptivo hasta que se despliegan los estambres, que le depositan parte de su polen. A pesar de lo anterior, la dicogamia favorece la polinización cruzada en la mayoría de las especies estudiadas de *Scrophularia* (Stiefelhagen, 1910; Dalgaard, 1979; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993c; Hoffmann & Kwak, 2005) teniendo, en general, la autogamia en sentido estricto una importancia limitada en el grupo. Sin embargo, la mayor parte de las especies investigadas hasta ahora son autocompatibles (AC) (Shaw, 1962; Dalgaard, 1979; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993c) y, por tanto, los polinizadores, al visitar flores sucesivas de una misma inflorescencia o de inflorescencias distintas de un mismo individuo, podrían propiciar la fecundación con el polen de la propia planta (geitonogamia), lo que genéticamente equivale a una autogamia. Tal AC se ha demostrado tanto en especies americanas (Shaw, 1962) como macaronésicas (Dalgaard, 1979) o del W del Mediterráneo (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993c). Desde el punto de vista genético la tasa de autogamia sólo se ha averiguado en *S. nodosa* por medio de isoenzimas (Koniuszek & al., 1986). El único caso experimentalmente documentado de autoincompatibilidad (AI) es el de la especie rifeña *S. fontqueri* donde se demostró que era de tipo gametofítico (Ortega-Olivencia & Devesa, 1998).

Hasta la fecha los estudios realizados sobre biología de la reproducción en *S. sambucifolia* y *S. grandiflora* señalan que de acuerdo con los valores del cociente P/O (nº de granos de polen/nº de primordios seminales) establecido por Cruden (1977) ambas especies se comportan como xenógamas facultativas (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993c). Así mismo, recientemente se ha descubierto que poseen un sistema de polinización mixto entre insectos y aves paseriformes (Ortega-Olivencia & al., 2012). La principal recompensa que ofertan a sus polinizadores es el néctar y su producción (en volumen y peso de azúcares) es la mayor de la generada por las especies iberobaleáricas (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b) y probablemente de todo el género. También se sabe que dicho sistema de polinización mixto ha evolucionado a partir de un sistema de polinización por avispa (Navarro-Pérez & al., 2013).

Con respecto al sistema de reproducción no se han realizado estudios que demuestren taxativamente el grado de AC o AI existente en *S. sambucifolia* y *S. grandiflora*. En este sentido, los estudios más próximos son los efectuados por Ortega-Olivencia & Devesa (1993c) quienes realizaron experimentos de autopolinización

espontánea en plantas cultivadas en el Jardín Experimental de la UEx (Badajoz), obteniendo como resultado que no había fructificación o que esta era muy baja (hasta un 12,2 % en *S. grandiflora*). Dichos resultados ponían de manifiesto que ambas especies necesitaban del concurso de los polinizadores para la reproducción sexual pero no permitían inferir nada sobre el grado de compatibilidad de las especies, ya que al tratarse de especies proteróginas hubiese sido necesario realizar autopolinizaciones manuales forzando en ellas una geitonogamia.

En definitiva, existe una falta de estudios sobre el sistema de reproducción en poblaciones naturales de *S. sambucifolia* y *S. grandiflora*, siendo este hecho el motivo principal del presente capítulo, con el que se persiguen los siguientes objetivos:

1. Evaluar la importancia de los polinizadores en la reproducción de *S. sambucifolia* y *S. grandiflora* determinando el porcentaje de fructificación y el de formación de semillas por fruto bajo condiciones naturales.
2. Averiguar si dichas especies se tipifican como AC o AI.
3. Conocer la importancia del fenómeno de la protoginia en la reducción de la autofecundación de ambas especies.
4. Averiguar si existe un reparto uniforme o no entre la producción de semillas/fruto en función de los verticilos a lo largo de la inflorescencia (verticilos inferiores, medios y superiores).

MATERIAL Y MÉTODOS

ESPECIES ESTUDIADAS

Scrophularia sambucifolia y *S. grandiflora* son hierbas perennes, rizomatosas, de las que permanece, de un año para otro, la parte basal con tallos secos y algunas ramas con frutos. Los tallos son cuadrangulares, columnares y alcanzan alturas similares -hasta 180 cm en *S. sambucifolia* y hasta 190 cm en *S. grandiflora* (Fig. 1). Las hojas son pinnatisectas con 2-4 pares de segmentos laterales (Fig. 2). Las flores se reúnen en inflorescencias largas (15-75 cm en *S. sambucifolia* y 24-110 cm en *S. grandiflora*) integradas por cimas dicasiales compuestas (rara vez simples), opuestas a lo largo del eje, a veces alternas hacia la parte superior, y con hasta 10 flores por cima. Las cimas

tienen pedúnculos cortos, hasta de 5(11) mm, y en su base brácteas indivisas o conformes con las hojas (Fig. 2). Las flores presentan cinco sépalos ovales o suborbiculares, obtusos,

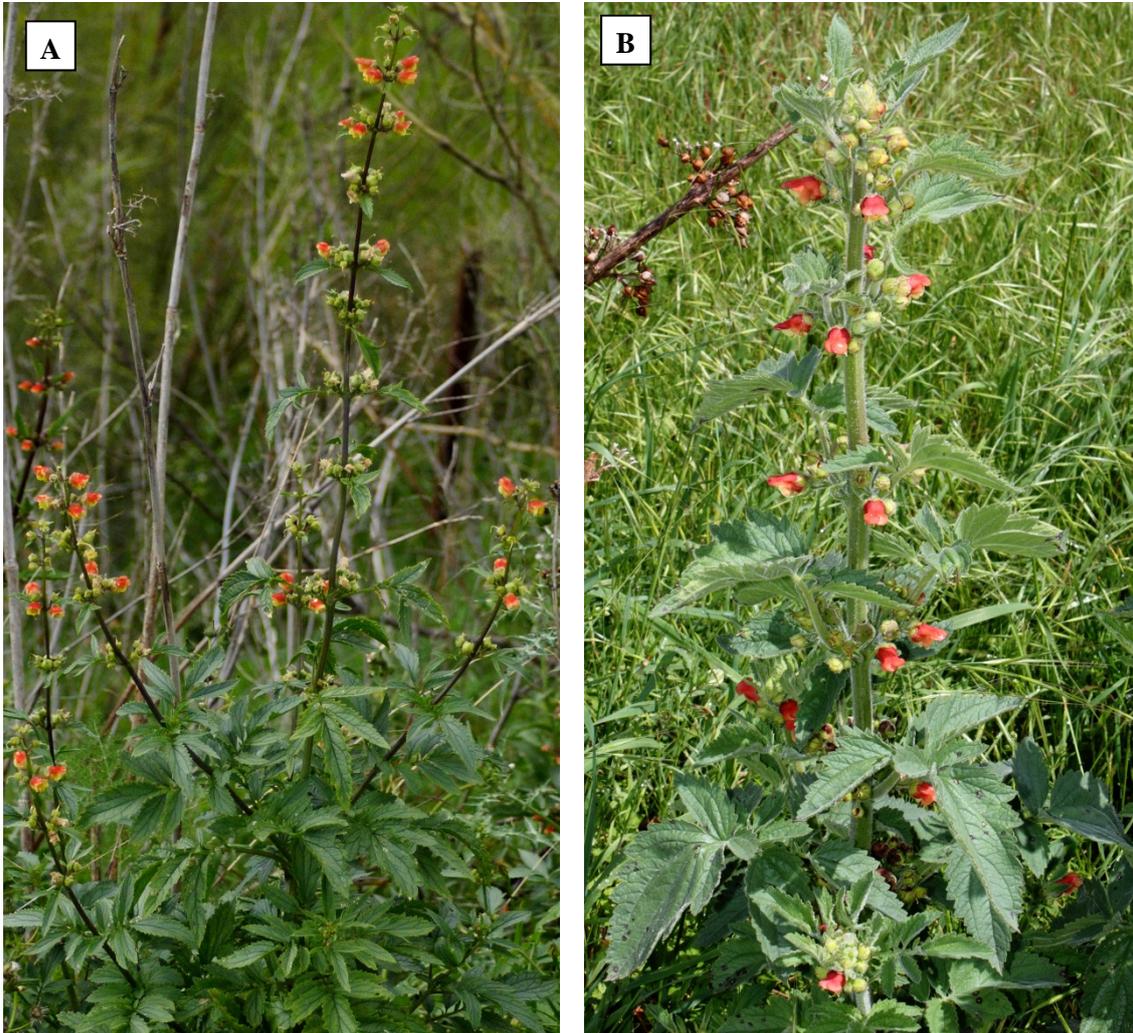


Figura 1. Aspecto al natural de *S. sambucifolia* (A) y *S. grandiflora* (B).

con margen escarioso de (0,4)0,5-1,5(2) mm de ancho, ondulado, blanquecino, entero o irregularmente dentado en *S. sambucifolia* y ligeramente crenado en *S. grandiflora*. La corola es bilabiada, de (10)12-19,5 mm, y de coloración muy llamativa (Fig. 3). El gineceo, bicarpelar, consta de un largo estilo que remata en un estigma capitado cuando joven y ligeramente bilobulado en la madurez (Fig. 3). El androceo lo integran cuatro estambres fértiles y un quinto estéril (el estaminodio) (Fig. 2). Las anteras son reniformes, con dehiscencia transversal y de color amarillo (Fig. 3 B). El estaminodio es obovado en *S. grandiflora* y de oblongo a suborbicular en *S. sambucifolia*, en ambos casos purpúreo. El fruto de las dos especies es una cápsula septicida hasta de 13 x 11

mm, ovoidea, lignificada en la madurez y de coloración parda o pardo-verdosa. Sus semillas, de $0,8-1,3 \times (0,4)0,5-0,8$ mm, son generalmente negruzcas o marrones (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a; Ortega-Olivencia, 2009).

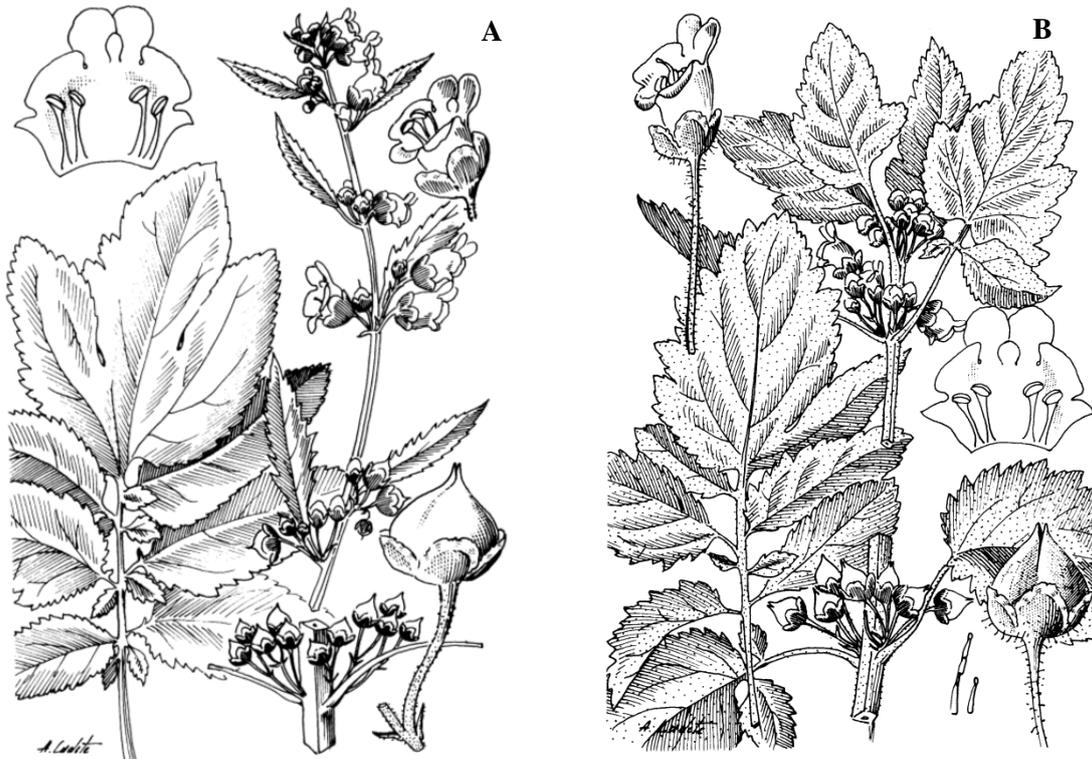


Figura 2. Caracteres vegetativos y florales de *S. sambucifolia* (A) y *S. grandiflora* (B). Icones extraídos de Ortega-Olivencia & Devesa (1993a).

No existen estudios sobre la dispersión de sus diásporas, aunque presumiblemente las semillas son expulsadas del interior de las cápsulas a través del viento (boleoanemocoria) y/o por la acción de algún animal al posarse o rozar las inflorescencias (boleozoocoria). La germinación de las semillas ocurre en otoño, desarrollándose la parte vegetativa de la planta a lo largo del invierno y la primavera, en tanto que la floración ocurre en primavera (marzo a mayo) (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a; Ortega-Olivencia, 2009). No obstante, esta última podría adelantarse a febrero (en *S. sambucifolia*) o retrasarse hasta julio (en *S. grandiflora*). La fructificación tiene lugar aproximadamente un mes después de la floración.

Las diferencias más relevantes entre ambas especies residen principalmente en el indumento, glabro en *S. sambucifolia* y pubescente-glanduloso en *S. grandiflora*, afectando dicha pubescencia a las partes vegetativas y al cáliz de la flor (Fig. 1-3).

Igualmente, la corola, aunque externamente rojiza en ambas especies, puede ser anaranjado-rojiza en la primera y rosado-cárnea en la segunda.



Figura 3. Aspecto natural de las flores de las especies estudiadas mostrando la maduración secuencial de los órganos sexuales en el tiempo. (A) *S. sambucifolia* y (B) *S. grandiflora*.

Con respecto a su ecología y distribución, *S. sambucifolia* se distribuye por el SW de la Península Ibérica y NW de África y habita preferentemente en suelos profundos de naturaleza margosa o caliza, junto a cunetas y riberas de ríos y arroyos, desde el nivel del mar hasta los 1.300 m; *S. grandiflora* (endemismo de la provincia portuguesa de Beira Litoral) se localiza en sitios más o menos sombríos y húmedos, muros, taludes herbosos, bordes de caminos y carreteras entre 400-500 m (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a; Ortega-Olivencia, 2009). Ambas especies poseen un comportamiento ruderal-viario, aunque sin llegar a ser calificadas como malas hierbas.

POBLACIONES ESTUDIADAS

Se han estudiado dos poblaciones peninsulares por especie durante dos años (Fig. 4). Las correspondientes a *S. sambucifolia* se ubican en Andalucía (provincias de Sevilla y de Cádiz), distando entre ellas unos 58 km y a unos 300 km de nuestro laboratorio en Badajoz. Las de *S. grandiflora* se localizan en el distrito de Coimbra, dentro del concejo de Penela, Soure y Condeixa-a-Nova, a unos 3 kilómetros de distancia entre sí y a 250 kilómetros de Badajoz (Fig. 4).

- ***S. sambucifolia***

La población 1 (en adelante Morón) se sitúa en el sur de la provincia de Sevilla a 228 m de altitud, 37° 06' de latitud N y 5° 23' de longitud O, sobre taludes, a lo largo de un tramo cercano al km 7 de la carretera A-406 que une Morón de la Frontera con Pruna, sobre los bordes de un camino que diverge de la misma. El terreno lindante ha

estado en barbecho durante los dos años de estudio. Por la misma pasa un pequeño tramo del río Guadaíra, afluente del Guadalquivir. La población 2 (en adelante El Gaster) se localiza en el N de la provincia de Cádiz a 454 m de altitud, 36° 52' de latitud N y 5° 21' de longitud O, en las estribaciones orientales de la Sierra de Lijar, en el término municipal de Algodonales, al comienzo de la carretera N-342 desde la A-374 en dirección a El Gaster. Como su homóloga, habita en taludes de camino, lindando a un lado con un cultivo de cereal y a otro con uno de leguminosas.

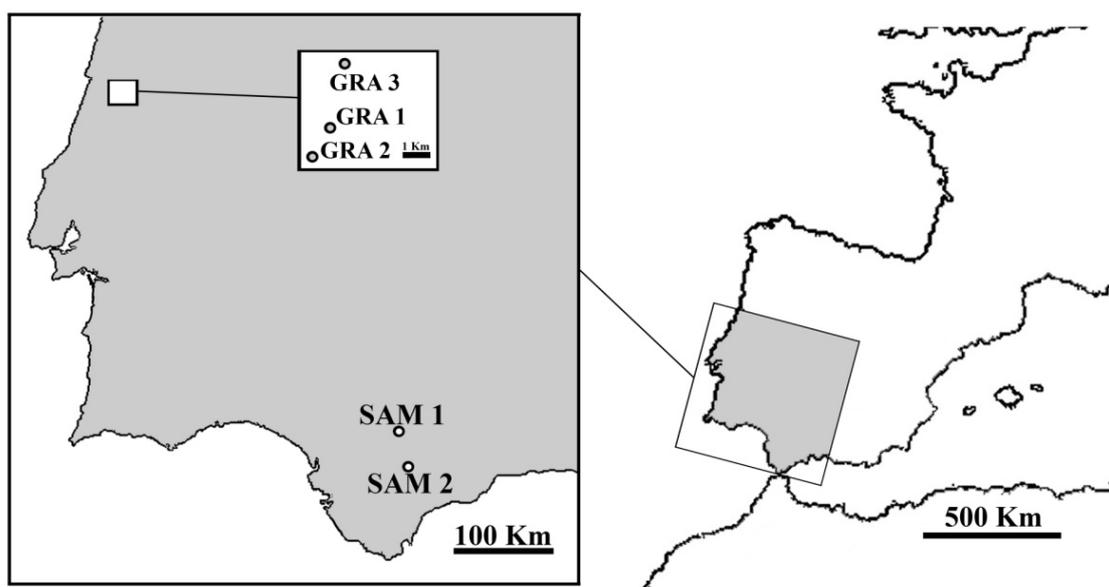


Figura 4. Localización de las poblaciones estudiadas de *S. sambucifolia* (SAM 1, Morón; SAM 2, El Gaster) y de *S. grandiflora* (GRA 1, Rabaçal; GRA 2, Pombalinho; GRA 3, Zambujal).

En ambas poblaciones el sustrato es básico, constituido por margo-calizas, con suelos en su conjunto relativamente jóvenes, fuertes, arcillosos y compactos, donde alternan grandes zonas permeables debido a su constitución de calizas jurásicas y grandes zonas impermeables con predominio de margo-calizas cretácicas (Reina, 2005).

Los datos meteorológicos (sec. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, periodo 2001-2010) de las estaciones más cercanas a las poblaciones (Puebla de Cazalla en Sevilla y Villamartín en Cádiz) arrojan una temperatura media anual de 17,8 °C y 17,3 °C para la población de Morón y El Gaster, respectivamente y unas precipitaciones medias anuales de 446,6 mm en Morón y 486,3 mm en El Gaster. Con respecto a su bioclimatología, ambas poblaciones presentan bioclima mediterráneo pluviestacional oceánico (Rivas Martínez, 2000), se localizan en el piso

termomediterráneo (Rivas Martínez & al., 2004) y poseen un ombroclima seco.

La vegetación potencial de ambas poblaciones se corresponde con un encinar basófilo, muy lejos de la vegetación real que actualmente se observa y que está constituida por un matorral mediterráneo de *Retama sphaerocarpa*, *Chamaerops humilis*, *Crataegus monogyna*, *Phlomis purpurea*, *Ceratonia siliqua*, *Olea europaea* var. *sylvestris*, *Rubia peregrina* y *Daphne gnidium* como elementos principales, acompañados de pies dispersos de encina (*Quercus rotundifolia*). Conviviendo con *S. sambucifolia* existen muchos otros elementos herbáceos cuya floración coincide en parte con la de ella (v.g. *Fedia cornucopiae*, *Geranium molle*, *Raphanus raphanistrum*, *Allium roseum*, *Salvia verbenaca*, *Diplotaxis virgata*, *Ophrys lutea*, *Centaurea pullata*, *Anchusa azurea*, *Ranunculus ficaria*, *Borago officinalis*, *Galium verrucosum*, *Sinapis alba*, etc.).

Desde el punto de vista biogeográfico las poblaciones pertenecen a la provincia bética, sector hispalense, aunque la población de El Gastor muestra transición hacia el sector rondeño (Rivas Martínez, 1988).

- *S. grandiflora*

La población 1 (en adelante Rabaçal) se encuentra en la pedanía de Rabaçal, en el concejo de Penela, a 199 m de altitud, 40° 01' de latitud N y 8° 27' de longitud O, junto a una fábrica de quesos, en los márgenes de la carretera EM-553 que se dirige a Pombalinho. La población 2 (en adelante Pombalinho) se localiza a 2,8 km de la población 1, en las cercanías de Pombalinho, en el concejo de Soure. Esta población se sitúa a 280 m de altitud, 40° de latitud N y 8° 28' de longitud O, en un terreno privado de uso pastoril junto a la carretera. Durante el segundo año de estudio esta población tuvo que sustituirse por otra debido a la falta de autorización de los dueños para continuar trabajando en ella, con similar ecología pero ubicada en terrenos públicos. La nueva población (en adelante Zambujal), a 175 m de altitud, 40° 03' de latitud N y 8° 27' de longitud O, se localiza a 2,6 km de Rabaçal en dirección a Zambujal por la carretera N347-1 en el concejo de Condeixa-a-Nova. Geológicamente, todas se asientan en sustrato calizo margoso del Jurásico.

Los datos meteorológicos (sec. el Instituto de Meteorología IP, Portugal, para el periodo 1971-2000) correspondientes a la estación de Coimbra-Bencanta muestran que la temperatura y las precipitaciones medias anuales de la zona son de 15,5 °C y 905,1

mm, respectivamente, siendo el mes más frío enero, con mínimas de - 4,9 °C y el más cálido agosto con máximas de 23 °C. De acuerdo con estos datos las poblaciones se engloban dentro del piso mesomediterráneo inferior, con un ombroclima subhúmedo (Rivas Martínez, 2008) y un bioclima mediterráneo pluviestacional oceánico (Rivas Martínez, 2000).

La vegetación potencial se correspondería con un encinar basófilo, reducido hoy en la población de Rabaçal a un seto de *Rubus ulmifolius* y un matorral típicamente mediterráneo compuesto de *Cistus albidus*, *Daphne gnidium*, *Crataegus monogyna*, *Ulex sp.*, *Phlomis purpurea* y *Scrophularia canina*, entre otras especies. La población de Pombalinho forma parte de un herbazal de una huerta junto a un pastizal salpicado con pies de olivo, *Daphne gnidium*, *Quercus faginea*, *Rosa sp.* y *Jasminum fruticans*, entre otros elementos arbóreos y arbustivos. La de Zambujal también bordea un olivar donde además convive con algunos individuos de *Antirrhinum majus*, *Crataegus monogyna* y *Cistus albidus*. Algunos elementos de la vegetación arvensis que acompañan a *S. grandiflora* son *Borago officinalis*, *Allium roseum*, *Euphorbia characias*, *Lathyrus cicera*, *L. aphaca*, *Centranthus calcitrapae*, *Muscari comosum*, *Rhagadiolus stellatus*, etc.

Desde el punto de vista biogeográfico, las poblaciones se sitúan en las confluencias de las provincias luso-extremadureña y carpetano-leonesa (Rivas Martínez & al., 2004).

SISTEMA DE REPRODUCCIÓN

El trabajo de campo se desarrolló durante los años 2010 y 2011, a lo largo del periodo de floración de ambas especies; comenzó a mitad de febrero con la exploración de las poblaciones a fin de conocer el estado fenológico de las mismas y finalizó en el mes de julio con la recolecta de los últimos frutos producidos por las plantas. Mientras estas estuvieron en flor se realizaron salidas semanales de c. dos días por semana; durante la fructificación las salidas fueron de un día de duración cada dos semanas. Esta programación hizo que no se excediera en quince días la visita a cada especie.

Para estudiar el sistema de reproducción se realizaron dos tests diferentes de polinización en el campo, uno de polinización geitonógama manual (PGM) y otro de autopolinización espontánea (ApE), los cuales fueron comparados con un tercer grupo

de plantas control (C) sometidas a polinización natural. Para ello se seleccionaron al azar y se marcaron con etiquetas de plástico de diferentes colores 10 individuos distintos por población, especie y tratamiento. Otros 10 individuos por población se marcaron y actuaron como control. En total se contó con 30 individuos en cada población, repartidos al azar en grupos de tres (PGM, ApE y C); de esta forma los individuos sometidos a tratamiento y control estaban lo más próximos posible.

El test PGM (geitonogamia “forzada”) consistió en polinizar manualmente, hasta un máximo de 100 por inflorescencia, las flores recién abiertas (cuando el estigma formaba un ángulo menor o igual a 90° con el plano longitudinal de la flor), depositando sobre sus estigmas, con ayuda de unas pinzas, una cantidad suficiente de polen del propio individuo. Posteriormente, se marcó el cáliz y el pedicelo de cada flor polinizada con pintura plástica y se procedió a embolsar las inflorescencias con bolsas de nylon blancas. Mediante un cable flexible de alambre se sujetaba la inflorescencia a una caña y a la bolsa, colocando una buena tira de algodón para evitar daños a la planta e impedir el acceso de insectos a la misma. Los individuos de autopolinización espontánea (ApE) no sufrieron ninguna manipulación floral; únicamente se aislaron de los polinizadores embolsando las inflorescencias como en el caso anterior.

Llegado el período de fructificación se recolectaron las inflorescencias completas y en el laboratorio se procedió a contar el número de flores y frutos producidos. El número total de flores se calculó sumando el de frutos producidos y flores abortadas, identificándose estas últimas a partir de los cálices y/o pedicelos florales que no suelen desprenderse de la planta. El recuento de semillas viables (bien conformadas) por fruto se realizó a la lupa con un contador manual. En el caso de los frutos generados tras geitonogamia y autogamia espontánea se contaron las semillas de todos ellos mientras que en los individuos control, dada la alta producción de frutos, tal recuento se hizo solo en 10 seleccionados al azar en cada individuo (4, 3 y 3 frutos de los verticilos inferiores, medios y superiores de la inflorescencia, respectivamente).

A partir de esos datos se averiguó el porcentaje de fructificación (n° de frutos x 100/ n° de flores) y el de formación de semillas (n° de semillas x 100/ n° de primordios seminales). El número de primordios seminales se contabilizó con la ayuda del MO en un total de 15 botones florales/población elegidos al azar, dada la imposibilidad de contarlos en los frutos.

Con el fin de obtener información sobre la probabilidad de geitonogamia en cada

población y especie, durante el período de floración de los años 2009 y 2010, se eligieron al azar 10 individuos/población y por cada período de muestreo (normalmente una vez por semana o cada 10-12 días) y se les contaba el número de flores en estado femenino y masculino a cada inflorescencia. Posteriormente, se realizó la diferencia entre el porcentaje de flores en estado sexual masculino y femenino. Valores de 0 se corresponderían con una geitonogamia total mientras que valores de 100 equivaldrían a la inexistencia de geitonogamia (geitonogamia impedida).

VARIACIÓN ESPACIAL DE LA PRODUCCIÓN DE SEMILLAS EN LA INFLORESCENCIA

Durante los años 2010 y 2011 y en 10 individuos de cada población sometidos a polinización natural se realizó un seguimiento de la producción de semillas viables (bien conformadas) por fruto, en función de la localización de estos en la inflorescencia. La inflorescencia se dividió en 3 partes (vi, verticilo inferior; vm, medio; vs, superior) y se seleccionaron al azar 4 frutos del verticilo inferior y 3 del medio y superior, cuyas semillas fueron contadas como en el apartado anterior. En este estudio se utilizaron además datos de frutos recolectados en el año 2009 (en las poblaciones de Morón y El Gaster para *S. sambucifolia*, y en Rabaçal y Pombalinho para *S. grandiflora*) por el grupo de investigación al que pertenece la doctoranda. Concretamente, se contaron las semillas de 6 cápsulas (2 del verticilo inferior, 2 del medio y 2 del superior) para cada uno de los 10 individuos. Igualmente, se tuvieron en cuenta los datos de producción de primordios seminales del apartado anterior de cara a la obtención del cociente semillas/primordios seminales.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 19. La normalidad de las variables se comprobó mediante el test no paramétrico de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors y la homocedasticidad con el test de Levene.

Tras normalizar los datos mediante la raíz cuadrada del cociente semillas/primordios seminales (S/PS), se emplearon ANOVAS de una vía, utilizando como variable o factor dependiente la raíz cuadrada de S/PS y como variables o factores independientes el año, la población, el tratamiento y los verticilos. Se seleccionó un

diseño factorial en el que se incluyeron todas las variables estudiadas y todas las interacciones por pares posibles. Tras el ANOVA todas las interacciones no significativas fueron eliminadas del diseño factorial y se repitió el análisis para comprobar que la existencia o no de diferencias se seguían manteniendo, aunque estos últimos resultados no se muestran. Una vez determinado que existían diferencias entre las medias, las pruebas significativas HSD de Tukey permitieron determinar qué medias por pares diferían en aquellos factores de 3 o más variables (tratamiento y verticilos).

Los datos de fructificación no pudieron ser normalizados, por lo que se analizaron mediante modelos lineales generalizados, ajustándose a una distribución binomial negativa con una función de enlace logarítmica y utilizando el logaritmo del número de flores como variable de compensación (offset). Las variables independientes utilizadas en el análisis fueron las mismas que las de la formación de semillas.

RESULTADOS

SISTEMA DE REPRODUCCIÓN

Antes de enunciar los resultados indicar que debido a que las poblaciones estudiadas estaban cerca de lugares accesibles al hombre hemos sufrido de acciones vandálicas lo que nos obligó a repetir ensayos y asumir la pérdida de algunos datos.

En ambas especies, la fructificación mostró diferencias significativas entre los dos tratamientos de polinización (ApE y PGM) y entre cada uno de ellos y el control (Tabla 1). Así, los individuos control presentaron un porcentaje de fructificación más alto en todas las poblaciones y los dos años de estudio (Fig. 5). En los individuos de ApE el porcentaje de fructificación en ningún caso superó el 5 %: en *S. sambucifolia* el mayor porcentaje (1,66) se alcanzó en la población de El Gastor el año 2011, mientras que en *S. grandiflora* (4,84 %) se consiguió en la de Rabaçal durante ese mismo año (Fig. 5); por tanto, las tasas de autogamia s.str. son muy bajas. Tras el experimento de PGM los niveles de fructificación se elevaron considerablemente y alcanzaron en *S. sambucifolia* el 29,9 % en la población de El Gastor el año 2011 y en *S. grandiflora* el 44,32 % en la de Zambujal (Fig. 5); por tanto, los niveles de AC son moderados. Las interacciones entre la población y el tratamiento o el año y el tratamiento no mostraron diferencias significativas (Tabla 1), lo que significa que el comportamiento de las

especies bajo los diferentes tratamientos (C > PGM > ApE) se mantuvo en ambos años y poblaciones de estudio.

Tabla 1. Modelo lineal generalizado para analizar el efecto de los tratamientos (polinización geitonógama, autopolinización espontánea, control), las poblaciones (*S. sambucifolia*: Morón, El Gastor; *S. grandiflora*: Rabaçal, Pombalinho/Zambujal) y los años (2010, 2011) y sus interacciones por pares sobre la fructificación (variable dependiente: número de frutos, variable de compensación: logaritmo de las flores). Los resultados significativos se muestran en negrita.

Especie	Origen	Tipo III		
		χ^2 de Wald	g.l.	Sig.
<i>S. sambucifolia</i>	Tratamiento	241,72	2	0,000
	Población	1,42	1	0,233
	Año	19,57	1	0,000
	Población * Tratamiento	0,16	2	0,921
	Año * Tratamiento	2,67	2	0,263
	Año * Población	17,95	1	0,000
<i>S. grandiflora</i>	Tratamiento	160,58	2	0,000
	Población	0,01	1	0,930
	Año	0,21	1	0,647
	Población * Tratamiento	2,73	2	0,255
	Año * Tratamiento	0,75	2	0,688
	Año * Población	0,25	1	0,617

Al fijarnos en las poblaciones y en los dos años de estudio para ambas especies, en general, los mayores porcentajes de fructificación, tanto en los individuos control como en los sometidos a tratamiento (PGM o ApE) se obtuvieron en 2011 (Fig. 5). No obstante, las diferencias entre años, cuando no se tenían en cuenta los tratamientos ni las poblaciones, solo fueron significativas en *S. sambucifolia* (Tabla 1).

De las dos especies, *S. grandiflora* fue la que presentó los porcentajes de fructificación más altos, con valores medios totales del 3,11 % y del 31,75 % tras ApE y PGM, respectivamente y del 61,36 % en los individuos control, frente al 0,94 %, 13,56 % y 46,23 % obtenidos en *S. sambucifolia*. Aunque las diferencias entre ambas especies fueron significativas ($\chi^2_{\text{Wald}} = 28,117$; g.l. = 1; P = 0,000) no ocurrió lo mismo respecto a la interacción entre especie y tratamiento ($\chi^2_{\text{Wald}} = 5,206$; g.l. = 2; P = 0,074), es decir, ambas especies mostraron la misma estrategia reproductiva (C > PGM > ApE).

En cuanto a la formación de semillas (cociente S/PS) por fruto, los valores más altos se obtuvieron para las dos especies en los individuos control, tanto en los dos años de estudio como en las diferentes poblaciones, excepto para *S. grandiflora* durante el año 2011 en la población de Zambujal (Fig. 6). De este modo, la formación de semillas en los controles fue significativamente mayor a la obtenida tras el tratamiento de PGM

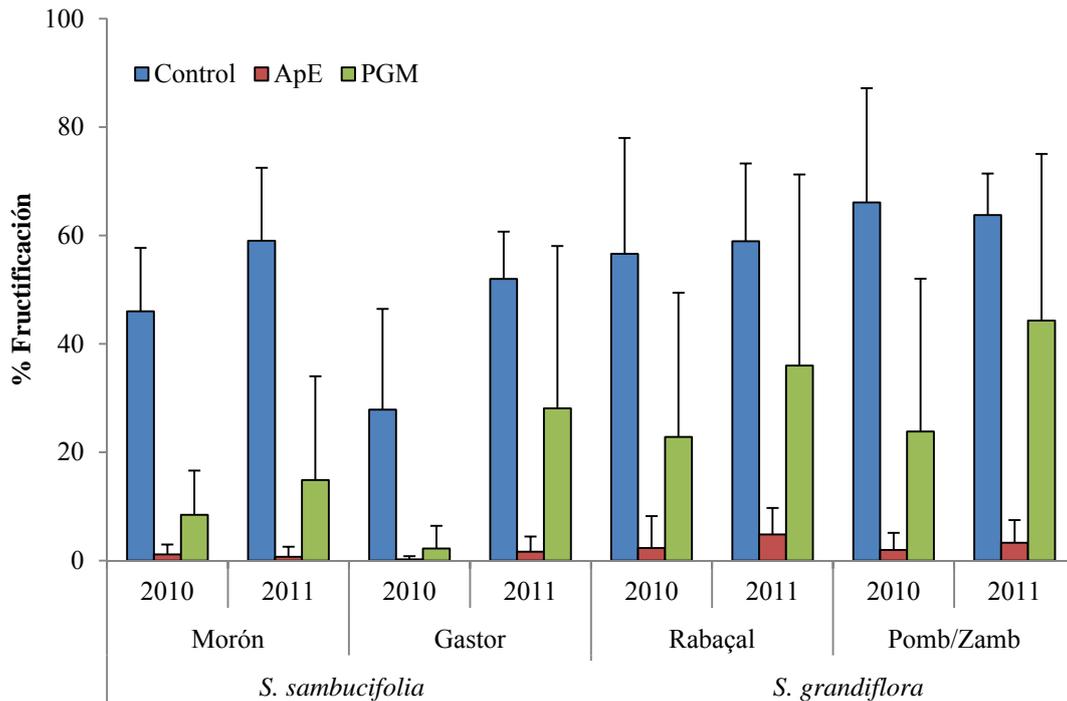


Figura 5. Porcentaje de fructificación (media \pm d.s.) en las dos especies estudiadas. Control = polinización natural; ApE = autopolinización espontánea; PGM = polinización geitonógama manual. Pomb = Pombalinho; Zamb = Zambujal.

($P = 0,000$) y de ApE ($P = 0,000$) en las dos especies (post hoc HSD de Tukey). A su vez, la formación de semillas tras PGM fue significativamente mayor que tras ApE (*S. sambucifolia*: $P = 0,023$; *S. grandiflora*: $P = 0,000$) (post hoc HSD de Tukey). Este comportamiento ($C > PGM > ApE$) fue significativamente diferente en los dos años y las poblaciones de estudio como muestran los resultados de las interacciones entre los factores año y tratamiento y población y tratamiento (Tabla 2). De manera general, y también para esta variable, se puede indicar que las dos especies se comportan como AC, y el mayor porcentaje de formación de semillas se alcanza bajo polinización natural.

Los mayores valores de generación de semillas/fruto, tanto en los individuos experimentales como en los controles, se dieron en *S. grandiflora* (Fig. 6) y fueron significativamente más altos que los de *S. sambucifolia* ($F = 17,60$; g.l. = 1; $P = 0,000$). Aunque el comportamiento de ambas especies fue el mismo ($C > PGM > ApE$) la interacción especie x tratamiento presentó diferencias significativas ($F = 5,95$; g.l. = 2; $P = 0,003$) debido a que en *S. grandiflora* la proporción de semillas formadas bajo condiciones naturales (controles) presentó una menor diferencia respecto a aquellas formadas bajo ambos tratamientos.

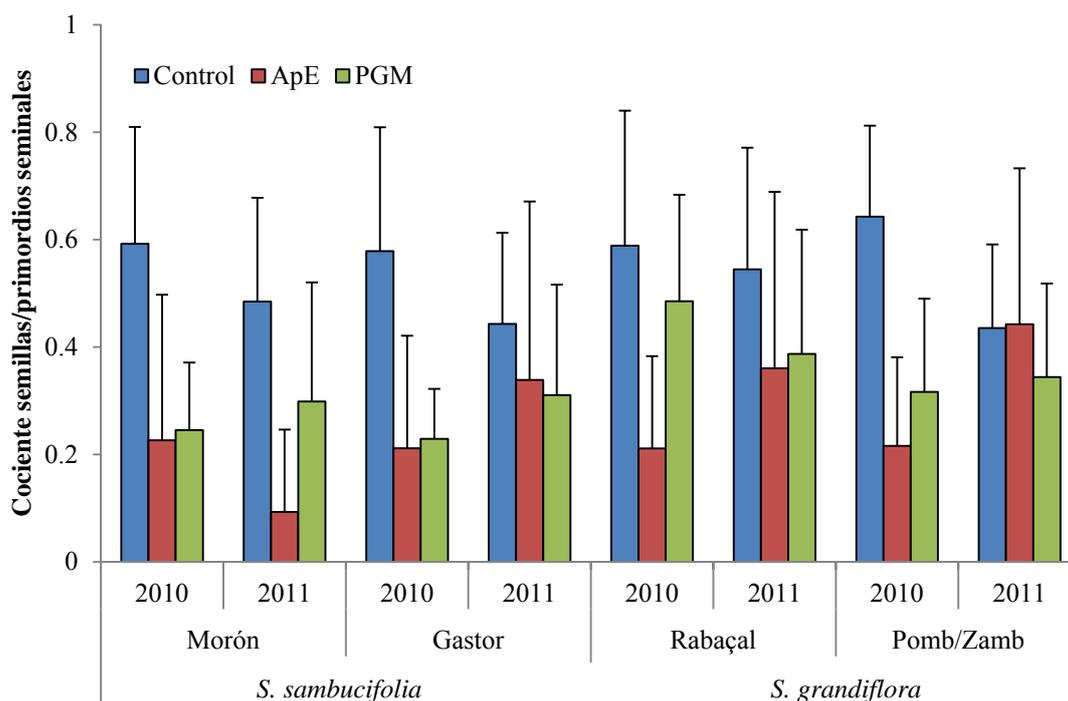


Figura 6. Formación de semillas por fruto (semillas/primordios seminales) en las dos especies estudiadas (media \pm d.s.). Control = polinización natural; ApE = autopolinización espontánea; PGM = polinización geitonógama manual. Pomb = Pombalinho; Zamb = Zambujal.

Respecto al potencial de geitonogamia por inflorescencia las diferencias absolutas obtenidas entre el porcentaje de flores en estado masculino y femenino indican que dicho sistema de reproducción juega un papel importante en la reproducción sexual de las dos especies. Ambos estados sexuales no se presentan en la misma proporción en cada inflorescencia sino que, por lo general, existe un mayor número de flores en estado masculino que femenino (resultados no mostrados). La diferencia obtenida entre el porcentaje de ambos estados sexuales en cada año y población mostró valores medios de 46,63-62,15 en *S. sambucifolia* y de 47,11-55,92 en *S. grandiflora* (Tabla 3), lo que mostraría la existencia clara de geitonogamia en las dos especies. En la figura 7, que representa dicha diferencia a lo largo del período de floración para cada año y población/especie, se observa no sólo la posible existencia de geitonogamia para cada período de muestreo sino que posee una tendencia ascendente, es decir, que en las fases más avanzadas de la floración, donde los individuos pueden considerarse adultos respecto a los individuos jóvenes de las primeras fases, existe una mayor diferencia entre los estados sexuales de las flores de la inflorescencia, lo que significa probabilidades más bajas de ocurrencia de dicho sistema de reproducción.

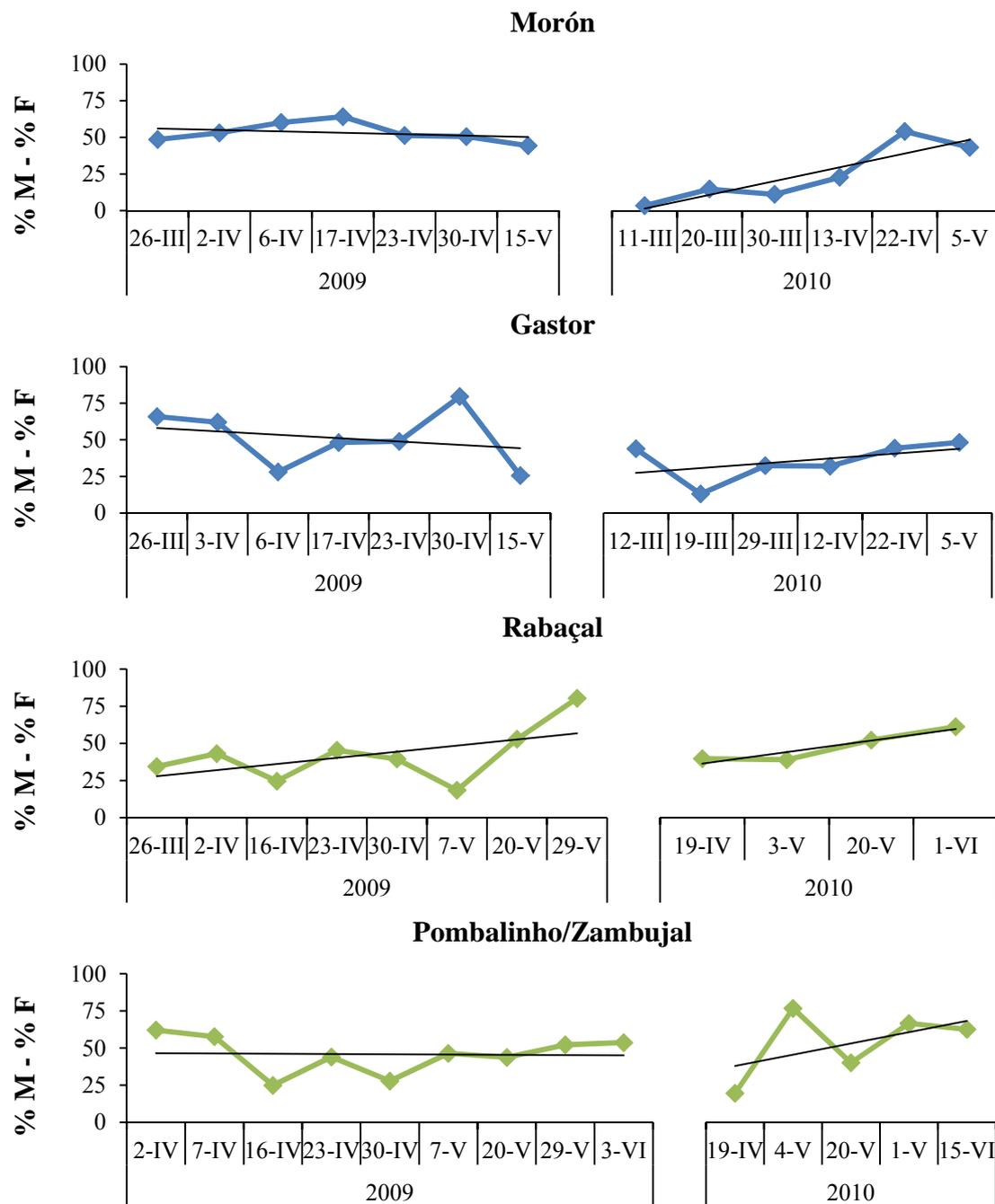


Figura 7. Diferencia absoluta entre el porcentaje de los estados sexuales de las flores presentes por inflorescencia en cada población a lo largo del periodo fenológico de los años 2009 y 2010. F = fase femenina; M = fase masculina. *S. sambucifolia*: gráficas azules; *S. grandiflora*: gráficas verdes.

El número medio de flores totales por inflorescencia durante el pico de floración (considerando únicamente los individuos del periodo en el cual se produjo un mayor número de flores) fue de 16,02 (\pm 11,21) en *S. sambucifolia* vs 22,52 (\pm 15,48) en *S. grandiflora*. Las inflorescencias que presentaron un número total de flores superior a la media eran consideradas “grandes” y “pequeñas” las que lo presentaron inferior. La di-

Tabla 2. ANOVA de una vía para analizar el efecto de los tratamientos (polinización geitonógama, autopolinización espontánea, control), las poblaciones (*S. sambucifolia*: Morón, El Gastor; *S. grandiflora*: Rabaçal, Pombalinho/Zambujal) y los años (2010, 2011) y sus interacciones por pares sobre la variable dependiente (raíz cuadrada del cociente semillas/primordios seminales). La media cuadrática (MC) se basa en la suma de cuadrados de tipo III. Los resultados significativos se muestran en negrita.

Especie	Origen	g.l.	MC	F	Sig.
<i>S. sambucifolia</i>	Tratamiento	2	3,49	133,06	0,000
	Población	1	0,13	4,76	0,030
	Año	1	0,07	2,68	0,102
	Población * Tratamiento	2	0,12	4,54	0,011
	Año * Tratamiento	2	0,27	10,42	0,000
	Año * Población	1	0,01	0,24	0,624
	Error		639	0,03	
<i>S. grandiflora</i>	Tratamiento	2	3,32	113,90	0,000
	Población	1	0,10	3,25	0,071
	Año	1	0,00	0,08	0,773
	Población * Tratamiento	2	0,26	8,83	0,000
	Año * Tratamiento	2	0,65	22,42	0,000
	Año * Población	1	0,18	6,07	0,014
	Error		1237	0,03	

ferencia absoluta entre el porcentaje de flores en estado masculino y femenino fue similar para las dos especies en ambos tipos de inflorescencias (*S. sambucifolia*: inflorescencias pequeñas, [% flores masculinas - % femeninas] = $55,36 \pm 30,93$, n = 33; inflorescencias grandes, [% flores masculinas - % femeninas] = $57,60 \pm 27,25$, n = 17. *S. grandiflora*: inflorescencias pequeñas, [% flores masculinas - % femeninas] = $45,41 \pm 29,82$, n = 27; inflorescencias grandes, [% flores masculinas - % femeninas] = $47,18 \pm 22,94$, n = 21). Si se incluye todo el período de floración las diferencias absolutas en ambas especies tanto para inflorescencias pequeñas como grandes sigue un patrón similar (datos no mostrados).

Tabla 3. Diferencia absoluta entre el porcentaje de flores en estado masculino y femenino de 10 inflorescencias seleccionadas al azar para cada periodo fenológico.

Especie	Población	Año	Media	d.s.	N
<i>S. sambucifolia</i>	Morón	2009	58,45	32,58	97
		2010	46,63	31,37	60
	Gastor	2009	62,15	28,65	87
		2010	49,36	33,78	60
<i>S. grandiflora</i>	Rabaçal	2009	47,11	27,81	98
		2010	50,27	28,15	46
	Pombalinho	2009	51,3	30,60	122
		2010	55,92	29,26	53

N = Número de inflorescencias estudiadas.

VARIACIÓN ESPACIAL DE LA PRODUCCIÓN DE SEMILLAS EN LA INFLORESCENCIA

La figura 8 muestra la formación de semillas por fruto en función de su localización en la inflorescencia (Vi, Vm, Vs) tras polinización natural. Dicha variable no mostró diferencias significativas entre verticilos en ninguna de las dos especies (Tabla 4). Este

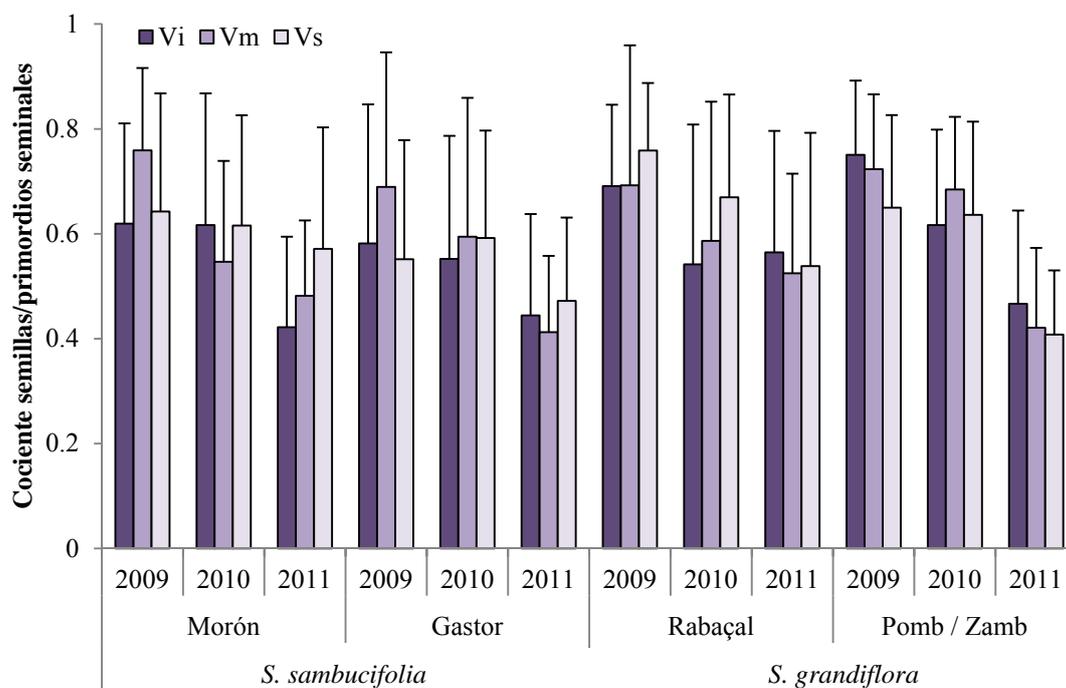


Figura 8. Formación de semillas por fruto (semillas/primordios seminales) en los diferentes verticilos de la inflorescencia en las dos especies estudiadas (media \pm d.s.). Vi: verticilo inferior; Vm: verticilo medio; Vs: verticilo superior. Pom = Pombalinho; Zam = Zambujal.

comportamiento se mantuvo para ambas poblaciones de cada especie por lo que no existieron diferencias significativas en la interacción población x verticilo, aunque sí las hubo en los valores de semillas producidas a lo largo de la inflorescencia en los diferentes años analizados (interacción año x verticilo) solo en *S. sambucifolia* (Tabla 4). Concretamente, estas diferencias para *S. sambucifolia* se produjeron en el año 2011 donde $Vs > Vi$ (Vm tuvo una producción intermedia entre Vs y Vi, no mostrando diferencias significativas con ellos) (post hoc HSD de Tukey).

En la figura 8 también se observa que *S. grandiflora* mostró en todos los verticilos una significativa mayor producción de semillas que *S. sambucifolia* ($F = 4,77$; g.l. = 1; $P = 0,029$) pero, en cualquier caso, el comportamiento de ambas especies respecto a los verticilos no mostró diferencias significativas ($F = 0,55$; g.l. = 2; $P = 0,576$).

Tabla 4. ANOVA de una vía para analizar el efecto de los verticilos (inferior, medio, superior), las poblaciones (*S. sambucifolia*: Morón, El Gastor; *S. grandiflora*: Rabaçal, Pombalinho/Zambujal) y los años (2009, 2010, 2011) y sus interacciones por pares sobre la variable dependiente (raíz cuadrada del número medio de semillas por fruto). La media cuadrática (MC) se basa en la suma de cuadrados de tipo III. Los resultados significativos se muestran en negrita.

Especie	Origen	g.l.	MC	F	Sig.
<i>S. sambucifolia</i>	Verticilo	2	0,03	1,56	0,211
	Población	1	0,10	4,84	0,028
	Año	2	0,51	24,45	0,000
	Población * Verticilo	2	0,01	0,53	0,591
	Año * Verticilo	4	0,06	2,70	0,030
	Año * Población	2	0,01	0,51	0,601
	Error	419	0,02		
	<i>S. grandiflora</i>	Verticilo	2	0,00	0,03
Población		1	0,01	0,67	0,413
Año		2	0,68	36,03	0,000
Población * Verticilo		2	0,04	1,89	0,152
Año * Verticilo		4	0,03	1,72	0,144
Año * Población		2	0,15	7,95	0,000
Error		405	0,02		

DISCUSIÓN

El papel de la dicogamia en la biología floral puede considerarse importante dado que la misma se encuentra generalizada dentro de las angiospermas, concretamente está representada en unas 144 familias, incluida la de las Scrophulariaceae (Bertin & Newman, 1993). Las dos especies aquí estudiadas, *Scrophularia sambucifolia* y *S. grandiflora*, poseen flores protóginas que evitan o dificultan la autofecundación, algo reflejado en nuestros resultados. Efectivamente, dicho mecanismo evita la autogamia en sentido estricto, ya que la fructificación de las flores sometidas a autopolinización espontánea fue nula o prácticamente nula (los pocos frutos producidos probablemente se debieron al roce accidental de los órganos sexuales con la bolsa de nylon que aislaba a las flores).

En general, en la mayoría de las especies de *Scrophularia* estudiadas hasta ahora la protoginia se ha manifestado como un buen mecanismo frente a la autofecundación, tanto en especies ibéricas o marroquíes (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993c, 1998) como en muchas macaronésicas (Dalgaard, 1979) y norteamericanas (Shaw, 1962). Refiriéndose a las especies macaronésicas Dalgaard (1979) indicaba dos posibles razones: (1) en la mayoría de las especies el estilo excede ampliamente en longitud a los estambres, por lo que el polen no contacta con el estigma (se trataría, en realidad, de una

hercogamia); (2) los estilos se hacen más o menos reflejos tan pronto como el primer estambre se eleva desde el fondo de la corola. En relación con el primer punto, debe indicarse que nuestras dos especies se comportan de manera desigual, ya que en *S. sambucifolia* ocurre como en las especies macaronésicas mientras que en *S. grandiflora* tal relación de longitud varía intrapoblacionalmente e incluso dentro de un mismo individuo, es decir, lo normal es que el estilo supere en longitud a los estambres, pero a veces los estigmas y anteras se sitúan al mismo nivel (observ. pers.). Respecto al segundo punto, lo general es que el estilo inicie su curvatura sobre el labio inferior de la corola cuando se eleva el primer estambre siempre que el estigma haya sido polinizado y este en poco tiempo se marchita. Por el contrario, en otras especies, como *S. peregrina*, *S. arguta* o *S. nodosa* (Shaw, 1962; Dalgaard, 1979; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993c) la protogonia no es completamente efectiva pues el estilo no siempre se curva hacia abajo lo que conlleva a que los estigmas se sitúen al mismo nivel que las anteras abiertas, promoviendo la autofecundación.

Además, la nula o escasa producción de frutos tras ApE claramente indica la importancia que juegan los polinizadores en la reproducción sexual, en nuestro caso, a través de un sistema combinado entre himenópteros y aves paseriformes (Ortega-Olivencia & al., 2012), en su mayoría buscando en las flores la principal recompensa (el néctar).

Los resultados del test de PGM demostraron que ambas especies son AC, con niveles variables entre años, poblaciones y especies, algo por lo general común en muchas especies (Charlesworth & Yang, 1998; Busch, 2005); en algunos casos se alcanzaron porcentajes de fructificación en torno al 50 %, sobre todo, en *S. grandiflora*. Esta última mostró valores significativamente mayores que *S. sambucifolia*. La AC está bastante extendida en el género (Shaw, 1962; Dalgaard, 1979; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993c) pues hasta ahora sólo se conoce un caso de AI (v.g. *S. fontqueri*, Ortega-Olivencia & Devesa, 1998). Precisamente la existencia de AC es la que favorecería el desarrollo de la geitonogamia al existir numerosas flores abiertas en estado sexual femenino y masculino a lo largo de la inflorescencia (protoginia asincrónica) y al hecho de que como norma la mayoría de las plantas poseen varias inflorescencias maduras/individuo al mismo tiempo. Por tanto, si bien la protoginia intrafloral es un excelente mecanismo que dificulta la autofecundación, la existencia de dicogamia asincrónica no evitará la geitonogamia, algo esto último ya puesto de

manifiesto en otras especies del género (Dalgaard, 1979; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993c).

Pero realmente, ¿cuál es el potencial de geitonogamia en las dos especies estudiadas? El seguimiento del porcentaje de flores femeninas respecto al de masculinas a lo largo del período de floración y para cada una de las poblaciones de ambas especies mostraron valores intermedios entre la inexistencia de geitonogamia (geitonogamia impedida: todas las flores de la inflorescencia están en un solo estado sexual) y la geitonogamia total (la mitad de las flores estarían en un estado sexual y la otra mitad en el otro). Esta situación intermedia podría deberse a varios factores, como por ejemplo, a la diferente longevidad de ambos estadios sexuales, ya que el masculino dura como media c. 4 veces más que el femenino (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b); ello se traduce en una mayor proporción de flores en estado masculino a lo largo de la inflorescencia. Por este mismo motivo y dada la proteroginia floral de esas especies la probabilidad de geitonogamia disminuye con la edad de la inflorescencia ya que conlleva un aumento en la diferencia entre flores en estado masculino y femenino a medida que avanza el periodo de floración: cuando las plantas son más maduras o viejas las últimas flores presentes en las inflorescencias se suelen encontrar en estado masculino. En *S. fontqueri*, Ortega-Olivencia & Devesa (1998) indicaron que la probabilidad de geitonogamia era alta aunque sin posibilidad de éxito al ser una planta AI. En nuestro caso, a los efectos negativos de la geitonogamia (equivalente genéticamente a una autogamia) se une la limitación del potencial reproductivo de las plantas debido al abarrotamiento (clogging) del estigma con polen propio y al desperdicio de polen que ya no se empleará en la fecundación cruzada (xenogamia) (Bawa & Opler, 1975; Rathcke, 1983; Shore & Barrett, 1984).

Los efectos negativos de la geitonogamia suelen ser más acentuados cuanto más grandes son las inflorescencias (Robertson, 1992; Karron & Mitchell, 2012), pero en nuestro caso el tamaño de la inflorescencia no fue un factor importante al no variar el potencial de geitonogamia entre inflorescencias pequeñas y grandes en ambas especies.

Tampoco hay que olvidar que en los niveles de geitonogamia también influyen el número de visitas (Robertson, 1992) y el comportamiento de los polinizadores al visitar las inflorescencias (Devaux & al., 2014). Estudios previos en ambas especies señalaban que los insectos polinizadores presentaban una mayor frecuencia de movimientos horizontales por inflorescencia (entre flores de una misma cima) frente a

los verticales (entre flores de diferentes cimas) y en estos últimos la mayoría ocurrían hacia arriba (Valtueña & al., 2013). Se indicó que la mayor frecuencia de movimientos horizontales podría relacionarse con la escasa distancia que hay entre las flores de la misma cima debido a los cortos pedicelos que poseen, por lo que en muchas ocasiones, más que volar entre flores los insectos suelen andar a lo largo de la cima. También la gran cantidad de néctar/flor/día (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b; Rodríguez-Riaño & al., 2014) explicaría que hubiera menor número de desplazamientos verticales ya que los polinizadores se saciarían visitando sólo unas pocas cimas para obtener los máximos recursos. Además, la probabilidad de visita es la misma en todas las flores abiertas de la inflorescencia al no existir sesgo sexual (ambas fases sexuales, femenina y masculina, producen similares volúmenes de néctar/día; Rodríguez-Riaño & al., 2014). Por tanto, en nuestras especies existe un dilema reproductivo (Klinkhamer & de Jong, 1993): las características implicadas en aumentar la atracción de los polinizadores (elevado número de flores nectaríferas, grandes y llamativas) también conllevan numerosas secuencias de visitas. Esto incrementa el nivel de geitonogamia en detrimento de la xenogamia al reducir la fracción de polen exportable a otros individuos.

Las especies estudiadas podrían caracterizarse como xenógamas facultativas dada la práctica ausencia de fructificación tras ApE, los niveles medios de fructificación tras geitonogamia manual y los altos valores alcanzados tras polinización natural, algo que ya había sido inferido mediante el cálculo del cociente P/O (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993c). Otras especies igualmente xenógamas facultativas y dicógamas presentaron un comportamiento diferente a las nuestras en cuanto a la autopolinización espontánea. Así, en la protógina *Sanguinaria canadensis* (Lyon, 1992) o las protandras *Salvia verbenaca* (Navarro, 1997, 1998) y *Chameiron angustifolium* (Routley & Husband, 2003) sí hubo un buen porcentaje de fructificación tras dicha autopolinización, lo que significa que poseen tasas de autogamia mayores que las nuestras, al tiempo que una mayor imperfección de su mecanismo de dicogamia.

Respecto a la baja formación de semillas/fruto en los controles, que rara vez supera el 60 % (media de c. 52,25 % en *S. sambucifolia* y de c. 55,25 % en *S. grandiflora*), los valores son intermedios entre los indicados para las plantas perennes autógamas ($62,1 \pm 16,7$) y los de las perennes alógamas ($49,1 \pm 20,3$) (Wiens, 1984). Aunque Wiens (1984) explicó que el cociente semillas/primordios seminales era independiente del tipo de reproducción, la tendencia es que en plantas xenógamas haya

mayores niveles de aborto que en las autógamias. Además, en las angiospermas es general que sólo cierta fracción de los primordios seminales se transformen en semillas (Bawa & Buckley, 1989), lo que puede ser achacable a múltiples causas (Stephenson, 1981; Wiens, 1984; Lee, 1988; Charlesworth, 1989; Wilcock & Neiland, 2002), una de las cuales, la consanguinidad a causa de un sistema de reproducción mixto donde la geitonogamia juega un gran papel, podría incrementar la proporción de genotipos homocigotos respecto al de heterocigotos.

El menor porcentaje de fructificación y de formación de semillas tras geitonogamia manual en comparación con los controles probablemente no se deba a una limitación de polen o de polinizadores porque si bien los insectos polinizadores bajo ciertas condiciones meteorológicas excepcionales del período de floración considerado (lluvia, viento o temperaturas frías) no actúan o lo hacen con menor intensidad, no ocurre lo mismo con las aves paseriformes que no están tan condicionados por dichos factores (Ortega-Olivencia & al., 2005). Más bien, la causa sería la identidad del polen (polen propio) causante de la consanguinidad. Algunos autores señalan que el desarrollo de estrategias de selfing (autofecundación + geitonogamia) en especies con flores hermafroditas constituye una garantía reproductiva siempre que ocurra de forma retrasada, dejando pasar un tiempo suficiente para dar oportunidad a la visita de los polinizadores y, por ende, a la polinización cruzada (Goodwillie & al., 2005). Ello ocurre en *Passiflora edulis*, que siendo AI en su hábitat nativo se comporta como AC en hábitats no nativos al estar la polinización limitada por la ausencia de polinizadores (Shivanna, 2012). En *Collinsia verna* (Kalisz & Vogler, 2003; Kalisz & al., 2004) o *Butea monosperma* (Tandon & al., 2003) una débil AI proporciona una flexibilidad hacia la autogamia y geitonogamia, que resulta útil cuando no se puede garantizar la xenogamia por la propia imprevisibilidad de los polinizadores. Evolutivamente parecen ser más frecuentes los casos donde el sistema de reproducción AI se ha perdido o transformado hacia el AC que viceversa (Routley & al., 2004; Barrett, 2013).

El significativamente mayor porcentaje de frutos en *S. sambucifolia* durante 2011, con independencia del tratamiento y la población, podría deberse a las diferentes condiciones meteorológicas habidas respecto a 2010 durante los meses de floración (abril a junio). 2010 presentó un menor volumen de precipitación que 2011 en las dos poblaciones (55 y 62,2 mm en Morón y El Gator, respectivamente vs 245,6 y 165,6 mm acumulados, respectivamente). Esto unido a un aumento en la temperatura media al

finalizar el periodo de floración del 2010 pudo propiciar la pérdida de muchos de los frutos ya iniciados, lo que pondría de manifiesto la plasticidad fenotípica de la especie para dar repuesta a variaciones climáticas menores (Ramos & Santos, 2005).

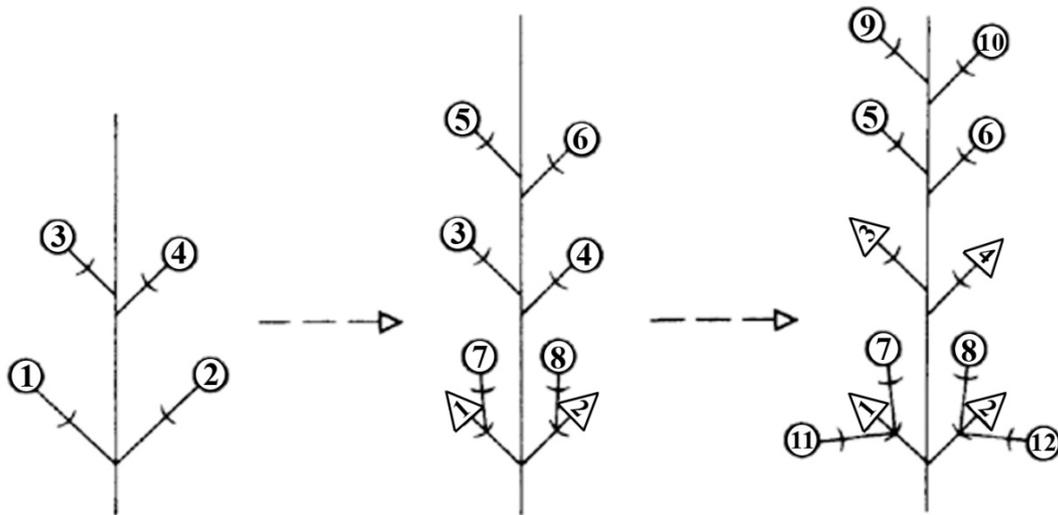


Figura 9. Secuencia de maduración floral, representada con números, en una inflorescencia típica de *Scrophularia*. Los círculos simbolizan flores y los triángulos frutos. Imagen extraída de Ortega-Olivencia & Devesa (1993b).

Finalmente, en relación a la formación de semillas en los frutos en función de su distribución en la inflorescencia, la similar producción entre los distintos verticilos podría deberse a la arquitectura de la misma, algo ya indicado en otras especies (v.g. *Lupinus luteus*, Lee, 1988 y referencias). Como puede observarse en la figura 9 el patrón de floración presenta un orden de apertura floral acrópeto pero, al no tratarse de racimos simples de flores sino de racimos de dicasios, siempre van naciendo flores nuevas en los distintos verticilos (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b). Sin embargo, las diferencias marginales obtenidas atendiendo a los años en el caso de *S. sambucifolia*, con una producción significativamente mayor en los verticilos superiores respecto a los inferiores durante el año 2011, podrían deberse también a las diferentes condiciones ambientales habidas a lo largo de dichos periodos de floración unido al propio entorno estocástico de la polinización (Knight & al., 2005) de cada año, así como a un desigual reparto de recursos. La menor producción de semillas a lo largo de la inflorescencia en *S. sambucifolia* respecto a *S. grandiflora*, a favor de un equilibrio entre verticilos, probablemente esté influida por la hercogamia variable indicada anteriormente y corroborada por las diferencias encontradas entre especies x tratamientos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arroyo M.T.K.** (1981) Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. *In*: Polhill R.M. & P.H. Raven (Eds.) *Advances in legume systematics*, pp. 723-769. Royal Botanic Garden, Kew, London.
- Barrett S.C.H.** (2003) Mating strategies in flowering plants: the outcrossing–selfing paradigm and beyond. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 358: 991-1004.
- Barrett S.C.H.** (2013) The evolution of plant reproductive systems: How often are transitions irreversible? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280, doi:1098/rspb.2013.0913.
- Bawa K.S. & Buckley D.P.** (1989) Seed: ovule ratios, selective seed abortion, and mating systems in Leguminosae. *In*: Stirton C.H. & J.L. Zarucchi (Eds.) *Advances in legume biology. Monographs in Systematics Botany from the Missouri Botanical Garden* 29: 243-262.
- Bawa K.S. & P.A. Opler** (1975) Dioecism in tropical forest trees. *Evolution* 29: 167-179.
- Bertin R.I. & C.M. Newman** (1993) Dichogamy in angiosperms. *The Botanical Review* 59: 112-152.
- Burd M.** (1994) Bateman's principle and plant reproduction: the role of pollen limitation in fruit and seed set. *The Botanical Review* 60: 83-139.
- Busch J.W.** (2005) The evolution of self-compatibility in geographically peripheral populations of *Leavenworthia alabamica* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 92: 1503-1512.
- Charlesworth D.** (1989) Why do plants produce so many more ovules than seeds? *Nature* 338: 21-22.
- Charlesworth D. & Z. Yang** (1998) Allozyme diversity in *Leavenworthia* populations with different inbreeding levels. *Heredity* 81: 453-461.
- Cruden R.W.** (1977) Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.
- Dalgaard V.** (1979) Biosystematics of the Macaronesian species of *Scrophularia*. *Opera Botanica* 51: 1-64.
- Devaux C., C. Lepers & E. Porcher** (2014) Constraints imposed by pollinator behavior on the ecology and evolution of plant mating systems. *Journal of Evolutionary Biology*, doi: 10.1111/jeb.12380.
- Diggle P.K.** (1995) Architectural effects and the interpretation of patterns of fruit and seed development. *Annual Review of Ecology and Systematics* 26: 531-552.
- Diggle P.K.** (1997) Ontogenetic contingency and floral morphology: the effects of architecture and resource limitation. *International Journal of Plant Sciences* 158: S99-S107.
- Faegri K. & L. van der Pijl** (1979) *The principles of pollination ecology*. Pergamon Press, Oxford.
- Goodwillie C., S. Kalisz & C.G. Eckert** (2005) The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical explanations, and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36: 47-79.
- Griffin S.R., K. Mavraganis & C.G. Eckert** (2000) Experimental analysis of protogyny in *Aquilegia canadensis* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany* 87: 1246-1256.

- Harder L.D., C.Y. Jordan, W.E. Gross & M.B. Routley** (2004) Beyond floriceentrism: the pollination function of inflorescences. *Plant Species Biology* 19: 137-148.
- Harder L.D. & Prusinkiewicz P.** (2013) The interplay between inflorescence development and function as the crucible of architectural diversity. *Annals of Botany* 112: 1477-1493.
- Hoffmann F. & M.M. Kwak** (2005) The vulnerability to pollinator species loss of plant species with various pollination syndromes and degrees of specialisation. In: Hoffmann F. (Ed.) *Biodiversity and pollination*, pp. 93-116. University of Groningen. Haren.
- Igic B., R. Lande & J.R. Kohn** (2008) Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences. *International Journal of Plant Science* 169: 93-104.
- Kalisz S. & D.W. Vogler** (2003) Benefits of autonomous selfing under unpredictable pollinator environments. *Ecology* 84: 2928-2942.
- Kalisz S., D.W. Vogler & K.M. Hanley** (2004) Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. *Nature* 430: 884-887.
- Karron J.D. & R.J. Mitchell** (2012) Effects of floral display size on male and female reproductive success in *Mimulus ringens*. *Annals of Botany* 109: 563-570.
- Klinkhamer P.G. & T.J. de Jong** (1993) Attractiveness to pollinators: a plant's dilemma. *Oikos* 66: 180-184.
- Knight T.M., J.A. Steets, J.C. Vamosi, S.J. Mazer, M. Burd, D.R. Campbell, M.R. Dudash, M.O. Johnston, R.J. Mitchell & T.L. Ashman** (2005) Pollen limitation of plant reproduction: pattern and process. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 36: 467-497.
- Koniuszek J.W.J., W.B. Bast-Cramer, R.A. Geerlings & J.A.C. Verkleij** (1986) Estimation of selfing rate in a natural population of *Scrophularia nodosa* L. using allozymes. *Acta Botanica Neerlandica* 35: 393-403.
- Lee T.D.** (1988) Patterns of fruit and seed production. In: Lovett J. & L. Lovett (Eds.) *Plant reproductive ecology, patterns and strategies*, pp. 179-202. Oxford University Press. New York.
- Lloyd D.G. & D.J. Schoen** (1992) Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences* 153: 358-369.
- Lyon D.L.** (1992) Bee pollination of facultatively xenogamous *Sanguinaria canadensis* L. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 119: 368-375.
- Morales C.L. & L. Galetto** (2003) Influence of compatibility system and life form on plant reproductive success. *Plant Biology* 5: 1-7.
- Müller H.** (1883) *The fertilization of flowers*. Macmillan and Co. London.
- Navarro L.** (1997) Is the dichogamy of *Salvia verbenaca* (Lamiaceae) an effective barrier to self-fertilization? *Plant Systematics and Evolution* 207: 111-117.
- Navarro L.** (1998) Effect of pollen limitation, additional nutrients, flower position and flowering phenology on fruit and seed production in *Salvia verbenaca* (Lamiaceae). *Nordic Journal of Botany* 18: 441-446.
- Navarro-Pérez M.L., J. López, M. Fernández-Mazuecos, T. Rodríguez-Riaño, P. Vargas & A. Ortega-Olivencia** (2013) The role of birds and insects in pollination shifts of *Scrophularia* (Scrophulariaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 239-254.
- Ortega-Olivencia A.** (2009) *Scrophularia* L. In: Benedí C., E. Rico, J. Güemes & A. Herrero (Eds.) *Flora iberica* 13: 97-122. Real Jardín Botánico de Madrid. CSIC. Madrid.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993a) Revisión del género *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae) en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Ruizia* 11: 1-157.

Monografías del Jardín Botánico de Madrid. CSIC. Madrid.

- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993b) Floral rewards in some *Scrophularia* species (Scrophulariaceae) from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *Plant Systematics and Evolution* 184: 139-158.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993c) Sexual reproduction in some *Scrophularia* species (Scrophulariaceae) from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *Plant Systematics and Evolution* 184: 159-174.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1998) Taxonomy and breeding system in a new species of *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae) from Morocco. *Botanical Journal of the Linnean Society* 128: 185-202.
- Ortega-Olivencia A., T. Rodríguez-Riaño, J.L. Pérez-Bote, J. López, C. Mayo, F.J. Valtueña & M.L. Navarro-Pérez** (2012) Insects, birds and lizards as pollinators of the largest-flowered *Scrophularia* of Europe and Macaronesia. *Annals of Botany* 109: 153-167.
- Ortega-Olivencia A., T. Rodríguez-Riaño, F.J. Valtueña, J. López & J.A. Devesa** (2005) First confirmation of a native bird-pollinated plant in Europe. *Oikos* 110: 578-590.
- Pacini E. & G.G. Franchi** (1984) Reproduction in Mediterranean plants. *Webbia* 38: 93-103.
- Ramos F.N. & F.A.M. Santos** (2005) Phenology of *Psychotria tenuinervis* (Rubiaceae) in Atlantic forest fragments: fragment and habitat scales. *Canadian Journal of Botany* 83: 1305-1316.
- Rathcke B.** (1983) Competition and facilitation among plants for pollination. In: Real L. (Ed.) *Pollination Biology*, pp. 305-329. Academic Press. Orlando.
- Reina J.** (2005) Caracterización de una explotación de cabras en extensivo en el sur de Sevilla. *Investigación y Educación* 2: 6.
- Rivas Martínez S.** (1988) Bioclimatología, biogeografía y series de vegetación de Andalucía Occidental. *Lagascalia* 15 (extra): 91-119.
- Rivas Martínez S.** (2000) *Bioclimatic map of Europe. Bioclimates*. Cartographic Service, University of León. León.
- Rivas Martínez S.** (2008) *Global Bioclimatics* (Clasificación Bioclimática de la Tierra). <http://www.globalbioclimatics.org>.
- Rivas Martínez S., A. Penas & T.E. Díaz** (2004) *Bioclimatic map of Europe. Termoclimatic belts*. Cartographic Service, University of León. León.
- Robertson A.W.** (1992) The relation between floral display size, pollen carryover and geitonogamy in *Myosotis colensoi* (Kirk) Macbride (Boraginaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 46: 333-349.
- Rodríguez-Riaño T., A. Ortega-Olivencia, J. López, J.L. Pérez-Bote & M.L. Navarro-Pérez** (2014) Main sugar composition of floral nectar in three species groups of *Scrophularia* (Scrophulariaceae) with different principal pollinators. *Plant Biology*, doi:10.1111/plb.12159.
- Routley M.B., R.I. Bertin & B.C. Husband** (2004) Correlated evolution of dichogamy and self-incompatibility: a phylogenetic perspective. *International Journal of Plant Sciences* 165: 983-993.
- Routley M.B. & B.C. Husband** (2003) The effect of protandry on siring success in *Chamerion angustifolium* (Onagraceae) with different inflorescence sizes. *Evolution* 57: 240-248.
- Routley M. & B. Husband** (2006) Sexual interference within flowers of *Chamerion angustifolium*. *Evolutionary Ecology* 20: 331-343.

- Rymer P.D., E.C. Morris & B.J. Richardson** (2002) Breeding system and population genetics of the vulnerable plant *Dillwynia tenuifolia* (Fabaceae). *Austral Ecology* 27: 241-248.
- Shaw J.** (1962) The biosystematics of *Scrophularia* in western north America. *Aliso* 5: 147-178.
- Shivanna K.** (2012) Reproductive assurance through unusual autogamy in the absence of pollinators in *Passiflora edulis* (passion fruit). *Current Science* 103: 1091-1096.
- Shore J.S. & S.C.H. Barrett** (1984) The effect of pollination intensity and incompatible pollen on seed set in *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *Canadian Journal of Botany* 62: 1298-1303.
- Sprengel K.C.** (1793) *Das entdeckte Geheimnis der Natur in Bau und in der Befruchtung der Blumen*. Lehre: Cramer. Berlin.
- Stebbins G.L.** (1974) *Flowering plants. Evolution above the species level*. Belknap Press. Cambridge.
- Stephenson A.G.** (1981) Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 12: 253-279.
- Stiefelhagen H.** (1910) Systematische und pflanzengeographische Studien zur Kenntnis der Gattung *Scrophularia*. Vorarbeiten zu einer Monographie. *Botanische Jahrbuecher fuer Systematik* 44: 406-496.
- Tandon R., K. Shivanna & H.M. Ram** (2003) Reproductive biology of *Butea monosperma* (Fabaceae). *Annals of Botany* 92: 715-723.
- Valtueña F.J., A. Ortega-Olivencia, T. Rodríguez-Riaño & J. López** (2008) Reproductive biology in *Anagyris foetida* L. (Leguminosae), an autumn-winter flowering and ornithophilous Mediterranean shrub. *Botanical Journal of the Linnean Society* 157: 519-532.
- Valtueña F.J., A. Ortega-Olivencia, T. Rodríguez-Riaño, J.L. Pérez-Bote & C. Mayo** (2013) Behaviour of pollinator insects within inflorescences of *Scrophularia* species from Iberian Peninsula. *Plant Biology* 15: 328-334.
- Webb C.J. & J.E. Shand** (1985) Reproductive biology of tree lucerne (*Chamaecytisus palmensis*, Leguminosae). *New Zealand Journal of Botany* 23: 597-606.
- Wiens D.** (1984) Ovule survivorship, brood size, life history, breeding systems, and reproductive success in plants. *Oecologia* 64: 47-53.
- Wilcock C. & R. Neiland** (2002) Pollination failure in plants: why it happens and when it matters. *Trends in Plant Science* 7: 270-277.

Capítulo 3

Sistema de polinización y reproducción en poblaciones sardas de *Scrophularia trifoliata*

RESUMEN

Se ha realizado un estudio de los sistemas de polinización y reproducción en dos poblaciones sardas de *Scrophularia trifoliata* (Scrophulariaceae), una hierba perenne, de flores proteróginas vivamente coloreadas, endémica de las islas de Cerdeña, Córcega y Gorgona. En este trabajo se han llevado a cabo experimentos encaminados a desentrañar el papel que tienen como guías de néctar las máculas que aparecen en el interior de la corola, a la vez que se ha analizado la naturaleza de las mismas. Para este aspecto se concluye que dichas máculas no parecen estar diseñadas o dirigidas hacia la atracción de los insectos y que su histología no revela ninguna diferencia con respecto al resto de la corola. En relación a la polinización se corrobora la existencia de un sistema mixto en el que participan insectos (avispa y abejorro) y aves paseriformes (*Sylvia atricapilla*). De ellos, los principales son las avispa y las aves, con una importancia desigual en las poblaciones estudiadas, descartándose en las mismas la polinización por reptiles, a diferencia de lo que sucede en su homóloga macaronésica *S. calliantha*. Los polinizadores realizaban similar proporción de movimientos horizontales (entre flores de un mismo verticilo) y verticales (a lo largo de la inflorescencia), siendo estos mayoritariamente ascendentes. En cuanto al sistema de reproducción, los resultados ponen de manifiesto que esta especie es autocompatible, con una alta eficacia de la proteroginia a nivel intrafloral que evita la autofecundación pero no la geitonogamia al existir numerosas flores abiertas en ambos estados sexuales a lo largo de la inflorescencia. La imposibilidad de autofecundación en *S. trifoliata* implica su dependencia de los polinizadores para que la reproducción sexual sea exitosa. La producción de semillas por fruto es similar en todos los verticilos de la inflorescencia, lo que podría deberse a la arquitectura de esta con un patrón de floración acrópeto de sus racimos de dicasios.

ABSTRACT

A study of pollination and breeding systems in two Sardinian populations of *Scrophularia trifoliata* has been performed. It is a perennial herb with showy and protogynous flowers, endemic to the islands of Sardinia, Corsica and Gorgona. In this study, experiments conducted to unravel the role that spots inside corolla have as nectar guides have been carried out, and also its nature. For this aspect it is concluded that these spots do not seem to be designed or directed toward insect attraction and their histology reveals no difference from the rest of the corolla. Regarding pollination it is corroborated the existence of a mixed system that involves insects (wasps and bumblebees) and passerines (*Sylvia atricapilla*). Of these, the most important are the wasps and birds, with unequal importance in the studied populations; in the same way, pollination by lizards is discarded in this plant, unlike what happens in its Macaronesian

homologous *S. calliantha*. Pollinators developed similar proportion of horizontal (between flowers of the same whorl) and vertical (along the inflorescence) movements, being last mostly upward. Concerning the breeding system, the results show that this species is self-compatible, with high efficiency of intrafloral protogyny that prevents autogamy but not geitonogamy due to exist numerous open flowers in both sexual states at the same time along the inflorescence. The inability of self-fertilization in *S. trifoliata* implies its reliance on pollinators for a successful sexual reproduction. The seed production per fruit is similar in all inflorescence whorls, which could be due to the architecture of this with an acropetal pattern of flowering of their racemes of dichasia.

INTRODUCCIÓN

La polinización biótica es en gran medida la causante de la enorme diversidad de flores que existen en angiospermas (Ollerton & al., 2011). Excluyendo factores ambientales adversos que pueden disminuir o impedir el movimiento de diferentes polinizadores (Pacini & Franchi, 1984), la zoofilia sólo puede tener éxito cuando un polinizador es alertado por la presencia de las flores y este las visita durante suficiente tiempo y de forma regular. Para los polinizadores las características florales como el tamaño, forma, color u olor suelen actuar como indicadores de la calidad o cantidad de las recompensas que las flores les ofrecen (véase Guzmán & al., 2011 y referencias) con lo que la planta desarrolla diferentes estrategias de atracción para asegurar una regularidad en sus visitas.

Es conocido que muchas plantas nectaríferas presentan flores con marcas, manchas o líneas que actúan como guías para los polinizadores, dirigiéndolos hacia el néctar (Sprengel, 1793), lo que contribuye a potenciar el éxito reproductivo de las mismas. De igual forma, en el caso de flores no nectaríferas también se ha documentado la presencia de marcas de polen (Barth, 1991) que dirigen de manera adecuada al polinizador hacia la recompensa, en este caso, el polen. Se sabe que al facilitar el acceso a la recompensa por parte del polinizador este aumenta la persistencia de sus visitas a las flores, incluso cuando estas ya no producen recompensas (Leonard & Papaj, 2011). De igual manera, también se ha indicado que se suele reducir el tiempo de manejo de la flor, lo que puede aumentar el éxito reproductivo de la planta al ampliar el rango de polinizadores potenciales y minimizar la cantidad de polen vertido por estos en la búsqueda de la recompensa, con lo que sus visitas son más eficaces (Leonard & Papaj,

2011).

El presente capítulo parte de la necesidad de ampliar el conocimiento sobre la biología floral, sistema de polinización y sistema de reproducción de *Scrophularia trifoliata*, cuyo estudio, iniciado en el trabajo de Ortega-Olivencia & al. (2012) no pudo ser ampliamente abordado por las condiciones meteorológicas adversas (frío, viento, lluvia, niebla) habidas durante la semana en la que se realizó. Salvo los resultados parciales de dicho estudio, no se tienen datos de ningún tipo sobre la biología floral y reproductiva de la especie, a pesar de ser un importante endemismo insular del C de la región Mediterránea (Peruzzi & al., 2014). En relación con la biología floral, nuestras observaciones previas indicaban la presencia de dos grandes máculas (hasta 7 x 6 mm) en la mitad inferior de la parte interna del tubo de la corola, justo debajo del estaminodio y en la zona donde se acumula el néctar (Fig. 1). Estas manchas, más o menos oscuras (rojizas o rojizo-purpúreas, rodeadas de una ancha banda negruzca) (Ortega-Olivencia & al., 2012), solo aparecen en esta especie de *Scrophularia* (Ortega-Olivencia, obser. pers.) y hasta donde sabemos no existe referencia alguna a ellas en la bibliografía científica relacionada con *S. trifoliata*. De hecho, ni en la descripción de la especie (Linnaeus, 1759) ni en revisiones posteriores del género en las que se incluye (véase Stiefelhagen, 1910; Fiori, 1969; Richardson, 1972; Valsecchi, 1979, 1982; Pignatti, 1982, entre otros) se refleja este carácter tan llamativo de sus flores.

En general, para el género *Scrophularia* los polinizadores más frecuentes son insectos y, en particular, avispas (Schremmer, 1959; Faegri and van der Pijl, 1979; de Vos, 1983; Hoffmann & Kwak, 2005, entre otros). Recientemente y de forma experimental Ortega-Olivencia & al. (2012) han demostrado que no solo avispas sino también abejas y abejorros han de ser considerados como polinizadores principales en dicho género. En el caso concreto de especies con flores grandes y llamativas, incluida *S. trifoliata*, se reconoce un sistema de polinización mixto en el que, además de los insectos, también están implicadas aves paseriformes, e incluso lagartos en una de ellas (*S. calliantha*). Se piensa que dicho sistema mixto de polinización entre vertebrados e insectos (MVI) tiene su origen en el sistema de polinización por avispas, estando presente en la actualidad en cuatro especies, concretamente tres europeas (*S. sambucifolia*, *S. grandiflora* y la ya mencionada, *S. trifoliata*) y una macaronésica (*S. calliantha*) (Navarro-Pérez & al., 2013).

En los sistemas complejos de polinización como el MVI indicado anteriormente,



Figura 1. Aspecto de las máculas presentes en el interior de la corola de *S. trifoliata*.

la combinación del comportamiento y características de dos grupos de polinizadores tan diferentes puede resultar altamente exitoso para las especies que lo presentan. Por ejemplo, las aves son animales homeostáticos que necesitan continuos suplementos de alimento para mantener su alta tasa metabólica y, por ello, son capaces de visitar las flores en condiciones de bajas temperaturas bajo las cuales los insectos no podrían volar (Ortega-Olivencia & al., 2005). De esta forma, se puede garantizar la reproducción bajo un rango de condiciones ambientales

más amplio que si solo se cuenta con insectos como polinizadores.

Un mecanismo floral ampliamente implantado en el género es la proteroginia, un tipo de dicogamia en el que los órganos femeninos maduran antes que los masculinos, siendo la función masculina más longeva y que presenta en este género una maduración secuencial de los estambres (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a). Así, las flores se comportan como funcionalmente unisexuales, favoreciendo la polinización cruzada en la mayoría de las especies estudiadas de *Scrophularia* (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b). Sin embargo, la autocompatibilidad (AC) demostrada en muchas especies del género (Shaw, 1962; Dalgaard, 1979; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b; Hoffmann & Kwak, 2005), las hace vulnerables ante la geitonogamia, ya que la dicogamia asincrónica presente en muchas de ellas provoca que tanto las flores en estado femenino como aquellas en estado masculino sean susceptibles de ser visitadas por sus polinizadores en un solo vuelo (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a), posibilitando así dicho sistema de reproducción.

No obstante, la dicogamia debería estudiarse en el contexto de la inflorescencia (Harder & al., 2004; Harder & Prusinkiewicz, 2013), cuya arquitectura y el comportamiento de los polinizadores en sus visitas a la misma son definitivos en los resultados que de dicha estrategia se obtenga en los sistemas de reproducción. Por ejemplo, en las especies que exhiben un gran número de flores abiertas por

inflorescencia al mismo tiempo la dicogamia no resulta totalmente efectiva si existe una sincronización entre la maduración de la fase femenina y la masculina de la flor. Lo anterior, además, coloca a la planta ante un dilema reproductivo: numerosas flores susceptibles de ser visitadas a cambio de aumentar los niveles de geitonogamia (Klinkhamer & de Jong, 1993; Harder & Prusinkiewicz, 2013).

Enlazando con lo anterior, en las especies de flores hermafroditas, como es el caso de *S. trifoliata*, la polinización biótica puede producir una pérdida de potencial reproductivo, ya que los polinizadores podrían depositar polen propio sobre los estigmas de las flores de un individuo, impidiendo así la llegada del de otras plantas conspecíficas y el desperdicio de dicho polen que no se emplearía en la fecundación cruzada (Bawa & Opler, 1975; Rathcke, 1983; Shore & Barrett, 1984). El resultado de estas interferencias propiciaría la autogamia o geitonogamia con los efectos negativos que ambos fenómenos conllevan, como la depresión endogámica (Barrett, 2002).

Con dichos antecedentes, los objetivos específicos que se persiguen en este capítulo son los siguientes:

1. Analizar los grupos principales de polinizadores de *S. trifoliata* y su comportamiento con un amplio período de censos.
2. Investigar el papel y naturaleza de las dos grandes máculas presentes en la mitad inferior del interior del tubo de la corola, justo en la zona donde se almacena el néctar. Se espera que estas manchas corolinas actúen como guías para los polinizadores, dirigiéndolos hacia el néctar floral y contribuyendo a potenciar el éxito reproductivo de la especie.
3. Conocer la importancia de la proteroginia como estrategia para evitar la autofecundación en la especie.
4. Evaluar la importancia de los polinizadores en la reproducción de *S. trifoliata*, averiguando si se tipifica como autocompatible o autoincompatible.
5. Examinar si existen diferencias en la producción de semillas por fruto entre los verticilos de la inflorescencia (inferiores, medios y superiores).

MATERIAL Y MÉTODOS

ESPECIE ESTUDIADA

Scrophularia trifoliata es una hierba erecta de 1 a 2 m, perenne, rizomatosa y glabra, de tallo robusto, fistuloso y ramificado. Las hojas, lirado-pinnatisectas, poseen 3-5 segmentos crenulados. Las flores se disponen en cimas densas y bracteadas, con bractéolas iguales o más cortas que los pedicelos. El cáliz, de 3 a 6 mm, posee lóbulos redondeados u oval-lanceolados, de margen estrechamente escarioso, con glándulas negruzcas dispersas. La corola, de 15 a 20 mm, bilabiada, posee 5 lóbulos subiguales, redondeados, y es de color amarillo-verdosa o rojiza, presentando en su cara externa un gran número de glándulas negruzcas. El androceo lo forman cuatro estambres fértiles y un estaminodio reniforme o casi, con una callosidad en la base de la corola. Las cápsulas, de 12 a 15 mm, ovoideo-cónicas, son largamente acuminadas y albergan semillas marrones de 1-1,5 mm, oblongas, con superficie crestado-alveolada (Fig. 2) (Valsecchi, 1979, 1982).



Figura 2. Caracteres vegetativos y florales de *S. trifoliata*. Icono extraído de Valsecchi (1979).

Algunos de los caracteres florales exhibidos por *S. trifoliata* (flores de gran tamaño, vistosamente coloreadas y con gran producción de néctar) (Valsecchi, 1979, 1982; Ortega-Olivencia & al., 2012; Rodríguez-Riaño & al., 2014) son compartidos con *S. sambucifolia*, *S. grandiflora* (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993c) y *S. calliantha* (Dalgaard, 1979), constituyendo todas ellas un grupo diferenciable del resto de especies mediterráneas y macaronésicas del género *Scrophularia*. No obstante, *S. trifoliata*

presenta dos grandes máculas oscuras en la mitad inferior del interior del tubo de la corola que permiten diferenciarla fácilmente de las especies anteriores. Dichas máculas no están presentes en material de herbario (observ. pers.), lo que podría explicar la falta de alusión a ellas en las descripciones taxonómicas.

La floración ocurre entre abril y junio (Valsecchi, 1979, 1982), aunque esta puede adelantarse al mes de marzo y/o retrasarse al mes de julio (obs. pers.). La fructificación comienza aproximadamente un mes después de la floración.

Este endemismo tirrénico, distribuido por Cerdeña (Italia), Córcega (Francia) y la isla de Gorgona (región de la Toscana, Italia), prefiere lugares húmedos, frescos y sombríos, aunque también habita en zonas soleadas sin la participación directa del agua y se puede encontrar desde el nivel del mar hasta zonas montañosas (Valsecchi, 1979, 1982).

POBLACIONES ESTUDIADAS

Con el fin de localizar dos poblaciones que al menos contasen con 60 individuos (número estimado para un buen desarrollo de los experimentos planteados) se realizó una intensa prospección por la isla, encontrándose un buen número de poblaciones, muchas de las cuales tuvieron que ser descartadas por su escasez de individuos, la dispersión de estos o el difícil o excesivamente fácil acceso del hombre a las mismas. Finalmente se eligieron dos poblaciones situadas en la provincia de Oristán (W de la isla de Cerdeña), una en Laconi (con c. 100 individuos) y otra en Santu Lussurgiu (con cerca de 200 individuos), a 88 y 131 km de Cagliari (capital de Cerdeña), respectivamente (Fig. 3), que fueron estudiadas de abril a julio de 2013.

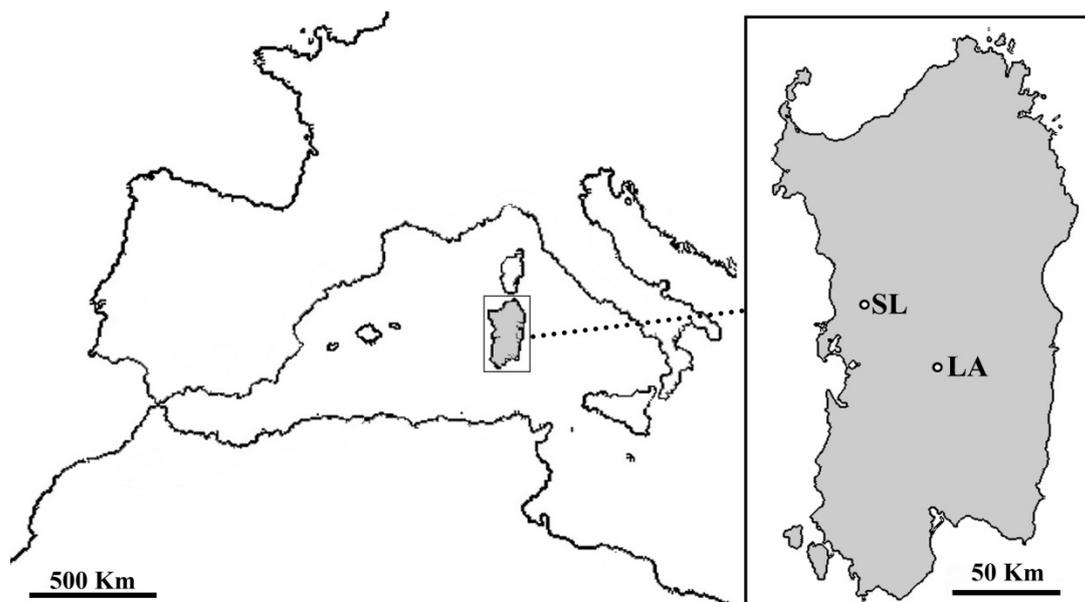


Figura 3. Localización de las poblaciones estudiadas de *S. trifoliata* en Cerdeña. La = Laconi; SL = Santu Lussurgiu.

La población 1 (en adelante Laconi) se encuentra en la región del “Sarcidano”, una meseta rocosa cuyo sustrato geológico está constituido por calizas del Mesozoico del que se derivan sedimentos de erosión arcillo-limosos de apreciable espesor (sec. Ayto. de Laconi, 2014). Se sitúa en la zona central de Cerdeña, en la frontera entre las provincias de Nuoro y Oristán, a 555 m de altitud, 39° 51’ de latitud N y 9° 03’ de longitud E. La población la constituye un grupo de individuos que crece en el patio interior de una casa deshabitada acompañados de escasos frutales de huerta (naranja, parral y granado). Se trata de una población artificial muy alejada del entorno vegetal natural que rodea al pueblo de Laconi y que, entre otros elementos, presenta *Quercus rotundifolia*, *Pistacia lentiscus*, *Phillyrea angustifolia* y diferentes representantes de los géneros *Cistus* y *Thymelaea*.

La población 2 (en adelante Santu Lussurgiu) se sitúa al W de la provincia de Oristán, en el borde de un macizo volcánico extinto de la región de “Montiferru” (Mele, 1993), a 503 m de altitud, 40° 08’ de latitud N y 8° 39’ de longitud E. Los individuos de esta población se localizan dentro de un terreno privado semiabandonado que se sitúa en una de las laderas que rodean al pueblo. Conviviendo con *S. trifoliata* aparecen numerosos individuos de *Olea europaea* asilvestrados.

Ambas poblaciones se desarrollan bajo una temperatura media anual de unos 17 °C, aunque durante los meses más calurosos se pueden alcanzar más de 40 °C en las mesetas y en algunas zonas internas de la isla donde se encuentra la población de Laconi. Las lluvias son principalmente otoñales y prácticamente inexistentes en verano. Durante la casi totalidad del año la isla se ve azotada por el viento Mistral proveniente del NW, al que se une el Siroco procedente del W de África (Dto. Specialistico Regionale Idrometeorologico, 2014). Desde el punto de vista biogeográfico las dos poblaciones pertenecen a la región Mediterránea, subregión Italo-Tirrenica (Rivas Martínez & al., 2004a). Respecto a su bioclimatología, ambas presentan un bioclima mediterráneo pluviestacional oceánico (Rivas Martínez & al., 2004b) y se localizan en el piso mesomediterráneo (Rivas Martínez & al., 2004c).

CENSOS Y COMPORTAMIENTO DE LOS VISITADORES/POLINIZADORES

Las observaciones de los visitantes florales se efectuaron siguiendo la metodología de Ortega-Olivencia & al. (2012). Para ello se realizaron, del 22 de abril al 10 de junio de 2013, censos de 10 minutos de duración para los insectos, a una distancia de las plantas

de 0,5 m, y de 20 minutos para aves y lagartos, en este caso a distancias nunca inferiores a 5 m. Dichos censos se llevaron a cabo desde las 8:00 h hasta las 20:00 h (c. las horas diarias de luz) y bajo todo tipo de condiciones meteorológicas. Los censos se hicieron en c. 20 individuos/día/población. En cada observación se registraba, siempre que era posible: (1) el tipo de visitador, (2) el tipo de movimiento realizado (horizontal a lo largo de un verticilo o vertical subiendo y/o bajando a lo largo de la inflorescencia), (3) el tiempo de permanencia en la flor, y (4) el número de flores e inflorescencias visitadas en cada vuelo. Para las aves también se anotaba la manera en que accedían a las flores. Los visitadores que en sus visitas contactaban con ambos órganos de la flor se consideraron polinizadores mientras que los que en busca de polen o néctar, o no contactaban con los órganos sexuales o sólo lo hacían con uno de ellos, fueron catalogados como ladrones o simplemente visitadores. Las observaciones directas se completaron con la realización de fotografías.

Tras los censos se calculó la tasa de visita de los diferentes visitadores como el número de flores visitadas por inflorescencia y por minuto.

ESTUDIO DE LAS MÁCULAS COROLINAS

Máculas como guías de néctar



Figura 4. Aspecto de la corola de las flores de *S. trifoliata* tras ocultar manualmente sus máculas.

Los experimentos diseñados consistieron en: (1) observación directa del comportamiento de los polinizadores ante flores sin máculas (SM) frente a flores con máculas o control (C); (2) comparar el éxito reproductivo relativo de ambos tipos de flores. En ambos casos, para ocultar las máculas se extrajo el néctar de la flor y a continuación se cubrieron con los lóbulos superiores de la corola de otra flor (Fig. 4). Posteriormente, el néctar extraído se depositó nuevamente en la misma zona, sobre el “falso fondo”.

Comportamiento de los polinizadores y éxito reproductivo

El estudio del comportamiento de los polinizadores sobre las flores con y sin máculas se llevó a cabo desde el 13 de mayo al 10 de junio de 2013. Para ello se realizaron censos de insectos de 10 minutos (a una distancia de 0,5 m de las plantas) desde las 8:00 h hasta las 19:00 h. Durante las observaciones se anotó el número y duración de las visitas de los insectos polinizadores. Se descartaron las observaciones de vertebrados porque la visita de los mismos producía movimientos bruscos de las inflorescencias lo que no garantizaba el mantenimiento del diseño original de las flores manipuladas. Además, la distancia requerida para realizar estos censos dificultaba la visión y no permitía discernir con seguridad entre las flores C y SM.

A partir del número y duración de las visitas se calculó la tasa de visita (número de flores visitadas/inflorescencia/minuto) para cada tipo de flor (C vs SM).

Para estudiar el éxito reproductivo, la tarde antes de iniciar el experimento se embolsaron inflorescencias de diferentes individuos (3-9), cuyas flores estaban en estado de botón. Al día siguiente se seleccionaron parejas de flores en estado femenino situadas, siempre que era posible, en el mismo verticilo (114 pares en Laconi y 112 en Santu Lussurgiu) y, tras cubrir las máculas en una de cada par, se marcaron ambos tipos de flores en el cáliz con pintura plástica de cara a su identificación. Posteriormente, se sometieron a polinización natural y se dejaron hasta su fructificación.

Una vez fructificadas se recolectaron y en el laboratorio se contabilizó el número de flores y frutos, obteniéndose el porcentaje de fructificación (n° de frutos \times 100/ n° de flores) para las flores con y sin máculas.

Estudio histológico de las máculas

Para el desarrollo de este apartado se siguió la metodología propuesta por Rodríguez-Riaño & al. (2006) y Valtueña & al. (2011) con algunas modificaciones. Las flores en diferente estado de desarrollo (botón, femenino y masculino) se fijaron en una solución de etanol 70 % y ácido acético glacial (3:1) durante 24 horas y posteriormente se conservaron en etanol al 70 % a 4 °C hasta su estudio. Las flores se diseccionaron y la parte de la corola donde se localizaban las máculas se sumergió durante c. 12 horas en tampón fosfato 0,03M, luego se deshidrataron en una serie continua de etanol (35 %, 50 %, 70 %, 96 % y 100 %), manteniéndolas durante 1 hora en las tres primeras

concentraciones y durante 1,5-2 horas en las dos últimas. Tras la deshidratación se introdujeron en historesina (Technovic 7100) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24-36 horas, tras las cuales se incluyeron en moldes de plástico rellenos con resina más endurecedor. Pasado un mínimo de 24 horas, tiempo necesario para que la resina se endurezca, las muestras se cortaron con un microtomo rotatorio (Leica RM2145) en secciones de 5 μm que se fijaron por calor en portaobjetos previamente etiquetados con los datos de la población, el número de individuo y el estado de desarrollo de la flor (botón, femenina o masculina).

Una vez obtenidas las secciones y con el fin de poder observar la composición de los tejidos, se tiñeron con PAS (ácido periódico y reactivo de Schiff) que permite la visualización de polisacáridos (gránulos de almidón) y se contrastaron con amido black para poder observar las proteínas. Todas las muestras se montaron permanentemente en Eukitt y se estudiaron y fotografiaron usando un MO (Nikon Eclipse Ci-S) con una cámara digital acoplada (Nikon Ds-fi2).

SISTEMA DE REPRODUCCIÓN

El trabajo de campo tuvo lugar en el año 2013, comenzando a partir de mediados de abril y mayo en la población de Laconi y Santu Lussurgiu, respectivamente y terminando con la recolección de los últimos frutos a finales del mes de julio. Durante la floración y fructificación las visitas a las poblaciones variaron entre una vez al día hasta dos veces por semana, en función de los experimentos y de las condiciones meteorológicas.

Para estudiar el sistema de reproducción se llevaron a cabo dos tests diferentes de polinización, uno de polinización geitonógama manual (PGM) y otro de autopolinización espontánea (ApE) que fueron comparadas con un tercer grupo de plantas control (C).

El procedimiento seguido para la realización de los experimentos consistió en seleccionar al azar 10 individuos por población y test y 10 individuos control, los cuales se marcaron con etiquetas de plástico de diferentes colores y se asociaron al azar en grupos de tres (PGM, ApE y C) con el fin de que los resultados fueran comparables.

- Test ApE: los individuos no sufrieron ninguna manipulación floral, simplemente se aislaron de los polinizadores por medio de bolsas de

nylon blancas. Mediante un cable flexible de alambre la inflorescencia se sujetaba a una caña y a la bolsa, colocando una buena tira de algodón para evitar daños a la planta e impedir el acceso de insectos a la misma.

- Test PGM: hasta 100 flores recién abiertas (cuando el estigma formaba un ángulo menor o igual a 90° con el plano longitudinal de la flor) se polinizaron manualmente. Para ello, se depositaba sobre los estigmas polen procedente de flores de la misma planta. Las flores polinizadas se marcaron en el cáliz y el pedicelo, y las inflorescencias se embolsaron como en el test anterior.
- Control: las flores de los distintos individuos no fueron manipuladas ni embolsadas; simplemente se dejaron libremente expuestas a polinización natural.

Alcanzado el período de fructificación, se recolectaron las inflorescencias completas y en el laboratorio se procedió a contar el número de flores (sumatorio de frutos producidos y flores abortadas, identificándose estas últimas a partir de los cálices y/o pedicelos florales que no suelen desprenderse de la planta), frutos y semillas producidas. El recuento de semillas bien conformadas por fruto se obtuvo de la totalidad de los producidos en el tratamiento ApE, mientras que en el tratamiento PGM y en el control se seleccionaron al azar 10 frutos por individuo dada la alta producción de estos en dichas plantas. Además, para investigar si existía variación espacial en la producción de semillas a lo largo de la inflorescencia, la selección de los 10 frutos de cada una de las plantas control se hizo de manera que 4 estuviesen situados en los verticilos inferiores, 3 en los medios y otros 3 en los superiores.

Con los datos anteriores se averiguó el porcentaje de fructificación (n° de frutos \times 100/ n° de flores) y la formación de semillas (n° de semillas/ n° de primordios seminales). El número de primordios seminales se contabilizó con la ayuda del MO en un total de 15 botones florales/población elegidos al azar, dada la imposibilidad de contarlos en los frutos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis se realizaron mediante el paquete estadístico SPSS versión 19. La normalidad de las variables se comprobó mediante el test no paramétrico de

Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors y la homocedasticidad con el test de Levene. Para comparar medias se emplearon Anovas de una vía si las variables poseían datos normalizados, o estos se podían normalizar.

Para el estudio de los visitantes florales se procedió de acuerdo a Ortega-Olivencia & al. (2012) de cara a analizar la tasa de visita a partir de un modelo lineal generalizado (MLG) con el número de flores visitadas por inflorescencia como la variable dependiente y el logaritmo del tiempo (minutos de censo) como variable de compensación (offset). Las variables independientes fueron el tipo de polinizador y la población. En el caso del análisis de la tasa de visita a las flores con máculas (C) y sin ellas (SM) se utilizaron como variables independientes las indicadas anteriormente más el tratamiento (C vs SM).

El comportamiento de los polinizadores se analizó mediante la prueba de χ^2 de Pearson por medio de una tabla de contingencia R x C de doble factor. Se efectuaron comparaciones enfrentando el número de movimientos horizontales al de verticales y dentro de estos el de ascensos frente al de descensos. Estas comparaciones se hicieron entre los diferentes polinizadores o para cada uno de ellos de manera individual en cada población. Las diferencias entre movimientos horizontales vs verticales y entre ascensos vs descensos de cada polinizador en cada población se analizaron a partir de una prueba binomial. Las abejas se descartaron de los análisis de comportamiento ya que además de que se registró un número muy bajo de sus visitas, los tiempos de estas eran muy largos por lo que el número total de movimientos contabilizados fue muy escaso.

Para conocer la relación entre la fructificación de las flores con y sin máculas se empleó igualmente la prueba de χ^2 de Pearson a través de tablas de contingencia.

En la producción de semillas, tras normalizar los datos mediante la raíz cuadrada del cociente semillas/primordios seminales (S/PS), se emplearon ANOVAS de una vía, utilizando como variable o factor dependiente la raíz cuadrada de dicho cociente y como variables o factores independientes el año, la población, el tratamiento y los verticilos. Se seleccionó un diseño factorial en el que se incluyeron todas las variables estudiadas y todas las interacciones por pares posibles. Tras el ANOVA, todas las interacciones no significativas fueron eliminadas del diseño factorial y se repitió el análisis para comprobar que la existencia o no de diferencias se seguían manteniendo (resultados no mostrados). Una vez determinado que había diferencias entre las medias, el test HSD de Tukey permitió determinar qué medias por pares diferían en aquellos factores de 3 o

más variables (tratamiento y verticilos).

Los datos de fructificación no pudieron ser normalizados, por lo que se analizaron mediante MLG, ajustándose a una distribución binomial negativa con una función de enlace logarítmica y utilizando el logaritmo del número de flores como variable de compensación (offset). Las variables independientes utilizadas en el análisis fueron las mismas que las de la formación de semillas.

RESULTADOS

CENSOS Y COMPORTAMIENTO DE LOS VISITADORES/POLINIZADORES

Se realizaron un total de 8.769,6 minutos de observación entre las dos poblaciones estudiadas (3.180 en Laconi y 3.360 en Santu Lussurgiu), de los cuales casi la mitad correspondieron a censos de insectos (4.309,8 minutos) y la otra (4.459,8 minutos) a vertebrados.

De los insectos contabilizados, los que actuaron como polinizadores se incluyeron en tres tipos funcionales de Hymenoptera: (1) abejas pequeñas (Halictidae), en adelante nos referiremos a este grupo como abejillas, (2) avispas (Vespidae) y (3) abejorros (Apidae). En el primer grupo se observaron individuos del género *Lasioglossum*. El segundo estuvo integrado por avispas sociales (*Vespula* y *Polistes*) y el tercero por representantes del género *Bombus*. No se observaron abejas melíferas.

La práctica totalidad de los vertebrados que polinizaron las flores de *S. trifoliata* pertenecieron a individuos, en su mayoría machos, de curruca capirotada (*Sylvia atricapilla*) y tan solo una visita fue efectuada por un herrerillo común (*Cyanistes caeruleus* = *Parus caeruleus*). No se registró ninguna visita de reptiles a las flores, aunque se observaron entre los individuos de la población de Laconi.

En Laconi las avispas constituyeron los polinizadores más abundantes, con un total de 185 individuos censados que visitaron 511 flores, seguidas de las aves (69 individuos observados que al menos visitaron 136 flores –la distancia a la que se realizaron los censos impedía precisar más este dato–) y de los abejorros (23 individuos censados y 110 flores visitadas); en último lugar se situaron las abejillas, con solo 27 flores visitadas en un total de 11 individuos. Por el contrario, en Santu Lussurgiu las aves fueron el grupo de polinizadores más importante, 133 individuos censados que

visitaron 1.094 flores, seguidas de las avispas y abejorros con 102 y 60 individuos visitando 228 y 224 flores, respectivamente. Por último, nuevamente las abejas presentaron el nivel más bajo de visitas (4 individuos contabilizados en 4 flores).

De los insectos, las abejas fueron las que más tiempo permanecían en la flor, registrándose visitas de $8,15 \pm 12,55$ segundos en Laconi y hasta c. 5 minutos en Santu Lussurgiu ($270 \pm 232,38$ segundos). A continuación se situaban las avispas (Laconi: $3,88 \pm 3,73$ segundos; Santu Lussurgiu $3,78 \pm 3,07$ segundos) y, por último, los abejorros (Laconi: $2,58 \pm 2,31$ segundos; Santu Lussurgiu $2,57 \pm 2,02$ segundos). Las aves por su parte, permanecían en las flores menos de un segundo.

Aunque la tasa total de visita entre ambas poblaciones no mostró diferencias significativas, estas sí se dieron entre polinizadores, así como en la tasa de visita de cada uno de ellos dentro de cada población (Tabla 1). Como se observa en la figura 5 estas diferencias venían dadas en la población de Laconi por la mayor tasa de visita de las avispas (9 veces la de las abejas, 4,5 la de los abejorros y 4,8 la de las aves), mientras que en la de Santu Lussurgiu se produjeron por la mayor tasa de las aves frente al resto de polinizadores (1,6 veces la de las avispas, 1,8 la de los abejorros y 56,3 la de las abejas). En la figura también se puede apreciar la igualdad en la tasa de visita entre las avispas de la población de Laconi y las aves de la de Santu Lussurgiu.

Tabla 1. Modelo lineal generalizado para analizar el efecto de los polinizadores (abejas, avispas, abejorros y aves), las poblaciones (Laconi, Santu Lussurgiu) y su interacción, sobre la tasa de visita (variable dependiente: número de flores visitadas por inflorescencia; variable de compensación: logaritmo del tiempo de censo). Los resultados significativos se muestran en **negrita**.

Origen	Tipo III		
	χ^2 de Wald	g.l.	P
Polinizador	103,321	3	0,000
Población	0,001	1	0,978
Polinizador * Población	65,800	3	0,000

En cuanto al comportamiento de los polinizadores indicar que estos se movían hacia arriba y hacia abajo a lo largo de la inflorescencia (movimientos verticales) y se desplazaban horizontalmente entre las flores de un mismo verticilo rozando los órganos sexuales de la flor en su búsqueda de néctar y/o polen. De todos ellos solo aves y abejorros visitaron las flores con tiempo frío, lluvioso o nublado.

En el caso de los insectos solo se muestran resultados estadísticos de

comportamiento para abejorros y avispa ya que, como se indicó en material y métodos, las abejas fueron eliminadas de los análisis porque el número de movimientos registrados fue muy bajo al haber visitado solo 31 flores; ello implicaba que el total de datos para el análisis fuese muy pequeño y, por tanto, inválido.

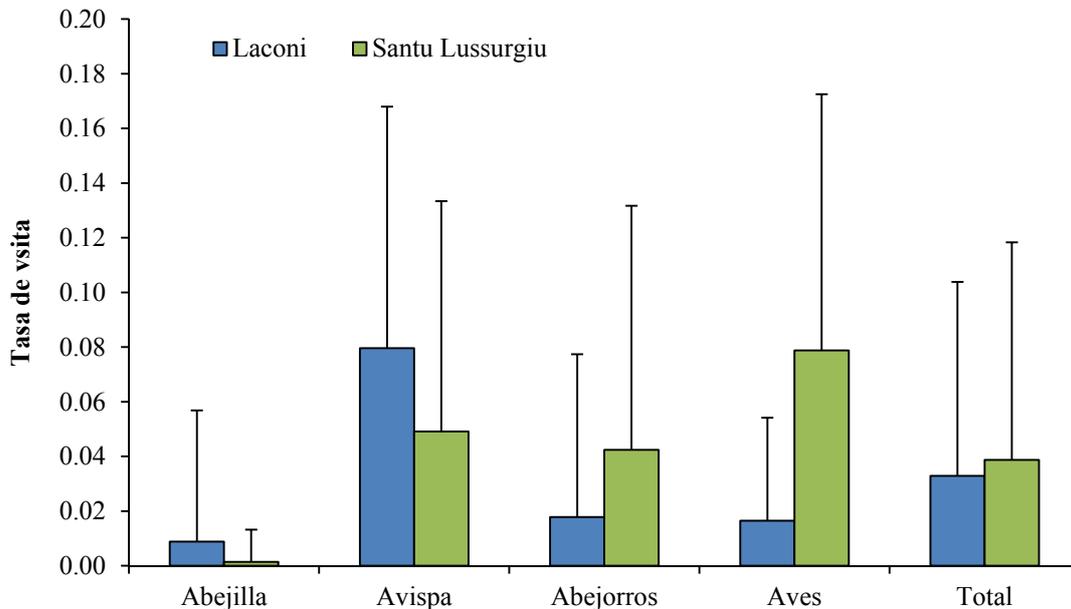


Figura 5. Tasa de visita (número de flores visitadas por inflorescencia y por minuto) de cada polinizador y tasa de visita del conjunto de los polinizadores (Total) (media ± d.s.) en las dos poblaciones de estudio.

Los porcentajes de movimientos horizontales y verticales realizados por avispa y abejorros no mostraron diferencias significativas al ser comparados ($\chi^2 = 3,45$; g.l. = 1; $P = 0,063$). De igual forma, para cada polinizador no fue significativa la diferencia entre dichos porcentajes (avispa: $\chi^2 = 1,71$; g.l. = 1; $P = 0,191$; abejorros: $\chi^2 = 0,01$; g.l. = 1; $P = 0,918$). Tampoco existieron tales diferencias entre ambos tipos de polinizadores en el caso de los movimientos verticales (ascensos vs descensos) ($\chi^2 = 3,18$; g.l. = 1; $P = 0,074$), aunque los ascensos fueron más abundantes que los descensos. Al comparar los porcentajes de ascensos y descensos de cada polinizador tampoco se produjeron diferencias significativas (avispa: $\chi^2 = 0,03$; g.l. = 1; $P = 0,863$; abejorros: $\chi^2 = 2,87$; g.l. = 1; $P = 0,09$).

Esos resultados variaron al tener en cuenta cada población. En Laconi ambos tipos de polinizadores mostraron un comportamiento similar respecto a los movimientos horizontales y verticales (Fig. 6A). Además, de acuerdo con la prueba binomial, cada

uno de ellos también realizó una similar proporción de movimientos horizontales y verticales (Fig. 6A). Respecto a los movimientos verticales, ambos polinizadores difirieron significativamente, aunque en ambos casos desarrollaban mayor número de ascensos que de descensos, sobre todo en los abejorros (Fig. 6B). En Santu Lussurgiu hubo diferencias con una baja significación entre avispa y abejorros en la proporción de movimientos horizontales vs verticales; no obstante, la prueba binomial no mostró diferencias entre ambos movimientos para cada polinizador (Fig. 6A). Respecto a los movimientos verticales, la proporción de subidas y bajadas no fue significativamente diferente entre ambos tipos de polinizadores, con un mayor número de subidas que de bajadas, aunque en el caso de los abejorros las subidas fueron significativamente mayores que las bajadas (Fig. 6B).

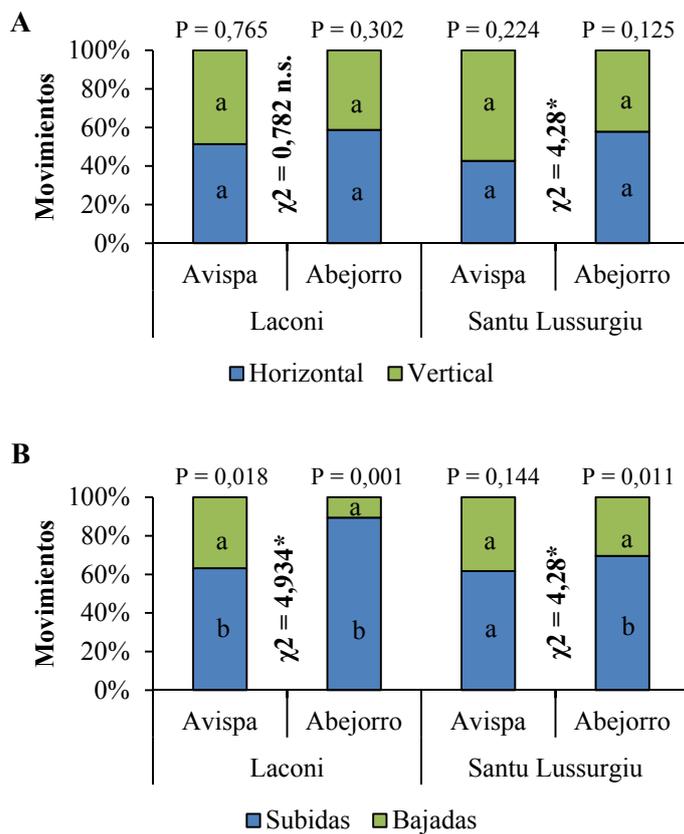


Figura 6. Relación entre los diferentes tipos de movimiento de los principales grupos de insectos que polinizan las flores de *S. trifoliata*. (A) Movimientos horizontales vs verticales. (B) Movimientos verticales de subida vs bajada. Entre las barras, información estadística tras comparar el comportamiento de los insectos en cada población. *, $P < 0,05$; n.s., no significativo. Encima de las barras información estadística tras comparar cada tipo de movimiento para cada polinizador en cada población a partir de la prueba binomial. Letras diferentes o iguales dentro de las barras indican la existencia o no de diferencias significativas, respectivamente.

Respecto a las aves, indicar que estas siempre se posaban en el entrenudo superior o inferior de la cima de flores que estaban a punto de visitar, rozando los órganos reproductores con la garganta (el caso más frecuente) o con la frente. También se sirvieron de las ramas cercanas de otras plantas vecinas para apoyarse y realizar

desde ellas sus visitas. Introducían la cabeza en la flor para beber néctar con movimientos rápidos de menos de un segundo. La dirección de estos movimientos fue mayoritariamente horizontal, c. 3 movimientos horizontales por cada vertical. En estos últimos, el número de subidas fue seis veces mayor que el de bajadas. En cualquier caso, estos datos son estimativos ya que la observación a larga distancia de movimientos tan rápidos no siempre permitió contabilizar todos los realizados por el polinizador.

ESTUDIO DE LAS MÁCULAS COROLINAS

Máculas como guías de néctar

Comportamiento de los visitantes y éxito reproductivo

De los 2.120 minutos de observación realizados en total para las dos poblaciones, únicamente hubo alguna interacción con los pares de flores C y SM en 24 de los 75 censos realizados en la población de Laconi y en 13 de los 137 efectuados en Santu Lussurgiu.

La tasa total de visita de los polinizadores no mostró diferencias significativas entre las flores sin máculas y las control (Tabla 2), y tampoco fueron diferentes esas tasas al comparar el comportamiento de avispas y abejorros en cada población (Fig. 7).

Tabla 2. Modelo lineal generalizado para analizar el efecto de los tratamientos (C = flores sin manipular vs SM = flores manipuladas), los polinizadores (avispa y abejorro) y las poblaciones (Laconi, Santu Lussurgiu) y su interacción sobre la tasa de visita (variable dependiente: número de flores visitadas por inflorescencia; variable de compensación: logaritmo del tiempo de censo). Los resultados significativos se muestran en negrita.

Origen	Tipo III		
	χ^2 de Wald	g.l.	P
Tratamiento	1,446	1	0,229
Polinizador	9,446	1	0,002
Población	0,065	1	0,798
Polinizador * Tratamiento	6,186	1	0,013
Población * Tratamiento	0,569	1	0,451
Polinizador * Población	0,643	1	0,423

Donde sí hubo diferencias significativas fue al comparar entre sí el comportamiento de avispas y abejorros ante las flores SM y las C (Tabla 2). Concretamente, estas diferencias se produjeron porque mientras que los abejorros visitaban significativamente

más a las flores SM que a las control ($P = 0,029$), las avispas no mostraron diferencias en sus visitas a ambos tipos de flores ($P = 0,135$). Por tanto, esas máculas no parecen estar diseñadas para los abejorros ni tampoco para las avispas.

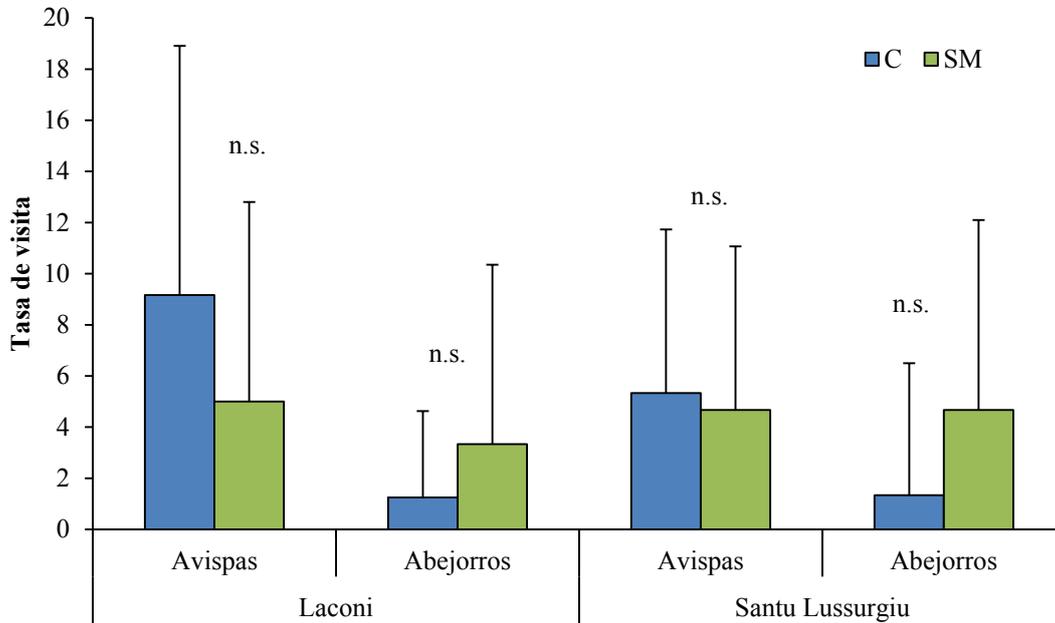


Figura 7. Tasa de visita (número de flores visitadas por inflorescencia y por minuto) (media \pm d.s.) de avispas y abejorros a flores con y sin máculas en las dos poblaciones estudiadas. C = flores con máculas; SM = flores sin máculas. Encima de las barras, información estadística tras comparar las tasas de visita a partir de un modelo lineal generalizado; n.s., no significativo.

En cuanto al éxito reproductivo de ambos tipos de flores, el porcentaje de fructificación no alcanzó en ningún caso el 50 % (Fig. 8). En la población de Laconi la fructificación fue del 44,64 % en las flores con máculas (C) y del 38,84 % en las manipuladas, es decir, a las que se les taparon las máculas (SM). Esto mismo sucedió en Santu Lussurgiu donde hubo un 42,77 y un 43,97 de formación de frutos en las flores C y SM, respectivamente (Fig. 8). A pesar de que los porcentajes indicados anteriormente para ambos tipos de flores son distintos, las diferencias solo fueron estadísticamente significativas en el caso de los individuos de Laconi (Fig. 8), población en la que fructificaron 100 flores C y 87 SM de las 112 visitadas en ambos casos. En Santu Lussurgiu el porcentaje de fructificación de ambos tipos de flores fue similar, 83 flores de cada tipo fueron visitadas y de ellas produjeron fruto 71 C y 73 SM.

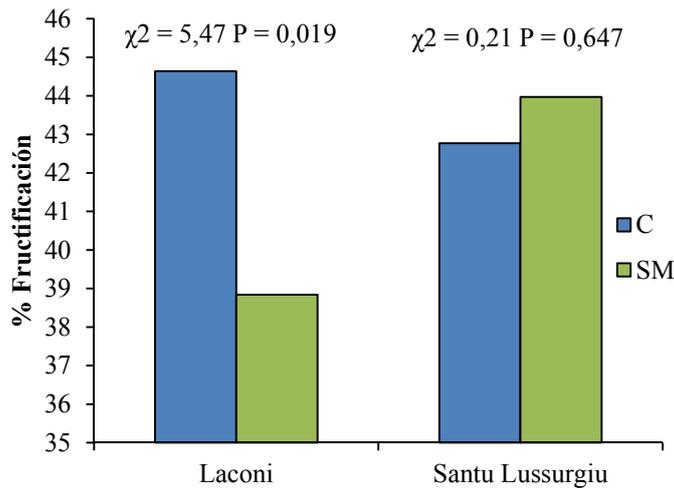


Figura 8. Porcentaje de fructificación en flores con máculas (C) y sin ellas (SM) en cada una de las poblaciones estudiadas. Encima de las barras, información estadística tras comparar la formación de frutos en ambos tipos de flores.

Estudio histológico de las máculas

Las máculas internas de la corola están presentes en todos los estadios del desarrollo floral (Fig. 9) y no varían en su conformación a lo largo de ellos.

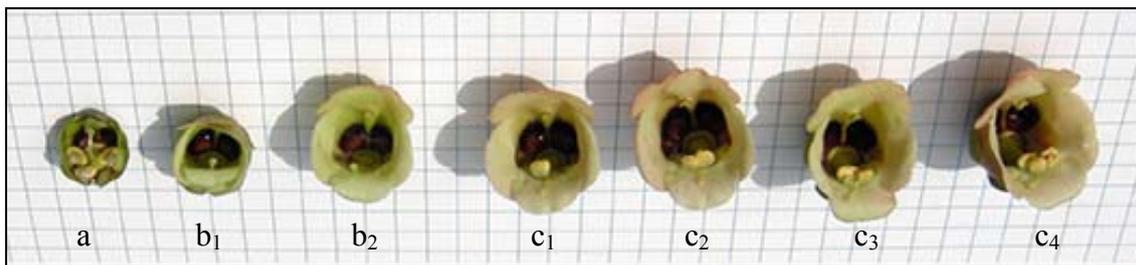


Figura 9. Aspecto de las máculas de la corola de *S. trifoliata* en diferentes estadios florales. a, preantesis; b₁-b₂, femenino; c₁-c₄, masculino.

El estudio de las secciones transversales de la zona de la corola donde se encuentran las máculas no reveló diferencias histológicas con el resto de tejidos de la misma (Fig. 10). Así, a lo largo de toda ella se observa una epidermis monocapa de células tapizadas por una cutícula conspicua y sin estomas; tanto la epidermis externa como la interna están formadas por células desiguales, de subredondeadas a subrectangulares. Entre ambas epidermis se extiende un parénquima cuyas células son escasas en polisacáridos y proteínas; inmerso en él aparecen haces vasculares de xilema y floema.

En la epidermis externa de la mayoría de los cortes se observaron tricomas pedicelados glandulares (Fig. 10). Se trata de unos apéndices visibles a simple vista y que,

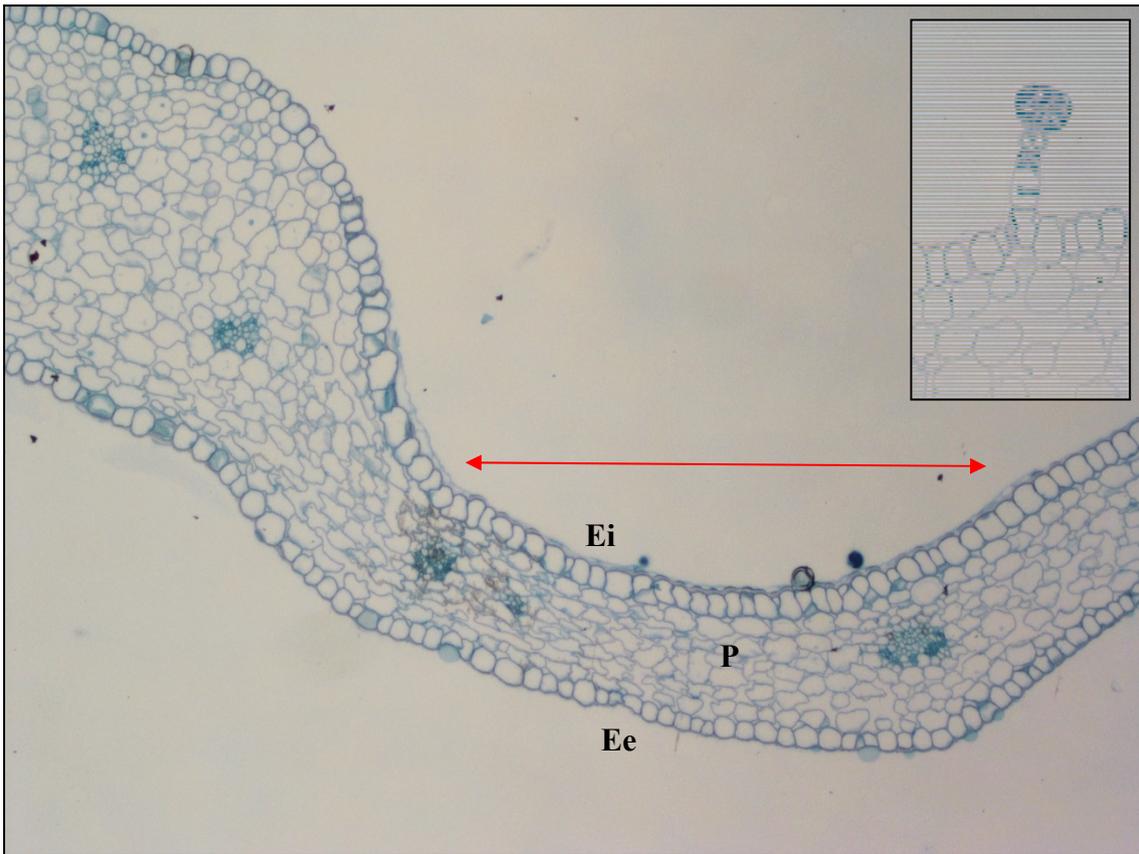


Figura 10. Sección transversal de la corola de *S. trifoliata* a nivel de la mácula (flecha roja de doble punta) mostrando la epidermis interna (Ei) y la externa (Ee), el parénquima (P) y los tricomas glandulares de la cara externa de la corola (recuadro interno). Tinción: PAS + amido black.

al igual que en la superficie de la corola, están también presentes en los filamentos de los estambres (donde son muy abundantes), en la cara abaxial de la zona libre del estaminodio y en el cáliz (de forma escasa y dispersa).

Tras la tinción de las secciones no se observó ningún contraste de color entre las células de la zona de las máculas y las del resto de la corola, probablemente porque los metabolitos secundarios presentes en las células de esta zona (posiblemente flavonoides) y responsables de su color más oscuro hayan desaparecido por el proceso de fijación de las flores previo a su estudio.

SISTEMA DE REPRODUCCIÓN

La formación de frutos en los dos tratamientos y el control fue significativamente diferente (Tabla 3); concretamente, en ambas poblaciones, la fructificación de los individuos sometidos a autopolinización espontánea (ApE) fue significativamente menor

Tabla 3. Modelo lineal generalizado para analizar el efecto de los tratamientos (polinización geitonógama, autopolinización espontánea, control), las poblaciones (Laconi, Santu Lussurgiu) y su interacción sobre la fructificación (variable dependiente: número de frutos; variable de compensación: logaritmo de las flores). Los resultados significativos se muestran en negrita.

Origen	Tipo III		
	χ^2 de Wald	g.l.	P
Tratamiento	151,379	2	0,000
Población	0,039	1	0,844
Población * Tratamiento	1,812	2	0,404

a la producida en aquellos con polinización geitonógama manual (PGM) ($P = 0,00$) y polinización natural ($P = 0,00$), no existiendo entre estos dos últimos diferencias significativas ($P = 0,89$) (comparaciones por pares de MLG). En la figura 11 pueden observarse estas diferencias con valores que no superaron el 7,41 % ($\pm 8,31$) bajo ApE, es decir, las tasas de autogamia s.str. fueron muy bajas. Por el contrario, los porcentajes

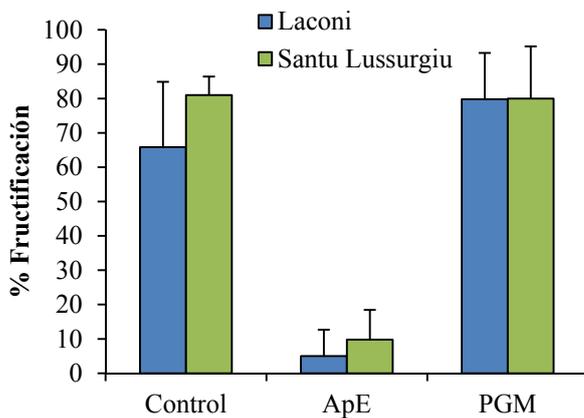


Figura 11. Porcentaje de fructificación (media \pm d.s.) en las dos poblaciones estudiadas de *S. trifoliata*. Control = polinización natural; ApE = autopolinización espontánea; PGM = polinización geitonógama manual.

medios obtenidos tras polinización natural y PGM se acercaron al 80 % (control: $73,42 \pm 15,66$; PGM: $79,88 \pm 14,01$). Estos últimos porcentajes ponen de manifiesto el alto nivel de autocompatibilidad (AC) de la especie. La población de Santu Lussurgiu presentó los mayores valores de fructificación en todos los tratamientos, aunque no mostró diferencias significativas con la de Laconi (Tabla 3, Fig. 11).

Respecto a la formación de semillas por fruto la mayor producción en ambas poblaciones se dio en los individuos control (Fig. 12), existiendo diferencias significativas entre las semillas generadas en dichos individuos y los sometidos a tratamiento (Tabla 4). Por poblaciones la producción difirió entre ellas, siendo significativamente mayor en Santu Lussurgiu (Tabla 4, Fig. 12). También se obtuvieron diferencias significativas al comparar entre sí los resultados de los diferentes tratamientos en ambas poblaciones (Tabla 4). Así, en Laconi la formación de semillas en los individuos de ApE fue significativamente menor que en los sometidos a PGM ($P = 0,000$)

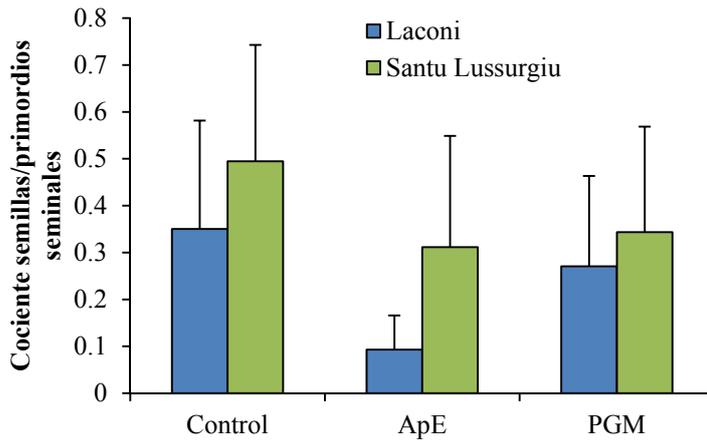


Figura 12. Formación de semillas por fruto (semillas/primordios seminales) en las dos poblaciones estudiadas de *S. trifoliata* (media \pm d.s.). Control = polinización natural; ApE = autopolinización espontánea; PGM = polinización geitonógama manual.

y los controles ($P = 0,000$); entre estos últimos no se dieron diferencias ($P = 0,089$; post hoc HSD de Tukey). En Santu Lussurgiu, sin embargo, los tratamientos de ApE y PGM no fueron significativamente diferentes entre sí ($P = 0,355$), pero ambos sí se mostraron significativamente menores que los controles ($P = 0,000$ en ambos casos;

post hoc HSD de Tukey). De estos resultados de nuevo se desprende que la especie se comporta como AC, especialmente en el caso de Laconi donde no existieron diferencias entre los individuos control y los sometidos a geitonogamia forzada.

Tabla 4. ANOVA de una vía para analizar el efecto de los tratamientos (autopolinización manual, autopolinización espontánea, control), las poblaciones (Laconi, Santu Lussurgiu) y su interacción sobre la formación de semillas (raíz cuadrada del cociente semillas/primordios seminales). La media cuadrática (MC) se basa en la suma de cuadrados de tipo III. Los resultados significativos se muestran en negrita.

Origen	g.l.	MC	F	P
Tratamiento	2	1,506	41,625	0,000
Población	1	2,254	62,32	0,000
Población * Tratamiento	2	0,226	6,262	0,002
Error	465	0,036		

Respecto a la variación espacial en la formación de semillas por fruto a lo largo de la inflorescencia, los resultados no arrojaron diferencias significativas en la producción habida entre los distintos verticilos de la misma ($F = 0,04$; g.l. = 2; $P = 0,957$).

DISCUSIÓN

CENSOS Y COMPORTAMIENTO DE LOS VISITADORES/POLINIZADORES

S. trifoliata presenta un sistema de polinización mixto vertebrado-insecto (MVI), constatado por la realización de un total de 8.769,6 minutos (c. 15 días) de censos, período más que suficiente para determinar los polinizadores de una especie (Ollerton & Cranmer, 2002). Por parte de los insectos los más importantes fueron las avispas (*Vespula sp.*), seguidos por los abejorros (*Bombus sp.*) y por parte de los vertebrados, la curruca capirotada (*Sylvia atricapilla*), generalmente individuos machos. Estos polinizadores fueron los más abundantes y constantes tanto en el tiempo como en el espacio. Otros como las abejas (*Lassioglossum sp.*) o el herrerillo común (*Cyanistes caeruleus*) deben considerarse como polinizadores secundarios por su escasa presencia y tasa de visita. Previamente, este sistema MVI de polinización había sido indicado por Ortega-Olivencia & al. (2012), aunque los autores apuntaban que los resultados debían tomarse con cautela por el escaso número de horas de observación.

La saurofilia es un sistema de polinización que se ha indicado para algunas especies insulares (véase revisión en Olesen & Valido, 2003), entre ellas algunas del Mediterráneo occidental (v.g. *Euphorbia dendroides*, Traveset & Sáez, 1997), e incluso en la especie canaria *Scrophularia calliantha* Ortega-Olivencia & al. (2012) indicaron que individuos juveniles del lagarto de Gran Canaria, *Gallotia sthelini*, formaban parte del sistema de polinización MVI. En las dos poblaciones estudiadas de *S. trifoliata* no ha podido confirmarse dicha saurofilia, a pesar de haber observado lagartos conviviendo con los individuos de esta especie. Aunque no se descarta que en otras poblaciones de la isla pudiera existir interacción con dichos reptiles, las diferencias en el tipo de corola y el porte de la planta podrían ser las principales causas de la falta de visitas de lagartos a las flores de *S. trifoliata*. Así, mientras la especie canaria no muestra una corola típicamente bilabiada, como es característico en *Scrophularia*, sino que parece subrotácea y además presenta inflorescencias decumbentes con cimas de flores muy apretadas, lo cual facilitaría la visita de reptiles (Ortega-Olivencia & al., 2012), en *S. trifoliata* la corola es bilabiada y sus inflorescencias son erectas y columnares, como en sus parientes *S. sambucifolia* y *S. grandiflora*.

En las dos poblaciones estudiadas los polinizadores más importantes difirieron, ya que mientras en Laconi fueron las avispas los principales, con una tasa de visita de 4,78 flores/inflorescencia/hora, en Santu Lussurgiu lo fueron las curruacas (4,73 flores/inflorescencia/hora), siendo ambas tasas estadísticamente muy similares. La explicación a dichos resultados puede estar en el ambiente desigual de ambas

poblaciones. Los individuos de Laconi crecen en un entorno bastante artificial y cerrado donde las avispas pueden moverse con comodidad, al estar resguardadas del viento; por el contrario, los individuos de Santu Lussurgiu lo hacen en un medio menos transformado y más abierto que es más propicio para el vuelo y pecoreo de las aves y en el que fácilmente pueden anidar, por lo que permanecen más tiempo en la población con el consiguiente aumento de visitas a las flores.

Ortega-Olivencia & al. (2012) indicaron para *S. trifoliata* una tasa de visita de las aves de 0,61 visitas/hora, una baja tasa achacable al escaso número de minutos de observación como consecuencia de las inclemencias del tiempo. El aumento del número de censos con el presente trabajo ha permitido, por una parte, demostrar que las avispas, como ya había sido indicado por dichos autores, son los principales insectos polinizadores de la especie, y por otra, y más importante, que las currucas, también señaladas por Ortega-Olivencia & al. (2012) juegan un importante papel en su polinización, al menos en la población de Santu Lussurgiu. Las tasas de visita de las aves con valores de c. 4,7 visitas/hora son ahora similares a las de las especies ibéricas *S. sambucifolia* (c. 3 visitas/hora) y *S. grandiflora* (c. 4,2 visitas/hora) (Ortega-Olivencia & al., 2012) y superan a las obtenidas para otras especies insulares también polinizadas por aves paseriformes (Vogel & al., 1984; Ollerton & al., 2009). No obstante, su nivel de interacción con las aves está lejos del obtenido en la también insular *S. calliantha* (endémica de Gran Canaria) que puede recibir hasta 13,2 visitas de aves/hora (Ortega-Olivencia & al., 2012).

Respecto a los movimientos de los insectos polinizadores (avispa y abejorro) a lo largo de las inflorescencias de *S. trifoliata* difirieron respecto a lo observado en *S. sambucifolia* y *S. grandiflora* (Valtueña & al., 2013); en la especie tirrénica, realizaron un número similar de movimientos horizontales por inflorescencia (entre flores de un mismo verticilo) que de verticales (entre flores de diferentes verticilos). Para el caso de las especies mencionadas, la mayor proporción de movimientos horizontales por inflorescencia probablemente se debe a la cercanía entre las flores de un mismo verticilo (Valtueña & al., 2013), debido a que son sésiles o subsésiles. Esto permite a sus polinizadores desplazarse horizontalmente y así, probablemente puedan saciar en gran medida sus necesidades alimenticias ya que las flores producen una gran cantidad de néctar, semejante entre las dos fases sexuales que normalmente coexisten en cada cima (Rodríguez-Riaño & al., 2014). Por el contrario, en la especie que aquí nos ocupa esta

situación no ocurre debido a que la longitud de sus pedicelos florales es generalmente mayor (Valsecchi, 1979, 1982) que la de las otras dos especies (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a), con lo que para sus polinizadores el coste de los desplazamientos en la inflorescencia puede resultar el mismo, tanto si son horizontales como verticales.

En los movimientos verticales ambos polinizadores (avispa y abejorro) tuvieron el mismo patrón de comportamiento al realizar un mayor número de ascensos que de descensos, como también ocurrió en *S. sambucifolia* y *S. grandiflora* (Valtueña & al., 2013) y para las que se esgrimió, entre otras, como una posible explicación, la óptima visión de la recompensa (néctar) por el polinizador. Esta explicación es perfectamente extrapolable a *S. trifoliata* por la similitud de sus flores con las de las especies anteriores. En todas ellas la estructura floral y la orientación de la flor en la inflorescencia, más o menos perpendicular a su eje, permiten a los visitantes descubrir el néctar siempre que la dirección del vuelo sea de abajo hacia arriba, ya que al contrario dicha recompensa no puede ser visualizada por aquellos porque los dos lóbulos superiores de la corola ocultan el interior de la misma (Valtueña & al., 2013).

Respecto a las aves, el comportamiento de las currucas coincide con el observado en *Anagryis foetida* (Ortega-Olivencia & al., 2005) o en las otras *Scrophularia* de flores grandes y vistosas (Ortega-Olivencia & al., 2012). Por tanto, se confirma que estas aves siempre liban en las flores de *S. trifoliata* mientras están posadas en los entrenudos de la propia inflorescencia o apoyadas en ramas de plantas cercanas, conspecíficas o no. Este comportamiento (posarse en perchas) está relacionado tanto con la arquitectura de la inflorescencia que favorece dicho soporte como con el peso de estas aves (Pyke, 1981). Debido a su peso no pueden acceder a las flores mediante revoloteo como sí ocurre con frecuencia en los mosquiteros (*Phylloscopus*) al polinizar las flores (v.g. *Phylloscopus collybita* en *Anagryis foetida* y *S. sambucifolia*; *P. canariensis* en *S. calliantha*, Ortega-Olivencia & al., 2005, 2012).

Igualmente, indicar que en *S. trifoliata* se corroboran los resultados obtenidos en trabajos previos para otras especies de *Scrophularia* (véase Valtueña & al., 2013 y referencias) en cuanto al hecho de que sus polinizadores (insectos y aves) muestran un modo de visita que favorece la geitonogamia en detrimento de la xenogamia (véase más adelante). En inflorescencias verticales de tipo racimo simple con flores proteróginas se espera que los polinizadores realicen más descensos que ascensos en sus movimientos verticales a lo largo de las mismas, ya que se evitaría la transferencia de polen desde las

flores más basales (en estado masculino) a las más superiores (en estado femenino) e incrementarían las posibilidades de transferencia de dicho polen a otros individuos, es decir, lo contrario a lo que sucede en *S. trifoliata*. Sin embargo, tanto en nuestra especie como en otras del género, las inflorescencias no son simples sino compuestas (racimos de dicasios), lo que significa que en cada cima, sea basal, media o apical, pueden coexistir las dos fases sexuales (Valtueña & al., 2013).

ESTUDIO DE LAS MÁCULAS COROLINAS

Máculas como guías de néctar

Comportamiento de los polinizadores y éxito reproductivo

En general, las guías de néctar se definen como manchas, líneas, puntos o dibujos de un color distinto al que posee la corola y que, consecuentemente suelen contrastar con el color general de la misma. Se suelen localizar en lugares donde los insectos deben pecorear si quieren llegar al néctar (Sprengel, 1793; Penny, 1983). Dichas marcas, a veces invisibles al ojo humano, son altamente frecuentes en flores polinizadas por abejas, y muy inusuales en flores primariamente visitadas por otras clases de polinizadores (Richards, 1986). Por lo general, aunque tales guías son frecuentes en flores polinizadas por aves, no están en ellas usualmente tan definidas como en las de los insectos (Proctor & al., 1996) o bien están ausentes (Faegri & van der Pijl, 1979). Las dos grandes manchas existentes en la base interna del tubo de la corola de *S. trifoliata*, justo debajo del estaminodio, contrastan mucho respecto al color general de la misma; son manchas que aparecen a lo largo de todo el desarrollo de la flor, desde el botón floral hasta que la flor se marchita. En principio, podrían tipificarse, como guías de néctar; la cuestión está en hacia qué polinizadores están dirigidas.

En las dos poblaciones estudiadas la tasa de visita de avispas y abejorros a flores con máculas frente a las que no las tenían fue estadísticamente similar; incluso los abejorros preferían más a las flores sin máculas, y las avispas o bien preferían a las control (Laconi) o las visitaban por igual (Santu Lussurgiu). Esto podría indicar que dichas máculas no parecen estar diseñadas para estos insectos. Respecto al éxito reproductivo, sólo en la población de Laconi hubo diferencias con un bajo nivel de significación en el porcentaje de fructificación entre ambos tipos de flores, siendo mayor en el caso de las flores control. No hay que olvidar que en esta población fueron

los insectos los principales polinizadores, por lo que este resultado aparentemente incomprensible parece apoyar que dichas marcas no se han diseñado específicamente para los insectos.

Los insectos pueden presentar comportamientos diferentes frente a flores que exhiben o no en sus corolas señales que actúan como guías de sus recompensas. Así, en especies polinizadas por insectos muy especializados como el de *Lapeirousia oreogena* (*Prosoeca* sp., Nemestrinidae, Diptera, Hansen & al., 2012) o el de *Rudbeckia hirta* y *R. fulgida* (diversos grupos como Scoliidae, Apidae, Halictidae, Syrphidae, entre otros, Horth & al., 2014) la ausencia de tales guías provocaba que los insectos no visitaran las flores. Sin embargo, en *Cistus ladanifer*, visitada por una gran variedad de polinizadores generalistas, no hubo diferencias en el éxito reproductivo entre las dos variedades de la especie, var. *maculatus* (con manchas en sus pétalos) y var. *ladanifer* (sin ellas) lo que reflejaría la indiferencia de los polinizadores en la elección de uno u otro tipo de flor (Guzmán & al., 2011). En el caso de *S. trifoliata*, la falta mayoritaria de discriminación entre las flores podría deberse a que los insectos no tienen la misma percepción visual que los humanos (Chittka & Raine, 2006). Tanto avispas como abejorros poseen fotorreceptores para la luz UV que les permiten ver en un rango de longitud de onda comprendido entre c. 550 nm y c. 328 nm (Peitsch & al., 1992; Briscoe & Chittka, 2001), por lo que en su guía hacia la recompensa floral pueden estar influyendo caracteres visuales que no percibimos nosotros. De hecho, en *S. umbrosa*, con un sistema de polinización “avispa”, se demostró que su corola refleja la luz UV en su labio inferior y la absorbe en la zona superior de la misma, lo cual facilita la detección de sus flores (Brodmann & al., 2012). En las flores de *S. trifoliata* podría existir también un patrón de color imperceptible al ojo humano que posea mayor importancia que las máculas para su percepción por parte de los insectos.

También se sabe que en la detección de las señales de la flor hay un proceso de aprendizaje y memorización de las mismas por los insectos. Por ejemplo, las abejas aprenden y memorizan las señales sensoriales de las flores que pecorean asociándolas con la recompensa ofrecida, lo que les permite el seguimiento de una especie en particular en el campo (Giurfa, 2007; Reser & al., 2012). El aprendizaje y la memoria son la base misma de la constancia de los insectos en sus visitas a las flores siempre que dicha oferta sea rentable (Chittka & al., 1999). Leonard & Papaj (2011), con flores artificiales y Horth & al. (2014), con flores reales, demostraron que un cambio de patrón

en las guías de néctar puede mostrar su efecto varios días después de recibir la primera visita, dependiendo del tiempo que tardan en aprender dicho cambio. En este sentido, en nuestro caso podría haber ocurrido que no hubiera existido la posibilidad para los insectos de discernir entre ambos tipos de flores (con y sin máculas) por el hecho de que estuvieran contiguas y próximas, unido al comportamiento de los polinizadores que suelen realizar numerosos movimientos en el mismo verticilo de la inflorescencia.

Las máculas de *S. trifoliata* son de gran tamaño y coloración llamativa, contrastando con el ya de por sí llamativo color de la corola. Efectivamente, las máculas, hasta de 7 x 6 mm, se sitúan detrás de las gotas de néctar y son de color rojizo o rojizo-purpúreo, rodeadas de una banda negruzca ancha, un color intenso que podría ser llamativo para las aves. Desgraciadamente, no se pudieron realizar observaciones de visitas de estos animales a flores C y SM. En fechas recientes, se ha demostrado que los néctares coloreados crean una señal visual para atraer o repeler principalmente a los vertebrados (Hansen & al., 2007). Esto se demostró con el néctar violáceo oscuro de *Leucosceptrum canum* (Lamiaceae) consumido, entre otros, por *Minla cyanouroptera* y *Zosterops palpebrosa*, sus dos principales especies de aves polinizadoras (Zhang & al., 2012), o el marrón oscuro de *Aloe vryheidensis* (Asparagaceae) cuyos polinizadores principales son dos paseriformes africanos (*Pycnonotus barbatus* y *Zosterops lateralis*, Johnson & al., 2006). Estas señales reales de presencia de néctar por el color incrementan la eficacia de la polinización y se han asociado con: (1) la polinización por vertebrados, (2) la insularidad (aislamiento en un hábitat) y/o (3) las grandes altitudes (Hansen & al., 2007). En el caso de *S. trifoliata*, donde se dan algunos de esos parámetros, al no tratarse de un néctar coloreado las máculas pueden estar jugando un doble papel, al actuar como una señal honesta o engañosa dependiendo de que la flor disponga o no de recompensa. Futuros experimentos involucrando a los vertebrados podrían despejar si dichas máculas están diseñadas para ellos.

Estudio histológico de las máculas

Histológicamente, la zona de la corola donde se encuentran no muestra ninguna característica especial o diferencial con el resto de la misma. Dichas manchas desaparecen con facilidad tras conservar las flores en alcohol o tras el prensado de las flores, incluso trascurrido tan solo un mes de ello; esto último explicaría la ausencia de referencia alguna a ellas en las descripciones taxonómicas que normalmente se basan en

material de herbario. Por la misma razón, debe pensarse que son muy superficiales y que contendrían compuestos de la familia de los flavonoides que se localizan generalmente disueltos en las vacuolas de las células epidérmicas como metabolitos secundarios (Kay & al., 1981). Desde luego, la ausencia de estomas en las células epidérmicas de dichas máculas elimina cualquier posibilidad de que estuvieran involucradas en la secreción de néctar, algo esto último que se lleva a cabo a través del nectario anular situado en la base del ovario.

En la zona corolina de las máculas no se observó histológicamente ningún carácter que pudiera relacionarse con la atracción de los polinizadores, v.g. células cónicas que aparecen en la epidermis externa de la corola en especies entomófilas de *Antirrhinum* (Whitney & al., 2009). La elevada presencia de tricomas glandulares en la parte externa de la corola podría ser el motivo de que las células epidérmicas no presenten dicha morfología cónica. Aunque en *S. trifoliata* la función de estos tricomas aún se desconoce, para otras como *Penstemon albidus* y *P. tubaeiflorus* (Plantaginaceae) con este tipo de pelos en el interior de su corola, se relacionaron con la exclusión de los ladrones de néctar (Kampny, 1995).

SISTEMA DE REPRODUCCIÓN

Muchas plantas con flores hermafroditas desarrollan estrategias florales de cara a impedir la autopolinización, como la separación temporal de la maduración de los órganos sexuales o dicogamia (Barrett, 2003; Routley & Husband, 2006). En *S. trifoliata* la protoginia de sus flores evita o dificulta en gran medida la autofecundación, como sucede en otras especies de *Scrophularia* ibéricas o marroquíes (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b, 1998), macaronésicas (Dalgaard, 1979) o norteamericanas (Shaw, 1962). Este hecho se constata, en nuestro caso, porque la fructificación tras polinización natural o geitonógama fue similar y significativamente mayor a la producida en los individuos de autopolinización espontánea. En este último caso, la escasa fructificación producida pudo ser causada por el propio embolsado que posibilitara el roce entre los órganos sexuales de las flores con la bolsa de nylon que las aislaba, algo bastante probable debido al potente viento Mistral que de manera continua azota la isla. En general, la dicogamia es un fenómeno generalizado en angiospermas, habiendo sido constatada su presencia en unas 144 familias, entre ellas la de las Scrophulariaceae (Bertin & Newman, 1993), lo que sin lugar a dudas evidencia su importante papel en las

estrategias de reproducción para evitar o disminuir la autogamia.

Al igual que ocurre en algunas especies macaronésicas del género (Dalgaard, 1979), la proteroginia de *S. trifoliata* se acompaña de otro mecanismo floral encaminado a evitar la autopolinización, la hercogamia, ya que el estilo es mucho más largo que los estambres, por lo que es prácticamente imposible que el polen contacte con el estigma. Un comportamiento similar aparece también en *S. sambucifolia* y en menor medida en *S. grandiflora* (observ. pers.). Por el contrario, en otras especies (v.g. *S. peregrina*, *S. arguta* o *S. nodosa*, Shaw, 1962; Dalgaard, 1979; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b) no siempre se produce la curvatura del estilo sobre el labio inferior de la corola por lo que los estigmas se sitúan al mismo nivel que las anteras abiertas; de esta forma se favorece la autofecundación, con lo que la protoginia de sus flores no es totalmente efectiva.

La baja producción de frutos tras ApE no sólo indica la efectividad de la proteroginia en *S. trifoliata*, sino también su total dependencia de los polinizadores, insectos y aves, en el éxito de la reproducción sexual.

El alto porcentaje de fructificación obtenido tras PGM pone de manifiesto la AC de esta especie, como ocurre en la mayoría de las estudiadas hasta ahora en el género (Shaw, 1962; Dalgaard, 1979; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b); hasta la fecha solo se conoce un caso de AI (e.g. *S. fontqueri*, Ortega-Olivencia & Devesa, 1998). Es de resaltar que en las dos poblaciones estudiadas el porcentaje de fructificación tras polinización geitonógama o fue significativamente mayor que el de los controles (Laconi: 79,79 PGM vs 65,87 C), o ambos fueron similares (Santu Lussurgiu: 79,97 PGM vs 80,98 C), evidenciándose que *S. trifoliata* es altamente AC. Precisamente, esta alta compatibilidad favorece la geitonogamia al presentarse al mismo tiempo numerosas flores abiertas en estado masculino y femenino a lo largo de la inflorescencia (dicogamia asincrónica); estas flores son igualmente susceptibles de ser visitadas ya que ambas producen cantidades de néctar similares (Rodríguez-Riaño & al., 2014). Además, la mayoría de las plantas de esta especie presentan varias inflorescencias maduras por individuo al mismo tiempo. Por lo tanto, y como en otras especies del género (Dalgaard, 1979; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b), la dicogamia asincrónica no puede evitar la geitonogamia por muy eficaz que sea la protoginia intrafloral que presenta.

Al no haber realizado un seguimiento del porcentaje de flores femeninas respecto al de masculinas a lo largo de la inflorescencia y durante todo el período de

floración no se puede saber realmente cuál es el potencial geitonógamo de la especie aunque presumiblemente este debe ser alto. Esto viene avalado porque mientras que los porcentajes de fructificación se acercan al 80 %, los de formación de semillas no superan el 50 % y, aunque esto puede ser debido a múltiples causas (Stephenson, 1981; Wiens, 1984; Lee, 1988; Charlesworth, 1989), la consanguinidad producida por la geitonogamia tiene un papel importante y puede ser la causante de esta pérdida de éxito reproductivo. Los efectos de la consanguinidad parecen ser más acusados en la población de Laconi donde, con una elevada densidad de individuos muy próximos entre sí (c. 100 en unos 144 m²), la producción de semillas en las plantas control no fue significativamente diferente a la generada en los individuos geitonógamos. Probablemente, muchos de dichos individuos estuvieran genéticamente muy relacionados.

Por otra parte, en la geitonogamia juega un papel importante el comportamiento de los polinizadores cuando visitan las inflorescencias (Devaux & al., 2014). En el caso de *S. trifoliata* dicho comportamiento, efectivamente, la favorece ya que los polinizadores, en su búsqueda del néctar ofrecido como principal recompensa floral, visitan en un solo vuelo diferentes flores de la inflorescencia mediante movimientos horizontales y verticales a lo largo de la misma.

La localización de los frutos en la inflorescencia no tuvo ningún efecto en la cantidad de semillas viables (bien conformadas) que estos presentaban ya que se obtuvo una producción similar al comparar la formación de semillas por fruto en los distintos verticilos. Este resultado podría ser una consecuencia de la arquitectura de la inflorescencia (racimo de dicasios) que posee un orden de apertura floral acrópeto, por lo que siempre existen flores nuevas en los distintos verticilos susceptibles de ser visitadas (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayuntamiento de Laconi** (2014) <http://comune.laconi.or.it/home.php>. [Fecha de consulta: 03/07/2014].
- Barth F.G.** (1991) *Insects and flowers. The biology of a partnership*. Princeton University Press. Princeton. New Jersey.
- Barrett S.C.H.** (2002) Sexual interference of the floral kind. *Heredity* 88: 154-159.
- Barrett S.C.H.** (2003) Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm

- and beyond. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 358: 991-1004.
- Bawa K.S. & P.A. Opler** (1975) Dioecism in tropical forest trees. *Evolution* 29: 167-179.
- Bertin R.I. & C.M. Newman** (1993) Dichogamy in angiosperms. *The Botanical Review* 59: 112-152.
- Briscoe A.D. & L. Chittka** (2001) The evolution of color vision in insects. *Annual Review of Entomology* 46: 471-510.
- Brodmann J., D. Emer & M. Ayasse** (2012) Pollinator attraction of the wasp-flower *Scrophularia umbrosa* (Scrophulariaceae). *Plant Biology* 14: 500-505.
- Charlesworth D.** (1989) Why do plants produce so many more ovules than seeds? *Nature* 338: 21-22.
- Chittka L. & N.E. Raine** (2006) Recognition of flowers by pollinators. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 428-435.
- Chittka L., J.D. Thomson & N.M. Waser** (1999) Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. *Naturwissenschaften* 86: 361-377.
- Dalgaard V.** (1979) Biosystematics of the Macaronesian species of *Scrophularia*. *Opera Botanica* 51: 1-64.
- de Vos O.C.** (1983) *Scrophularia nodosa*, adapted to wasp pollination? *Acta Botanica Neerlandica* 32: 345.
- Devaux C., C. Lepers & E. Porcher** (2014) Constraints imposed by pollinator behaviour on the ecology and evolution of plant mating systems. *Journal of Evolutionary Biology*, doi: 10.1111/jeb.12380.
- Dipartimento Specialistico Regionale Idrometeorologico** (2014) <http://www.sar.sardegna.it/publicazioni/notetecniche/nota2/pag004.asp>. [Fecha de consulta: 03/07/2014].
- Faegri K. & L. van der Pijl** (1979) *The principles of pollination ecology*. Pergamon. Oxford.
- Fiori A.** (1969) *Nuova flora analitica d'Italia* 2: 338. Edagricole. Bologna.
- Giurfa M.** (2007) Behavioral and neural analysis of associative learning in the honeybee: a taste from the magic well. *Journal of Comparative Physiology A* 193: 801-824.
- Guzmán B., E. Narbona & P. Vargas** (2011) Similar reproductive success of the two petal colour polymorphisms of *Cistus ladanifer* (Cistaceae). *Plant Biosystems* 145: 931-937.
- Hansen D.M., J.M. Olesen, T. Mione, S.D. Johnson & C.B. Müller** (2007) Coloured nectar: distribution, ecology, and evolution of an enigmatic floral trait. *Biological Reviews* 82: 83-111.
- Hansen D.M., T. van der Niet & S.D. Johnson** (2012) Floral signposts: testing the significance of visual 'nectar guides' for pollinator behaviour and plant fitness. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 634-639.
- Harder L.D., C.Y. Jordan, W.E. Gross & M.B. Routley** (2004) Beyond floriculture: The pollination function of inflorescences. *Plant Species Biology* 19: 137-148.
- Harder L.D. & P. Prusinkiewicz** (2013) The interplay between inflorescence development and function as the crucible of architectural diversity. *Annals of Botany* 112: 1477-1493.
- Hoffmann F. & M.M. Kwak** (2005) The vulnerability to pollinator species loss of plant species with various pollination syndromes and degrees of specialisation. In: Hoffmann F. (Ed.) *Biodiversity and pollination*, pp. 93-116. University of Groningen. Haren.
- Horth L., L. Campbell & R. Bray** (2014) Wild bees preferentially visit *Rudbeckia* flower heads with exaggerated ultraviolet absorbing floral guides. *Biology Open*:

BIO20146445.

- Johnson S.D., A.L. Hargreaves & M. Brown** (2006) Dark, bitter-tasting nectar functions as a filter of flower visitors in a bird-pollinated plant. *Ecology* 87: 2709-2716.
- Kampny C.M.** (1995) Pollination and flower diversity in Scrophulariaceae. *The Botanical Review* 61: 350-366.
- Kay Q.O.N., H.S. Daoud & C.H. Stirton** (1981) Pigment distribution, light reflection and cell structure in petals. *Botanical Journal of the Linnean Society* 83: 57-83.
- Klinkhamer P.G. & T.J. de Jong** (1993) Attractiveness to pollinators: a plant's dilemma. *Oikos* 66: 180-184.
- Lee T.D.** (1988) Patterns of fruit and seed production. In: Lovett Doust J. & L. Lovett Doust (Eds.) *Plant reproductive ecology, patterns and strategies*, pp. 179-202. Oxford University Press. New York.
- Leonard A.S. & D.R. Papaj** (2011) 'X' marks the spot: The possible benefits of nectar guides to bees and plants. *Functional Ecology* 25: 1293-1301.
- Linnaeus C.** (1759) *Systema Naturae*, ed. 10, 2: 1114. Impensis Laurentii Salvii. Holmiae.
- Mele G.** (1993) *Montiferru*. EdiSar. Cagliari.
- Navarro-Pérez M.L., J. López, M. Fernández-Mazuecos, T. Rodríguez-Riaño, P. Vargas & A. Ortega-Olivencia** (2013) The role of birds and insects in pollination shifts of *Scrophularia* (Scrophulariaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 239-254.
- Olesen J.M. & A. Valido** (2003) Lizards as pollinators and seed dispersers: an island phenomenon. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 177-181.
- Ollerton J. & L. Cranmer** (2002) Latitudinal trends in plant-pollinator interactions: are tropical plants more specialised? *Oikos* 98: 340-350.
- Ollerton J., L. Cranmer, R.J. Stelzer, S. Sullivan & L. Chittka** (2009) Bird pollination of Canary Island endemic plants. *Naturwissenschaften* 96: 221-232.
- Ollerton J., R. Winfree & S. Tarrant** (2011) How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120: 321-326.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993a) Floral rewards in some *Scrophularia* species (Scrophulariaceae) from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *Plant Systematics and Evolution* 184: 139-158.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993b) Sexual reproduction in some *Scrophularia* species (Scrophulariaceae) from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *Plant Systematics and Evolution* 184: 159-174.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993c) Revisión del género *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae) en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Ruizia* 11: 1-157. Monografías del Real Jardín Botánico de Madrid. CSIC. Madrid.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1998) Taxonomy and breeding system in a new species of *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae) from Morocco. *Botanical Journal of the Linnean Society* 128: 185-202.
- Ortega-Olivencia A., T. Rodríguez-Riaño, J.L. Pérez-Bote, J. López, C. Mayo, F.J. Valtueña & M.L. Navarro-Pérez** (2012) Insects, birds and lizards as pollinators of the largest-flowered *Scrophularia* of Europe and Macaronesia. *Annals of Botany* 109: 153-167.
- Ortega-Olivencia A., T. Rodríguez-Riaño, F.J. Valtueña, J. López & J.A. Devesa** (2005) First confirmation of a native bird-pollinated plant in Europe. *Oikos* 110: 578-590.

- Pacini E. & G.G. Franchi** (1984) Reproduction in Mediterranean plants. *Webbia* 38: 93-103.
- Peitsch D., A. Fietz, H. Hertel, J. de Souza, D.F. Ventura & R. Menzel** (1992) The spectral input systems of hymenopteran insects and their receptor-based colour vision. *Journal of Comparative Physiology A* 170: 23-40.
- Penny J.** (1983) Nectar guide colour contrast: a possible relationship with pollination strategy. *New Phytologist* 95: 707-721.
- Peruzzi L., F. Conti & F. Bartolucci** (2014) An inventory of vascular plants endemic to Italy. *Phytotaxa* 168: 1-75.
- Pignatti S.** (1982) *Flora d'Italia* 2: 536. Edagricole. Bologna.
- Proctor M., P. Yeo & A. Lack** (1996) *The natural history of pollination*. HarperCollins Publishers. London.
- Pyke G.H.** (1981) Why hummingbirds hover and honeyeaters perch. *Animal Behaviour* 29: 861-876.
- Rathcke B.** (1983) Competition and facilitation among plants for pollination. In: Real L. (Ed.) *Pollination Biology*, pp. 305-329. Academic Press. Orlando.
- Reser D.H., R.W. Witharanage, M.G. Rosa & A.G. Dyer** (2012) Honeybees (*Apis mellifera*) learn color discriminations via differential conditioning independent of long wavelength (green) photoreceptor modulation. *PLOS ONE* 7: e48577.
- Richards A.J.** (1986) *Plant breeding systems*. Unwin Hyman. London.
- Richardson I.B.K.** (1972) *Scrophularia* L. In: Tutin T.G., V.H. Heywood, N.A. Burges, D.H. Valentine, S.M. Walters & D.A. Webb (Eds.) *Flora Europaea* 3: 216-221. Cambridge University Press. Cambridge.
- Rivas Martínez S., A. Penas & T.E. Díaz** (2004a) *Biogeographic map of Europe*. Cartographic Service, University of León. León.
- Rivas Martínez S., A. Penas & T.E. Díaz** (2004b) *Bioclimatic map of Europe. Bioclimates*. Cartographic Service, University of León. León.
- Rivas Martínez S., A. Penas & T.E. Díaz** (2004c) *Bioclimatic map of Europe. Thermoclimatic belts*. Cartographic Service, University of León. León.
- Rodríguez-Riaño T., A. Ortega-Olivencia, J. López, J.L. Pérez-Bote & M.L. Navarro-Pérez** (2014) Main sugar composition of floral nectar in three species groups of *Scrophularia* (Scrophulariaceae) with different principal pollinators. *Plant Biology*, doi:10.1111/plb.12159.
- Rodríguez-Riaño T., F.J. Valtueña & A. Ortega-Olivencia** (2006) Megasporogenesis, megagametogenesis and ontogeny of the aril in *Cytisus striatus* and *C. multiflorus* (Leguminosae: Papilionoideae). *Annals of Botany* 98: 777-791.
- Routley M. & B. Husband** (2006) Sexual interference within flowers of *Chamerion angustifolium*. *Evolutionary Ecology* 20: 331-343.
- Schremmer F.** (1959) Die bestäuber der Blüten von *Scrophularia canina* L. und Beobachtungen über postflorale Nektarabsonderung. *Oesterreichische Botanische Zeitschrift* 106: 187-193.
- Shaw J.** (1962) The biosystematics of *Scrophularia* in western north America. *Aliso* 5: 147-178.
- Shore J.S. & S.C.H. Barrett** (1984) The effect of pollination intensity and incompatible pollen on seed set in *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). *Canadian Journal of Botany* 62: 1298-1303.

- Sprenkel C.K.** (1793) Discovery of the secret of nature in the structure and fertilization of flowers. In: Lloyd D.G. & S.C. Barrett (Eds.) *Floral Biology*, pp. 3-43. Chapman and Hall. New York. [Traducido al inglés by P. Haase en 1996].
- Stephenson A.G.** (1981) Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 12: 253-279.
- Stiefelhagen H.** (1910) Systematische und pflanzengeographische Studien zur Kenntnis der Gattung *Scrophularia*. Vorarbeiten zu einer Monographie. *Botanische Jahrbuecher fuer Systematik* 44: 406-496.
- Traveset A. & E. Sáez** (1997) Pollination of *Euphorbia dendroides* by lizards and insects: spatio-temporal variation in patterns of flower visitation. *Oecologia* 111: 241-248.
- Valsecchi F.** (1979) Observations sur quelques espèces du genre «*Scrophularia*» L. en Sardaigne. *Webbia* 34: 265-288.
- Valsecchi F.** (1982) Le Piante endemiche della Sardegna: 115-117. *Bollettino della Società Sarda di Scienze Naturali* 21: 427-441.
- Valtueña F.J., A. Ortega-Olivencia, T. Rodríguez-Riaño, J.L. Pérez-Bote & C. Mayo** (2013) Behaviour of pollinator insects within inflorescences of *Scrophularia* species from Iberian Peninsula. *Plant Biology* 15: 328-334.
- Valtueña F.J., T. Rodríguez-Riaño & A. Ortega-Olivencia** (2011) Ephemeral and non-ephemeral structures during seed development in two *Cytisus* species (Papilionoideae, Leguminosae). *Plant Biosystems* 145: 98-105.
- Vogel S., C. Westerkamp, B. Thiel & K. Gessner** (1984) Ornithophilie auf den Canarischen Inseln. *Plant Systematics and Evolution* 146: 225-248.
- Whitney H.M., L. Chittka, T.J. Bruce & B.J. Glover** (2009) Conical epidermal cells allow bees to grip flowers and increase foraging efficiency. *Current Biology* 19: 948-953.
- Wiens D.** (1984) Ovule survivorship, brood size, life history, breeding systems, and reproductive success in plants. *Oecologia* 64: 47-53.
- Zhang F.P., X.H. Cai, H. Wang, Z.X. Ren, Z. Larson-Rabin & D.Z. Li** (2012) Dark purple nectar as a foraging signal in a bird-pollinated Himalayan plant. *New Phytologist* 193: 188-195.

Capítulo 4

Composición de azúcares y análisis de la existencia de levaduras en el néctar de *Scrophularia*

RESUMEN

La principal recompensa floral ofertada por las especies de *Scrophularia* a los polinizadores es el néctar. Mientras que el volumen y concentración del mismo era conocido en unos 20 táxones, su composición de azúcares solo se había investigado hasta ahora en cuatro especies y en todas ellas era rico en sacarosa. La composición de azúcares en el género podría variar en función del sistema de polinización o del tipo de hábitat o, por el contrario, ser debido a restricción filogenética. Por otra parte, se sabe que la composición del néctar puede ser modificada por la presencia en él de comunidades de microorganismos y que estos utilizan a los polinizadores/visitadores florales como vectores de transmisión. En este capítulo se persigue analizar cuáles y cómo de abundantes son estos microorganismos en el néctar de *Scrophularia* a fin de establecer las posibles relaciones entre la composición de azúcares del mismo, tales microorganismos y sus vectores de transmisión. Para ello se investigaron tanto especies de flores grandes y vistosas (*S. grandiflora*, *S. sambucifolia*, *S. calliantha* y *S. trifoliata*) como otras de mediano tamaño y coloración apagada (*S. lyrata* y *S. scorodonia*), o de pequeño tamaño y color violeta (*S. canina*), con distintos sistemas de polinización. Los resultados indican que en todas las especies el néctar es alto en sacarosa, excepto en la macaronésica *S. calliantha*, donde es balanceado (porcentajes similares de sacarosa y hexosas); esto último podría deberse a que dicha especie presenta las mayores tasas de interacción con aves paseriformes. Dado que no existe correlación con el tipo de polinizadores principales, la composición de azúcares podría considerarse como un carácter taxonómico conservado. Además, para las especies de flores grandes existe sesgo sexual en el porcentaje de sacarosa que es mayor en la fase femenina de la flor. El análisis microbiano del néctar desveló una baja cantidad y diversidad de levaduras en las especies estudiadas, que son transferidas a dicho caldo azucarado a través de abejas, abejorros e incluso avispas, aspecto este último desconocido hasta ahora. La identificación de las levaduras, tanto desde el punto de vista morfológico como molecular, reveló que las especies del género *Metschnikowia* eran las más abundantes, pero sólo en *S. grandiflora* su presencia superó el 2 %. De esta forma, parece mínimo el papel de dichos microorganismos en el metabolismo de los azúcares del néctar en las especies analizadas.

ABSTRACT

The main floral reward offered by *Scrophularia* species to pollinators is the nectar. Whereas its volume and concentration are known in c. 20 taxa, its sugar composition was only investigated until now for four species and for all of them it was rich in sucrose. Sugar composition in this genus could vary depending on pollination system or type of habitat, or otherwise to be due to phylogenetic constraint. Moreover, it is known that nectar composition can be modified by the

presence of organism communities which use the pollinators/floral visitors as transmission vectors. In this chapter we pursue to analyze what and how abundant these microorganisms are within nectar of *Scrophularia*'s flowers and then, to establish possible relationships among sugar composition, such microorganisms and their transmission vectors. For this aim, we investigated species with large and showy (*S. grandiflora*, *S. sambucifolia*, *S. calliantha* and *S. trifoliata*), medium sized and dull (*S. lyrata* and *S. scorodonia*) and small and violet flowers (*S. canina*), with different pollination systems. The results indicate that in all species nectar is high in sucrose, except in the Macaronesian *S. calliantha* where is balanced (similar percentages of sucrose and hexoses); this latter could be due to this species has the highest interaction rates with passerine birds. Because of there is no correlation between the main pollinator group and nectar sugar composition, this character could be considered as a conservative taxonomic trait. In addition, for large flowers species there is gender bias in sucrose percentage, being higher in the female phase of flower. Microbial analysis of nectar revealed a low quantity and diversity of yeasts in the studied species which are transferred to nectar through bees, bumblebees and even wasps, this last aspect being unknown until now. The identification of yeasts, from both morphological and molecular point of view, revealed that species of genus *Metschnikowia* were the most abundant, but only in *S. grandiflora* their presence exceeded 2 %. Thus, the role of these microorganisms in the metabolism of sugars in the nectar of studied species seems to be minimal.

INTRODUCCIÓN

El néctar es mucho más que un líquido azucarado secretado por las plantas como recompensa para sus polinizadores. Además de actuar como atrayente para ellos por ser una importante fuente de energía, interviene en la modulación de su conducta durante sus visitas a las flores (Nepi & al., 2012). La composición química del néctar es muy compleja y entre sus principales componentes se encuentran agua, carbohidratos (azúcares), aminoácidos y proteínas, iones inorgánicos, antioxidantes, lípidos, compuestos volátiles (v.g. terpenoides), ácidos orgánicos, vitaminas y, a veces, compuestos tóxicos secundarios (v.g. sustancias fenólicas y alcaloides) (Nicolson & Thornburg, 2007). Muchos de estos compuestos aparecen en cantidades traza pero, sin duda, los solutos principales de la mayoría de los néctares son el disacárido sacarosa y los monosacáridos glucosa y fructosa, y sólo en algunos casos otros tipos, como maltosa, melibiosa, rafinosa, xilosa, lactosa, etc. (Nicolson & Thornburg, 2007).

Las variaciones en la composición del néctar entre plantas de la misma especie

pueden reflejar diferencias intrínsecas o respuestas a variaciones ambientales (Pacini & al., 2003; Petanidou, 2005), pero más difíciles de explicar son las variaciones encontradas entre flores de la misma planta o néctares de la misma flor, como ocurre en *Helleborus foetidus* (Herrera & al., 2006); por ello, son necesarios diseños de muestreo de néctar muy elaborados para detectar debidamente la variación posible dentro de una planta. A un nivel intraespecífico, dicha composición puede variar de acuerdo con la edad y/o estado sexual de las flores y su posición en la inflorescencia y en la planta (Pacini & Nepi, 2007; Nepi & al., 2012; Nocentini & al., 2012).

Según diversos autores, la composición del néctar varía de acuerdo con el tipo de polinizador y el ambiente (Baker & Baker, 1983; Pacini & Nepi, 2007; Nepi & al., 2012). Por ejemplo, el néctar de plantas polinizadas por colibríes, polillas y abejas de larga probóscide suele ser dominante en sacarosa, mientras que el de especies polinizadas por paseriformes, abejas de probóscide corta y murciélagos neotropicales lo suele ser en hexosas. Pero no siempre se ha demostrado tal correlación entre la composición de azúcares y el síndrome de polinización, por lo que algunos autores sugieren otros factores responsables, como por ejemplo constrictión filogenética (Galletto & Bernardello, 2003; Chalcoff & al., 2006; Nicolson & Thornburg, 2007) o factores abióticos, como el tipo de hábitat o la distribución geográfica (Davis, 2003; Nicolson & Thornburg, 2007; Nepi & al., 2012). Recientemente, se ha demostrado que factores bióticos, como la presencia de levaduras (Herrera & al., 2008, 2009, 2010; Pozo & al., 2009; Herrera & Pozo, 2010) u otros grupos de microbios (v.g. bacterias), también frecuentes en el néctar floral (Álvarez-Pérez & al., 2012; Fridman & al., 2012; Vannette & al., 2013), pueden modificar la composición de azúcares, así como la concentración del mismo.

Existen estudios que relacionan las variaciones en la composición química del néctar con la diferente identidad de los polinizadores (revisión en Nicolson & Thornburg, 2007), como himenópteros, coleópteros o dípteros, entre otros (Lachance & al., 2001a). Estos pueden ser importantes vehículos de transporte y dispersión de las levaduras que aparecen en los néctares florales (Brysch-Herzberg, 2004). Las levaduras tienen la capacidad de modificar el perfil original de azúcares mediante la hidrólisis del disacárido sacarosa en los monosacáridos glucosa y fructosa y/o por el consumo diferencial de monosacáridos (Canto & al., 2007 y referencias).

Uno de los grupos de levaduras mejor estudiados de los sistemas mutualistas

establecidos entre ellas y los animales es el género ampliamente distribuido *Metschnikowia* (Saccharomycetales, Metschnikowiaceae / clado *Metschnikowia*) (Suh & al., 2006), cuya mayoría de especies están asociadas a angiospermas y a sus polinizadores. Recientemente, un interesante trabajo sobre *Metschnikowia* ha demostrado que la diversificación de este clado probablemente se desencadenó en el Eoceno temprano, cuando muchos de sus potenciales hospedadores, como las rósidias, astéridas o las cariofiláceas, ya contaban con una amplia distribución (Guzmán & al., 2013). Concretamente, siete de sus especies son capaces de crecer en ambientes con alta concentración de azúcares, como el néctar (Giménez-Jurado & al., 2003; Brysch-Herzberg, 2004; Peay & al., 2012). No es una casualidad que dentro de la comunidad de levaduras nectarívoras raramente se encuentren basidiomicetos, ya que los néctares son hábitats que favorecen a las especies fermentativas, osmotolerantes y copiotróficas, como ocurre con la mayoría de las levaduras del orden Saccharomycetales (Lachance, 2006).

El presente trabajo se centra en el estudio de la composición de azúcares del néctar y de la posible comunidad de levaduras albergadas en él en dos especies del género *Scrophularia*, *S. sambucifolia* y *S. grandiflora*, la primera endémica del SW de la Península Ibérica y NW de África y la segunda del CW de Portugal (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a). Un análisis menos exhaustivo se realizó en dos especies insulares con el mismo sistema de polinización, *S. calliantha* (isla de Gran Canaria) y *S. trifoliata* (islas del mar Tirreno) (Ortega-Olivencia & al., 2012). Otras tres especies con diferente sistema de polinización y más amplia distribución, *S. lyrata*, *S. scorodonia* y *S. canina* (Navarro-Pérez & al., 2013), fueron igualmente analizadas con fines comparativos.

Todas las especies estudiadas poseen las características florales típicas del género, con flores zigomorfas y hermafroditas, reunidas en cimas dicasiales formando inflorescencias racemosas (Ortega-Olivencia, 2009). La corola es más o menos tubular-urceolada y bilabiada, con el labio superior bilobulado y el inferior trilobulado, rara vez subrotácea (*S. calliantha*). El androceo posee cuatro estambres adnatos a la base del labio inferior de la corola y un estaminodio representado por un órgano más o menos desarrollado, excepto en *S. canina* donde es linear e inconspicuo. El gineceo, bicarpelar, consta de un largo estilo que remata en un estigma que madura típicamente antes que el androceo y una vez polinizado sufre una incurvación sobre el lóbulo central del labio

inferior, comenzando en ese momento a desplegarse los estambres. Por tanto, poseen proteroginia. Como resultado de la desigual maduración en el tiempo de los órganos sexuales las flores se comportan como funcionalmente unisexuales, siendo normalmente más longeva la función masculina, que posee una maduración secuencial de los estambres (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b).



Figura 1. Aspecto del interior de una flor de *S. grandiflora* mostrando gineceo, disco nectarífero y néctar.

La principal recompensa que ofertan las flores de *Scrophularia* a los polinizadores es el néctar, el cual es secretado por un nectario anular situado en la base del ovario (Fig. 1), pero fácilmente visible desde el exterior en la mayoría de las especies. Dicho néctar se almacena justo debajo del estaminodio, en la mayoría de los casos en forma de gotas que recuerdan a dos ojos, al menos en las especies con corolas grandes,

pero que normalmente terminan uniéndose. A la vez, esta posición evita el contacto con los estambres que se encuentran enrollados en la base del labio inferior y, por ende, evita que sus anteras se humedezcan (Fulton, 1886). En las especies iberobaleáricas la mayor producción de néctar (expresado como volumen y peso de azúcares) ocurre en la sect. *Scrophularia*, siendo escasa en la sect. *Caninae*. Además, por lo general, las flores en fase femenina producen mayores volúmenes de néctar/día que cuando están en fase masculina (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b).

Estudios previos en las especies iberobaleáricas de *Scrophularia* mostraron una correlación positiva entre el volumen de néctar floral y el tamaño de la corola (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b). Sin embargo, hasta la fecha son muy escasas las especies en las que se ha estudiado la composición de azúcares del néctar (v.g. *S. nodosa*, *S. vernalis*, Percival, 1961; *S. smithii*, Dupont & al., 2004; *S. umbrosa*, Brodmann & al., 2012). En todas ellas el néctar presentaba niveles altos de sacarosa. En un trabajo reciente de nuestro grupo de investigación se han confirmado los mismos azúcares predominantes en una serie de especies analizadas, tanto de flores grandes (*S. sambucifolia*, *S. grandiflora*, *S. trifoliata*) o medianas (*S. lyrata*, *S. scorodonia*) como pequeñas (*S. canina*, *S. frutescens*) y su relación con diversos parámetros florales (Rodríguez-Riaño & al., 2014).

Las especies de flores grandes y vistosas poseen un sistema de polinización mixto entre vertebrados e insectos (*S. sambucifolia*, *S. grandiflora*, *S. trifoliata* y *S. calliantha*) (Ortega-Olivencia & al., 2012); concretamente en las dos primeras especies los principales polinizadores fueron abejas, abejorros y avispas, en tanto que en la especie canaria, *S. calliantha*, los principales fueron aves paseriformes, como los mosquiteros, interviniendo también, aunque con un papel secundario individuos juveniles del lagarto canario (Ortega-Olivencia & al., 2012). Y para *S. trifoliata* tanto vertebrados como invertebrados podrían considerarse sus polinizadores fundamentales (véase capítulo dedicado a esta especie). Las especies de flores medianas (*S. lyrata* y *S. scorodonia*) poseen un sistema de polinización por insectos, siendo los principales polinizadores las avispas, así como abejorros en el caso de *S. scorodonia* (Valtueña & al., 2013; Rodríguez-Riaño & al., 2014); las de flores pequeñas (*S. canina*, *S. frutescens*) poseen un sistema de polinización por sírfidos, así como por pequeñas abejas (Valtueña & al., 2013; Rodríguez-Riaño & al., 2014).

Con esos antecedentes, los objetivos que se persiguen en este capítulo son los siguientes:

1. Conocer la composición de azúcares del néctar en las especies de Scrophularia de flores más grandes y llamativas del Mediterráneo y Macaronesia, y su comparación con la de otras especies de flores menos vistosas y de menor tamaño (*S. lyrata*, *S. scorodonia* y *S. canina*).
2. Investigar si en dicho néctar se desarrollan levaduras que pudieran estar involucradas en el metabolismo de los azúcares. En caso afirmativo, comprobar en qué densidad y diversidad se encuentran, así como la relación del insecto que visita las flores como posible vector de transporte de dichos microorganismos. Dado que las avispas son polinizadores importantes en muchas de las especies, se persigue también averiguar si actúan como transmisores de dichos microorganismos.

MATERIAL Y MÉTODOS

ESPECIES Y POBLACIONES ESTUDIADAS

Las especies focales de este capítulo son *S. sambucifolia*, *S. grandiflora*, *S. trifoliata* y

S. calliantha, las cuales comparten una serie de caracteres morfológicos que las distinguen dentro del género *Scrophularia*. Presentan flores de gran tamaño (12-16,5 mm de longitud media), vistosamente coloreadas de rojo, naranja o rojizo-amarillento, además de una gran producción de néctar (entre 17 y 51,7 μ l). *S. calliantha* es la especie con características florales más desviantes, debido a que posee una corola prácticamente subactinomorfa.

Respecto a su distribución y ecología, *S. sambucifolia* es un endemismo iberonorteafricano que habita preferentemente en suelos profundos de naturaleza margosa o caliza, junto a cunetas y riberas de ríos y arroyos, desde el nivel del mar hasta los 1.300 m (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a; Ortega-Olivencia, 2009), mientras que *S. grandiflora* es endémica del CW de Portugal (Beira Litoral) y aparece en sitios más o menos sombríos y húmedos, muros, taludes herbosos, bordes de caminos y carreteras, a unos 400-500 m (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a; Ortega-Olivencia, 2009). En relación a las especies insulares, *S. calliantha* es endémica de la isla de Gran Canaria donde vive sobre paredes húmedas, normalmente colonizando grietas o fondos de barrancos poco profundos con humedad más o menos permanente, desde 600 a c. 1.600 m (Navarro & al., 2004), mientras que *S. trifoliata* es un endemismo de las islas del mar Tirreno (Córcega, Cerdeña e isla de Gorgona), propia de lugares abrigados y húmedos en zonas montanas y submontanas (Valsecchi, 1979).

S. lyrata, *S. scorodonia* y *S. canina* poseen flores poco llamativas y de menor tamaño. Específicamente, las dos primeras tienen flores de mediano tamaño (v.g. 6-12 mm), de color apagado, predominantemente púrpura-verdoso o púrpura y marrón, y una moderada producción de néctar (entre 1 y 10 μ l). La última, *S. canina*, presenta corolas violetas de exiguo tamaño (menos de 6 mm) (Ortega-Olivencia, 2009) y muy baja producción de néctar (inferior a 1 μ l) (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b). Este grupo de especies muestra una distribución más amplia que las anteriores. *S. lyrata* es una especie higrófila propia de bordes de cursos de agua tranquilos, lagunas, acequias, fuentes y zonas encharcadas en general, desde el nivel del mar hasta 2.000 m, con distribución en la Península Ibérica, Baleares, Cerdeña, Sicilia, Creta y NW África (Ortega-Olivencia, 2009). *S. scorodonia* generalmente habita en sotobosques de alisedas, castañares, alcornocales, robledales, bordes de ríos, márgenes húmedos de prados, junto a tapias, etc., desde el nivel del mar hasta los 1.750 m, y está presente en el W y el SW de Europa, Macaronesia y el NW de Marruecos. Por último, *S. canina*,

subnitrófila y heliófila, ocupa lugares perturbados, como bordes de caminos, carreteras, márgenes de arroyos, etc., así como suelos arenosos tanto del interior como de zonas costeras y aparece desde el nivel del mar hasta los 1.500 m. Se distribuye por el S y C de Europa, S de Rusia, N de África, Anatolia, NW de Irán y S de Asia (Himalaya occidental) y se encuentra naturalizada en Gran Bretaña (Ortega-Olivencia, 2009).

La localización geográfica y el número de poblaciones estudiadas en cada especie se recogen en la figura 2, indicándose resumidamente sus características ecológicas en la Tabla 1.

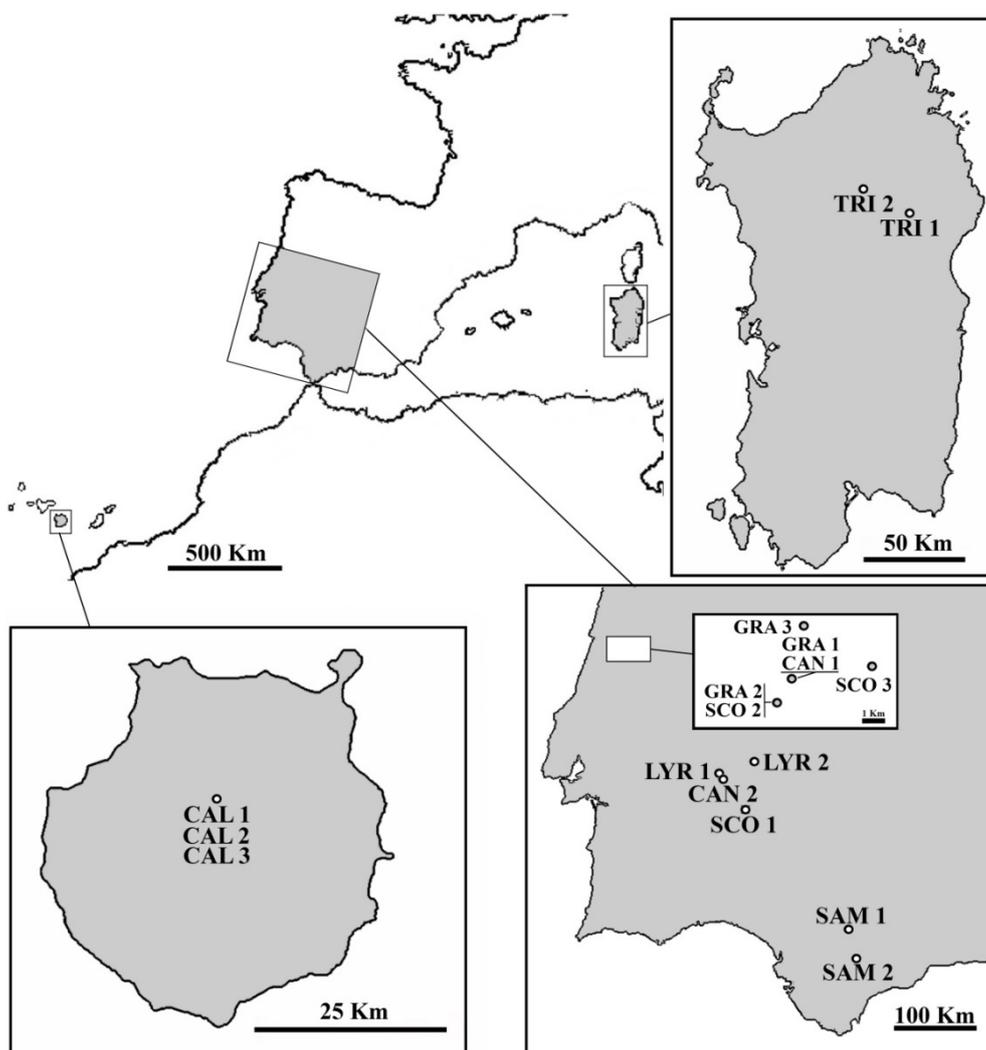


Figura 2. Poblaciones estudiadas de las especies de *Scrophularia*. *S. calliantha*: CAL1, Presa de Hornos; CAL2, Canal de la Mina; CAL3, Barranquillo de Juan Francés. *S. canina*: CAN1, Rabaçal; CAN2, San Jorge de Alor. *S. grandiflora*: GRA1, Rabaçal; GRA2, Pombalinho; GRA3, Zambujal. *S. lyrata*: LYR1, Olivenza; LYR2, ribera de Guadajira. *S. sambucifolia*: SAM1, Morón de la Frontera; SAM2, El Gastor. *S. scorodonia*: SCO1, Valle de Matamoros; SCO2, Pombalinho; SCO3, Penela. *S. trifoliata*: TRI1, Bitti; TRI2, Pattada.

Tabla 1. Localización geográfica y características ecológicas de las poblaciones estudiadas.

Sp	Población	Altitud (m)/Sustrato	Ecología
<i>S. grandiflora</i>	GRA1: Rabaçal (Por, Coimbra)	199 / calizo-margoso	Borde de carretera, herbazal antropizado y matorral mediterráneo
	GRA2: Pombalinho (Por, Coimbra)	280 / calizo-margoso	Huerta y pastizal con restos de elementos arbóreos mediterráneos
	GRA3: Zambujal (Por, Coimbra)	175 / calizo-margoso	Borde de carretera, herbazal antropizado y matorral mediterráneo
<i>S. sambucifolia</i>	SAM1: Morón de la Frontera (Esp, Sevilla)	228 / margo-calizo	Borde de carretera y cultivo de olivos
	SAM2: El Gastor (Esp, Cádiz)	454 / calizo	Herbazal de margen de carretera y cultivo cerealista entremezclado con matorral mediterráneo
	SAM3: Olvera (Esp, Cádiz)	480 / calizo	Herbazal y matorral mediterráneo
<i>S. calliantha</i>	CAL1: Presa de Hornos (Esp, Las Palmas)	1.475 / riolitas y traquitas	Borde de presa, con matorral y bosque de pino canario
	CAL2: Canal de la Mina (Esp, Las Palmas)	1.500 / riolitas y traquitas	Márgenes de canal, con saucedas y matorral de genisteas
	CAL3: Barranquillo de Juan Francés (Esp, Las Palmas)	880 / basáltico	Bosque en galería
<i>S. trifoliata</i>	TRI1: Bitti (It, Nuoro)	608 / granítico, esquistoso	Bosque mixto de encinas y robles, cerca de ribera, muros y bordes de carretera
	TRI2: Pattada (It, Sassari)	656 / granítico, esquistos	Herbazal húmedo en terraplén de la carretera
<i>S. lyrata</i>	LYR1: Olivenza, charca de Ramapallas (Esp, Badajoz)	250 / cuarcítico	Herbazal de ribera, con juncos y espadañas
	LYR2: ribera de Guadajira (Esp, Badajoz)	185 / silíceo	Vegetación de ribera
<i>S. scorodonia</i>	SCO1: Valle de Matamoros (Esp, Badajoz)	595 / pizarroso y cuarcítico	Castañar
	SCO2: Pombalinho (Por, Coimbra)	298 / calizo-margoso	Huerta y pastizal con restos de elementos arbóreos mediterráneos
	SCO3: Penela (Por, Coimbra)	280 / calizas	Bosque y matorral mediterráneo
<i>S. canina</i>	CAN1: Rabaçal (Por, Coimbra)	199 / calizo-margoso	Borde de carretera, herbazal antropizado y matorral mediterráneo
	CAN2: San Jorge de Alor (Esp, Badajoz)	400 / calizo	Olivar, bosque y matorral mediterráneo

Esp = España; It = Italia, Por = Portugal

MÉTODOS DE CAMPO Y DE LABORATORIO

De acuerdo con los objetivos planteados, durante el periodo de floración de las especies se han llevado a cabo dos tipos de experimentos en sendos grupos de individuos muestreados/especie: (1) en un primer grupo se analizó la composición de azúcares del néctar en todas las especies durante 2009 y 2010, utilizándose para ello 182 muestras de néctar procedentes de flores aisladas de los polinizadores y se anotaba el estado sexual de cada flor (véase apartado de Composición de Azúcares del Néctar); (2) en un segundo grupo se realizaron experimentos centrados en averiguar si en el néctar existían comunidades de microorganismos, concretamente levaduras, que pudieran influir en dicha composición de azúcares, teniendo en cuenta el tipo de insecto visitador de las flores y que pudiera ser el posible transportador de dichos microorganismos (véase apartado Análisis Microbiano del Néctar). Uno de los experimentos, enfocado en conocer la ocurrencia de levaduras en el mismo, se efectuó durante 2010, 2011 y 2012 en *S. sambucifolia* y *S. grandiflora*. Para las especies insulares, *S. calliantha* y *S. trifoliata*, sólo se contó con las muestras recolectadas durante una excursión de una semana de duración por especie en el año 2010. Por último, para *S. lyrata* se tomaron muestras durante los años 2011 y 2012 y únicamente durante 2012 para *S. scorodonia* y *S. canina* (véase subapartado Densidad estimada de células de levaduras). El análisis dirigido a conocer la diversidad de levaduras se desarrolló durante el último año (2012) en *S. sambucifolia*, *S. grandiflora* y *S. lyrata*, las únicas especies en cuyo néctar crecieron colonias de levaduras tras ser sembrado en un medio de cultivo (véase subapartado Diversidad de levaduras). El análisis de la composición del néctar con presencia de levaduras y procedente de flores visitadas por insectos tuvo lugar durante el año 2011 (véase subapartado Composición de azúcares en el néctar de flores visitadas).

Para la toma de muestras se contó con el apoyo de los miembros del grupo de investigación al que pertenezco.

COMPOSICIÓN DE AZÚCARES DEL NÉCTAR

Se seleccionaron mayoritariamente 2 individuos/población (rango 1-3, excepto en la población Presa de Hornos de *S. calliantha* donde se seleccionaron 4 individuos) cuyas flores (en general 4) tanto en estado femenino como masculino (2 flores por fase sexual y por individuo) eran embolsadas la tarde previa al estudio. Al día siguiente, empleando micropipetas graduadas se extraía el néctar de las flores y se depositaba una pequeña

alícuota de volumen y concentración conocidos en papel Whatman nº 1 y, este a su vez protegido dentro de una placa de Petri, se congelaba hasta el posterior análisis de la composición de azúcares. Para el caso de *S. canina*, debido a la exigua cantidad de néctar que producían sus flores, se tuvo que mezclar el de varias flores por planta.

Los principales tipos de azúcares (sacarosa, fructosa y glucosa) del néctar se analizaron mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) desarrollada a una tasa de flujo de 1,8 ml/minuto en una columna de carbohidratos Zorbax-NH₂, con acetonitrilo-agua (75:25) como eluyente. Dichos análisis se llevaron a cabo en el Centro Tecnológico Agroalimentario de Extremadura, el cual se encuentra equipado de bomba cuaternaria, degasificador, muestreador automático, compartimento de termostatación de columna y detector del índice de refracción.

De acuerdo con la recomendación de Nicolson & Thornburg (2007) en este trabajo no se usará el cociente sacarosa/hexosas empleado por Baker & Baker (1990), sino que se expresarán los azúcares como porcentajes del azúcar total. Igualmente, en adelante se denominará “néctar balanceado” a aquel que contenga similares porcentajes de sacarosa y de hexosas.

ANÁLISIS MICROBIANO DEL NÉCTAR

Para el análisis microbiano se tomaron muestras de néctar a diferentes horas del día, a un ritmo de 2 a 6 días por mes, no excediendo de 15 días la visita a las poblaciones naturales de cada especie. El estudio se llevó a cabo durante los meses de floración de las especies: marzo-abril en *S. sambucifolia*; marzo-mayo para *S. grandiflora* y *S. lyrata*; mayo para *S. scorodonia*; mayo-junio para *S. canina*. Se emplearon tres días en cada población cuando las flores debían dejarse embolsadas 48 horas tras la visita del insecto (véase más adelante). En el caso de las especies insulares únicamente se recolectaron muestras de néctar del 29 de abril al 5 de mayo para *S. calliantha* y del 10 al 16 de mayo para *S. trifoliata*, coincidiendo con sendas excursiones a las islas.

Cada muestra de néctar, extraída con especial cuidado de no dañar el nectario o contaminar el néctar con polen, se dividió a su vez en tres submuestras, siempre que fue posible. La primera se utilizó para comprobar la presencia de levaduras en el néctar y, en caso afirmativo, calcular su nivel de ocurrencia (véase subapartado Densidad estimada de células de levaduras). La segunda era cultivada con el fin de identificar la

biodiversidad microbiana existente (véase subapartado Diversidad de levaduras) y la tercera fue empleada para conocer la composición de azúcares (véase subapartado Composición de azúcares en el néctar de flores visitadas).

El muestreo fue sometido a diferentes tratamientos. Mediante el previo embolsado de los individuos, se pudo distinguir entre flores no visitadas (o control), incluido botones florales *vs* flores a las que se les permitió una única visita por parte de los visitantes; en este último caso, se anotaba el tiempo de dicha visita y se diferenciaba entre polinizadores siempre que era posible (véase Apartado Observación de visitantes florales). Únicamente se anotaban aquellas visitas en las que el insecto contactaba con el néctar. Posteriormente, las flores se aislaban de los polinizadores mediante unos sencillos “capuchones caseros” a modo de dedal, fabricados con trozos de papel del tamaño de las corolas y cinta adhesiva, los cuales no interferían en el contexto natural de la planta; se evitaba así una segunda visita en las flores ya inspeccionadas y se permitía la visita del resto. Finalmente y con el fin de permitir la multiplicación de las levaduras, las plantas se reembolsaban durante 6, 24 y 48 horas, transcurridas las cuales se recogían las muestras de néctar; en este punto hay que indicar que no siempre fue posible recolectar, con el paso de las horas, el néctar de todas las flores visitadas ya que muchas de ellas perdían su corola (caso de las masculinas) o este adquiría una densidad tal que su extracción era imposible.

Durante el último año de estudio (2012), también se tomaron muestras al azar de flores de plantas que nunca fueron embolsadas, estando así expuestas a indefinidas visitas y, por ende, a la potencial colonización por parte de levaduras.

El número de muestras recolectadas por día para los diferentes experimentos dependió del número de flores presentes en cada individuo seleccionado y siempre se anotaba el estado sexual de la flor (femenino o masculino).

Densidad estimada de células de levaduras

La primera submuestra, de al menos 5 μ l de néctar (en algunos casos menor de 5 debido a la abundancia de visitas o a la evaporación por las altas temperaturas), se depositaba en viales de microcentrífuga esterilizados de 0,2 ml y se le añadían 5 μ l de azul de lactofenol al 25-60 % para facilitar la detección posterior de levaduras al microscopio óptico (MO) (de Vega & al., 2009; Herrera & al., 2009).

En el laboratorio se estimaba la densidad de células (células/ μl) directamente mediante una cámara de Neubauer por el método de conteo estándar de células con ayuda del MO a 400X (Boundy-Mills, 2006). Brevemente, la cámara de Neubauer es

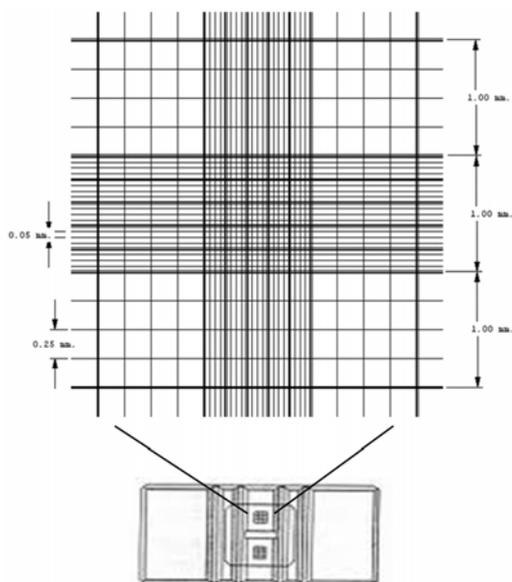


Figura 3. Cámara de recuento de células utilizada en este estudio. Fuente: obtenida de <http://edurrom.blogspot.com.es>.

una especie de portaobjetos que tiene dos zonas ligeramente deprimidas (0,1 mm de profundidad) en cuyo fondo se han marcado dos retículos cuadrangulares de 3 mm de lado. Cada retículo consta de 9 cuadrados grandes, cada uno de 1 mm de lado. Con el cubreobjetos colocado, cada cuadrado grande representa un volumen de $0,1 \text{ mm}^3$, lo cual equivale a $0,1 \mu\text{l}$ (10^{-4} ml) (véase Fig. 3). La concentración de células en la muestra original se calcula a partir de la siguiente fórmula: partículas/ μl = (partículas contadas) / [(superficie contada (mm^2) x profundidad de la cámara (mm)] x factor de dilución.

Los microorganismos presentes en el néctar fueron identificados como levaduras por su gran tamaño y características morfológicas, tales como la presencia de yemas de división, grandes vacuolas con corpúsculos refringentes, etc. (Guilliermond, 1920; Yarrow, 1998). Este bajo nivel de resolución taxonómica era suficiente para el primer propósito de este estudio (Herrera & al., 2009).

Diversidad de levaduras

La segunda submuestra fue utilizada para conocer la diversidad de levaduras del néctar a partir de métodos moleculares. Para el desarrollo de esta metodología se contó con la ayuda y colaboración de los compañeros del departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura (Prof. Dr. Manuel Ramírez Fernández y D^a Rocío Velázquez Molinero).

Las submuestras se conservaban en viales de microcentrífuga esterilizados y se mantenían en frío, mediante neveras portátiles con hielo, hasta llegar al laboratorio donde se efectuó el mencionado estudio molecular, de acuerdo con el protocolo siguiente:

- Siembra. Cada submuestra se sembró individualmente en placas de Petri con medio de cultivo agar malta (1,0 % de glucosa, 0,5 % de peptona, 0,3 % de extracto de malta, 0,3 % de extracto de levadura, 2,0 % de agar) con 0,01 % de cloranfenicol para evitar el crecimiento de bacterias. Para potenciar el crecimiento y desarrollo de las posibles levaduras presentes en el néctar las placas se incubaron en una estufa durante 24-48 horas a 28 °C.

- Selección de colonias. Las colonias de levaduras desarrolladas tras la siembra del néctar se seleccionaron siguiendo los criterios morfológicos descritos por Yarrow (1998), y se aislaron a partir de diversas resiembras. A continuación, cada colonia fue observada con una gota de azul de lactofenol al MO, pudiendo así distinguir al menos 10 cepas diferentes, las cuales se seleccionaron como una representación aproximada de la diversidad de levaduras alojadas en el néctar de las flores de estudio. Estos aislados se conservaron en glicerol al 15 % hasta que pudieron ser procesados.

- Aislamiento del ADN. Se ha seguido la metodología utilizada por Maqueda & al. (2010) con algunos cambios mínimos. Los aislados en el paso anterior se sembraron individualmente en 5 ml de extracto de levadura peptona dextrosa (YEPPD), un medio completo apto para el crecimiento de levaduras. Tras una noche a 30 °C con agitación, este medio se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 1 ml de 50 mM Tris-H₂SO₄, a pH 9 y 2,5 % de mercaptoetanol durante 15 minutos a temperatura ambiente con el fin de desestabilizar el organismo. A continuación, las células se sedimentaron una vez más, centrifugando a 3.500 rpm durante 3 minutos, y se resuspendieron de nuevo en 0,6 ml de 0,1 M ClNa, 10 mM Tris-ClH a pH 7,5, 10 mM EDTA y 0,2 % SDS (detergente). En el siguiente paso se añadieron 0,5 ml de fenol, conservado en frío y equilibrado con Tris-ClH a pH 8, incubándose las muestras a temperatura ambiente durante 30 minutos con agitación. Tras 1 minuto de centrifugación se extrajo la fase acuosa que contenía los ácidos nucleicos. Después de la adición de 1/10xV (40 µl) de 3M acetato sódico, tales ácidos se precipitaron al añadir 1 µl de isopropanol previamente enfriado, incubados durante 30 minutos a -20 °C y centrifugados a 14.000 rpm durante 10 minutos. El precipitado de ADN se lavó un par de veces con 1 ml de etanol al 70 %, se centrifugó durante 2 minutos, se dejó secar durante la noche y, por último, se resuspendió en 25 µl de tampón TE (Tris-EDTA) a pH 8, un agente quelante que se emplea para proteger el ADN de la acción de las enzimas nucleasas.

- Amplificación y secuenciación del ADN. Los dominios D1 y D2 de la subunidad grande del ribosoma (26S), ampliamente utilizados para estudios filogenéticos de hongos, se amplificaron usando los cebadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG), de acuerdo con Kurtzman & Robnett (1998). La amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador (XP thermal cycler, BIOER) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor de la *Taq* polimerasa (TaKaRa Ex Taq), esto es, 10 μ M de cada cebador, 0,25 μ l de TaKaRa Ex Taq ADN polimerasa recombinante, 2,5 mM de los dNTPs, 10X de Ex Taq Buffer, 2 μ l de ADN y agua destilada estéril hasta completar los 50 μ l de volumen de reacción. La reacción se inició con una desnaturalización del producto de PCR a 95 °C durante 12 minutos, seguido por 35 ciclos de: (1) desnaturalización a 94 °C durante 15 segundos; (2) alineamiento: la temperatura de alineamiento, durante 10 segundos cada ciclo, fue disminuyendo desde 55,7 hasta 53,7 °C durante los 20 primeros ciclos y se mantuvo constante el resto de ellos; (3) extensión a 72 °C durante 20 segundos. Por último, se llevó a cabo una extensión final a 72 °C durante 5 minutos (Lachance & al., 1999). La visualización de las muestras bajo luz ultravioleta se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % teñida con *Gelstar* (Lonza Rockland, Inc) durante 20 minutos a 100 V. Para la reacción de secuenciación se utilizaron los cebadores externos previamente usados en la amplificación (NL-1 y NL-4) junto con otros dos internos, NL-2A (5'-CTTGTTTCGCTATCGGTCTC) y NL-3A (5'-GAGACCGATAGCGAACAAG) (Kurtzman & Robnett, 1998). Los cuatro fragmentos de cada microorganismo aislado se enviaron a la compañía MacroGen Inc. (Seoul, South Korea) para su secuenciación. Posteriormente, las secuencias parciales del gen 26S fueron ensambladas y editadas con Geneious Pro v.5.1.7 (Drummond & al., 2010).

- Identificación de especies. Las secuencias obtenidas se identificaron por comparación con las ya publicadas en Genbank a través de la herramienta BLAST (Altschul & al., 1997). De este modo, las secuencias conocidas, previamente publicadas en la base de datos del NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>), que mostraban más de un 99 % de similitud a las nuestras fueron agrupadas en la misma unidad taxonómica operacional (UTO).

Composición de azúcares en el néctar de flores visitadas

La tercera submuestra procedía de flores visitadas de aquellas especies en cuyo néctar previamente se habían observado levaduras.

La metodología utilizada para el desarrollo de este experimento fue la misma que la empleada en el apartado de composición de azúcares del néctar.

Observación de visitantes florales

Atendiendo al posible agente transportador de levaduras, los visitantes que contactaron con el néctar de las flores se clasificaron en seis grupos diferentes de acuerdo a su tamaño y taxonomía: (1) abejorros (Bombinae), registrando únicamente individuos del género *Bombus*; (2) abejas (Apinae), concretamente, *Apis mellifera*; (3) sírfidos, en un sentido amplio nos referimos a la familia Syrphidae; (4) abejas pequeñas (Halictidae), incluyendo en este grupo a los géneros *Halictus* y *Lassioglossum* (en adelante abejillas); (5) avispas (Vespinae), abarcando individuos de los géneros *Dolichovespula*, *Polistes* y *Vespula*; (6) otros, haciendo referencia a visitantes que contactaban con el néctar pero que no forman parte del conjunto habitual de polinizadores y/o visitantes, como hormigas, moscas, escarabajos, arañas, así como larvas de la oruga *Cucullia scrophulariae* que habitualmente ataca a las flores de *Scrophularia*. Además de estos seis grupos, se denominaron “desconocidos” a los visitantes de las muestras de néctar obtenidas al azar de plantas sin previo embolsado y de las cuales no se conocían las visitas recibidas. Por último, el grupo denominado “control” hace referencia a las muestras de néctar de flores que no recibieron ninguna visita.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se ha empleado el paquete estadístico SPSS versión 19, analizándose la normalidad y homocedasticidad de las variables mediante el test de Kolmogorov-Smirnov y Levene, respectivamente. Los datos se analizaron mediante Anovas encajados, así como a través de los tests post-hoc HSD de Tukey (varianzas homogéneas) o de Games-Howell (varianzas no homogéneas), ya que en la mayoría de los casos dichos datos estaban normalizados, se podían normalizar o un análisis de los residuos garantizaba su aplicabilidad. Tales residuos simplemente presentaron una pequeña desviación frente a la normalidad por lo que dicho método se consideró robusto. Para comprobar la independencia de diferentes variables (ausencia/presencia vs tratamiento o estado

sexual), se utilizó la prueba χ^2 de Pearson; en los casos en los que no se verificaban las condiciones necesarias para la utilización del test χ^2 se empleó el test exacto de Fisher, el cual se considera una prueba útil para examinar la significación de la asociación entre datos categóricos que resultan de clasificar los objetos en formas diferentes, como ocurrió con la densidad de levaduras encontradas en el néctar.

RESULTADOS

COMPOSICIÓN DE AZÚCARES DEL NÉCTAR

Las especies estudiadas, a excepción de *S. calliantha*, mostraron el mismo patrón en cuanto a la composición de azúcares de sus néctares, los cuales resultaron ser altos en sacarosa y con mayores porcentajes de fructosa que de glucosa, este último con valores cercanos a cero. Por su parte, *S. calliantha* presentó un néctar balanceado (con proporciones similares de sacarosa y hexosas) y con porcentajes similares entre los monosacáridos fructosa y glucosa (Fig. 4).

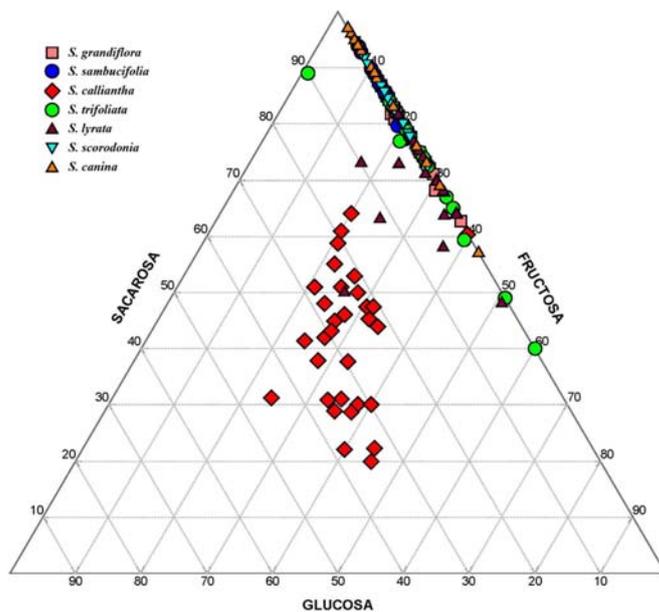


Figura 4. Diagrama ternario mostrando la distribución de las muestras de néctar obtenidas (n = 182) de las diferentes especies estudiadas de *Scrophularia* sobre el plano definido por las proporciones de sacarosa, fructosa y glucosa relativas al total de azúcares. Cada símbolo representa la composición del néctar (%) de una flor, exceptuando algunas muestras de *S. canina* donde se necesitó el volumen de néctar de más de una flor.

A pesar de que la mayoría de las especies estudiadas comparten las mismas características respecto a la composición de azúcares del néctar se han encontrado diferencias significativas entre dichas especies (Fig. 5). A partir del test de comparaciones múltiples (HDS-Tukey) se han podido especificar estas diferencias (Fig. 5), no encontrándose patrones particulares de relación entre ellas, salvo para el porcentaje de glucosa. Este, con valores cercanos a cero, fue similar en

todas las especies, independientemente del color o tamaño floral, a excepción de *S. calliantha* que mostró porcentajes medios de 27,4.

Considerando la sexualidad de la flor se obtuvo que el porcentaje de sacarosa era mayor en las flores funcionalmente femeninas que en las masculinas, mientras que el de monosacáridos lo fue en la fase masculina, aunque estas diferencias no siempre fueron significativas (véase Fig. 6). Concretamente, la proporción de azúcares del néctar entre fases sexuales fue significativamente diferente en *S. grandiflora* para la sacarosa ($t = 2,858$, $P < 0,01$) y la fructosa ($t = - 2,504$, $P < 0,05$), en *S. calliantha* también para la sacarosa ($t = 5.029$, $P < 0.001$) y para la glucosa ($t = - 6,631$, $P < 0,001$) y en *S. sambucifolia* únicamente para la sacarosa ($F = 2,363$, $P < 0,05$). *S. trifoliata*, fue la única especie del grupo con flores grandes y llamativas que no mostró diferencias significativas de acuerdo al estado sexual de sus flores, lo que podría estar relacionado con las altas desviaciones que presentaron sus valores. De las otras tres especies, con flores de menor tamaño y menos llamativas, sólo *S. lyrata* mostró diferencias entre las fases sexuales y estas únicamente para la fructosa ($t = - 2,364$, $P < 0,05$).

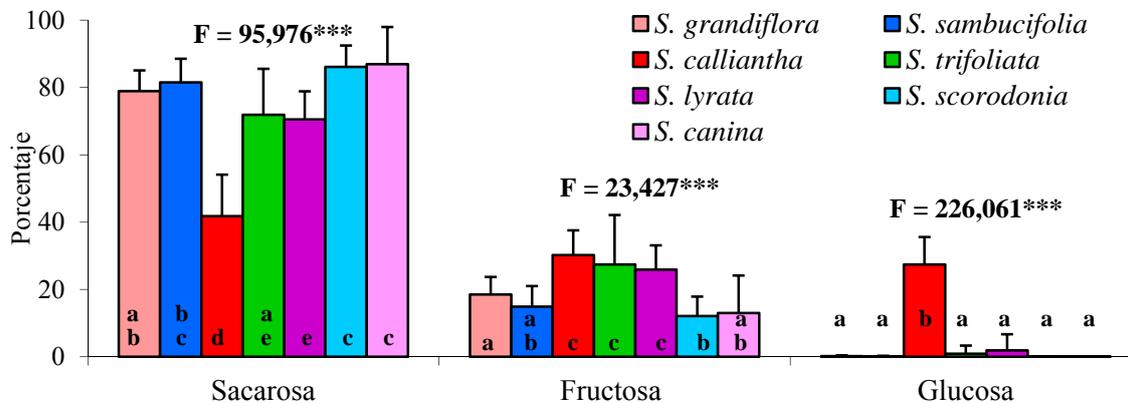


Figura 5. Composición de azúcares del néctar (media \pm s.d.) de las especies de *Scrophularia* estudiadas. Sobre las barras de cada variable se indica la existencia de diferencias significativas entre las distintas especies (***) = $P < 0,001$) mediante un ANOVA anidado que considera las especies como factor principal y la fase sexual anidada en ellas. Las diferentes letras en las barras de una misma variable corresponden a un nivel mínimo de significación de $\alpha = 0,05$ entre las especies estudiadas.

En resumen, exceptuando a *S. trifoliata*, las especies del grupo de flores grandes y llamativas presentaban sesgo entre el estado sexual de sus flores y los azúcares del néctar, concretamente con la sacarosa en todos los casos (mayor en fase femenina que masculina) y únicamente con la fructosa y glucosa (mayores en la fase masculina) en *S. grandiflora* y *S. calliantha*, respectivamente.

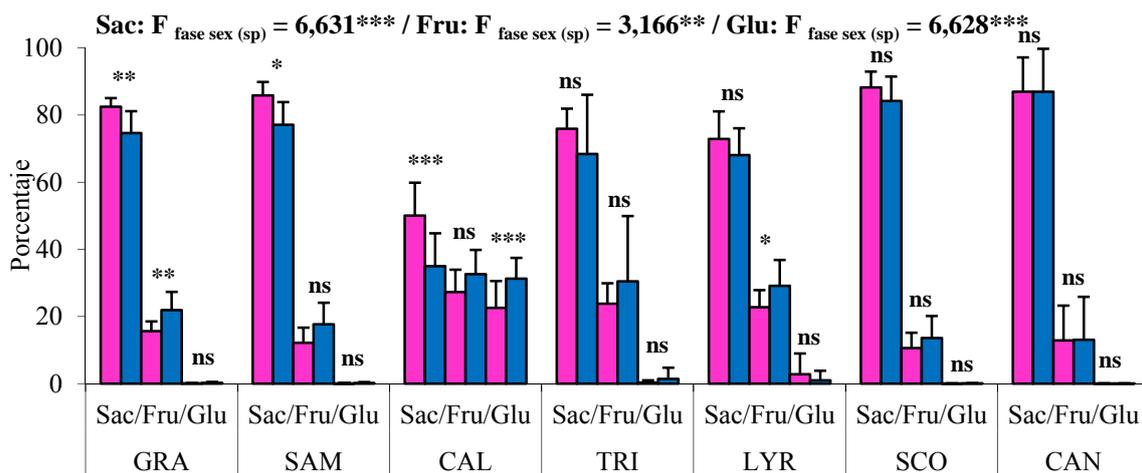


Figura 6. Composición de azúcares del néctar (media ± d.s.) de las especies de *Scrophularia* estudiadas diferenciando el estado sexual de la flor (en rosa = funcionalmente femeninas, en azul = funcionalmente masculinas). Los datos fueron analizados usando un ANOVA anidado considerando las especies como factor principal y la fase sexual anidada a estas. Sobre cada pareja de barras (femenina/masculina) para cada variable estudiada se muestra la existencia o no de diferencias significativas entre las fases sexuales de cada especie para cada tipo de azúcar (*** = $P < 0,001$; ** = $P < 0,01$; * = $P < 0,05$; ns = no significativa). GRA, *S. grandiflora*; SAM, *S. sambucifolia*; TRI, *S. trifoliata*; CAL, *S. calliantha*; LYR, *S. lyrata*; SCO, *S. scorodonia*; CAN, *S. canina*. Sac, sacarosa; Fru, fructosa; Glu, glucosa.

ANÁLISIS MICROBIANO DEL NÉCTAR

En total se hizo un seguimiento a 2.006 flores entre las siete especies analizadas desde el año 2010 hasta el 2012. De ellas, 1.651 fueron examinadas siguiendo las dos metodologías expuestas en los subapartados de densidad y diversidad, obteniéndose presencia de levaduras en sólo tres de las siete especies investigadas: *S. grandiflora*, *S. sambucifolia* y *S. lyrata*, con unos porcentajes de ocurrencia del 11,8, 2,7 y 4, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Número de muestras de néctar con presencia/ausencia de levaduras en las flores de siete especies analizadas de *Scrophularia*. GRA, *S. grandiflora*; SAM, *S. sambucifolia*; CAL, *S. calliantha*; TRI, *S. trifoliata*; LYR, *S. lyrata*; SCO, *S. scorodonia*; CAN, *S. canina*.

	GRA	SAM	CAL	TRI	LYR	SCO	CAN
Ausencia	569	484	24	13	327	114	27
Presencia	67	13	0	0	13	0	0

Además, los resultados mostraron una total ausencia de levaduras en los botones florales y en las flores no visitadas (flores control, N = 196). De este modo, asumimos que los visitantes fueron los únicos vectores de transmisión de levaduras.

Teniendo en cuenta el estado sexual de las flores de dichas especies con respecto a la ausencia/presencia de levaduras en el néctar, las pruebas de χ^2 de Pearson indicaron que ambas variables eran independientes, sin que existiera una relación entre ellas para ninguna de las tres especies estudiadas (*S. sambucifolia*: $\chi^2 = 1,496$, $P > 0,05$; *S. grandiflora*: $\chi^2 = 1,513$, $P > 0,05$; *S. lyrata*: $\chi^2 = 0,281$, $P > 0,05$). Atendiendo únicamente al estado sexual de las flores en los casos en los que sí hubo presencia de levaduras (Fig. 7), se puede decir que existía una mayor tendencia de flores femeninas con presencia de levaduras en *S. sambucifolia* (N = 13; ♀ 69,2 %, ♂ 30,8 %) y *S. lyrata* (N = 13; ♀ 61,5 %, ♂ 38,5 %), mientras que en *S. grandiflora* ocurrió al contrario (N = 67; ♀ 40,3 %, ♂ 59,7 %). Sin embargo, la significación obtenida en la prueba χ^2 entre la ausencia/presencia de levaduras en el néctar y el tratamiento utilizado (sin embolsar, embolsado hasta 6, 24 o 48 horas) rechazó la hipótesis nula de independencia en *S. sambucifolia* ($\chi^2 = 14,969$, $P < 0,05$) y en *S. grandiflora* ($\chi^2 = 53,207$, $P < 0,05$), es decir, que ambas variables estudiadas eran dependientes y para esas dos especies existía una relación entre la ausencia/presencia de levaduras en el néctar y el tratamiento utilizado.

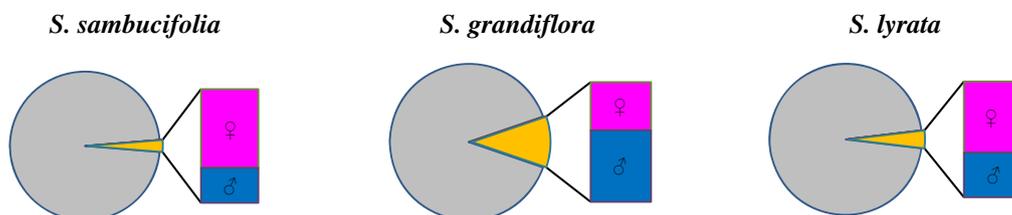


Figura 7. Recuento de flores funcionalmente femeninas (en rosado) y masculinas (en azul) en las cuales apareció algún tipo de levadura.

Por otro lado, en esas tres especies quedó patente que ni los sírfidos, ni los visitantes esporádicos del grupo “otros” (Tabla 3) estuvieron involucrados en la presencia de levaduras del néctar. Sin embargo, la alta ocurrencia de las mismas en el grupo “desconocidos” era de esperar dado que en este caso las flores tuvieron más oportunidades de ser visitadas y, por ende, contaminadas por dichos microorganismos. Mientras que para *S. sambucifolia* y *S. lyrata* la familia de las abejas (Apinae) fue la principal portadora de levaduras, en el caso de *S. grandiflora* lo fue la de los abejorros (Bombinae). Las avispas (Vespinae) estuvieron involucradas en muchas de las muestras de néctar con presencia de levaduras de *S. grandiflora* y, en menor medida, de *S. lyrata*.

Tabla 3. Número de muestras con presencia o ausencia de levaduras en función del visitador floral. Guión = ausencia de visitas.

Visitador	<i>S. grandiflora</i>		<i>S. sambucifolia</i>		<i>S. lyrata</i>	
	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia
Abejorros	212	26	11	1	8	0
Abejas	15	4	209	11	91	5
Sírfidos	-	-	-	-	1	0
Abejillas	19	1	53	0	10	1
Avispas	124	16	64	0	69	1
Desconocido	130	20	94	1	94	6
Otros	3	0	13	0	1	0
Control	66	0	40	0	53	0

Densidad estimada de células de levaduras

En las flores visitadas por polinizadores y/o visitadores se identificaron y clasificaron, gracias a sus características morfológicas, dos grupos de microorganismos: en primer lugar y de forma concreta, los pertenecientes al género *Metschnikowia* (en adelante “tipo 1”; Fig. 8A) dada su característica configuración celular en forma de hélice; en segundo lugar y de forma más general, se agruparon todos aquellos microorganismos que presentaron una morfología micelial y/o levuriforme (en adelante “tipo 2”; Fig. 8B). También se observaron de forma esporádica esporas aerovagantes de *Alternaria sp.* o *Cladosporium sp.* y hongos epífitos generalistas del género *Aureobasidium*, todos ellos descartados por no ser objeto de análisis.

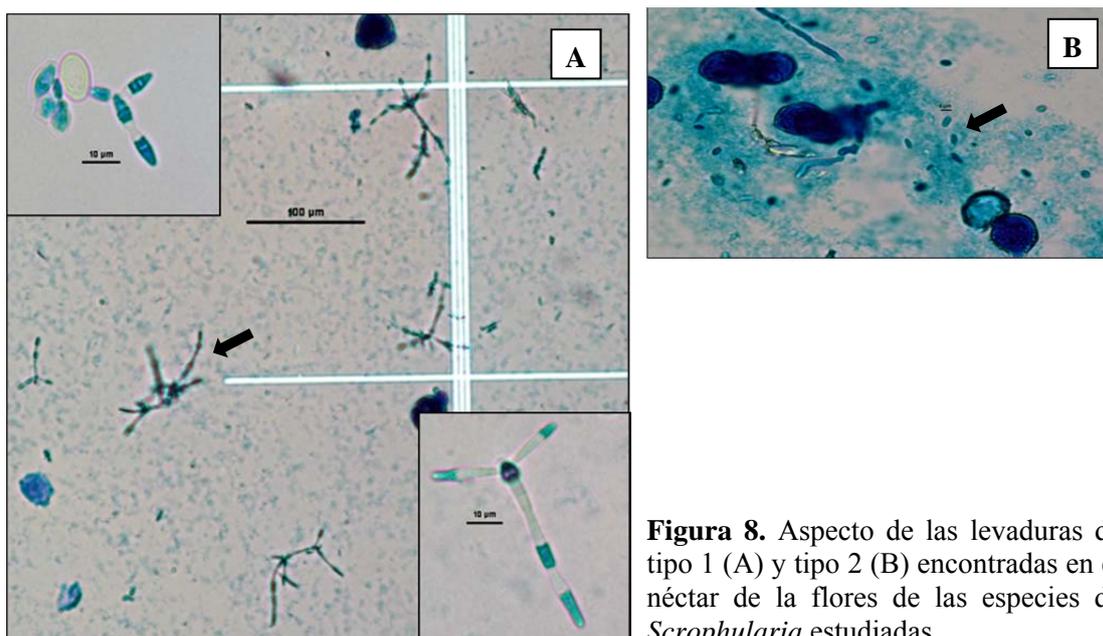


Figura 8. Aspecto de las levaduras de tipo 1 (A) y tipo 2 (B) encontradas en el néctar de la flores de las especies de *Scrophularia* estudiadas.

En este primer ensayo donde se estimó la presencia y densidad de levaduras, únicamente se obtuvieron densidades de levaduras diferentes de cero o desconocidas, en cuatro de las 497 muestras extraídas de *S. sambucifolia*, todas ellas del tipo 1 y cuyos valores de densidad oscilaron desde 13,3 hasta 92,4 células/ μl . En *S. lyrata*, de las 341 muestras extraídas, aparecieron levaduras del tipo 2, concretamente en tres muestras que fluctuaron desde 12,6 hasta 14.196,4 células/ μl . En *S. grandiflora*, ambos tipos de levaduras estuvieron presentes en 33 de las 637 muestras, aunque únicamente dos de ellas correspondían a las de tipo 2, cuya densidad varió desde 35 hasta 128,9 células/ μl . Las levaduras del tipo 1 aparecieron en 31 de las muestras con valores de densidad desde 2,2 hasta 666,7 células/ μl . En este último caso, dado que el número de muestras contaminadas en *S. grandiflora* sí fue considerable, se pudo analizar si existía o no relación entre las variables de tipo cualitativo, tratamiento *vs* densidad y evaluar su grado de asociación.

El análisis anterior se efectuó con la densidad de levaduras como variable cualitativa para lo cual sus valores fueron previamente categorizados agrupándolos en intervalos de igual amplitud (Fig. 9A). La separación en intervalos de los valores originales no era evidente debido a que estos estaban excesivamente alejados, lo que no

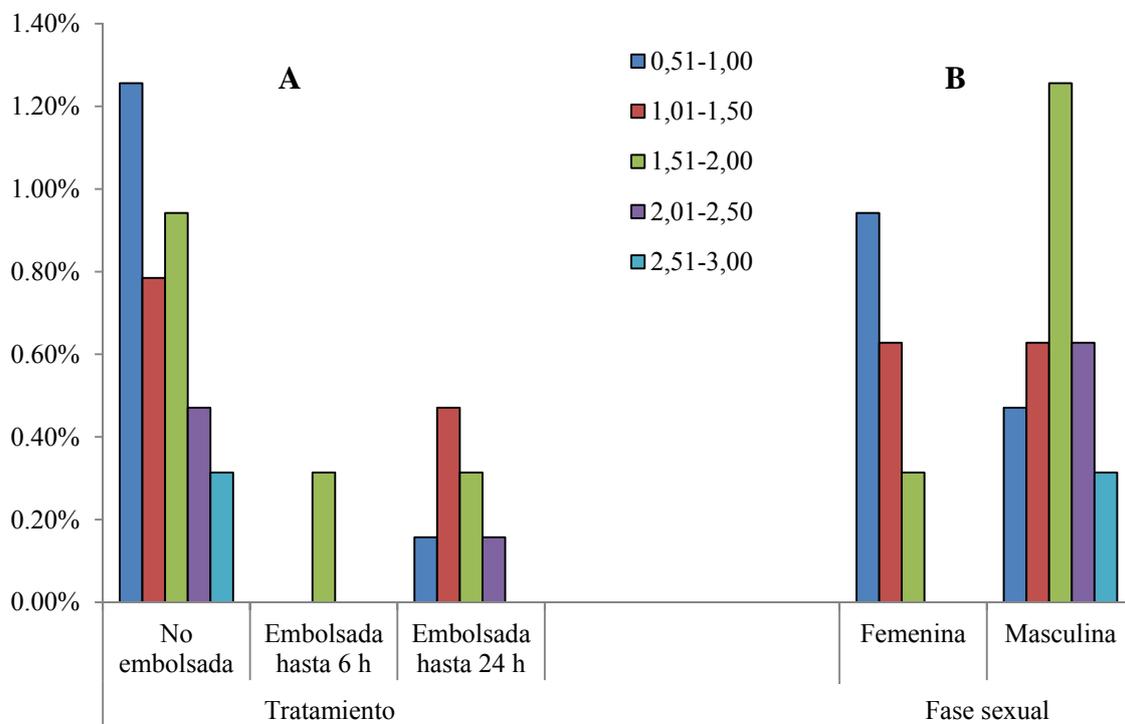


Figura 9. Diagrama de barras representando los porcentajes de los intervalos de densidad de levaduras del tipo 1 dentro de los diferentes tratamientos utilizados (A) y según el estado sexual de la flor (B) en *Scrophularia grandiflora*.

permitía diferenciar bien las densidades altas de las medias. Fue necesario aproximarlos entre sí para que las diferencias fueran más patentes, lo cual se logró transformando los valores originales mediante el $\log_{10}(\text{densidad}+1)$. De acuerdo con el test exacto de Fisher ($p = 0,043$) las variables tratamiento y densidad estaban asociadas. Esta asociación fue aún más evidente, con un $p < 0,001$, cuando realizamos dicho test eliminando el grupo control y dejando únicamente dos tratamientos, “embolsadas” vs “no embolsadas”. Como cabía esperar, las plantas no embolsadas de *S. grandiflora* presentaron las mayores densidades de levaduras ya que tuvieron una mayor probabilidad de recibir más de una visita por parte de los visitantes y/o polinizadores. Respecto a las embolsadas, aquellas que permanecieron un mayor número de horas aisladas tras la visita, fueron las que mostraron mayores densidades. No se obtuvo ningún valor de densidad para el tratamiento de embolsado entre 24 y 48 horas, lo que pudo deberse a la problemática que dicho tratamiento conllevaba (véase apartado de Material y Métodos).

Respecto a las variables estado sexual vs densidad, el test exacto de Fisher ($p = 0,072$) indicó para *S. grandiflora* que la densidad de levaduras del néctar de las flores no estaba asociada con el estado sexual de las mismas (Fig. 9B). En cualquier caso, la falta de significación estadística no quiere decir que no hubiera ningún efecto subyacente, sino que no se detectó ninguno.

El escaso número de datos con respecto al tiempo que duró la visita de los polinizadores no permitió realizar correlaciones al respecto, ya que de las 31 muestras de *S. grandiflora* con una densidad de levaduras del tipo 1 diferente de cero, sólo 7 correspondían a muestras extraídas de flores embolsadas y de las que se conocía su visitador y el tiempo que este dedicó a la visita (Tabla 4).

Diversidad de levaduras

Tras la siembra de 980 muestras de néctar floral en medios de cultivo, únicamente en 55 crecieron colonias de levaduras, las cuales, a continuación, fueron clasificadas en 8 tipos diferentes de acuerdo a criterios morfológicos, y a continuación aisladas. Entre las colonias crecidas aparecieron contaminaciones de bacterias, generalmente como una mucosa blanquecino-amarillenta y de otros hongos, como *Cladosporium sp.*, *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*, que dificultaron la selección y aislamiento de las

colonias de interés en este trabajo.

Tabla 4. Datos relativos a las muestras de néctar con levaduras tipo 1 (*Metschnikowia*) procedentes de plantas embolsadas de *S. grandiflora*. Se indica de izquierda a derecha: año de recolección de muestras; fase sexual de las flores (F = femenina, M = masculina); visitador, tipo de insecto que contactó con el néctar; TV, tiempo de visita (en segundos) del insecto a la flor; tratamiento, número de horas que permaneció la planta embolsada desde la visita hasta la recolección del néctar; densidad, número de células de la levadura por cada μl de néctar.

<i>S. grandiflora</i>					
Año	Fase sexual	Visitador	TV	Tratamiento	Densidad
2010	M	Avispa	15	≤ 6	85
2010	M	Avispa	10	≤ 6	75
2011	F	Abejorro	10	6 - 24	19,26
2011	F	Abejorro	15	6 - 24	13,33
2012	F	Abejorro	8	6 - 24	5,93
2012	F	Avispa	5	6 - 24	37,69
2012	F	Abejorro	3	6 - 24	15,56

Los resultados obtenidos tras la secuenciación e identificación de los 8 representantes aislados se correspondieron con un total de 4 táxones (véanse secuencias en material suplementario S1): *Phaeomonillea sp.*, *Beauveria bassiana*, *Metschnikowia reukaufii* y *Starmerella bombicola*. Más de la mitad de las colonias crecidas (67 %), pertenecieron al género *Metschnikowia* y de estas, el 92 % se encontraron en los néctares recolectados en *S. grandiflora* (Tabla 5).

Tabla 5. Número de muestras de néctar de las especies de *Scrophularia* en las que crecieron colonias de los microorganismos indicados en la primera columna.

	<i>S. grandiflora</i>	<i>S. sambucifolia</i>	<i>S. lyrata</i>	Total
<i>Metschnikowia reukaufii</i>	34	2	1	37
<i>Starmerella bombicola</i>	5	0	8	13
<i>Phaeomonillea sp.</i>	1	3	1	5
<i>Beauveria bassiana</i>	0	0	1	1

Sólo en 13 de las 55 muestras pudo relacionarse cada tipo de microorganismo con su vector de transmisión (Tabla 6), dado que estas fueron las únicas procedentes de flores controladas bajo tratamientos de embolsado. Aunque el escaso número de muestras de plantas embolsadas no permitió realizar ninguna correlación estadística, quedó patente la intervención de abejas, avispas y abejillas como vectores de transmisión para *Metschnikowia*, mientras que para *Phaeomonillea sp.* y *Starmerella bombicola* lo fueron, sobre todo, las abejas, concretamente *Apis mellifera*. La cuarta

especie identificada, *Beauveria bassiana*, no aparece representada en la tabla 6 ya que se obtuvo de una muestra sin embolsar de la cual no se tenían datos sobre los posibles visitantes.

Tabla 6. Muestras de néctar con presencia de levaduras identificadas en las diferentes especies de *Scrophularia* analizadas bajo condiciones controladas donde se conocía el insecto (visitador) y el tiempo (en horas) que las plantas estuvieron embolsadas tras su visita (tratamiento).

Tipo de levaduras	Especie	Visitador	Tratamiento
<i>Metschnikowia</i>	<i>S. sambucifolia</i>	Abeja	> 24
	<i>S. grandiflora</i>	Abeja	6 – 24
	<i>S. grandiflora</i>	Abeja	6 – 24
	<i>S. grandiflora</i>	Avispa	6 – 24
	<i>S. grandiflora</i>	Abejilla	6 – 24
	<i>S. lyrata</i>	Abeja	> 24
<i>Starmerella</i>	<i>S. lyrata</i>	Abeja	6 – 24
	<i>S. lyrata</i>	Abeja	6 – 24
	<i>S. lyrata</i>	Abeja	> 24
	<i>S. lyrata</i>	Abejilla	≤ 6
<i>Phaeomonillea</i>	<i>S. sambucifolia</i>	Abeja	> 24
	<i>S. sambucifolia</i>	Abeja	> 24
	<i>S. sambucifolia</i>	Abeja	> 24

Composición de azúcares en el néctar de las flores visitadas

Durante el año 2011 se extrajo una tercera submuestra de néctar, siempre que el volumen del mismo lo permitió, para conocer la composición de azúcares en las flores visitadas. Se analizaron un total de 37 muestras para las tres especies en las que se observó algún tipo de levaduras (Tabla 7).

La proporción de sacarosa, fructosa y glucosa únicamente mantuvo el patrón inicialmente observado (véase apartado de composición de azúcares del néctar) en el caso de *S. sambucifolia*, es decir, néctar alto en sacarosa y mayor porcentaje de fructosa que de glucosa; por el contrario en *S. grandiflora* y *S. lyrata*, los valores mostraron un néctar balanceado que a su vez presentaba márgenes altos de desviación, es decir, que existía mucha diferencia entre los valores obtenidos (Fig. 10). Mientras que las flores utilizadas en el apartado de composición de azúcares del néctar anteriormente tratado se aislaban el día anterior, asegurando así la ausencia de visitas, resultó lógico encontrar diferentes patrones en las proporciones obtenidas en este experimento. En este caso el néctar analizado correspondía a un grupo de muestras que tenían más posibilidades de contener levaduras ya que se les había permitido la visita de un insecto y, a su vez, tras esta, se dejaron un tiempo embolsadas, generalmente 24 horas, lo que pudo permitir la

Tabla 7. Valores (media \pm d.s.) de las características del néctar en las tres especies de *Scrophularia* con levaduras: F sex = fase sexual de la flor (F = femenina; M = masculina); Visitador = tipo de insecto; TV = tiempo que duró la visita (en segundos); Trat = tratamiento o tiempo de embolsado tras la visita (horas); Vol = volumen (en μ l); [C] = concentración (%); Sac = sacarosa (%); Fru = fructosa (%); Glu = glucosa (%).

Especie	F sex	Visitador	TV	Trat	Vol	[C]	Sac	Fru	Glu
<i>S. grandiflora</i>	M	Abejorro	48	6 – 24	32	30	40,7	0,1	59,3
	F	Abejilla	155	6 – 24	40,5	30	20,6	79,4	0,1
	F	Abejorro	25	6 – 24	65	29	23,48	0,1	76,52
	M	Avispa	132	6 – 24	11	82	0,1	63,29	36,71
	F	Abejorro	7	6 – 24	26,5	28	38,51	0,1	61,49
	M	Avispa	11	6 – 24	17	16	30,33	24,15	45,52
	M	Avispa	15	\leq 6	48,5	28	53,51	12,32	34,17
	M	Avispa	8	\leq 6	23	36,5	26,02	0,1	73,98
	M	Avispa	5	\leq 6	15	55	0,1	17,15	82,85
	M	Abejilla	78	\leq 6	38,5	31	17,25	82,75	0,1
	M	Avispa	18	\leq 6	12	31,5	45,42	54,58	0,1
	F	Avispa	4	6 – 24	8,5	20	83,83	16,17	0,1
	M	Avispa	30	6 – 24	5	20	0,1	30,06	69,94
	F	Abejorro	10	6 – 24	26	23	100	0,1	0,1
	F	Abejorro	15	6 – 24	16	32	69,84	30,16	0,1
	M	Abejorro	370	6 – 24	5	52	68,08	31,92	0,1
	M	Abejilla	22	6 – 24	20	60,5	34,22	0,1	65,78
	M	Avispa	83	6 – 24	18	12	22,31	77,69	0,1
						X	37,47	28,90	33,73
						DS	28,57	29,96	33,27
<i>S. sambucifolia</i>	F	Abeja	12	> 24	33	24	75,97	24,03	0,1
	F	Abeja	10	> 24	16	70	84,91	15,09	0,1
	M	Abeja	11	> 24	14,5	73	75,3	20,25	2,61
	F	Abeja	35	> 24	15,5	70	86,54	13,46	0,1
	M	Avispa	19	6 – 24	19	82	73,68	13,95	0,1
	F	Abejilla	44	6 – 24	26	76	76,48	20,28	0,1
	M	Abejilla	5	6 – 24	22,5	61	79,19	20,81	0,1
	M	Abejorro	11	6 – 24	19,5	19	82,34	8,99	5,57
	F	Abeja	89	6 – 24	15,5	65	92,25	6,28	0,1
	F	Abeja	8	6 – 24	8,5	15	71,65	28,35	0,1
	M	Abejilla	6	6 – 24	20,5	74	87,45	11	0,1
	M	Avispa	37	6 – 24	7,5	77	86,24	13,76	0,1
							X	81,00	16,35
						DS	6,51	6,47	1,68
<i>S. lyrata</i>	F	Avispa	17	6 – 24	6,3	30	75,56	0,1	0,1
	F	Avispa	10	6 – 24	5	36	21,82	0,1	40,65
	F	Avispa	9	6 – 24	10,5	38,5	13,65	44,84	41,52
	F	Avispa	15	6 – 24	3,5	21	77,75	22,25	0,1
	M	Avispa	5	6 – 24	3,2	28	0,1	62,28	37,72
	M	Abejilla	107	6 – 24	1,5	37	0,1	64,34	35,66
	F	Avispa	5	6 – 24	6,5	29	25,48	33	0,1
						X	30,64	32,42	22,26
						DS	32,90	26,64	20,82

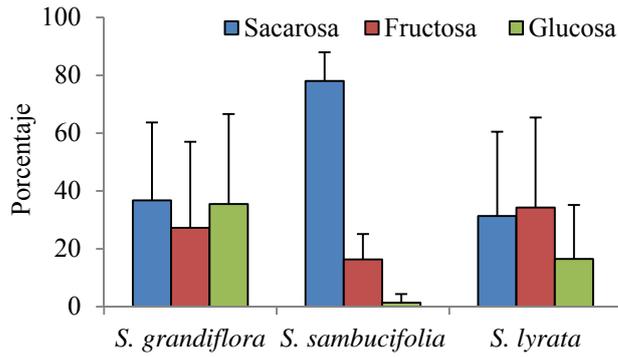


Figura 10. Composición de azúcares del néctar (media \pm d.s.) de las especies de *Scrophularia* estudiadas en las que se observó algún tipo de levadura en el néctar de sus flores.

estadística con los datos dado el escaso número de muestras de cada especie y tratamiento. Estos resultados, en cualquier caso, ponen de manifiesto cambios en la composición de azúcares del néctar que pueden ser debidos a las levaduras que contienen y que lo degradan.

Considerando la sexualidad de la flor se mantuvo el patrón obtenido en el apartado anterior, es decir, el porcentaje de sacarosa era mayor en las flores funcionalmente femeninas que en las masculinas, mientras que el de monosacáridos lo era en la fase masculina, aunque estas diferencias no estuvieron tan marcadas en *S. sambucifolia*, probablemente por ser la especie que mostró una menor presencia de levaduras (Fig. 11).

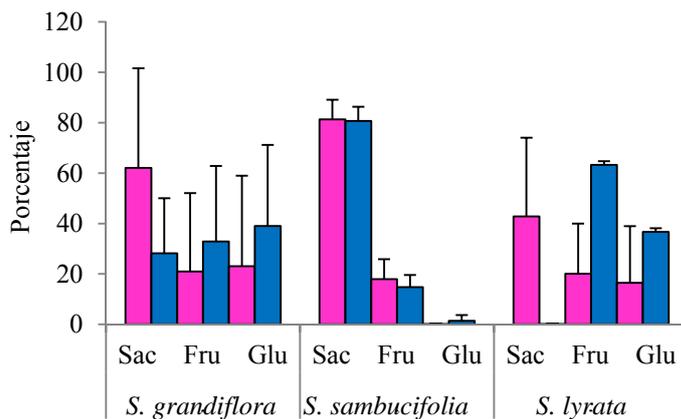


Figura 11. Composición de azúcares del néctar (media \pm d.s.) de las especies de *Scrophularia* estudiadas en las que se observó algún tipo de levadura en el néctar de sus flores diferenciando su estado sexual (en rosa = funcionalmente femeninas, en azul = funcionalmente masculinas). Sac = Sacarosa, Fru = Fructosa, Glu = Glucosa.

DISCUSIÓN

COMPOSICIÓN DE AZÚCARES DEL NÉCTAR

multiplicación de dichos microorganismos. A la vista de la alta desviación en los valores obtenidos (Fig. 10), que las flores reciban dicha visita no parece implicar obligatoriamente la transferencia de levaduras al néctar.

No fue posible realizar ningún tipo de correlación

El néctar de las especies de *Scrophularia* analizadas en este capítulo puede tipificarse como alto en sacarosa, excepto en *S. callianta* que lo presenta balanceado. El perfil de néctar alto en sacarosa coincide con los resultados publicados en cuatro especies estudiadas hasta la fecha (*S. nodosa* y *S. vernalis*, Percival, 1961; *S. smithii*, Dupont & al., 2004; *S. umbrosa*, Brodmann & al., 2012) y corrobora los obtenidos en las mismas especies aquí analizadas (*S. grandiflora*, *S. sambucifolia*, *S. calliantha*, *S. trifoliata*, *S. lyrata*, *S. scorodonia*, *S. canina* y *S. frutescens*, Rodríguez-Riaño & al., 2014). Rodríguez-Riaño & al. (2014) indicaron que la composición de azúcares podría ser un carácter conservado en esta muestra euromacaronésica del género. En realidad, la composición de azúcares del néctar no se relacionó con el espectro de polinizadores principales, ni tampoco podía explicarse esa casi uniformidad en el tipo de azúcares principales (sacarosa) por factores de tipo climatológico o geográfico (Rodríguez-Riaño & al., 2014).

En las especies de flores grandes (*S. grandiflora*, *S. sambucifolia*, *S. calliantha*) aquí estudiadas, excepto en *S. trifoliata*, el porcentaje de sacarosa está significativamente afectado por la fase sexual de la flor, siendo mayor en la femenina, lo que corrobora de nuevo los resultados obtenidos por Rodríguez-Riaño & al. (2014). Esto podría indicar que las flores funcionalmente masculinas, antes de ser embolsadas, pudieron ser visitadas por algunos polinizadores inoculándolas con levaduras, siendo éstas las responsables de tales variaciones en los azúcares del néctar (Fig. 6).

Respecto a las hexosas, los porcentajes de fructosa siempre eran mayores que los de glucosa y, al contrario de lo que ocurría con la sacarosa, el porcentaje de fructosa aumentaba cuando la flor se encontraba en fase masculina, aunque dicha diferencia sólo fue significativamente mayor en *S. grandiflora* y en una de las especies de flores medianas, *S. lyrata*. La glucosa únicamente mostró sesgo sexual en *S. calliantha* con un porcentaje significativamente mayor en las flores en estado masculino. De nuevo, la posibilidad es que, en *Scrophularia*, tal desequilibrio se deba a la acción de levaduras nectarívoras, las cuales ordinariamente modifican el perfil original del néctar añadiendo enzimas que hidrolizan el disacárido sacarosa en los monosacáridos glucosa y fructosa. Adicionalmente, las levaduras a menudo metabolizan de modo preferencial uno de los dos monosacáridos, conduciendo eventualmente a proporciones no estaquiométricas entre ellos respecto a la proporción esperada 1:1 de una hidrólisis típica de la sacarosa (Canto & al., 2007, 2008; Herrera & al., 2008 y referencias).

Lo anterior viene apoyado por los resultados obtenidos tras el análisis de la composición del néctar de flores en las que sí se pudo asegurar que recibieron una única visita por parte de alguno de sus polinizadores invertebrados. Este análisis únicamente se realizó en las tres especies (*S. grandiflora*, *S. sambucifolia* y *S. lyrata*) en las que se encontraron levaduras (véase más adelante). Así, al menos para *S. grandiflora* y *S. lyrata*, los porcentajes de azúcares cambiaron de manera que, sobre todo, en las flores en estado masculino la sacarosa dejó de ser el azúcar mayoritario (Fig. 11). Las altas desviaciones obtenidas en los datos pueden deberse al pequeño tamaño muestral utilizado, a la baja ocurrencia que estos microorganismos presentan y/o al tiempo transcurrido desde la visita del polinizador hasta la extracción del néctar en cada una de las muestras (véase más adelante).

Aunque sería necesario analizar un mayor número de flores visitadas, los resultados obtenidos hasta ahora son un ejemplo donde se demuestra que las levaduras están implicadas en el sesgo sexual a nivel de composición de azúcares del néctar de algunas *Scrophularia*. De este modo no se descarta que las mismas podrían cambiar el patrón de dicha composición, como ya se ha indicado en diferentes estudios acerca de la presencia de levaduras nectarívoras y de cómo explotan el mutualismo entre plantas y polinizadores, aprovechando por un lado, las oportunidades alimenticias que ofrece la planta y, por otro, el medio de transporte que le supone el movimiento del polinizador a lo largo de estas efímeras fuentes de néctar (Brysch-Herzberg, 2004; Canto & al., 2007, 2008; de Vega & al., 2009; Herrera & al., 2008, 2009, 2010).

ANÁLISIS MICROBIANO DEL NÉCTAR

En las muestras de néctar estudiadas no se hallaron levaduras ni en los botones florales ni en las procedentes de flores no visitadas, confirmando que su presencia en el néctar se debió a una contaminación de origen externo a la planta (Brysch-Herzberg, 2004). Los resultados mostraron un bajo nivel de ocurrencia de levaduras, al tiempo que una escasa diversidad de las mismas y todo ello resultó ser dependiente del polinizador y/o visitador floral, que en nuestro caso se trató de especies de Apidae y Vespidae, y en menor medida de abejas (véase más adelante).

Experimentos basados en el embolsado de flores demostraron que el establecimiento de comunidades específicas de levaduras requería que la flor abierta fuera visitada por los insectos (v.g. *Ipomoea indica*, Lachance & al., 2001a, b). No

obstante, a veces flores protegidas contra los insectos pueden adquirir un bajo número de levaduras basidiomicétidas y de *Aureobasidium*, probablemente a través de dispersión por el aire. En otros casos, como en flores de *Hibiscus* se requerían al menos 2-4 horas tras la visita del insecto para que se estableciera una comunidad de levaduras (Lachance & al., 2001b). Nuestros resultados también pusieron de manifiesto este hecho, dándose la mayor ocurrencia y densidad de levaduras en las plantas embolsadas hasta 6 y 24 horas desde la visita del insecto.

Aunque únicamente se han encontrado levaduras en el néctar de tres de las siete especies analizadas (*S. sambucifolia*, *S. grandiflora* y *S. lyrata*), este resultado debe tomarse con cautela, ya que su ausencia en las otras cuatro (*S. calliantha*, *S. trifoliata*, *S. scorodonia* y *S. canina*) pudo deberse a otros factores, como por ejemplo, el menor tamaño muestral estudiado.

Los vectores principales de transporte de levaduras en las tres especies de *Scrophularia* indicadas fueron véspidos (*Vespula sp.* y *Polistes sp.*), abejas y, sobre todo, ápidos (*Apis sp.* y *Bombus sp.*). Si bien existen bastantes evidencias de que abejas y abejorros visitantes de flores actúan como vectores de transporte de levaduras (Rosa & al., 1995, 2007; Lachance & al., 2001a, b; Brysch-Herzberg, 2004; Pimentel & al., 2005; Manson & al., 2007; Canto & al., 2007, 2008; de Vega & al., 2009; Herrera & al., 2008, 2009, 2010), no ocurre lo mismo con las avispas ni con las abejas. En relación con las avispas se sabe que una especie de levadura (*Candida davenportii*) fue aislada a partir de un individuo muerto de *Vespula vulgaris*, aunque no visitando flores, sino cerca de un líquido azucarado de un tanque de refrescos (Stratford & al., 2002). En otro estudio se demostró que parte de la contaminación del néctar de dos especies de orquídeas (*Epipactis purpurata* y *E. helleborine*) se debía a la transferencia de algunos microorganismos por las avispas desde el fruto maduro de otras plantas (Ehlers & Olesen, 1997). Nuestros resultados demuestran, al igual que el anterior, que las avispas pueden actuar también como eficaces transportadores de levaduras al néctar floral, en este caso en *S. grandiflora* y *S. lyrata*. En la segunda especie, las avispas son sus polinizadores principales, pero en la primera son de tipo secundario (Rodríguez-Riaño & al., 2014).

Respecto a las abejas, consideramos como un hecho casual los dos únicos casos encontrados con presencia de levaduras asociadas a estos insectos (uno para *S. grandiflora* y otro para *S. lyrata*); algo similar ocurrió en otras especies estudiadas en

España y en la Península de Yucatán (Méjico), donde dichos insectos no tuvieron efectos sobre la composición de azúcares del néctar mientras que en las muestras visitadas por *Bombus terrestris* y *B. pratorum* sí se estimulaba una gran reducción en el porcentaje de sacarosa y un aumento en el de fructosa como consecuencia de la contaminación por levaduras (Canto & al., 2008; Herrera & al., 2009).

El análisis morfológico de las levaduras presentes en los néctares de *Scrophularia* mostró escasa diversidad de las mismas en las tres especies antes indicadas. En *S. grandiflora* hubo menos del 1 % de levaduras de tipo 2 (levuriformes) y un 4,8 % del tipo 1 (género *Metschnikowia*), estas últimas caracterizadas por su peculiar morfología en forma de hélice. Similares porcentajes (≤ 5 %) de presencia de *Metschnikowia reukaufii* se observaron en el néctar de varias especies (*Echium flavum*, *Lonicera arborea*, *Thymus serpylloides*) de la sierra de Cazorla (SE de España) (Herrera & al., 2012). Ambos tipos de levaduras fueron también muy escasas (menos de 1 %) en *S. sambucifolia* y en *S. lyrata*. De forma esporádica se encontraron esporas aerovagantes, como *Alternaria sp.* o *Cladosporium sp.*, sin interés en nuestro estudio, ya que son comunes en la mayoría de los ecosistemas terrestres (van Burik & Magee, 2001). Lo mismo se puede decir respecto a hongos epífitos generalistas del género *Aureobasidium* que suelen hallarse en otros microambientes, como la superficie de las hojas, el suelo, el agua dulce, el aire (Pozo & al., 2011) y/o los insectos (Davis & Landolt, 2013).

El análisis de las secuencias de ADN reveló los mismos resultados, ya que la especie que formó colonias más frecuentemente fue identificada como *Metschnikowia reukaufii*, casi el 92 % de las veces procedente del néctar de *S. grandiflora*. Esta especie junto con *M. gruessii* fueron igualmente las más abundantes en el néctar de diferentes plantas del C de Europa (Brysch-Herzberg, 2004) y S de España (Herrera & al., 2009, 2010; Pozo & al., 2011). Se ha sugerido que las flores son el hábitat principal de esas levaduras (véanse referencias en Brysch-Herzberg, 2004). Otras especies de dicho género se han encontrado en flores de plantas tanto del Nuevo Mundo como de Australia (Lachance & al., 2001b; Peay & al., 2012). En segundo lugar de ocurrencia se identificó a *Starmerella bombicola*, una levadura fermentativa y osmotolerante asociada a insectos, generalmente abejas y a sus hábitats más comunes, como por ejemplo, el néctar o la miel (Rosa & Lachance, 1998; Lachance & al., 2001b; Rosa & al., 2003; Brysch-Herzberg, 2004; Pimentel & al., 2005; Belisle & al., 2012; Peay & al., 2012;

Morais & al., 2013). Dicha especie sólo apareció en el néctar de *S. grandiflora* y *S. lyrata*.

Respecto a las otras levaduras identificadas mediante secuenciación de ADN, *Phaeomoniella sp.* y *Beauveria bassiana*, no se consideran de interés para este estudio ya que su presencia está asociada a otro tipo de interacción planta-insecto por lo que su presencia es meramente aleatoria. Lo habitual es encontrar a la primera ocupando otros ambientes, como el interior de las plantas (v.g. xilema), algunas de cuyas especies provocan una enfermedad devastadora de la vid (Valtaud & al., 2009). *Beauveria bassiana* crece de forma natural en los suelos de todo el mundo y es más probable encontrarla parasitando algunos insectos, a los que les causa la enfermedad conocida como blanca de la muscardina (Zaki, 1998).

La exigua diversidad de levaduras encontradas en el néctar de las flores de *Scrophularia* coincide con los resultados obtenidos en otros estudios llevados a cabo en hábitats templados tanto del Viejo como del Nuevo Mundo (Herrera & al., 2010 y referencias; Peay & al., 2012). Aunque no podemos descartar que el método de cultivo utilizado para aislar las levaduras haya podido intervenir en la diversidad de especies que crecieron en él, esta pobreza, como Herrera & al. (2010) apuntaban para *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae), podría deberse a que el néctar representa un ambiente fuertemente inhibitorio que constriñe el crecimiento de la mayoría de las especies de levaduras. Sólo una o pocas especies especialistas en néctar con ciertas capacidades fisiológicas para desarrollarse en el mismo (v.g. poseer una gran tolerancia ante una combinación de alta presión osmótica y compuestos fungicidas que a menudo contienen los néctares; Carter & Thornburg, 2004; Herrera & al., 2010), serán capaces de colonizar este tipo de medio hostil para la mayoría de las levaduras. Dado que la abundancia de azúcares en el néctar puede considerarse como una fuente de estrés osmótico más que una limitación de recursos, acotando así la diversidad de levaduras, la mayor ocurrencia de *Metschnikowia reukaufii* encontrada en *S. grandiflora* (Tabla 5) podría ser el resultado de una menor limitación de aminoácidos en su néctar (Baker & Baker, 1986; Peay & al., 2012) que en el del resto de las especies analizadas.

La mayor densidad de levaduras del tipo 1 (*Metschnikowia*) ocurrió en *S. grandiflora* (N = 31) con $0,66 \times 10^3$ células/ μl , valores bastante menores que los obtenidos en otros estudios (v.g. densidad media entre $10^4 - 10^5$ células/ μl ; de Vega, 2009; Herrera & al., 2008, 2009), mientras que para las levaduras de tipo 2 se llegó a las

$0,14 \times 10^5$ células/ μl en una de las tres muestras de *S. lyrata*. Sin embargo, en *S. sambucifolia* (N = 4, todas tipo 1) sólo se alcanzaron densidades del orden de 10^2 células/ μl . Esta baja densidad encontrada podría deberse a diversos factores, como son: (a) el tipo de polinizador que visitara la flor, (b) el tiempo de permanencia en la visita, (c) el tiempo transcurrido desde la visita hasta la recolección del néctar, y/o (d) la temperatura habida en ese intervalo de tiempo. Estos efectos, aún a pesar del escaso tamaño muestral que poseemos con presencia de levaduras, podrían haber sido importantes ya que: (i) la morfología de *Metschnikowia* permite su anclaje en los pelos de los abejorros, aunque éstos no son los únicos insectos que las transportan (Brysch-Herzberg, 2004); (ii) un mayor tiempo de visita implica mayor posibilidad de transferencia de levaduras; (iii) un mayor período de tiempo desde la visita hasta la recolección de la muestra permite una mayor oportunidad para que las colonias de levaduras se multipliquen; y (iv) una mayor temperatura ambiental podría acelerar dicha multiplicación como ya manifestó Brysch-Herzberg (2004) en especies del C de Europa. En relación con la temperatura dichos microorganismos dependen de los insectos (v.g. abejorros o avispas) para su dispersión, siendo más activos a temperaturas mayores, lo que fomenta visitas florales más frecuentes; a su vez las levaduras por sí mismas necesitan temperaturas más elevadas para conseguir una tasa mayor de crecimiento (Brysch-Herzberg, 2004).

Otro aspecto a tener en cuenta al respecto es la longevidad de las flores que albergan a estas levaduras, encontrándose las mayores densidades en especies donde la vida de sus flores supera las dos semanas (Herrera & al., 2008). En este sentido la vida media de las flores de las especies de *Scrophularia* donde se observaron levaduras se encuentra entre 2,5-4 días para el caso de *S. sambucifolia* y *S. grandiflora* (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b), siendo menor que la de especies estudiadas en otros trabajos (Herrera & al., 2009; Belisle & al., 2012). Por ejemplo, en la proterógina *Helleborus foetidus*, la media de tiempo transcurrido entre ambos estadios sexuales es de 8 días (Herrera & al., 2008). No obstante, en *Scrophularia* hay una correlación negativa entre la temperatura diaria y la longevidad de la flor, por lo que a menores temperaturas la longevidad se alarga (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b).

Aparte de factores estocásticos, la comunidad de microorganismos en el néctar también depende de otros elementos que probablemente inciden en la baja riqueza de especies en el mismo (Brysch-Herzberg, 2004; Pozo & al. 2011) y en la abundancia de

unas frente a otras, como es el caso de *M. reukaufii* (Peay & al., 2012). Estos elementos son el orden de llegada y la relación de parentesco entre los microorganismos que compiten, es decir, que las especies más relacionadas filogenéticamente (Suh & al., 2006) muestran una mayor competitividad dado que poseen similares requerimientos de recursos (Peay & al., 2012). Así, en un estudio reciente sobre la limitada dispersión de *M. reukaufii* en el néctar floral de *Mimulus aurantiacus* (Belisle & al., 2012) se encontró que la distribución espacial de esta levadura no seguía un patrón al azar y ninguno de los factores ambientales y florales ensayados (intensidad de luz, volumen de néctar, densidad de flores y densidad de plantas vecinas) podían explicarlo. En realidad, el factor principal involucrado en su limitada dispersión fue el patrón de pecoreo de sus polinizadores, el cual tampoco era aleatorio. En las especies de *Scrophularia* estudiadas hasta ahora se ha demostrado que el patrón de pecoreo depende del tamaño de las flores ya que para las especies de flores grandes se registró un número significativamente mayor de movimientos entre flores del mismo verticilo que a lo largo de la inflorescencia (Valtueña & al., 2013). En este trabajo no se tuvo en cuenta la distribución de las muestras analizadas ni las posibles especies de levaduras que potencialmente podrían competir en el néctar, por lo que se deja una puerta abierta para futuras investigaciones.

La incidencia de levaduras es mayor en las flores más viejas (funcionalmente masculinas) de *S. grandiflora*, ya que en ellas ha podido existir un prolongado periodo de multiplicación celular. Además, el tiempo transcurrido hasta alcanzar la fase masculina conlleva una mayor exposición del néctar y, como consecuencia, aumenta la probabilidad de nuevas visitas de los vectores de transmisión (Herrera & al., 2008). En las otras dos especies de *Scrophularia* (*S. sambucifolia* y *S. lyrata*) se apreció una tendencia a la inversa (Fig. 7), aunque estos resultados deben tomarse con cautela dado el escaso tamaño muestral (N = 13 en ambos casos). La mayor presencia de levaduras cuando la flor se encuentra aún en fase femenina puede deberse a que *S. sambucifolia* y *S. lyrata*, como sucede en la mayoría de especies del género, secretan el mayor volumen de néctar/flor/día durante dicha fase, a diferencia de *S. grandiflora*, en la que la máxima producción ocurre en la masculina (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b). Se ha demostrado para estas mismas especies que sólo el volumen del néctar está claramente correlacionado con el tamaño de la flor y con el del cuerpo del polinizador (Rodríguez-Riaño & al., 2014). De este modo, una mayor disponibilidad de néctar podría favorecer

una mayor atracción de los polinizadores y/o visitantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul S.F., T.L. Madden, A.A Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller & D.J. Lipman** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Álvarez-Pérez S., C.M. Herrera & C. de Vega** (2012) Zooming-in on floral nectar: a first exploration of nectar-associated bacteria in wild plant communities. *FEMS Microbiology Ecology* 80: 591-602.
- Baker H.G. & I. Baker** (1983) Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In: Jones C.E. & R.J. Little (Eds.) *The handbook of experimental pollination biology*, pp. 117-141. Scientific & Academic Editions. New York.
- Baker H.G. & I. Baker** (1986) The occurrence and significance of amino acids in floral nectar. *Plant Systematics and Evolution* 151: 175-186.
- Baker H.G. & I. Baker** (1990) The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator types. *Israel Journal of Botany* 39: 157-166.
- Belisle M., K. Peay & T. Fukami** (2012) Flowers as islands: spatial distribution of nectar-inhabiting microfungi among plants of *Mimulus aurantiacus*, a Hummingbird-pollinated shrub. *Microbial Ecology* 63: 711-718.
- Boundy-Mills K.** (2006) Methods for investigating yeast biodiversity. In: Rosa C. & G. Peter (Eds.) *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, pp. 67-100. Springer. Berlin.
- Brodmann J., D. Emer & M. Ayasse** (2012) Pollinator attraction of the wasp-flower *Scrophularia umbrosa* (Scrophulariaceae). *Plant Biology* 14: 500-505.
- Brysch-Herzberg M.** (2004) Ecology of yeasts in plant-bumblebee mutualism in Central Europe. *FEMS Microbiology Ecology* 50: 87-100.
- Canto A., C.M. Herrera, M. Medrano & R. Pérez & I.M. García** (2008) Pollinator foraging modifies nectar sugar composition in *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae): an experimental test. *American Journal of Botany* 95: 315-320.
- Canto A., R. Pérez, M. Medrano, M.C. Castellanos & C.M. Herrera** (2007) Intra-plant variation in nectar sugar composition in two *Aquilegia* species (Ranunculaceae): contrasting patterns under field and glasshouse conditions. *Annals of Botany* 99: 653-660.
- Carter C. & R.W. Thornburg** (2004) Is the nectar redox cycle a floral defense against microbial attack? *Trends in Plant Science* 9: 320-324.
- Chalcoff V.R., M.A. Aizen & L. Galetto** (2006) Nectar concentration and composition of 26 species from the temperate forest of South America. *Annals of Botany* 97: 413-421.
- Davis A.R.** (2003) Influence of elevated CO₂ and ultraviolet-B radiation levels on floral nectar production: a nectary-morphological perspective. *Plant Systematics and Evolution* 238: 169-181.
- Davis T.S. & P.J. Landolt** (2013) A survey of insect assemblages responding to volatiles from a ubiquitous fungus in an agricultural landscape. *Journal of Chemical Ecology* 39: 860-868.
- de Vega C., C.M. Herrera & S.D. Johnson** (2009) Yeasts in floral nectar of some South African plants: quantification and associations with pollinator type and sugar

- concentration. *South African Journal of Botany* 75: 798-806.
- Drummond A.J., B. Ashton, M. Cheung, J. Heled, M. Kearse, R. Moir & S. Stones-Havas** (2010) *Geneious* v5.0. <http://www.geneious.com>.
- Dupont Y.L. D.M. Hansen, J.T. Rasmussen & J.M. Olesen** (2004) Evolutionary changes in nectar sugar composition associated with switches between bird and insect pollination: the Canarian bird-flower element revisited. *Functional Ecology* 18: 670-676.
- Ehlers B.K. & J.M. Olesen** (1997) The fruit-wasp route to toxic nectar in *Epipactis* orchids? *Flora* 192: 223-229.
- Fridman S., I. Izhaki, Y. Gerchman & M. Halpern** (2012) Bacterial communities in floral nectar. *Environmental Microbiology Reports* 4: 97-104.
- Fulton A.** (1886) The inflorescence, floral structure and fertilisation of *Scrophularia aquatica* and *S. nodosa*. *Botanical Society of Scotland* 16: 379-389.
- Galetto L. & G. Bernardello** (2003) Nectar sugar composition in angiosperms from Chaco and Patagonia (Argentina): an animal visitor's matter? *Plant Systematics and Evolution* 238: 69-86.
- Giménez-Jurado G., C.P. Kurtzman, W.T. Starmer & I. Spencer-Martins** (2003) *Metschnikowia vanudenii* sp. nov. and *Metschnikowia lachancei* sp. nov., from flowers and associated insects in North America. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53: 1665-1670.
- Guilliermond A.** (1920) *Yeasts: culture, identification, and microbiology*. Wexford College Press. Boston.
- Guzmán B., M.A. Lachance & C.M. Herrera** (2013) Phylogenetic analysis of the angiosperm-floricolous insect-yeast association: Have yeast and angiosperm lineages co-diversified? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68: 161-175.
- Herrera C.M., A. Canto, M.I. Pozo & P. Bazaga** (2010) Inhospitable sweetness: nectar filtering of pollinator-borne inocula leads to impoverished, phylogenetically clustered yeast communities. *Proceedings of the Royal Society B* 277: 747-754.
- Herrera C.M., C. de Vega, A. Canto & M.I. Pozo** (2009) Yeasts in floral nectar: a quantitative survey. *Annals of Botany* 103: 1415-1423.
- Herrera C.M., I.M. García & R. Pérez** (2008) Invisible floral larcenies: microbial communities degrade floral nectar of bumble bee-pollinated plants. *Ecology* 89: 2369-2376.
- Herrera C.M., R. Pérez & C. Alonso** (2006) Extreme intraplant variation in nectar sugar composition in an insect-pollinated perennial herb. *American Journal of Botany* 93: 575-581.
- Herrera C.M. & M.I. Pozo** (2010) Nectar yeasts warm the flowers of a winter-blooming plant. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277: 1827-1834.
- Herrera C.M., M.I. Pozo & P. Bazaga** (2012) Jack of all nectars, master of most: DNA methylation and the epigenetic basis of niche width in a flowerliving yeast. *Molecular Ecology* 21: 2602-2616.
- Kurtzman C.P. & C.J. Robnett** (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie Van Leeuwenhoek* 73: 331-371.
- Lachance M.A.** (2006) Yeast biodiversity: how many and how much? In: Rosa C.A. & G. Peter (Eds.) *Biodiversity and ecophysiology of yeast*, pp. 1-9. Springer. Berlin.
- Lachance M.A., J.M. Bowles, M. Chavarría Díaz & D.H. Janzen** (2001a) *Candida*

cleridarum, *Candida tilneyi* and *Candida powellii*, three new yeast species isolated from insects associated with flowers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1201-1207.

- Lachance M.A., J.M. Bowles, W.T. Starmer & J.S.F. Barker** (1999) *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian *Hibiscus* flowers. *Canadian Journal of Microbiology* 45: 172-177.
- Lachance M.A., W.T. Starmer, C.A. Rosa, J.M. Bowles, J.S.F. Barker & D.H. Janzen** (2001b) Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. *FEMS Yeast Research* 1: 1-8.
- Manson J.S., M.A. Lachance & J.D. Thomson** (2007) *Candida gelsemii* sp. nov., a yeast of the *Metschnikowiaceae* clade isolated from nectar of the poisonous *Carolina jessamine*. *Antonie van Leeuwenhoek* 92: 37-42.
- Maqueda M., E. Zamora, N. Rodríguez-Cousiño & M. Ramírez** (2010) Wine yeast molecular typing using a simplified method for simultaneously extracting mtDNA, nuclear DNA and virus dsRNA. *Food Microbiology* 27: 205-209.
- Morais P., P.S. Calça & C. Rosa** (2013) Microorganisms associated with stingless bees. In: Vit P., S.R.M. Pedro & D. Roubik (Eds.) *Pot-Honey*, pp. 173-186. Springer. New York.
- Navarro J., B. Navarro & J. Naranjo** (2004) *Scrophularia calliantha* Webb & Bertel. In: Bañares A., G. Blanca, J. Güemes, J.C. Moreno & S. Ortiz (Eds.) *Atlas y libro rojo de la flora vascular amenazada de España: táxones prioritarios*, pp. 480-481. Ministerio de Medio Ambiente. Madrid.
- Navarro-Pérez M.L., J. López, M. Fernández-Mazuecos, T. Rodríguez-Riaño, P. Vargas & A. Ortega-Olivencia** (2013) The role of birds and insects in pollination shifts of *Scrophularia* (Scrophulariaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 239-254.
- Nepi M., P. von Anderkas & E. Pacini** (2012) Sugary exudates in plant pollination. In: Vivanco J.M. & F. Baluška (Eds.) *Secretions and exudates in biological systems*, pp. 155-185. Springer. Berlin, Heidelberg.
- Nicolson S.W. & R.W. Thornburg** (2007) Nectar chemistry. In: Nicolson S.W., M. Nepi & E. Pacini (Eds.) *Nectaries and nectar*, pp. 215-263. Springer. Dordrecht.
- Nocentini D., E. Pacini, M. Guanieri & M. Nepi** (2012) Flower morphology, nectar traits and pollinators of *Cerintho major* (Boraginaceae-Lithospermae). *Flora* 207: 186-196.
- Ortega-Olivencia A.** (2009) *Scrophularia* L. In: Benedí C., E. Rico, J. Güemes & A. Herrero (Eds.) *Flora iberica* 13: 97-122. Real Jardín Botánico de Madrid. CSIC. Madrid.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993a) Revisión del género *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae) en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Ruizia* 11: 1-157. Monografías del Real Jardín Botánico de Madrid. CSIC. Madrid.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993b) Floral rewards in some *Scrophularia* species (Scrophulariaceae) from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *Plant Systematics and Evolution* 184: 139-158.
- Ortega-Olivencia A., T. Rodríguez-Riaño, J.L. Pérez-Bote, J. López, C. Mayo, F.J. Valtueña & M.L. Navarro-Pérez** (2012) Insects, birds and lizards as pollinators of the largest-flowered *Scrophularia* of Europe and Macaronesia. *Annals of Botany* 109: 153-167.
- Pacini E. & M. Nepi** (2007) Nectar production and presentation. In: Nicolson S.W., M. Nepi & E. Pacini (Eds.) *Nectaries and nectar*, pp. 167-214. Springer. Dordrecht.
- Pacini E., M. Nepi & J.L. Vesprini** (2003) Nectar biodiversity: A short review. *Plant Systematics and Evolution* 238: 7-21.

- Peay K.G., M. Belisle & T. Fukami** (2012) Phylogenetic relatedness predicts priority effects in nectar yeast communities. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 749-758.
- Percival M.S.** (1961) Types of nectar in angiosperms. *New Phytologist* 60: 235-281.
- Petanidou T.** (2005) Sugars in Mediterranean floral nectars: An ecological and evolutionary approach. *Journal of Chemical Ecology* 31: 1065-1088.
- Pimentel M.R.C., Y. Antonini, R.P. Martins, M.A. Lachance & C.A. Rosa** (2005) *Candida riococensis* and *Candida cellae*, two new yeast species from the *Starmerella* clade associated with solitary bees in the Atlantic rain forest of Brazil. *FEMS Yeast Research* 5: 875-879.
- Pozo M.I., C. de Vega, A. Canto & C.M. Herrera** (2009) Presence of yeasts in floral nectar is consistent with the hypothesis of microbial-mediated signaling in plant-pollinator interactions. *Plant Signaling & Behavior* 4: 1102-1104.
- Pozo M.I., C. Herrera & P. Bazaga** (2011) Species richness of yeast communities in floral nectar of Southern Spanish plants. *Microbial Ecology* 61: 82-91.
- Rodríguez-Riaño T., A. Ortega-Olivencia, J. López, J.L. Pérez-Bote & M.L. Navarro-Pérez** (2014) Main sugar composition of floral nectar in three species groups of *Scrophularia* (Scrophulariaceae) with different principal pollinators. *Plant Biology*, doi:10.1111/plb.12159.
- Rosa C.A. & M.A. Lachance** (1998) The yeast genus *Starmerella* gen. nov. and *Starmerella bombicola* sp. nov., the teleomorph of *Candida bombicola* (Spencer, Gorin and Tullock) Meyer and Yarrow. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48: 1413-1417.
- Rosa C.A., M.A. Lachance, J.O.C. Silva, A.C.P. Teixeira, M.M. Marini, Y. Antonini & R.P. Martins** (2003) Yeast communities associated with stingless bees. *FEMS Yeast Research* 4: 271-275.
- Rosa C.A., P.B. Morais, S.R. Santos, P.R. Neto, L.C. Mendonça-Hagler & A.N. Hagler** (1995) Yeast communities associated with different plant resources in sandy coastal plains of southeastern Brazil. *Mycological Research* 99: 1047-1054.
- Rosa C.A., F.C. Pagnocca, M.A. Lachance, C.C. Ruivo, A.O. Medeiros, M.R.C. Pimentel, J.C.R. Fontenelle & R.P. Martins** (2007) *Candida floscolorum* sp. nov. and *Candida floris* sp. nov., two yeast species associated with tropical flowers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 2970-2974.
- Stratford M., C.J. Bond, S.A. James, I.N. Roberts & H. Steels** (2002) *Candida davenportii* sp. nov., a potential soft-drinks spoilage yeast isolated from a wasp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 1369-1375.
- Suh S.O., M. Blackwell, C.P. Kurtzman & M.A. Lachance** (2006) Phylogenetics of Saccharomycetales, the ascomycete yeasts. *Mycologia* 98: 1006-1017.
- Valsecchi F.** (1979) Observations sur quelques espèces du genre «*Scrophularia*» L. en Sardaigne. *Webbia* 34: 265-288.
- Valtaud C., P. Larignon, G. Roblin & P. Fleurat-Lessard** (2009) Developmental and ultrastructural features of *Phaeoemoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* in relation to xylem degradation in esca disease of the grapevine. *Journal of Plant Pathology* 91: 37-51.
- Valtueña F.J., A. Ortega-Olivencia, T. Rodríguez-Riaño, J.L. Pérez-Bote & C. Mayo** (2013) Behaviour of pollinator insects within inflorescences of *Scrophularia* species from Iberian Peninsula. *Plant Biology* 15: 328-334.
- Van Burik J.A.H. & P.T. Magee** (2001) Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annual*

Review of Microbiology 55: 743-772.

Vannette R.L., M.P.L. Gauthier & T. Fukami (2013) Nectar bacteria, but not yeast, weaken a plant-pollinator mutualism. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280: 20122601.

Yarrow D. (1998) Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. In: Kurtzman C.P. & J.W. Fell (Eds.) *The yeast, a taxonomic study*, pp. 77-100. Elsevier. Amsterdam.

Zaki F.N. (1998) Efficiency of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana* (Bals), against *Aphis crassivora* Koch and *Bemesia tabaci* Gennandius. *Journal of Applied Entomology* 122: 397-399.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Material suplementario S1. Secuencias de nucleótidos de las diferentes colonias de levaduras aisladas del néctar en las flores de las *Scrophularia* estudiadas. A continuación se indica la especie identificada de acuerdo con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), la longitud de las secuencias, el número y el porcentaje de sitios idénticos entre nuestras secuencias y las del NCBI y el porcentaje de similitud entre estos pares de secuencias.

Levadura nº 1

GGTCCGTGTTTCAAGACGGGTTCGCTTACAACCATTACGCCAGCATCCGAGCAGATG
 CGCGTACCTCAGTCTAGGTAGGGCACATTACACCGAGGGCTATAAGTCTACACCCG
 AAGGAGTAGATACATTCCCAAGGCCTTTAACTACCCACCCAAACTGATGCTGGCCT
 GGACGAACGGAATGGGCCACTGAAAACAGTGGTTGAACCGTTCGAAACAAGTCTG
 GTTGCAAGCGCTTCCCTTTCAACAATTTACATACTGTTTAACTCTCTTTTCAAAGTG
 CTTTTCATCTTTTCGATCACTCTACTTGTGCGCTATCGGTCTCTGGCCAATATTTAGCT
 TTAGAAGAAATTTACCTCCCATTTTGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCGTCGA
 AGGAGTTTCACATGGACGCGGCATAGGGACCAAGACGGGATTCTCACCCCTCTATGA
 CGTCTGTTCCAAGGAACCTTAGACCCAAGCCTTGTCCGAAACATCCTCTACAAATTA
 CAACTCGGACCCTAAAAGAGCCAGATTTCAAATTTGAGCTATTGCCGTTCACTCG
 CCGTTACTAAGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCCCTCCGCTTATTGATATGCAAAGA
 GGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAGAGAATAAACATTTGTGAAATTGTTGA
 AAGGAAGCGCTTGAACCAAGTTGTTTCCAAGGGCTCAACCACTGTTTTTCAGAGG
 CCATTCCGTTCTCCAGGCCAGCTGAGTTTGGGTGGGTAGTTAAAGGCCTTGGGAAA
 GTATCTACTCCTTCGGGCGTAGACTTATAGCCCTCAGCGTAATGTGCCATACCAAGA
 CTGAGGTATGCGCATCTGCTCAGATGCGGGAGTAATGGTGGTAAGCGACCCGTCTT
 GAAACACGGAG

Phaeomonilla sp.

Longitud: 913 / Sitios idénticos: 912 (99,9 %) / Similitud por pares %: 99,9 %

Levadura nº 2

CAAGAGGGATCGCTGACAACCATTACGCCAGCAGCCTCGCAATGCGCGTCCCTCAC
 TCCTCAACTGGGCATTATGCATCGGGCTATACCACTCGTGAGGGATCCACATTCCCG
 TTGCCTTTCTCCCCGCGCGGTCTGAGGACGGCCTGCCCCCGCAAAGTGCGCC
 GGGAGAGTCTGCGTGATTCCCCGGGAAAAATTCTGGTCATAGTCGCTTCCCTTTCA
 ACAATTTACGTACTTTTTAAACCCTATTTTTAAAGTAGCTTTTCTTTTTTCGATCACT
 CTTGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGG
 CGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTCAGGGCCCGAGTTGTA
 ATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGAGGTGCCTTCCGAGTTCCCTGGAACGGGACGCC
 ACAGAGGGTGAGAGCCCCGTATGGTCGGACACCGAGCCTCTGTAAAGCTCCTTCGA
 CGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCAAAATGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGC
 TAAATATTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAG
 CACTTTGAAAAGAGGGTTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGCCTAT
 GACCAGACTTGCGCCCGGTGAATCACCCAGCGTTTCTCGCTGGTGCCTTTGCCGGG
 CACAGGCCAGCATCAGTTCAGCGCGGGGGAGAAAGGCTTCGGGAATGTGGCTCCCT
 CGGGAGTGTTATAGCCCGCTGCGTAATGCCCTGCGCCGGACTGAGGTACGCGCATT
 GCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCATCAGCGACCCGTCTTGAAACACGGACCACGAA
 AGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGG
 AAGCGCCTATGACCAGACTTGCGCCCGGTGAATCACCCAGCGTTCTCGCTGGTGCA
 CTTTGCCGGGCACAGGCCAGCATCAGTTCAGCGCGGGGGAGAAAGGCTTCGGGAA
 TGTGGCTCCCTCGGGAGTGTTATAGCCCGCTGCGTAATGCCCTGCGCCGGACTGAG
 GTACGCGCATTGCAAGGATGCTGGCGTAATGGTCATCAGCGACCCGTCTTGAAACA
 CGGACC

Beauveria bastiana

Longitud: 1181 / Sitios idénticos: 1,177 (99,7 %) / Similitud por pares %: 99,7 %

Levadura nº 3

GGTCCGTGTTTCAAGACGGGCGACTTGCAACCATTACGCCAGCATCCTTGAAGAAT
CGCAGGCCTCGGAAGGGGGTGGAGATATGAGAAAAAGGCTATAATACTCAATGAG
TTACATTCCTTTTCTTTTTGTCTCCCCCACTCCGATGCTGGCCCAACCGAGGTGT
GTCTGCTTGAAGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTAATTTTCACTCTCTTTTCA
AAGTGCTTTTTCATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATT
TAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTC
TTTGGAGGGAATGGATAAAAGGAAAAGGGATACTTTTACGGGGCTATCACCTCCA
TGGCGCCATTTTCCAATGGACTTAAAGTAACTTTTCTAACCACCAACCCACCTTCAA
ATACAATTCCCGAAGGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTG
AGGCAATCCCTGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGC

Metschnikowia reukaufii

Longitud: 555 / Sitios idénticos: 555 (100 %) / Similitud por pares %: 100 %

Levadura nº 4

CAAGACGGGCGACTTGCAACCATTACGCCAGCATCCTTGAAGAATCGCAGGCCTCG
GAAGGGGGTGGAGATATGAGAAAAAGGCTATAATACTCAATGAGTTACATTCCTTT
TCTTTTTTGTCTCCCCCACTCCGATGCTGGCCCAACCGAGGTGTGTCTGCTTGCA
AGCCCTTCCCTTTCAACAATTTACGTAATTTTCACTCTCTTTTCAAAGTGCTTTTC
ATCTTTCCATCACTGTACTTGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGAT
GGAATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTTGGAGGGA
ATGGATAAAAGGAAAAGGGATACTTTTACGGGGCTATCACCTCCATGGCGCCATT
TTCCAATGGACTTAAAGTAACTTTTCTAACCACCAACCCACCTTCAAATAACAATTCC
CGAAGGATTTCAAATTTGAGCTTTTGCCGCTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATCCC
TGTTGGTTTCTTTTCTCCGCTTATTGATATGCAACAGTAATGGAAAGATGAAAAGC
ACTTTGAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAA
GCAGACACAACCTCGGTTGGGCCAGCATCGGAGTGGGGGGAGACAAAAAAGAAAA
GGAATGTAACCTCATTGAGTATTATAGCCTTTTTCTCATATCTCCACCCCTTCCGAG
GCCTGCGATTCTTCAAGGATGCTGGCGTA

Metschnikowia reukaufii

Longitud: 764 / Sitios idénticos: 721 (94,4 %) / Similitud por pares %: 97,9 %

Levadura nº 5

GTATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGA
GTGAACAGGCAAGAGCTCAGATTTGAAGCCTTTCGGGGCATTGTATTCTGAAGCCT
TGATTCTGAGAACCGGTACCTAAGTCTTCTGGAAAGGAGCGCCAAGGAGGGTGATA
GCCCCGTACGGTACTGACCTCATTGTAGAATCTTGGCGTGGAGTCGAGTTGTTTGGG
AATGCAGCTCAAATGGGTGGTATGCTCCATCTAAAGCTAAATATCTGCGAGAGACC
GATAGCGAACAAGAAGTGTGAAGGAAAGATGAAAAGAAGTGTGAAAAGAGAGTGA
AAAAGTACGTGAAATTGTTGAAATGGAAGGACAGGCCGCTAACCACGTAGAGCCG
TGTCTGAGGGCAGGATAAAAGCTGTAGAATGTGGCTCTTCGGAGTGTATAGCTGC
A

Starmerella bombicola

Longitud: 447 / Sitios idénticos: 446 (99,8 %) / Similitud por pares %: 99,3 %

Levadura nº 6

CATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAG
TGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCGCAAGGTCCGAGTTGTAATTTG
TAGAGGATGCTTTTGGCGAGGTGACTTCCGAGTTCCCTGGAACGGGACGCCATAGA
GGGTGAGAGCCCCGTACGGTCGTGCCACCGAGCCTC-
TGTAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGAGGT
GTACGTCTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGA

TCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGGGTTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGA
AAGGGAAGCATTTCATGACCAGACTTGGGCTTGGTTGAACATCCGGCGTTCTCGCCG
GTGCACTCTGCCAGCTCAGGCCAGCATCAGTTTCCCCGGGGGACAAAGGCGGCGG
GAATGTGGCTCCCCACGGGGAGTGTTATAGCCCGTCGTGTAATGCCCTGGGGTGA
CTGAGGTTTCGCGCTTCGGCACGGATGCTGGCGTAATGGTCATCAATGACCCGTCTT
GAAACACGGACC

Acremonium implicatum, Sarocladium bacillisporum

Longitud: 607 / Sitios idénticos: 427 (70,3 %) / Similitud por pares %: 89,2 %

Levadura nº 7

TCAGTTACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCCGCAAGGTC
CGAGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTTTGGCGAGGTGACTTCCGAGTTCCTGGAAC
GGGACGCCATAGAGGGTGAGAGCCCCGTACGGTAGTGACACCGAGCCTCTGTAAA
GCTCCTTCGACGAGTCGAGTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGAGGTGTAAGT
CTTCTAAAGCTAAATACCGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAA
AGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGC
AAGCATTATGACCAGACTTGGGCTTGGATGAACATCCGGCGTTCTCGCCGGTGCA
CTCTGCCAGCCTAGGCCAGCATCAGTTACGACCGGGGATAAAGGTAGCGGGAAT
GTGACTCCCTCCGGGGAGTGTTATAGCCCGTTGCGCAATGCCCTGGGGTGGACTGA
GGAACGCGCTTCGGCACGGATGCTGGCGTAATGGTCATCAATGACTCGTCTTAAAA
CACGGACC

Especie no identificada

Longitud: 566 / Sitios idénticos: 4566 (100 %) / Similitud por pares %: 100 %

Levadura nº 8

AGATGAGATTTACCACCCACTTAGAGCTGCATTCCCAAACAACCTCGACTCTTTGGA
GGGGGAAGATATGTATTGTGTTGAATCAGACGGGGCTATCACCCCTCTGTGGCGCCA
TTTTCCAATAGACTTAGAAGAACACGTTACTTTTTCCCCAACCTTCAAATTACAATT
CCCGGGGGATTTCAAATTTGAGCTTTTGGCGTTCACTCGCCGTTACTGAGGCAATC
CCTGTTGGTTTCTTTTCCCTCCGCTTATTGATA

***Metschnikowia gruessii* (secuencia incompleta)**

Longitud: 258 / Sitios idénticos: ¿? / Similitud por pares %: ¿?

RESUMEN

Levadura nº 1 = *Phaeomoniella* sp.

Levadura nº 2 = *Beauveria bastiana*

Levadura nº 3 = *Metschnikowia reukaufii*

Levadura nº 4 = *Metschnikowia reukaufii* (< 99% de similitud)

Levadura nº 5 = *Starmerella bombicola*

Levadura nº 6, 7 y 8 = Especies con una similitud de secuencia menor del 99 % o sin identificar.

Capítulo 5

The role of birds and insects in pollination shifts of *Scrophularia* (Scrophulariaceae)

Capítulo publicado en *Molecular Phylogenetics and Evolution*:

Navarro-Pérez M.L., J. López, M. Fernández-Mazuecos, T. Rodríguez-Riaño, P. Vargas & A. Ortega-Olivencia (2013) The role of birds and insects in pollination shifts of *Scrophularia* (Scrophulariaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 239-254.

ABSTRACT

The mixed vertebrate-insect pollination system is rare in Holarctic plants. Phylogenetic relationships of 116 *Scrophularia* taxa were investigated based on two plastid (*ndhF* and *trnL-trnF*) and one nuclear (ITS) DNA regions. A wider time-calibrated analysis of *ndhF* sequences of the Lamiales revealed that *Scrophularia* diverged as early as in the Miocene (< 22 Ma). Results of maximum-likelihood optimizations supported wasp pollination as the ancestral pollination system from which other systems derived (hoverfly, mixed vertebrate-insect and bird systems). Four origins for a mixed vertebrate-insect (MVI) pollination system were inferred, in which two western Mediterranean species (*S. sambucifolia* and *S. grandiflora*) and two island species (the Tirrenian *S. trifoliata* and the Canarian *S. callianta*) were involved. *S. callianta* is the only species in which a more complex MVI system, including pollination by the lizard *Gallotia stehlini*, has evolved. In addition, bird (hummingbird) floral traits found in the New Mexican *S. macrantha* appear to have been independently acquired. In contrast, we failed to find evidence for an ancient role of hummingbirds in the evolution of European *Scrophularia*. Indeed, paleontological data revealed that extinction of European hummingbirds (30-32 Ma) occurred earlier than the divergence of European MVI lineages of *Scrophularia*. In conclusion, our results showed that a role of birds in pollination of *Scrophularia* may not have been effective in the Miocene-Pliocene, but bird pollination that shows its origin in the Pliocene–Pleistocene is still operating independently in different islands and continents.

RESUMEN

El sistema mixto de polinización vertebrados e insectos es poco frecuente en plantas holárticas. En este capítulo se han investigado las relaciones filogenéticas de 116 táxones de *Scrophularia* sobre la base de dos regiones de ADN, dos plastidiales (*ndhF* y *trnL-trnF*) y una nuclear (ITS). Un amplio análisis datado de secuencias *ndhF* de Lamiales reveló que *Scrophularia* divergió como muy pronto en el Mioceno (< 22 Ma). Los resultados de las optimizaciones de máxima probabilidad apoyaron la polinización por avispa como el sistema de polinización ancestral a partir del cual derivaron los otros sistemas (por sírfidos, mixto vertebrado-insectos y por aves). Se han inferido cuatro orígenes para el sistema de polinización mixto vertebrado-insectos (MVI), en el que han participado dos especies mediterráneas occidentales (*S. sambucifolia* y *S. grandiflora*) y dos insulares, la tirrénica *S. trifoliata* y la canaria *S. calliantha*. *S. calliantha* es la única especie en la cual ha evolucionado el sistema MVI más complejo, incluyendo la polinización por el lagarto *Gallotia stehlini*. Además, los rasgos florales ornitófilos (por colibríes) que se encuentran en *S. macrantha*, endémica de Nuevo México, parecen haber sido adquiridos de forma independiente. Por el contrario, no hemos podido encontrar evidencia del

papel ancestral de los colibríes en la evolución de las *Scrophularia* europeas. De hecho, los datos paleontológicos revelaron que la extinción de los colibríes en Europa (30-32 Ma) se produjo antes de la divergencia de los linajes europeos MVI de *Scrophularia*. En conclusión, nuestros resultados mostraron que el papel de las aves en la polinización de *Scrophularia* puede no haber sido efectivo en el Mioceno-Plioceno, pero la polinización por aves que muestra su origen en el Plioceno-Pleistoceno sigue operando de forma independiente en diferentes islas y continentes.

INTRODUCTION

Pollination syndromes are being increasingly analyzed using phylogenetic comparative methods (Smith, 2010). Early claims assumed that highly specialized flower morphologies were the main consequence of selective pressures exerted by pollinators (Stebbins, 1970; Faegri & van der Pijl, 1979). Current evidence reveals more complex pollination mechanisms referred to as pollination systems interpreted herein as sets of traits facilitating particular pollinator guilds, instead of the more commonly used term ‘pollination syndromes’ (Johnson, 2010). Even so, pollination syndromes are not entirely rejected; in many cases, the correlated evolution of floral traits and pollination systems provides support for the pollination syndrome concept (e.g. Martén-Rodríguez & al., 2010), although certainly some pollination syndromes have greater predictability than others (e.g. Wilson & al., 2004; Ollerton & al., 2009a; Danieli-Silva & al., 2012). Despite criticisms and current debate, pollination syndromes provide great utility in understanding the mechanisms of floral diversification, being important to organize pollinators into functional groups according to presumed similarities in the selection pressures they exert (Fenster & al., 2004).

Quantitative field observations and specific experiments are the first step to obtain actual data on pollination visitors, pollinator performance, pollinator effectiveness and pollination efficiency (Johnson & Steiner, 2000; Ne’eman & al., 2010). Only when this information and phenotypic floral traits are known, evolutionary trajectories of floral phenotypes can be reliably inferred in a phylogenetic context (Fenster & al., 2004, and references therein). Nevertheless, this type of state-of-the-art approach has only been implemented for species-poor plant lineages (e.g. *Dalechampia*: Armbruster & Baldwin, 1998; *Narcissus*: Pérez-Barrales & al., 2006; *Iochroma*: Smith & al., 2008; *Gesnerieae*: Martén-Rodríguez & al., 2010). A reliable reconstruction of

pollination systems is more complex with higher diversity of species and pollination systems (e.g. Valente & al., 2012; van der Niet & Johnson, 2012).

The lure of bird-mediated pollination has traditionally led to insightful evolutionary studies (van der Niet & Johnson, 2012). Although birds pollinate flowers with a great variety of color patterns and shapes (Faegri & van der Pijl, 1979; Proctor & al., 1996), the floral traits adapted to them, and widely referred to as “ornithophily” (Faegri & van der Pijl, 1979), are more predictable (Hargreaves & al., 2004; Kaczorowski & al., 2005; Cronk & Ojeda, 2008; Danieli-Silva & al., 2012). These floral traits appear in many species as a combination of typical characters, such as showy flowers with striking coloration, corollas dominating in red color, tubular, odorless, with diurnal anthesis and abundant nectar that peaks in the early morning hours (Faegri & van der Pijl, 1979; Proctor & al., 1996). In addition, there is current evidence, at least from the Australian flora, that bird-pollinated flowers also have a distinctive floral reflectance (Shrestha & al., 2013).

Bird flowers are primarily distributed throughout America, Central and South Africa, Australia, New Zealand, and tropical Asia (Stiles, 1981; Ford, 1985; Pellmyr, 2002). Indeed, the two major groups of birds involved in pollination are passerines and hummingbirds, which are distributed in tropical and subtropical areas. Reports of bird pollination in native plants are extremely rare in temperate Asia (e.g. *Eriobotrya japonica*: Fang & al., 2012) and Europe (e.g. *Anagyris foetida*: Ortega-Olivencia & al., 2005). Hummingbirds (Trochilidae, Apodiformes), considered the most important vertebrate pollinators, have long beaks that are highly specialized for nectar feeding (Yanega & Rubega, 2004). They are currently endemic to America, with a hotspot of diversity in the Neotropics (Bawa, 1990). However, in recent years hummingbird fossils have been found in Europe (e.g. Germany: Mayr, 2004, 2005, 2007; Poland: Bochenski & Bochenski, 2008; and France: Louchart & al., 2008) consistently for the early Oligocene (30-32 Ma). These fossils provide the first evidence for Old World nectarivory in early Tertiary stem-group hummingbirds and birds in general (Mayr, 2004). Thus, a working hypothesis on the evolution of the European bird-pollinated flowers postulates that the ancestors of these extant bird-pollinated plants could have been pollinated by hummingbirds. Moreover, paleontologists concur that passerines originated in the Southern Hemisphere and colonized the Northern Hemisphere in the late Eocene or early Oligocene. The earliest fossils of passerines in Europe are from the

lower Oligocene, and they did not become prevalent until the Miocene (James, 2005, and references therein). Hence, passerines may have coexisted with hummingbirds in Europe, since the lower Oligocene.

Records of plants that display traits related to bird pollination are more frequent in the Macaronesian region than in Europe, where six passerine species visit at least 11 native flowers that offer nectar rewards (Valido & al., 2004). Recently, bird pollination has been documented in two plant species of the Canary Islands (*Isoplexis canariensis*, and *Canarina canariensis*: Rodríguez-Rodríguez & Valido, 2008; Ollerton & al., 2009b; Rodríguez-Rodríguez & al., 2013). However, there are not nectar-feeding specialist bird populations or fossils indicating their presence; in fact, current birds acting as pollinators are generalists (Rodríguez-Rodríguez & Valido, 2008; Ollerton & al., 2009b). Valido & al. (2004) postulated two hypotheses to explain the origin and evolution of the Macaronesian ornithophilous flora. According to “the island de novo hypothesis”, bird-pollinated flowers evolved after island colonization by mainland insect-pollinated ancestors. Alternatively, “the relict hypothesis” argues that the ancestors of Macaronesian ornithophilous plants evolved bird-pollinated flowers before colonization of the islands. Whereas a relict condition was interpreted for *Canarina* and *Lavatera*, the “de novo” hypothesis better fitted the case of *Echium wildpretii*, which has flowers with mixed features of pollination by insects and birds (Valido & al., 2004). Nevertheless, neither hypothesis could be rejected for *I. canariensis* (Rodríguez-Rodríguez & Valido, 2008). Recent studies are increasing the list of Macaronesian ornithophilous taxa that are better explained by the “de novo” hypothesis (e.g. Campanulaceae species other than *C. canariensis*, Olesen & al., 2012; *Lotus*, Ojeda & al., 2012). Evolution towards bird pollination from insect-pollinated ancestors seems to be the norm in oceanic islands, possibly because birds are more efficient pollinators than insects.

Bird pollination is so successful in angiosperms that reversals to other types of pollination appear to have rarely occurred (e.g. Rausher, 2008; but see Tripp & Manos, 2008). In the *Penstemon* clade (Plantaginaceae), c. 21 origins of bird from bee pollination have been inferred, while transitions in the opposite direction are unsupported (Wilson & al., 2007). In Papilionoideae, most species are bee-pollinated, whereas bird pollination is rare and occurs in genera not closely related, which suggests that it has arisen multiple times (Bruneau, 1997, and references therein). In the tribe

Antirrhineae, Ghebrehiwet & al. (2000) indicated that pollination by hummingbirds would have arisen independently three times from bee-pollinated ancestors (Guzmán & Vargas, unpubl. results). Similarly, for *Costus* subgenus *Costus* (Costaceae), Kay & al. (2005) showed that traits related to pollination by hummingbirds derived from those related to pollination by bees, and that they evolved independently seven or more times in the American tropics. Nonetheless, some cases of evolution in the opposite direction have also been reported. Lavin (1987) indicated that pollination by hummingbirds was the ancestral state for *Poitea* (Papilionoideae), and that there have been two reversals towards insect pollination. Likewise, multiple transitions from hummingbird to insect pollination were inferred in *Ruellia* (Acanthaceae) by Tripp & Manos (2008).

In this paper we focused on *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae), a genus predominantly distributed in Holarctic regions of both the Old and New World (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a), including both herbaceous and semishrubby plants. Stiefelhagen (1910) recognized 143 species of *Scrophularia*, although more recent estimates raise that number to 200 (Mabberley, 1997) or 270 (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a). It is believed that the primary center of diversification of *Scrophularia* is located in south-west Asia, in an area around Asia Minor, Iraq, Afghanistan, the Himalayas and the mountain ranges of western Tibet (Stiefelhagen, 1910; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a). In Europe there are c. 30 taxa (cf. Richardson, 1972), where the Iberian Peninsula (12 endemic species) is the most important diversity center (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a; Ortega-Olivencia, 2009). The Iberian species resemble those of northern Morocco (three endemic species; Ortega-Olivencia & Devesa, 2002) and Macaronesia (eight endemic species; Dalgaard, 1979).

Wasps (Vespidae) are generally considered the most frequent pollinators of *Scrophularia* (Faegri & van der Pijl, 1979), although other groups of insects have also been recorded with a lower presence and pollination importance (Schremmer, 1959; de Vos, 1983; Hoffmann & Kwak, 2005, among others). A mixed vertebrate-insect (hereafter MVI) pollination system has been unveiled in three European and one Macaronesian species with large and showy flowers (Ortega-Olivencia & al., 2012): *Scrophularia sambucifolia* and *S. grandiflora* (endemic to the western Mediterranean region), *S. callianta* (island of Gran Canaria), and *S. trifoliata* (Tyrrhenian islands). In particular, birds play the greatest role in pollination of *S. callianta*, and in addition, a third pollination guild (juveniles of the lizard *Gallotia stehlini*) is involved. In the other

three species, insects (honeybees, bumblebees, wasps) are the most important pollinators (Ortega-Olivencia & al., 2012). In addition, the American species *S. macrantha* (endemic to New Mexico, USA) was suggested to be pollinated by hummingbirds (Shaw, 1962) due to its large, tubular corollas with a pink-red pigmentation similar to that of other typically bird-pollinated flowers of south-western United States.

Our main objective was to reconstruct the evolution of the MVI pollination system in *Scrophularia*, paying special attention to the four Mediterranean and Macaronesian species previously studied (Ortega-Olivencia & al., 2012). In particular, we investigated the hypotheses that better explain the role of birds in the evolution of *Scrophularia* pollination. Three explicit hypotheses were tested: (i) ancestors of European *Scrophularia* were pollinated by hummingbirds and passerines, followed by bird floral trait maintenance; (ii) the island de novo hypothesis (*vs* the relict hypothesis) better fits the evolution of the MVI pollination pattern in the Canarian *S. calliantha*; and (iii) bird-mediated pollination has been so successful that no evidence for reversal towards other types of pollination can be found. To test these hypotheses, we addressed the following aims: (1) to estimate phylogenetic relationships and divergence times of *Scrophularia* lineages; (2) to characterize flower traits defining pollination systems in a representative sample of *Scrophularia* species; (3) to reconstruct and quantify shifts of pollination systems in the course of the evolution of *Scrophularia* in a phylogenetic context.

MATERIALS AND METHODS

STUDY TAXA

The genus *Scrophularia* is characterized by traits such as: hermaphrodite, protogynous flowers, and the typically bilateral corolla of most lineages of the core Lamiales (Tank & al., 2006). It is also characterized by a bicarpelar gynoecium, four stamens adnate to the base of the lower lip of the corolla, and a rudimentary fifth stamen or staminode, well-developed in most species but absent in a few species (e.g. *S. vernalis*, *S. crithmifolia*, Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a). These characters, together with plant habit, leaf size and venation, have historically been used to classify taxonomically the species of the genus.

Two sections are recognized within *Scrophularia*. Section *Scrophularia* (c. 50 % of the genus) is formed by herbs (rarely partially woody) with abundant leaf development and clearly anastomosed nerves, while section *Caninae* G. Don mainly comprises semishrubby and xerophyte species, with limited leaf development and few or no leaf anastomosed nerves (Stiefelhagen, 1910; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a). In this study, the two sections recognized by Stiefelhagen (1910) were sampled, i.e. sect. *Anastomosanthès* Stiefelh. (= sect. *Scrophularia*) and sect. *Tomiohyllum* Benth. (= sect. *Caninae*). Stiefelhagen (1910) additionally distinguished two subsections for *Anastomosanthès*: *Vernales* Stiefelh. (nine species), with corolla lobes similar to each other, and *Scorodonia* G. Don (= subsect. *Scrophularia*; 66 species), with lobes of the upper lip of the corolla larger than those of the lower lip. In sect. *Caninae* this author distinguished three subsections: (i) *Farinosa* Stiefelh. (one species), with the corolla tube narrow and cylindrical and three times greater than the calyx, (ii) *Orientalès* Stiefelh. (three species), with the corolla tube paunchy and similar lobes, and (iii) *Lucidae* Stiefelh. (= subsect. *Caninae*) (62 species), with the corolla tube paunchy and the upper lobes longer than the others. Since then there has been no other infrageneric classification, or has been retrofitted and even more systematized in some cases (e.g. Flora of the USSR, Gorshkova, 1955).

TAXA SAMPLING AND DNA SEQUENCING

We used DNA sequences from a total of 116 taxa of *Scrophularia* (see Table S1) covering all recognized sections and subsections and also providing comprehensive coverage of all major geographical areas mentioned in the introduction section (Asia, Europe, North Africa, North America). Ninety-one sequences of *Scrophularia* and one of *Verbascum* were newly generated, while 37 sequences were obtained from the GenBank database (see below). Tissue samples were collected in the field and dried in silica gel or obtained from herbarium specimens (Table S1). Genomic DNA was extracted using DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN Inc., California) following the manufacturer's protocol.

To select the most variable sequences, we performed a pilot study using 5-7 different species of *Scrophularia* and 11 DNA regions, including six plastid DNA regions previously used in phylogenetic and phylogeographic analyses: *trnL-trnF* (Taberlet & al., 1991), *rps16-trnQ*, *trnH-psbA*, *rpl32-trnL*, *trnS-trnG*, *ycf6-psbM* (Shaw

& Small, 2004; Shaw & al., 2005, 2007); four low copy nuclear Conserved Ortholog Set (COS) genes: *Agt1*, *Eif3E*, *At103* and *AroB* (Li & al., 2008); and the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) (Sun & al., 1994). One nuclear (ITS) and one plastid (*trnL-trnF*) DNA region were eventually chosen because they provided consistent amplification and sequencing, displayed high nucleotide variation and have been employed in previous phylogenetic studies of *Scrophularia* (Attar & al., 2011; Scheunert & Heubl, 2011). Additionally, the less variable *ndhF* plastid region (Olmstead & Sweere, 1994; Olmstead & Reeves, 1995) was chosen to analyze divergence times in a wider phylogenetic context (Lamiales, see below).

All regions were amplified in Eppendorf Mastercycler egradient S or a XP thermal cycler. Polymerase Chain Reactions (PCR) were carried out as described by Guzmán & Vargas (2005), except for minor details. Standard external primers were used for amplification of the short *trnL-trnF* spacer and only the forward primer for sequencing (Taberlet & al., 1991). The ITS region was amplified using primers 17SE and 26SE (Sun & al., 1994), and sequenced bidirectionally using primers ITS-A and ITS-4 (White & al., 1990). For *ndhF*, in addition to standard external primers used for amplification, we employed internal sequencing primers 1318F and 1318R (Olmstead & Sweere, 1994; Olmstead & Reeves, 1995) due to the great length of the region. Reactions were performed in 25 μL reaction volumes (50 μL for *ndhF*). After 1 min pretreatment at 94 $^{\circ}\text{C}$, PCR conditions were: 30 cycles of 30-60 s at 94 $^{\circ}\text{C}$, 30-60 s at 48-55 $^{\circ}\text{C}$ and 1-2 min at 72 $^{\circ}\text{C}$, ending with a final step of 10 min at 72 $^{\circ}\text{C}$. For the *ndhF* region, elongation temperature (72 $^{\circ}\text{C}$) started in 1.30 min and was increased 30 s each cycle. In certain reactions, a volume of 1 μL of bovine serum albumin (BSA) at 1 mg ml^{-1} and/or 1 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was included in each 25 μL reaction to improve the efficiency of amplification. Amplified products were submitted to Macrogen Inc. (Seoul, South Korea or Amsterdam, The Netherlands) for sequencing.

The resulting sequence dataset was assembled and edited using Geneious Pro v5.1.7 (Drummond & al., 2010). All sequences were submitted to the GenBank database (see supporting information for accession numbers, Table S1). In addition to the 92 newly-generated sequences, 37 ITS sequences of *Scrophularia*, four ITS and four *trnL-trnF* sequences of related genera (*Teedia*, *Selago*, *Manulea*, *Antherothamnus*, Table S1) were obtained from the GenBank. No further *trnL-trnF* sequences of *Scrophularia* were found. For *ndhF* 37 (*Scrophularia*) + 1 (*Verbascum*) new sequences were generated while 56 of Lamiales were retrieved from the GenBank (see references

in Table S2).

PHYLOGENETIC ANALYSES

All DNA sequence datasets were aligned separately by using MAFFT 6 (Kato & Toh, 2008) with default parameters. Automatic alignment was followed by visual inspection in order to perform further adjustments. Phylogenetic relationships based on ITS and *trnL-trnF* sequences were inferred separately and in combination using three different methods: maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian inference. Maximum parsimony (MP) was implemented in TNT 1.1 (Goloboff & al., 2003) using a heuristic search with 10,000 replicates saving two most-parsimonious trees per replicate, followed by a second heuristic search retaining all best trees and using the trees obtained in the previous 10,000 replicates as the starting ones. Bootstrap support (MP-BS) of clades was assessed using 10,000 standard replicates. Maximum likelihood (ML) was implemented in PhyML 3.0 (Guindon & Gascuel, 2003) with 500 non-parametric bootstrap replicates. Bayesian inference (BI) was conducted in MrBayes v3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) using two searches with 10 million generations each and a sample frequency of 1000. Chain convergence was assessed with Tracer 1.4, and a 50 % majority rule consensus tree with Bayesian posterior probabilities (PP) of clades was calculated to obtain the Bayesian estimate of phylogeny after removing the first 10 % generations as burn-in. For ML and BI the simplest model of sequence evolution that best fits the sequence data was GTR + I + G for ITS, GTR + G for *trnL-trnF* and GTR + I + G for combined dataset according to Akaike Information Criterion (AIC) values calculated in jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008). In all analyses, we used *Teedia* as the outgroup taxon based on previous phylogenetic evidence (Oxelman & al., 2005).

ESTIMATION OF DIVERGENCE TIMES

In order to infer divergence times among *Scrophularia* lineages, we implemented a relaxed molecular-clock approach in BEAST v1.6.2 (Drummond & al., 2006; Drummond & Rambaut, 2007). *Scrophularia* fossils have not been discovered to date. Therefore, fossils belonging to other families of Lamiales, together with a previous molecular estimate, were first used for temporal calibration of the *ndhF* phylogeny. The result of the *ndhF* dating analysis was then employed to implement a secondary

calibration in additional relaxed molecular clock analyses of the ITS, *trnL-trnF* and combined ITS + *trnL-trnF* dataset. A total-evidence ITS + *trnL-trnF* + *ndhF* analysis was not conducted because of the high variation of the *trnL-trnF* and ITS regions at the Lamiales level, which prevented the reliable alignment of sequences from different families.

The relaxed molecular-clock analysis of *ndhF* sequences incorporated a calibration of 74 Ma for the crown-age of Lamiales (Bell & al., 2010). Minimum stem-age constraints for Lamiales families and tribes were also included based on five fossils following Fernández-Mazuecos & Vargas (2011). The suitable substitution model, as inferred by jModelTest, was GTR + I + G. A relaxed uncorrelated lognormal clock was implemented, and a birth-death prior was set for branch lengths (Gernhard, 2008). Other priors were set to default values, and four Markov Chain Monte Carlo (MCMC; Drummond & al., 2002) analyses were initiated on a random starting tree. Chains were run for 20 million generations each, with a sample frequency of 2000. After adequate effective sample size (ESS) was confirmed in Tracer 1.4 (Rambaut & Drummond, 2007), the four chains were combined in LogCombiner 1.4.8, discarding the first 10 % of sampled generations as burn-in. The maximum clade credibility (MCC) tree was summarized in TreeAnnotator v1.4.8 (Drummond & Rambaut, 2007) with a posterior probability (PP) limit of 0.9 and visualized in FigTree 1.3.1. From these results, the mean and standard deviation (SD) of the *Scrophularia* crown-age were obtained in TreeStat v1.6.2 (Drummond & al., 2006; Drummond & Rambaut, 2007). Thus, in the relaxed molecular clock analyses of the ITS, *trnL-trnF* and combined ITS + *trnL-trnF* dataset, the divergence time between *Teedia* and *Scrophularia* was modeled as a normal distribution with mean = 26.77 Ma and SD = 4.27. The substitution models inferred by jModelTest were implemented, and all remaining parameters were set as in the previous *ndhF* analysis. Note that the differences between our dating results and those of Scheunert & Heubl (2011) could be due to the different calibration strategies. While we calibrated the crown-age of Lamiales according to Bell & al. (2010), Scheunert & Heubl (2011) followed Bremer & al. (2004). Also the number of species and the DNA regions used could affect dating results.

INFERENCE OF POLLINATION SYSTEMS

Based on previous results that evaluated species and pollination systems using a

methodology to contrast visitors and pollinators (Ortega-Olivencia & al., 2012; Rodríguez-Riaño & al., unpubl. results), we performed a reconstruction of ancestral characters associated with the pollination systems in *Scrophularia*. First, a direct association between specific floral traits of angiosperms (e.g. size, shape and color of corolla, amount of nectar) and pollinators involved in pollination systems was inferred from the literature. Second, we tested the association between those traits and actual pollinators for a sample of *Scrophularia* species, by reviewing previous studies and performing our own field observations. Third, we inferred the most likely pollination mode for the remaining studied species of *Scrophularia* for which the pollination system has not yet been studied in the field (Table S3). We followed an approach to relate flower traits and the most likely pollination modes in order to infer ancestral states as successfully applied for some groups of Bignoniaceae by Alcantara & Lohmann (2010) and Curti & Ortega-Baes (2011), among others. To this end, the floral traits of *Scrophularia* (corolla color and size) were extracted from various Holarctic floras and from personal observations in the field (California, Israel, Turkey, Greece, Morocco, Madeira, Sardinia, Iberian Peninsula, Canary Islands). In addition, nectar production is known for about 21 species of *Scrophularia* (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b). These authors indicated a positive correlation between the volume secreted and the corolla size. This was the basis for inferring the degree of expected nectar production in groups of species whose nectar production is unknown.

Four pollination systems were recognized: hoverflies, wasps, MVI, and birds. Species with small (e.g. less than 6 mm) violet corollas and very low nectar production (less than 1 μL) were assigned to hoverfly (Diptera) pollination, although other insects could visit and pollinate the flower, at a lower extent (Rodríguez-Riaño & al., unpubl. results; Schremmer, 1959; Valtueña & al., 2013). Species with medium-sized corollas (e.g. 6-12 mm) that are dull in color (predominantly purplish-greenish, dull purple or brown) and have moderate nectar production (between 1 and 10 μL) were assigned to wasp pollination, although other insects, with minor importance and frequency, could act locally as secondary pollinators (Müller, 1883; Proctor & al., 1996; Rodríguez-Riaño & al., unpubl. results; Valtueña & al., 2013). A small group of species (our four focal species) with large (12-23 mm), vividly-colored (red, orange or reddish-yellow) corollas and large nectar production (17-51.7 μL) have MVI pollination system including passerine birds and insects (*S. sambucifolia*, *S. grandiflora*, *S. trifoliata* and *S.*

callianta), and even lizards (*S. callianta*) (Ortega-Olivencia & al., 2012). Finally, the American *S. macrantha* was assigned to the bird (hummingbird) pollination system (Shaw, 1962; Grant, 1994). Flowers of this species differ from those of the MVI system mainly by having all corolla lobes erect and slightly incurved, and a tube that is narrower and closed, giving the corolla a more slender and tubular appearance (Ortega-Olivencia & al., 2012).

ANCESTRAL STATE RECONSTRUCTIONS

Evolutionary patterns of pollination systems in *Scrophularia* were explored using Mesquite 2.72 (Maddison & Maddison, 2006) following a similar approach to that of Valente & al. (2012). The maximum likelihood (ML) method used for ancestral reconstructions offers the advantage of allowing transition rates between states to vary, estimating the statistical support for a given trait reconstruction and using branch lengths to inform the probability of change (Smith, 2010, and references therein).

Ancestral state reconstructions were performed on phylogenetic trees obtained in the Bayesian (BEAST) analysis. We used the maximum likelihood criterion with the Markov k-state 1 parameter default model, thus all character states were equally weighted and considered unordered in all analyses. Due to phylogenetic uncertainty, the analysis was performed over the entire distribution of c. 30,000 trees from the BEAST analyses, and only nodes with high posterior probability ($P \geq 0.9$) were considered. For each state at each node, the analysis calculated the number of trees on which such state was reconstructed as uniquely best according to a decision threshold of two log likelihood units (Maddison & Maddison, 2009). Nodes were indicated as “equivocal reconstruction” when they had no uniquely best state. The estimated number of shifts between each of the four pollination systems was obtained using the “Summarize State Changes Over Trees” application in Mesquite. For comparison, this analysis was also performed using unordered maximum parsimony (MP), as implemented in Mesquite.

RESULTS

PHYLOGENETIC ANALYSES

Alignment features of the 113 ITS and 88 *trnL-trnF* sequences revealed that the cpDNA

region had fewer parsimony-informative characters (Table 1). Overall, BI, ML and MP

Table 1. Characteristics of DNA sequence datasets. ITS and *trnL-trnF* features were obtained for *Scrophularia*, whereas those of *ndhF* for *Scrophularia* and other Lamiales (see text).

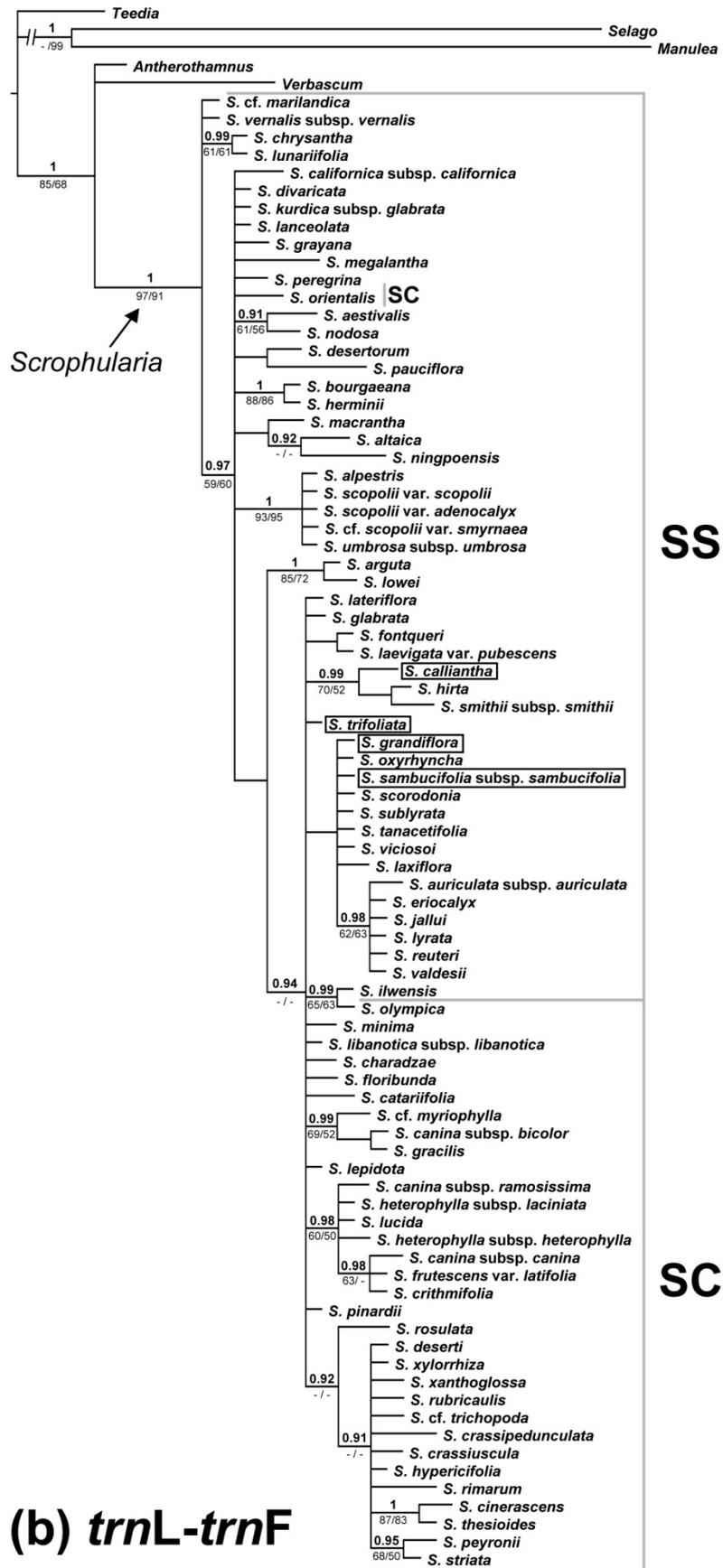
	ITS	<i>trnL-trnF</i>	Combined ITS/ <i>trnL-trnF</i>	<i>ndhF</i>
Number of sequences	113	88	82	94
Aligned length (bp)	562	793	1355	2022
Ungapped length range	544-559	729-779	1288-1330	2004-2022
Pairwise % identity	93.9	97.1	96.2	92.2
Variable characters	244	146	362	1039
Parsimony-informative character	158	57	186	669
Mean % G+C	60.4	33.4	44.8	32.8

phylogenetic analyses based on the two DNA regions yielded mostly congruent topologies, although the BI analyses (Fig. 1a and b) displayed better resolution and higher support values. The analysis of plastid *trnL-trnF* sequences yielded limited resolution, with nineteen well-supported nodes ($PP \geq 0.9$; Fig. 1b), mostly in agreement with those of the ITS tree (Fig. 1a). All analyses recognized *Scrophularia* as a strongly supported monophyletic clade. The ITS tree showed sect. *Scrophularia* as a paraphyletic group, while sect. *Caninae* appeared to be a monophyletic group nested within sect. *Scrophularia*. In the plastid tree (Fig. 1b), sect. *Caninae* was also nested within sect. *Scrophularia*, although largely unresolved. Two species previously classified by Stiefelhagen (1910) in sect. *Caninae* (*S. orientalis* in Fig. 1a and b, and *S. nervosa* in Fig. 1a) were related to sect. *Scrophularia*. Our results suggested a close relationship of one species (*S. ilwensis*) historically circumscribed in sect. *Scrophularia* and the main clade of sect. *Caninae* species in the ITS analysis. To gain a better insight, 82 ITS and *trnL-trnF* samples were analyzed using the same procedure. The combined ITS + *trnL-trnF* analysis (Fig. 1c), rendered a better resolution for the four focal species (*S. sambucifolia*, *S. grandiflora*, *S. trifoliata* and *S. callianta*) that supported previous results. The four species formed a monophyletic group with 16 other primarily Mediterranean species. Although support for sister group relationships is poor in the combined analysis, *S. callianta* appears to be the most divergent lineage to the clade including the three other focal species (Fig. 1c).

The only species with a clear syndrome of ornithophily (*S. macrantha*) appeared unrelated to the four MVI species. A significant number of American species could only



Figure 1. Majority rule consensus trees from Bayesian phylogenetic analyses of *Scrophularia* and related taxa, based on (a) ITS, (b) *trnL-trnF* and (c) combined ITS and *trnL-trnF* sequences. Numbers above branches are Bayesian posterior probabilities ≥ 0.9 . Numbers below branches are maximum likelihood/maximum parsimony bootstrap percentages. A hyphen (-) indicates no bootstrap support over 50 %. Sections are indicated according to Stiefelhagen (1910): sect. *Scrophularia* (SS) and sect. *Caninae* (SC). Species with mixed vertebrate-insect pollination system are indicated within boxes.



(b) *trnL-trnF*

Figure 1 (continued)

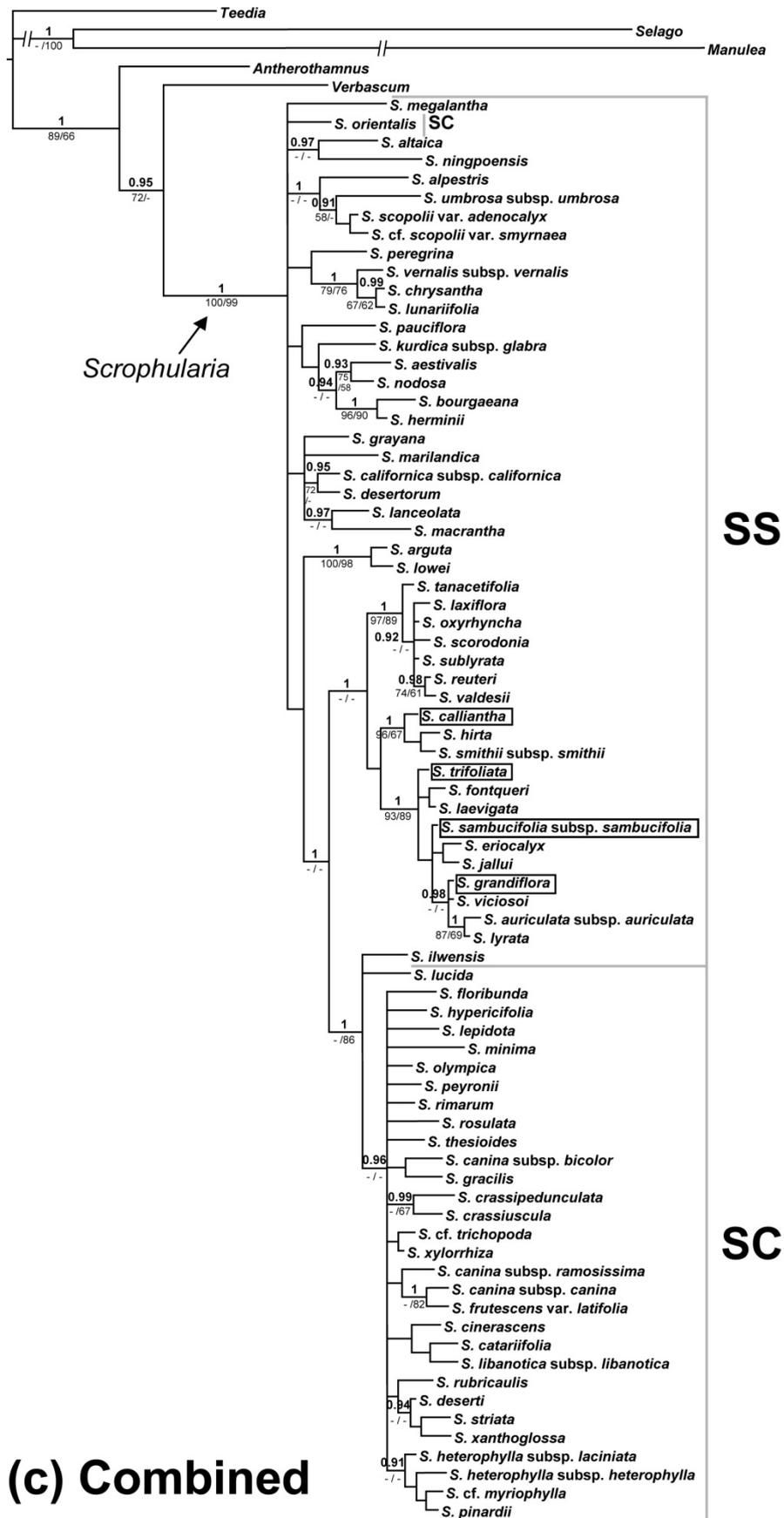


Figure 1 (continued)

be included in the nuclear analysis (Fig. 1a), where *S. macrantha* formed a monophyletic group with two other New Mexican species (*S. laevis* and *S. montana*) and two additional North American species (*S. lanceolata* and *S. serrata*). Therefore, a strong geographic rather than floral phenotypic pattern was obtained.

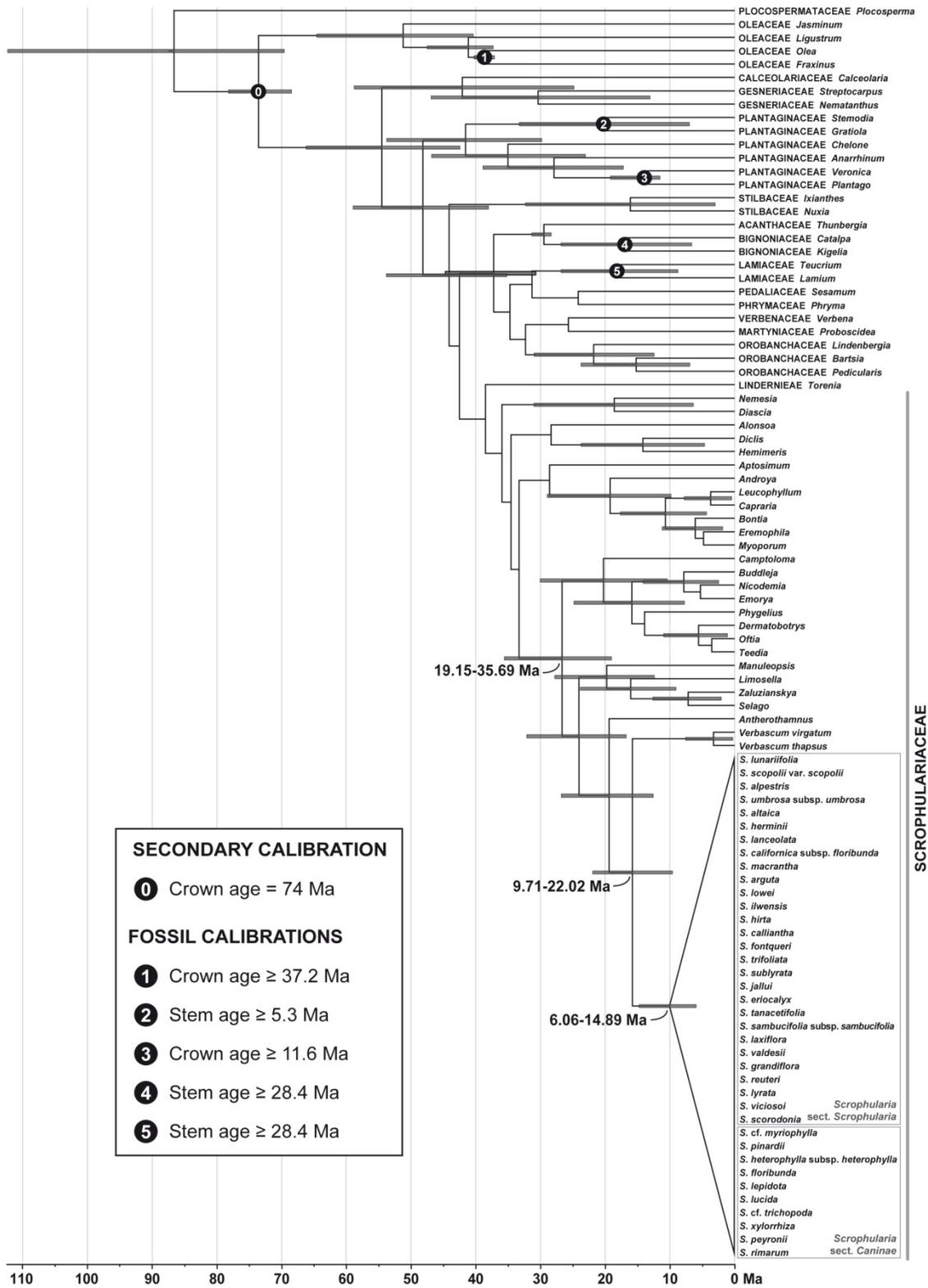
DIVERGENCE TIMES ESTIMATION

The number of MCMC iterations of all BEAST analyses was sufficient according to parameter analysis in Tracer, with values of effective sample size (ESS) above 200 and plots showing equilibrium after discarding burn-in. Values of SD of the uncorrelated lognormal relaxed clock and coefficient of variation for rate heterogeneity within all DNA regions (Table 2) supported the use of a relaxed molecular clock. The *ndhF* chronogram of Lamiales obtained using five reliable fossils (Fig. 2) suggested a divergence between *Scrophularia* and *Verbascum* in the early-middle Miocene (9.71-22.02 Ma), while the differentiation of current lineages of *Scrophularia* appears to have begun in the middle Miocene (6.06-14.89 Ma).

Table 2. Values of standard deviation (SD) of the uncorrelated lognormal relaxed clock and coefficient of variation (CV) for rate heterogeneity within all sequence datasets. Estimated ranges and, in parenthesis, means for divergence dates in million years of the *Verbascum* + *Scrophularia* clade, genus *Scrophularia* and sect. *Caninae* are also indicated.

	SD	CV	Crown-age		
			<i>Verbascum</i> + <i>Scrophularia</i>	Genus <i>Scrophularia</i>	Sect. <i>Caninae</i>
<i>ndhF</i>	0.867	0.971	9.71–22.02 (15.92)	6.06–14.89 (10.2)	–
ITS	0.548	0.622	6.89–20.2 (13.3)	4.97–15.02 (9.75)	2.77–9.69 (6.11)
<i>trnL-trnF</i>	0.913	1.045	7.16–24.05 (15.48)	4.39–17.78 (10.61)	2.39–12.39 (7.15)
Combined ITS/ <i>trnL-trnF</i>	0.439	0.453	6.02–17.86 (11.76)	3.67–10.94 (7.14)	2.15–6.84 (4.38)

The MCC trees from the BEAST analyses of ITS, *trnL-trnF* (trees not shown) and combined (Fig. 3) datasets (including secondary calibrations and a higher sampling of *Scrophularia* species) showed congruent topologies with those of the previous phylogenetic analyses, and similar dating results to those of the *ndhF* analysis. The three chronograms supported a diversification of *Scrophularia* mostly since the late Miocene, while a Pliocene (or late Miocene) divergence was estimated for the main lineages of sect. *Caninae* (Table 2). The combined dated tree revealed that the four focal species



originated and diverged between the late Pliocene and the Pleistocene (see Fig. 3). Specifically, the divergence time of the Canarian *S. callianta* was estimated to 0.36-2.62 Ma (95 % highest posterior density interval), whereas a narrower interval (maximum 1.05 Ma)

Figure 2. Molecular dating analysis of Lamiales, including *Scrophularia*. The maximum clade credibility tree produced by relaxed molecular-clock analysis of *ndhF* sequences in BEAST is shown. Node bars represent the 95 % highest posterior density intervals for the divergence time estimates of clades with posterior probabilities above 0.9. Calibrations are indicated in the inset. The crown-age of Lamiales (excluding Plocospermataceae; node 0) was calibrated with a mean age of 74 Ma (Bell & al., 2010). Five fossils were additionally used for calibration at the following nodes: 1 = *Fraxinus wilcoxiana* (Oleaceae, middle Eocene; Call & Dilcher, 1992), 2 = *Gratiola tertiaria* (Gratiolaceae, Miocene; Łańcucka-Środoniowa, 1977), 3 = *Plantaginacearumpollis* (Plantaginaceae s.str., middle Miocene; Nagy, 1963), 4 = *Catalpa rugosa* (Bignoniaceae, early-middle Oligocene; Reid & Chandler, 1926) and 5 = *Ajuginucula smithii* (Lamiaceae, early-middle Oligocene; Reid & Chandler, 1926). The two sections of *Scrophularia* are delimited following Stiefelhofen (1910).

←

was found for *S. grandiflora* (W Portugal). The less resolved relationships obtained for *S. sambucifolia* (W Mediterranean region) and the Tirrenian *S. trifoliata* only allowed us to estimate a maximum divergence time of 2.89 Ma for the two species.

Considering the ITS results, the species with apparent bird pollination traits (*S. macrantha*) was estimated to have branched off between 0.3 and 2.62 Ma, and between 0.79 and 4.01 Ma in the combined analysis. Different sample sizes used in the nuclear and plastid datasets prevented us from inferring its most closely related species and a more precise divergence time. In any case, in all analyses *S. macrantha* was closely related to North American species that have an old origin and non-ornithophilous floral traits.

ANCESTRAL RECONSTRUCTION OF POLLINATION SYSTEM

The basal node for the core clade of *Scrophularia* was reconstructed as having wasp pollination in 85.45 % of trees of the Bayesian posterior distribution. The hoverfly system was inferred in 26.9 % of trees for the ancestral lineage of sect. *Caninae* (excluding *S. lucida* and *S. ilwensis*) and only in 4 % of trees the wasp system was inferred, while in 68.9 % of trees the reconstruction was equivocal (Fig. 4). Due to a high number of missing pollination system data, the analysis was not reliable for seven of the thirty-four supported nodes (PP \geq 0.9). Nevertheless, results of the “Summarize State Changes Over Trees” analysis provided a well-supported estimate of the number of shifts between pollination systems. Only four types of pollination system transitions (of the 12 possible) were clearly supported: from the wasp system to the other three systems and from the hoverfly system to the wasp system (Table 3 and Fig. 5). Estimates using ML and MP yielded similar results: (1) four transitions from wasp to MVI



Figure 3. Molecular dating analysis of *Scrophularia* lineages. The maximum clade credibility tree produced by relaxed molecular-clock analysis of combined ITS and *trnL-trnF* sequences in BEAST is shown (outgroup accessions were pruned). Node bars represent the 95 % highest posterior density intervals for the divergence time estimated of clades with posterior probabilities above 0.90. Two sections (sect. *Scrophularia*, SS, and sect. *Caninae*, SC) are indicated according to Stiefelhagen (1910).

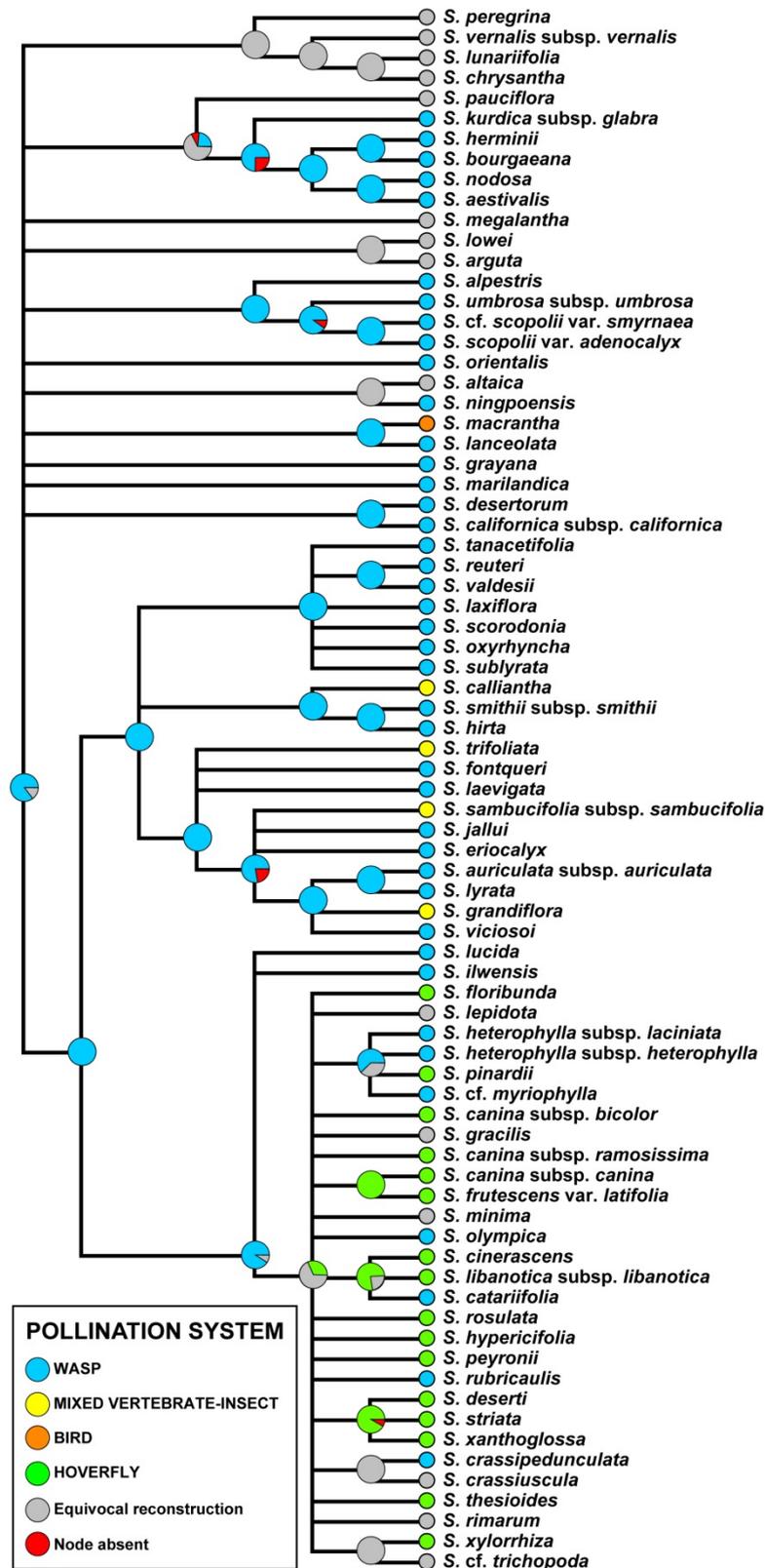


Figure 4. Pollination system evolution in *Scrophularia* reconstructed under the maximum likelihood character optimization analysis in Mesquite. The majority rule consensus tree from the BEAST analysis (with unsupported nodes, posterior probability < 0.9, collapsed) is shown. Pie charts show the percentage of trees from the BEAST posterior distribution (c. 30.000 highly probable trees) for which a given pollination system was reconstructed as ancestral for that node, thus accounting for phylogenetic uncertainty.

Table 3. Summary of estimated pollination system transitions in *Scrophularia* based on ancestral state reconstructions using the time-calibrated ITS/*trnL-trnF* phylogeny. Phylogenetic uncertainty is accounted for. Columns show the average number of unequivocal transitions between each of the pollination systems using maximum-parsimony and maximum-likelihood methods. Between parentheses are the minimum and maximum number of transitions inferred.

Transition ^a	Maximum-parsimony	Maximum-likelihood
MVI → W	0.02 (0–3)	0 (0–0)
MVI → H	0 (0–0)	0 (0–0)
MVI → B	0 (0–0)	0 (0–0)
W → MVI	3.96 (1–4)	3.98 (1–4)
W → H	2.90 (1–8)	0.87 (0–5)
W → B	1 (1–1)	0.99 (0–1)
H → MVI	0 (0–0)	0 (0–0)
H → W	3.57 (0–8)	1.94 (0–5)
H → B	0 (0–0)	0 (0–0)
B → MVI	0 (0–0)	0 (0–0)
B → W	0 (0–0)	0 (0–0)

^a Pollination system.- MVI: mixed vertebrate-insect; W: wasp; H: hoverfly; B: bird.

were strongly supported; (2) the only species with bird pollination traits evolved from a wasp-pollinated ancestor; and (3) bird and MVI pollination are the only systems that have never been lost (Table 3 and Fig. 4). Hence, transitions from bird and MVI pollination system to any other pollination system appeared to have never occurred for extant lineages.

DISCUSSION

Previous studies focused on particular geographical regions (Iranian species: Attar & al., 2011; primarily American species: Scheunert & Heubl, 2011) reported the first phylogenetic and biogeographic insights into the genus *Scrophularia*. In our study, previous nuclear and plastid sequences were incorporated to a newly generated dataset.

SYSTEMATICS OF *SCROPHULARIA*

Although the objectives of this paper are not taxonomic, it is suitable to indicate briefly some ideas based on our results that supported a nested position of sect. *Caninae* within sect. *Scrophularia* (Fig. 1-3). Indeed, our phylogenetic analyses are consistent with the recognition of sect. *Caninae* as a mostly monophyletic group that is embedded within sect. *Scrophularia*. The semi-shrubby species of sect. *Caninae* characterized by scanty leaf development and nerves little or not anastomosed form a lineage derived from mostly

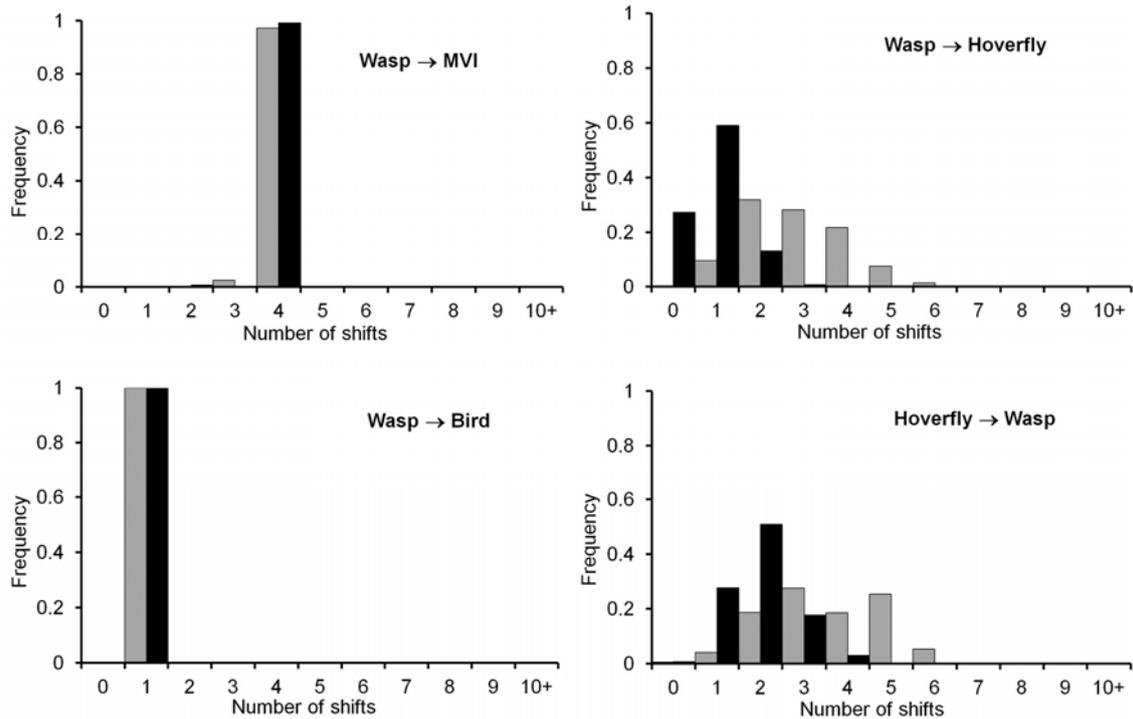


Figura 5. Summary distributions of the number of changes between pollination systems, obtained when implementing ancestral state reconstructions over the posterior distribution (c. 30.000 highly probable trees) obtained in the BEAST analysis. Only shifts with at least one inferred event are shown. The abscissa axis represents the number of unequivocal transitions between each of the pollination systems as inferred by character optimization analyses conducted in Mesquite, using maximum likelihood (black) and maximum parsimony (grey) methods. The ordinate axis shows the frequency (probability) of such number of changes.

herbaceous plants, with great leaf development and nerves clearly anastomosed. For a long time a current of thought prevailed which considered that generally the shrubby forms of angiosperms, rather than herbs, were ancestral (e.g. Cronquist, 1988; Takhtajan, 1991). Our results do not agree with this hypothesis for *Scrophularia*, as has also been shown for other plant lineages (e.g. Böhle & al., 1996; Crespo & al., 2000; García-Maroto & al., 2009).

Our results are not fully concordant with the subsections proposed by Stiefelhagen (1910) for sect. *Caninae* given that two species (*S. orientalis* and *S. nervosa*) previously classified in that section were phylogenetically related to sect. *Scrophularia*. At least, *S. orientalis* should be included in this section (see Carlbon, 1969), because of its herbaceous habit with well-developed leaves displaying anastomosing venation on the inferior surface (Ortega-Olivencia, personal observation).

RECENT EVOLUTION OF BIRD-MEDIATED POLLINATION

Main lineages of *Scrophularia* appear to have diverged in the mid-late Miocene or Pliocene (< 15 Ma) (Fig. 3). This result implies that our working hypothesis of an early origin of bird-mediated pollination is unsupported for *Scrophularia*. In particular, our dating analyses and ancestral state reconstructions do not support the hypothesis of ancient hummingbird pollination in European *Scrophularia*. On the contrary, floral traits of the four MVI species (*S. callianta*, *S. sambucifolia*, *S. grandiflora* and *S. trifoliata*) are the result of recent innovation rather than old ancestry. Estimates of divergence times for these species (< 2.89 Ma, Fig. 3) clearly postdated the Oligocene, period of occurrence of hummingbird fossils in Europe (30-32 Ma). This undoubtedly rules out any involvement of hummingbirds in the evolution of the MVI system in these four European-Macaronesian species of *Scrophularia*. On the contrary, it is well known that hummingbirds and *Scrophularia* currently meet in North America, and that one species (*S. macrantha*) acquired bird pollination traits (Shaw, 1962; Grant, 1994). The question remained as to whether the role of hummingbirds is ancestral or recent in the evolution of the *S. macrantha* lineage. Our results supported that the role of hummingbirds in the pollination of the New Mexican *S. macrantha* has been recently played based on lineage divergence estimates (0.79-4.01 Ma, Fig. 3). This result also agrees with the occurrence of hummingbirds in North America after a relatively recent colonization from South America (McGuire & al., 2007).

Regarding the two island hypotheses (de novo vs relict hypothesis), our results suggest a continental wasp-pollinated ancestor for *S. callianta* (Fig. 4). This supports the island de novo hypothesis proposed by Valido & al. (2004). Our divergence estimate suggests colonization of the *S. callianta* lineage in a period (0.36-2.62 Ma) in which the ancestor of its current main bird pollinator (*Phylloscopus canariensis*, Ortega-Olivencia & al., 2012) may have been already resident (as earlier as 2.5 Ma, see Olesen & al., 2012). Therefore, this result is not in agreement with the relict hypothesis given that the ancestor of *S. callianta* may have had features unrelated to bird pollination. A parallel example is found in *Anagyris latifolia* (Fabaceae), a Canarian endemic that diverged from the continental ancestor in a similar period (1.9 ± 2.1 Ma) (Ortega-Olivencia & Catalán, 2009) and is likely pollinated by generalist birds (*Phylloscopus spp.*, *Sylvia spp.*) (see Vogel & al., 1984). However, the MVI pollination system of *S. callianta* is more complex. Juveniles of the lizard *Gallotia stehlini* visit flowers of *S. callianta*

(Ortega-Olivencia & al., 2012) and may have exerted additional pressures in a lizard-bird-insect pollination system, a hypothesis previously proposed for island bellflower species (Campanulaceae) by Olesen & al. (2012).

IS BIRD POLLINATION AN EVOLUTIONARY DEAD END?

Our analysis of reconstruction of pollination systems is consistent with wasp pollination as the ancestral state for any other pollination system. Of 12 possibilities of transition, only four were significantly observed (three from wasp to the other three systems, and one from hoverfly to wasp) (Fig. 5). Interestingly, although traits related to hoverfly pollination are present in a high number of species and subspecies (16), these were all included in the sect. *Caninae* clade. Lack of knowledge about the pollination strategies for 18 % of the species studied, together with lack of phylogenetic resolution, cause uncertainty in our reconstruction, particularly for the sect. *Caninae* lineage. Anyway, the retention of the wasp pollination state for most lineages evidences that this functional group exerted high selective pressures resulting in ancestral and derived traits related to wasp pollination in the evolutionary history of *Scrophularia* (Fig. 4).

Vertebrate pollination resulted in two derived pollination strategies (MVI and bird pollination systems). Estimates of divergence times for the three Mediterranean MVI species (mid-late Pliocene to mid-Pleistocene) are similar to those found for *Anagyris foetida* (Fabaceae) by Ortega-Olivencia & Catalán (2009), the first native bird-pollinated plant confirmed in Europe (Ortega-Olivencia & al., 2005). This period, in which the Mediterranean climate was established (Suc, 1984), could have favoured plants to invest in big flowers in a region with rich pollinator fauna. Such flowers may have somehow attracted big pollinators (e.g. birds), which may have then selected for a greater production of rich resources (e.g. nectar) given that birds require more energy than insects (Rocca & Sazima, 2010, and references therein).

Since pollination by birds is energetically expensive for plants (Stiles, 1978) we can hypothesize that the MVI pollination system could be regarded as successful. Rausher (2008) put forward a hypothesis for angiosperms in which transitions from bird-mediated pollination (associated to the typical red/orange flowers) to bee pollination (frequently associated to blue flowers) are rare as revealed by the asymmetry in evolutionary transition rates of floral colors and other characters. Indeed, our analysis supports that the MVI system has been acquired independently four times in the

European-Macaronesian *Scrophularia*, while transitions from the MVI to other systems are unsupported. The same appears to apply for the patent bird pollination system inferred for the American *S. macrantha*, given that one transition occurred from wasp pollination independently of the MVI system.

It has long been hypothesized that most bird-pollinated flowers evolved from insect-pollinated flowers (Proctor & al., 1996; Fleming & Muchhala, 2008). In *Scrophularia* species, such insects may have been wasps in the four cases. The question remains as to whether reversal from bird-mediated pollination to other types of pollination has rarely occurred in other angiosperms (Rauscher, 2008; van der Niet & Johnson, 2012). For instance, the number of transitions towards hummingbird traits from insect pollination in *Penstemon* has been much greater than reversals (Wolfe & al., 2006; Wilson & al., 2007). In the family Marantaceae, Ley & Claßen- Bockhoff (2011) found the same tendency. In Southern African *Gladiolus*, sunbird pollination has evolved independently from moth-, long-tongued bee- and long-proboscid fly-pollinated ancestors (Valente & al., 2012). The predominant directionality in angiosperms could be explained based on the more efficient transfer of pollen by birds than by any other pollinator together with genetic constraints (Thomson & Wilson, 2008). Further studies integrating reliable pollinator data, together with abiotic and other biotic traits, in phylogenetic analyses are necessary to evaluate correlated changes and the relative importance of birds in the evolution of pollination systems.

CONCLUSIONS

Selective pressures of birds on floral traits of *Scrophularia* appear to have been recent. Passerines are responsible for current bird pollination in the Old World, whereas hummingbirds appear to have early gone extinct (Oligocene) in Europe, long before differentiation of *Scrophularia* (Miocene). Even in the only species bearing exclusive bird pollination features (*S. macrantha*, New Mexico), a bird pollination system appears to have been acquired in the Pliocene-Pleistocene. The selective pressures exerted by birds on floral evolution of four MVI species resulted in four different origins in different geographic ranges (the western Mediterranean *S. sambucifolia* and *S. grandiflora*, the Tirrenian *S. trifoliata* and the Canarian *S. callianta*). An ancestral wasp state was not only reconstructed for the four Old World lineages but also for the

American *S. macrantha* lineage. Indeed, our analyses suggest that shifts from wasp to hoverfly, to MVI, and to bird pollination systems have been predominant in *Scrophularia*. In addition, pollination systems in which birds are involved (MVI, primarily bird) could have been so successful that no reversals are observed.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financed by Spain's Ministry of Science and Innovation through Project CGL2008-00123/BOS, co-financed by ERDF. A predoctoral grant of that Ministry to MLNP (BES-2009-011957) is greatly appreciated. Funding was partially obtained from the Economy, Trade, and Innovation Council of Extremadura (CCV004). The herbaria (E, MA, MO, SALA, UNEX, UPOS) kindly gave permission for DNA extraction from herbarium specimens, M. Kintgen (Denver Bot. Gard.), A. Krämer (Bot. Gärt. Univ. Bonn), J. Terry (Kew, Roy. Bot. Gard.), A. Amini Rad (Iranian Res. Inst. Pl. Protection) sent us *Scrophularia* samples, F.J. Valtueña (Univ. of Extremadura) helped in the field, E. Cano gave laboratory assistance, and B. Guzmán, I. Liberal and J.L. Blanco (Bot. Gard. of Madrid) helped with phylogenetic analyses. We thank two anonymous reviewers for constructive comments on the manuscript.

REFERENCES

- Alcantara S. & L.G. Lohmann** (2010) Evolution of floral morphology and pollination system in Bignoniaceae (Bignoniaceae). *American Journal of Botany* 97: 782-796.
- Armbruster W.S. & B.G. Baldwin** (1998) Switch from specialized to generalized pollination. *Nature* 394: 632.
- Attar F., M. Riahi, F. Daemi & F. Aghabeigi** (2011) Preliminary molecular phylogeny of Eurasian *Scrophularia* (Scrophulariaceae) based on DNA sequence data from *trnS-trnG* and ITS regions. *Plant Biosystems* 145: 857-865.
- Bawa K.S.** (1990) Plant-pollinator interactions in tropical rain forests. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 399-422.
- Bell C.D., D.E. Soltis & P.S. Soltis** (2010) The age and diversification of the angiosperms revisited. *American Journal of Botany* 97: 1296-1303.
- Bochenski Z. & Z.M. Bochenski** (2008) An Old World hummingbird from the Oligocene: A new fossil from Polish Carpathians. *Journal of Ornithology* 149: 211-216.
- Böhle U.R., H.H. Hilger & W.F. Martin** (1996) Island colonization and evolution of the insular woody habit in *Echium* L. (Boraginaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 11740-11745.
- Bremer K., E.M. Friis & B. Bremer** (2004) Molecular phylogenetic dating of asterid flowering plants shows early cretaceous diversification. *Systematic Biology* 53: 496-505.

- Bruneau A.** (1997) Evolution and homology of bird pollination syndromes in *Erythrina* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 84: 54-71.
- Call V.B. & D.L. Dilcher** (1992) Investigations of angiosperms from the Eocene of southeastern North America: samaras of *Fraxinus wilcoxiana* Berry. *Review of Palaeobotany and Palynology* 74: 249-266.
- Carlson C.** (1969) Evolutionary relationships in the genus *Scrophularia* L. *Hereditas* 61: 287-301.
- Crespo M.B., M.D. Lledó, M.F. Fay & M.W. Chase** (2000) Subtribe *Vellinae* (Brassicaceae, Brassicaceae): a combined analysis of ITS nrDNA sequences and morphological data. *Annals of Botany* 86: 53-62.
- Cronk Q. & I. Ojeda** (2008) Bird-pollinated flowers in an evolutionary and molecular context. *Journal of Experimental Botany* 59: 715-727.
- Cronquist A.** (1988) *The evolution and classification of flowering plants*. The New York Botanical Garden. New York.
- Curti R.N. & P. Ortega-Baes** (2011) Relationship between floral traits and floral visitors in two coexisting *Tecoma* species (Bignoniaceae). *Plant Systematics and Evolution* 293: 207-211.
- Dalgaard V.** (1979) Biosystematics of the Macaronesian species of *Scrophularia*. *Opera Botanica* 51: 3-64.
- Danieli-Silva A., J.M.T. de Souza, A.J. Donatti, R.P. Campos, J. Vicente-Silva, L. Freitas & I.G. Varassin** (2012) Do pollination syndromes cause modularity and predict interactions in a pollination network in tropical high-altitude grasslands? *Oikos* 121: 35-43.
- de Vos O.C.** (1983) *Scrophularia nodosa*, adapted to wasp pollination? *Acta Botanica Neerlandica* 32: 345.
- Drummond A.J., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper, J. Heled, M. Kearse, R. Moir, S. Stones-Havas & S. Sturrock** (2010) *Geneious v5.0*. Website <http://www.geneious.com>.
- Drummond A.J., S.Y.W. Ho, M.J. Phillips & A. Rambaut** (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biology* 4: 699-710.
- Drummond A.J., G.K. Nicholls, A.G. Rodrigo & W. Solomon** (2002) Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data. *Genetics* 161: 1307-1320.
- Drummond A.J. & A. Rambaut** (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- Faegri K. & L. van der Pijl** (1979) *The principles of pollination ecology*. Pergamon Press. Oxford.
- Fang Q., Y.Z. Chen & S.Q. Huang** (2012) Generalist passerine pollination of a winter-flowering fruit tree in central China. *Annals of Botany* 109: 379-384.
- Fenster C.B., W.S. Armbruster, P. Wilson, M.R. Dudash & J.D. Thomson** (2004) Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35: 375-403.
- Fernández-Mazuecos M. & P. Vargas** (2011) Historical isolation versus recent long-distance connections between Europe and Africa in Bifid Toadflaxes (*Linaria* sect. *Versicolores*). *PLoS ONE* 6: e22234.
- Fleming T.H. & N. Muchhala** (2008) Nectar-feeding bird and bat niches in two worlds:

- pan-tropical comparisons of vertebrate pollination systems. *Journal of Biogeography* 35: 764-780.
- Ford H.A.** (1985) Nectarivory and pollination by birds in southern Australia and Europe. *Oikos* 44: 127-131.
- García-Maroto F., A. Mañas-Fernández, J.A. Garrido-Cárdenas, D.L. Alonso, J.L. Guill-Guerrero, B. Guzmán & P. Vargas** (2009) Δ^6 -Desaturase sequence evidence for explosive Pliocene radiations within the adaptive radiation of Macaronesian *Echium* (Boraginaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 563-574.
- Gernhard T.** (2008) The conditioned reconstructed process. *Journal of Theoretical Biology* 253: 769-778.
- Ghebrehiwet M., B. Bremer & M. Thulin** (2000) Phylogeny of the tribe *Antirrhineae* (Scrophulariaceae) based on morphological and *ndhF* sequence data. *Plant Systematics and Evolution* 220: 223-239.
- Goloboff P., J. Farris & K. Nixon** (2003) *TNT: Tree analysis using new technology*. Program and documentation, available from the authors and at www.zmuc.dk/public/phylogeny.
- Gorshkova S.G.** (1955) *Scrophularia*. In: Shishkin B.K. & E.G. Bobrov (Eds.) *Flora of the USSR* 12: 264-349. Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR. Moskva-Leningrad. [Translated into English in 1994, Bishen Singh Mahendra Pal Singh and Koeltz Scientifica Books].
- Grant V.** (1994) Historical development of ornithophily in the western North American flora. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 10407-10411.
- Guindon S. & O. Gascuel** (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.
- Guzmán B. & P. Vargas** (2005) Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, *trnL-trnF*, and *matK* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 644-660.
- Hargreaves A.L., S.D. Johnson & E. Nol** (2004) Do floral syndromes predict specialization in plant pollination systems? An experimental test in an "ornithophilous" African *Protea*. *Oecologia* 140: 295-301.
- Hoffmann F. & M.M. Kwak** (2005) The vulnerability to pollinator species loss of plant species with various pollination syndromes and degrees of specialisation. In: Hoffmann F. (Ed.) *Biodiversity and pollination*, pp. 93-116. University of Groningen. Haren.
- James H.F.** (2005) Paleogene fossils and the radiation of modern birds. *Auk* 122: 1049-1054.
- Johnson S.D.** (2010) The pollination niche and its role in the diversification and maintenance of the southern African flora. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365: 499-516.
- Johnson S.D. & K.E. Steiner** (2000) Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 140-143.
- Kaczorowski R.L., M.C. Gardener & T.P. Holtsford** (2005) Nectar traits in *Nicotiana* section *Alatae* (Solanaceae) in relation to floral traits, pollinators, and mating system. *American Journal of Botany* 92: 1270-1283.
- Katoh K. & H. Toh** (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9: 286-298.
- Kay K.M., P.A. Reeves, R.G. Olmstead & D.W. Schemske** (2005) Rapid speciation and the evolution of hummingbird pollination in neotropical *Costus* subgenus *Costus* (Costaceae): Evidence from nrDNA ITS and ETS sequences. *American Journal of Botany* 92: 1899-1910.

- Łańcucka-Środoniowa M.** (1977) New herbs described from the Tertiary of Poland. *Acta Palaeobotanica* 18: 37-44.
- Lavin M.** (1987) A cladistic analysis of the tribe *Robinieae* (Papilionoideae, Leguminosae). In: Stirton C.H. (Ed.) *Advances in legume Systematics* 3: 31-64. Royal Botanic Gardens. Kew.
- Ley A.C. & R. Claßen-Bockhoff** (2011) Evolution in African Marantaceae - Evidence from phylogenetic, ecological and morphological studies. *Systematic Botany* 36: 277-290.
- Li M., J. Wunder, G. Bissoli, E. Scarponi, S. Gazzani, E. Barbaro, H. Saedler & C. Varotto** (2008) Development of COS genes as universally amplifiable markers for phylogenetic reconstructions of closely related plant species. *Cladistics* 24: 727-745.
- Louchart A., N. Tourment, J. Carrier, T. Roux & C. Mourer-Chauviré** (2008) Hummingbird with modern feathering: An exceptionally well-preserved Oligocene fossil from southern France. *Naturwissenschaften* 95: 171-175.
- Mabberley D.J.** (1997) *The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Maddison W.P. & D.R. Maddison** (2006) *StochChar: A package of Mesquite modules for stochastic models of character evolution v1.1*. Website <http://mesquiteproject.org>.
- Maddison W.P. & D.R. Maddison** (2009) *Mesquite: a modular system for evolutionary analysis v2.72*. Website <http://mesquiteproject.org>.
- Martén-Rodríguez S., C.B. Fenster, I. Agnarsson, L.E. Skog & E.A. Zimmer** (2010) Evolutionary breakdown of pollination specialization in a Caribbean plant radiation. *New Phytologist* 188: 403-417.
- Mayr G.** (2004) Old World fossil record of modern-type hummingbirds. *Science* 304: 861-864.
- Mayr G.** (2005) Fossil hummingbirds in the Old World. *Biologist* 52: 12-16.
- Mayr G.** (2007) New specimens of the early Oligocene Old World hummingbird *Eurotrochilus inexpectatus*. *Journal of Ornithology* 148: 105-111.
- McGuire J.A., C.C. Witt, D.L. Altshuler & J. Remsen** (2007) Phylogenetic systematics and biogeography of hummingbirds: Bayesian and maximum likelihood analyses of partitioned data and selection of an appropriate partitioning strategy. *Systematic Biology* 56: 837-856.
- Müller H.** (1883) *The fertilization of flowers*. Macmillan and Co. London.
- Nagy E.** (1963) Some new spore and pollen species from the neogene of the Mecsek mountain. *Acta Botanica Hungarica* 9: 387-404.
- Ne'eman G., A. Jürgens, L. Newstrom-Lloyd, S.G. Potts & A. Dafni** (2010) A framework for comparing pollinator performance: effectiveness and efficiency. *Biological Reviews* 85: 435-451.
- Ojeda I., A. Santos-Guerra, R. Jaén-Molina, F. Oliva-Tejera, J. Caujapé-Castells & Q. Cronk** (2012) The origin of bird pollination in Macaronesian *Lotus* (Loteae, Leguminosae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 62: 306-318.
- Olesen J.M., M. Alarcón, B.K. Ehlers, J.J. Aldasoro & C. Roquet** (2012) Pollination, biogeography and phylogeny of oceanic island bellflowers (Campanulaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 14: 169-182.
- Ollerton J., R. Alarcón, N.M. Waser, M.V. Price, S. Watts, L. Cranmer, A. Hingston, C.I. Peter & J. Rotenberry** (2009a) A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany* 103: 1471-1480.
- Ollerton J., L. Cranmer, R.J. Stelzer, S. Sullivan & L. Chittka** (2009b) Bird pollination of

- Canary Island endemic plants. *Naturwissenschaften* 96: 221-232.
- Olmstead R.G. & P.A. Reeves** (1995) Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 176-193.
- Olmstead R.G. & J.A. Sweere** (1994) Combining data in phylogenetic systematics: An empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae. *Systematic Biology* 43: 467-481.
- Ortega-Olivencia A.** (2009) *Scrophularia* L. In: Benedí C., E. Rico, J. Güemes & A. Herrero (Eds.) *Flora iberica* 13: 97-122. Real Jardín Botánico de Madrid. CSIC. Madrid.
- Ortega-Olivencia A. & P. Catalán** (2009) Systematics and evolutionary history of the circum-Mediterranean genus *Anagyris* L. (Fabaceae) based on morphological and molecular data. *Taxon* 58: 1290-1306.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993a) Revisión del género *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae) en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Ruizia* 11: 1-157. Monografías del Real Jardín Botánico de Madrid. CSIC. Madrid.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993b) Floral rewards in some *Scrophularia* species (Scrophulariaceae) from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *Plant Systematics and Evolution* 184: 139-158.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (2002) *Scrophularia* L. In: Valdés B., M. Rejdali, A. Achal El Kadmiri, J.L. Jury & J.M. Montserrat (Eds.) *Checklist of Vascular Plants of N Morocco with identification keys* 2: 560-565. CSIC. Madrid.
- Ortega-Olivencia A., T. Rodríguez-Riaño, J.L. Pérez-Bote, J. López, C. Mayo, F.J. Valtueña & M.L. Navarro-Pérez** (2012) Insects, birds and lizards as pollinators of the largest-flowered *Scrophularia* of Europe and Macaronesia. *Annals of Botany* 109: 153-167.
- Ortega-Olivencia A., T. Rodríguez-Riaño, F.J. Valtueña, J. López & J.A. Devesa** (2005) First confirmation of a native bird-pollinated plant in Europe. *Oikos* 110: 578-590.
- Oxelman B., P. Kornhall, R.G. Olmstead & B. Bremer** (2005) Further disintegration of Scrophulariaceae. *Taxon* 54: 411-425.
- Pellmyr O.** (2002) Pollination by animals. In: Herrera C.M. & O. Pellmyr (Eds.) *Plant-animal interactions: an evolutionary approach*, pp. 157-184. Blackwell Science. Oxford.
- Pérez-Barrales R., P. Vargas & J. Arroyo** (2006) New evidence for the Darwinian hypothesis of heterostyly: breeding systems and pollinators in *Narcissus* sect. *Apodanthi*. *New Phytologist* 171: 553-567.
- Posada D.** (2008) jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Proctor M., P. Yeo & A. Lack** (1996) *The natural history of pollination*. Harper Collins Publishers. London.
- Rambaut A. & A.J. Drummond** (2007) *Tracer v1.4*. Website <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Rausher M.D.** (2008) Evolutionary transitions in floral color. *International Journal of Plant Sciences* 169: 7-21.
- Reid E.M. & M.E.J. Chandler** (1926) *The Bembridge Flora. Catalogue of Cainozoic plants in the Department of Geology*, vol. 1. British Museum (Natural History). London.
- Richardson I.B.K** (1972) *Scrophularia* L. In: Tutin T.G., V.H. Heywood, N.A. Burges, D.H. Valentine, S.M. Walter & D.A. Webb (Eds.) *Flora Europaea* 3: 216-221. Cambridge University Press. Cambridge.

- Rocca M.A. & M. Sazima** (2010) Beyond hummingbird-flowers: the other side of ornithophily in the Neotropics. *Oecologia Australis* 14: 67-99.
- Rodríguez-Rodríguez M.C. & A. Valido** (2008) Opportunistic nectar-feeding birds are effective pollinators of bird-flowers from Canary Islands: Experimental evidence from *Isoplexis canariensis* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany* 95: 1408-1415.
- Ronquist F. & J.P. Huelsenbeck** (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Scheunert A. & G. Heubl** (2011) Phylogenetic relationships among New World *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae): New insights inferred from DNA sequence data. *Plant Systematics and Evolution* 291: 69-89.
- Schremmer F.** (1959) Die bestäuber der Blüten von *Scrophularia canina* L. und Beobachtungen über postflorale Nektarabsonderung. *Oesterreichische Botanische Zeitschrift* 106: 187-193.
- Shaw J.** (1962) The biosystematics of *Scrophularia* in western north America. *Aliso* 5: 147-178.
- Shaw J., E.B. Lickey, J.T. Beck, S.B. Farmer, W. Liu, J. Miller, K.C. Siripun, C.T. Winder, E.E. Schilling & R.L. Small** (2005) The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142-166.
- Shaw J., E.B. Lickey, E.E. Schilling & R.L. Small** (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275-288.
- Shaw J. & R.L. Small** (2004) Addressing the “hardest puzzle in American pomology”: Phylogeny of *Prunus* sect. *Prunocerasus* (Rosaceae) based on seven noncoding chloroplast DNA regions. *American Journal of Botany* 91: 985-996.
- Smith S.D.** (2010) Using phylogenetics to detect pollinator-mediated floral evolution. *New Phytologist* 188: 354-363.
- Smith S.D., C. Ané & D.A. Baum** (2008) The role of pollinator shifts in the floral diversification of *Iochroma* (Solanaceae). *Evolution* 62: 793-806.
- Stebbins G.L.** (1970) Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1: 307-326.
- Stiefelhagen H.** (1910) Systematische und pflanzengeographische Studien zur Kenntnis der Gattung *Scrophularia*. Vorarbeiten zu einer Monographie. *Botanische Jahrbuecher fuer Systematik* 44: 406-496.
- Stiles F.G.** (1978) Ecological and evolutionary implications of bird pollination. *Integrative and Comparative Biology* 18: 715-727.
- Stiles F.G.** (1981) Geographical aspects of bird-flower coevolution, with particular reference to Central America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68: 323-351.
- Suc J.P.** (1984) Origin and evolution of the Mediterranean vegetation and climate in Europe. *Nature* 307: 429-432.
- Sun Y., D.Z. Skinner, G.H. Liang & S.H. Hulbert** (1994) Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 26-32.
- Taberlet P., L. Gielly, G. Pautou & J. Bouvet** (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Takhtajan A.** (1991) *Evolutionary trends in flowering plants*. Columbia University Press. New

York.

- Tank D.C., P.M. Beardsley, S.A. Kelchner & R.G. Olmstead** (2006) Review of the systematics of Scrophulariaceae s.l. and their current disposition. *Australian Systematic Botany* 19: 289-307.
- Thomson J.D. & P. Wilson** (2008) Explaining evolutionary shifts between bee and hummingbird pollination: Convergence, divergence, and directionality. *International Journal of Plant Sciences* 169: 23-38.
- Tripp E.A. & P.S. Manos** (2008) Is floral specialization an evolutionary dead-end? Pollination system transitions in *Ruellia* (Acanthaceae). *Evolution* 62: 1712-1737.
- Valente L.M., J.C. Manning, P. Goldblatt & P. Vargas** (2012) Did pollination shifts drive diversification in southern African *Gladiolus*? Evaluating the model of pollinator-driven speciation. *The American Naturalist* 180: 83-98.
- Valido A., Y.L. Dupont & J.M. Olesen** (2004) Bird-flower interactions in the Macaronesian islands. *Journal of Biogeography* 31: 1945-1953.
- Valtueña F.J., A. Ortega-Olivencia, T. Rodríguez-Riaño, J.L. Pérez-Bote & C. Mayo** (2013) Behaviour of pollinator insects within inflorescences of *Scrophularia* species from Iberian Peninsula. *Plant Biology* 15: 328-334.
- van der Niet T. & S.D. Johnson** (2012) Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms. *Trends in Ecology & Evolution* 27: 353-361.
- Vogel S., C. Westerkamp, B. Thiel & K. Gessner** (1984) Ornithophilie auf den Canarischen Inseln. *Plant Systematics and Evolution* 146: 225-248.
- White T.J., T. Bruns, S. Lee & J. Taylor** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: Innis M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky & T.J. White (Eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18: 315-322. Academic Press. San Diego.
- Wilson P., M.C. Castellanos, J.N. Hogue, J.D. Thomson & W.S. Armbruster** (2004) A multivariate search for pollination syndromes among penstemons. *Oikos* 104: 345-361.
- Wilson P., A.D. Wolfe, W.S. Armbruster & J.D. Thomson** (2007) Constrained lability in floral evolution: Counting convergent origins of hummingbird pollination in *Penstemon* and *Keckiella*. *New Phytologist* 176: 883-890.
- Wolfe A.D., C.P. Randle, S.L. Datwyler, J.J. Morawetz, N. Arguedas & J. Diaz** (2006) Phylogeny, taxonomic affinities, and biogeography of *Penstemon* (Plantaginaceae) based on ITS and cpDNA sequence data. *American Journal of Botany* 93: 1699-1713.
- Yanega G.M. & M.A. Rubega** (2004) Feeding mechanisms: Hummingbird jaw bends to aid insect capture. *Nature* 428: 615.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Material studied.

Taxon	Population ^a	GenBank Accession ^b : ITS / <i>trnL-trnF</i> / <i>ndhF</i>
<i>Scrophularia</i>		
<i>S. aestivalis</i> Griseb.	Greece. PI: Litochoro, w.d., PV, 97PV08 (MA)	KC692523/KC692596/-
<i>S. alpestris</i> J. Gay ex Benth. in DC.	France. 64: Plateau de Ley, c. Gourette, 26.VII.2007, JL & al., JL2407 (UNEX 35943)	KC692524/KC692671/-
<i>S. alpestris</i>	France. 12: Aveyron, Laccesat, 11.VI.2009, FJV, AOO33/09 (UNEX 35945)	-/-/KC692679
<i>S. altaica</i> Murray	Russia. AL: Siberia: Montes del Altai, río Chulyshman, 19.VIII.1996, SC & EV, 14264SC (MA 614445)	KC692525/KC692597/KC692682
<i>S. amplexicaulis</i> Benth.		JF409899 (Attar & al., 2011)/-/-
<i>S. arguta</i> Sol. in Aiton	Spain. GC: Lanzarote, San Bartolomé, 7.IV.2006, CA, LM & AQ, AQ1854 (MA 750857)	-/-/KC692688
<i>S. arguta</i>	Morocco. DA: Safi, cabo Safi, 28.IV.2011, AOO & FJV, 80AOO/11 (UNEX 36084)	KC692526/KC692598/-
<i>S. atrata</i> Pennell		HQ130081 (Scheunert & Heubl, 2011)/-/-
<i>S. auriculata</i> L. subsp. <i>auriculata</i>	Spain. S: Puente del Arrudo, río Nansa, 2.VII.2007, PV, 76PV07 (MA)	KC692527/KC692599/-
<i>S. bourgaeana</i> Lange in Willk. & Lange	Spain. Av: pr. Puerto de Peña Negra, Piedrahita 9.VI.2009, AOO & AB, 27AOO/09 (UNEX 35989)	KC692528/KC692650/-
<i>S. buergeriana</i> Miq.		EU165339 (Lee & al., 2010)/-/-
<i>S. californica</i> Cham. & Schldtl. subsp. <i>californica</i>	Germany. RP: cultivada en el Jardín Botánico de Mainz., 9.IX.2010, FJV & JK (UNEX 36018)	KC692529/KC692638/-
<i>S. californica</i> subsp. <i>floribunda</i> (Greene) R.J. Shaw	USA. CA: Marin Co, Sausalito, 31.III.2001, PV, 73PV01 (MA)	-/-/KC692683
<i>S. calliantha</i> Webb & Berthel.	Spain. GC: presa de Hornos, 1.V.2010, MN & al., 49AOO/10 (UNEX 35995)	KC692530/KC692646/KC692690
<i>S. canina</i> subsp. <i>bicolor</i> (Sm.) Greuter	Turkey. 20: Denizli: 8 km de Bazagoc, 27.V.2011, AOO & FJV, 89AOO/11 (UNEX 36050)	KC692532/KC692626/-
<i>S. canina</i> L. subsp. <i>canina</i>	Morocco. TD: puerto de Tizi-n-Nissi, 3.VI.2006, M & al., LM3416 (MA 745799)	KC692531/KC692657/-
<i>S. canina</i> subsp. <i>ramosissima</i> (Loisel.) P. Fourn.	Italy. SA: Palau, porto Pollo, 14.V.2010, MN & al., 54AOO/10 (UNEX 35911)	KC692533/KC692619/-
<i>S. catariifolia</i> Boiss. & Heldr.	Turkey. 58: Sivas, Dogançal, 2.VII.2001, JA & al., 2738 (MA 689885)	KC692534/KC692660/-
<i>S. charadzae</i> Kem.-Nath.	Georgia. AT: Samtskhe-Javakheti, Azavreti, 15.VII.2002, GMS & al. (W 2003-10832)	-/-/KC692662/-
<i>S. chrysantha</i> Jaub. & Spach	Armenia. AG: monte Aragat, Ghazaravan, 30.VI.2005, M & al., 2552 (MA 742218)	KC692535/KC692666/-
<i>S. cinerascens</i> Boiss.	Armenia. GR: lago Sevan, pr. Tsovozard, 23.VI.2005, H & al., 2544 (MA 744226)	KC692536/KC692629/-
<i>S. crassicaulis</i> Boiss.		JF409900 (Attar & al., 2011)/-/-
<i>S. crassipedunculata</i> Attar & Joharchi	Iran. KV: SE Neyshabour, Dizbad-e-oly, Ghojhar, 20.VIII.2003, J (UNEX 36019)	KC692537/KC692636/-
<i>S. crassiuscula</i> Grau	Iran. ES: Semirom, Vanak, Cheshme-Naz, 12.VI.2004, MRP (MA 748751)	KC692538/KC692668/-
<i>S. crithmifolia</i> Boiss.	Spain. Ma: Álora, a 9 km de Carratraca, 25.VI.2000, AOO (UNEX 26214)	-/-/KC692659/-
<i>S. densifolia</i> Urb. & Ekman		HQ130093 (Scheunert & Heubl, 2011)/-/-
<i>S. deserti</i> Delile	Jordan. JO: hacia Petra, 17.IV.2000, PV (MA)	KC692539/KC692631/-
<i>S. desertorum</i> (Munz) R.J. Shaw	USA. CA: Modoc Co, Lava Beds National Monument, 15.V.2001, PV, 104PV01 (MA)	-/-/KC692643/-
<i>S. desertorum</i>		HQ130087 (Scheunert & Heubl, 2011)/-/-
<i>S. divaricata</i> Ledeb.	Georgia. GE: w.l., 12.VI.1999, JFG, 680 (MO 5562003)	-/-/KC692639/-
<i>S. domingensis</i> Urb.		HQ130089 (Scheunert & Heubl, 2011)/-/-
<i>S. duplicatoserrata</i> Makino		HQ130076 (Scheunert & Heubl, 2011)/-/-
<i>S. eggersii</i> Urb.		HQ130090 (Scheunert & Heubl, 2011)/-/-
<i>S. elbursensis</i> Bornm.		JF409902 (Attar & al., 2011)/-/-
<i>S. eriocalyx</i> Emb. & Maire	Morocco. TH: ctra. Bab Berret a Ketama, 30.IV.2011, AOO & FJV, 83AOO/11 (UNEX 36081)	KC692540/KC692600/KC692695
<i>S. flava</i> Grau		JF409903 (Attar & al., 2011)/-/-
<i>S. floribunda</i> Boiss. & Balansa	Turkey. 35: Kemalpaşa, Karabel, 27.V.2011, AOO & FJV, 88AOO/11 (UNEX 36049)	KC692541/KC692623/KC692713
<i>S. fontqueri</i> Ortega Oliv. & Devesa	Morocco. TO: Xauen, Djebel Kelaa, Bab Lars, 24.IV.2004, PV, 173bPV04 (MA)	KC692542/KC692605/KC692692

<i>S. frigida</i> subsp. <i>haussknechtii</i> Bornm. ex Grau		JF409904 (Attar & al., 2011)/-/-
<i>S. frutescens</i> var. <i>latifolia</i> Benth. in DC.	Portugal. BAI: ctra. Comporta-Troia, 16.IV.2010, AOO & FJV, 46AOO/10 (UNEX 35939)	KC692543/KC692658/-
<i>S. glabrata</i> Aiton	Spain. TF: Teide, 31.VII.2000, VV, 30VV00 (UPOS)	-/KC692665/-
<i>S. gracilis</i> Blakelock	Iraq. NI: Mosul (Kurdistan), Hakari, Sharanish, 4-9.VII.1957, KHR, 10735 (MA 496384)	KC692544/KC692627/-
<i>S. grandiflora</i> DC.	Portugal. BL: 6,2 km antes de Condeixa desde carretera de Tomar, 19.II.2009, AOO & TR, 01AOO/09 (UNEX 35932)	KC692545/KC692607/KC692712
<i>S. grayana</i> Maxim. ex Kom.	Russia. PR: Khasadnoi Island, at SE of Astafyev Inlet, 9.IX.1993, JCS & VB, 19575 (MO 04629221)	KC692546/KC692644/-
<i>S. herminii</i> Hoffmanns. & Link	Spain. Za: Galende, 10.VI.2009, AOO & AB, 30AOO/09 (UNEX 35985)	KC692547/KC692651/-
<i>S. herminii</i>	Spain. Za: San Martín de Castañeda, 10.VI.2009, AOO & AB, 31AOO/09 (UNEX 35986)	-/-/KC692684
<i>S. heterophylla</i> Willd. subsp. <i>heterophylla</i>	Greece. LM: c. Pros Stomio, Omoli, 28.V.2011, TR & JL, 112AOO/11 (UNEX 35956)	KC692548/KC692622/KC692715
<i>S. heterophylla</i> subsp. <i>laciniata</i> (W. & K.) Maire & Petitm.	Greece. IPI: Monte Peristeri, pico Tsoukarela, 30.VI.2007, SC & al., 18324SC (MA 765296)	KC692549/KC692620/-
<i>S. hirta</i> Lowe	Portugal. MAD: de San Vicente a Porto Moniz, c. túnel de João Delgado, 31.III.2011, TR & JL, 68AOO/11 (UNEX 36011)	KC692550/KC692647/KC692691
<i>S. hypericifolia</i> Wydler	Israel. TAV: Tel-Aviv, Holon, dunas, junto a calle Menahem Begin, 29.III.2010, TR & ABO, 44AOO/11 (UNEX 36093)	KC692551/KC692669/-
<i>S. ilwensis</i> K. Koch	Armenia. KT: Tehenis mountain, 22.VI.2005, SC & al., 17740 (MA 742376)	-/-/KC692717
<i>S. ilwensis</i>	Turkey. 53: Rize, Porto Ovit Dagi Geçidi, 28.VI.2001, SN & al., 877 (MA 688800)	KC692552/KC692616/-
<i>S. jallui</i> (Gattef. & Weiller) Ibn Tattou	Morocco. MK: Alto Atlas, Adrar-n-Oukaïmeden, 29.VI.2006, AH & al., AH 3093 (MA 746563)	KC692553/KC692601/KC692706
<i>S. kakudensis</i> Franch.		GU175295 (Han et al., 2009)/-/-
<i>S. korariensis</i> Nakai		EU165340 (Lee & al., 2010)/-/-
<i>S. kurdica</i> subsp. <i>glabra</i> Grau	Iran. QM: Chalil Kuh, Azerbaijan occidentalis, 2.VII.1974, K.H. Rechinger Nr. 48719, cultivada en München Bot. Gat. Nr. Sc-246, VII.1996, FS (SALA 118667)	-/KC692640/-
<i>S. kurdica</i> subsp. <i>glabra</i>		JF409905 (Attar & al., 2011)/-/-
<i>S. laevigata</i> var. <i>pubescens</i> Maire	Morocco. GB: Beni Snassen, 21.IV.2004, PV, 165PV04 (MA)	KC692554/KC692606/-
<i>S. laevis</i> Wootton & Standl.		HQ130077 (Scheunert & Heubl, 2011)/-/-
<i>S. lanceolata</i> Pursh	USA. CO: Kintgen Steamboat Garden, 6.VII.2010. Originally collected in CO, Hinman Lake, Routt County, DBG acc. 082472 (UNEX 36017)	KC692555/KC692641/KC692686
<i>S. lateriflora</i> Trautv.	Norway. 03: Oslo Botanical Garden, 27.VII.2000, PV (MA)	-/KC692664/-
<i>S. laxiflora</i> Lange	Spain. Ca: El Jautor, pr. Alcalá de los Gazules, 4.IV.2009, AOO, 10AOO/09 (UNEX 35972)	KC692556/KC692618/KC692696
<i>S. lepidota</i> Boiss.	Turkey. 58: Sivas, salida hacia Şarkışla, 31.V.2011, AOO & FJV, 104AOO/11 (UNEX 36064)	KC692557/KC692624/KC692710
<i>S. leucoclada</i> Bunge		JF409906 (Attar & al., 2011)/-/-
<i>S. libanotica</i> Boiss. subsp. <i>libanotica</i> var. <i>libanotica</i>	Turkey. 29: Gümüşhane, road Gümüşhane to Bayburt, 26.VI.2001, SN & al. (MA 687764)	KC692558/KC692614/-
<i>S. lowei</i> Dalggaard	Portugal. MAD: Caniço Baixo, 2.IV.2011, TR & JL, 69AOO/11 (UNEX 36010)	KC692559/KC692654/KC692689
<i>S. lucida</i> L.	Greece. PEL: entre Sofikó y Angelokastro, 27.V.2011, TR & JL, 106AOO/11 (UNEX 35961)	KC692560/KC692621/KC692694
<i>S. lunariifolia</i> Boiss. & Balansa ex Boiss.	Georgia. BT: E. of Batumi, 21.VI.1999, JFG, 351 (MO 5578042)	KC692561/KC692667/-
<i>S. lunariifolia</i>	Georgia. BT: Batumi, Bzoniza-Flusstal, 24.V.2007, WL & AK, GE-0-BONN-28227 (UNEX 36028)	-/-/KC692687
<i>S. lyrata</i> Willd.	Spain. Ba: hacia Rincón de Caya, 8.VII.2007, AOO, 02AOO/07 (UNEX 35983)	-/-/KC692701
<i>S. lyrata</i>	Morocco. TO: Bab Taza, 29.IV.2011, AOO & FJV, 82AOO/11 (UNEX 36082)	KC692562/KC692602/-
<i>S. macrantha</i> Greene ex Stiefelh.	USA. CA: Kintgen Home Garden, 12.VII.2010, DBG Acc. 090231 (UNEX 36016)	-/KC692653/KC692685
<i>S. macrantha</i>		AY880244 (Freeman, unpublished)/-/-
<i>S. macrophylla</i> Boiss.		JF409907 (Attar & al., 2011)/-/-
<i>S. cf. marilandica</i> L.	USA. GA: N Carolina, Asheville, Richtung Busick, 5.VII.1986, HF, USA 147 (MJG 43)	-/KC692677/-
<i>S. marilandica</i> L.		HQ130085 (Scheunert & Heubl, 2011)/-/-
<i>S. megalantha</i> Rech. f.	Iran. MN: Mazandarán, Chalandar, 16.V.2010, AR (UNEX 36021)	KC692563/KC692645/-

S. micrantha Desv. ex Ham.
S. minima M. Bieb.
S. minutiflora Pennell
S. montana Wooton
S. multiflora Pennell
S. musashiensis Bonati
S. cf. myriophylla Boiss. & Heldr.
S. nervosa Benth. subsp. *nervosa*
S. ningpoensis Hemsl.
S. nodosa L.
S. olympica Boiss.
S. orientalis L.
S. oxyrhyncha Coincey
S. oxysepala Boiss.
S. parviflora Wooton & Standl.
S. pauciflora Benth.
S. peregrina L.
S. peyronii Post
S. pinardii Boiss.
S. reuteri Daveau
S. rimarum Bornm.
S. rosulata Stiefelh.
S. rubricaulis Boiss.
S. rubricaulis
S. sambucifolia L. subsp. *sambucifolia*
S. scopolii var. *adenocalyx* (Sommier & Levier) Grau
S. scopolii Hoppe ex Pers. var. *scopolii*
S. cf. scopolii var. *smyrnaea* (Boiss.) Boiss.
S. scorodonia L.
S. serrata Rydb.
S. smithii Hornem. subsp. *smithii*
S. striata Boiss.
S. striata
S. sublyrata Brot.
S. takesimensis Nakai
S. tanacetifolia Willd.
S. thesioides Boiss. & Bushe
S. cf. trichopoda Boiss. & Balansa
S. trifoliata L.
S. umbrosa Dumort. subsp. *umbrosa*
S. valdesii Ortega Oliv. & Devesa
S. valida Grau

Georgia. TB: Tusheti, 21.VIII.1989, S (MA 578728)

Greece. TC: de Arahova a Polydrosos, 28.V.2011, TR & JL, 111A00/11 (UNEX 35962)

China. XA: Jiang Xi Xiu Shui, 6.VIII.1996, CSY, 2035 (MO 5578042)
 Norway. 12: Bratland, camping (Bergen), 27.VIII.2010, FJV & al. (UNEX 35941)
 Turkey. 53: Rize, 8 km antes do Porto Ovit Dagi Geçidi, 29.VI.2001, SN & al., 949 (MA 689560)
 Armenia. KT: pr. Tsahkadzor, Tehenis mountain, 22.VI.2005, SC & al., 17688 (MA 743942)
 Spain. Co: Sta. Eufemia, repetidor de TV, 10.V.2009, AOO, 23A00/09 (UNEX 35981)

Nepal. SO: Sagarmantha, Langmuche valley, 24.IX.2005, MFW & al. (E 246586)
 Greece. KRI: Creta, Hania, Skynes, 17.V.2005, PV, ML & SM, 112PV05 (MA)
 Turkey. 63: Sanliurfa, ctra. Sanliurfa-Hilvan, 30.V.2011, AOO & FJV, 97A00/11 (UNEX 36057)
 Turkey. 32: ctra. a Isparta desde Dinar, 27.V.2011, AOO & FJV, 91A00/11 (UNEX 36052)
 Spain. Av: Navalonguilla, 9.VI.2009, AOO & AB, 25A00/09 (UNEX 35978)
 Turkey. 44: Malatya, de Erkenek a Reşadiye, 30.V.2011, AOO & FJV, 103A00/11 (UNEX 36063)
 Iran. KS: NW Bojnurd, Emam-Darreh, 17.IV.2001, J & Z (UNEX 36020)
 Israel. BA: Nahat tut bridge to Hagit, 26.III.2010, AD & al., 38A00/10 (UNEX 36087)
 Jordan. JA: Jarash, 2003 (semillas procedentes de Kew Bot. Gard.). Cultivada en Badajoz, 2010, MN (UNEX 36086)
 Spain. Ca: Pruna, km 18 ctra. A363, 24.II.2009, AOO & TR, 06A00/09 (UNEX 35974)
 Turkey. 52: Ordu, Canik Daglari, c. 3 km de Çambasi, 23.VI.2001, AH & al., AH 1097 (MA 689511)
 Italy. AB: Abruzzo, L'Aquila, valle Cortina, 29.VI.2002, CA & al., 8252 (MA 699632)
 Turkey. 35: ctra. a Yamanlar Dag, 27.V.2011, AOO & FJV, 87A00/11 (UNEX 36048)
 Portugal. AAL: Pombalinho, 1.V.2009, JL & TR, 20A00/09 (UNEX 35930)

Spain. TF: San Cristóbal de la Laguna, mirador de Jardina, 4.V.1997, JLPA & JFO, 7009 (MA 595601)
 Turkey. 63: Yukarikoymat, ctra. a Kabahayda, Montes Urfa, 30.V.2011, AOO & FJV, 100A00/11 (UNEX 36060)

Spain. Ba: Alburquerque, finca El Hito, 12.IV.2009, TR, 19A00/09 (UNEX 35970)

Spain. Gr: Albuñol, 29.II.2004, CA, 9757 (MA 713864)
 Armenia. AR: c. embalse Azat, c. Landjazat, 2.VII.2005, CN & al., 5837 (MA 742276)
 Turkey. 33: 10 km de Uzuncabure, road Silifke-Kirobasi, 29.V.2011, AOO & FJV, 96A00/11 (UNEX 36056)
 Italy. SA: Nuoro, Desulo, ctra. a Foni, 16.V.2010, MN & al., 57A00/10 (UNEX 35914)
 Greece. MH: Dráma, 29.V.2011, TR & JL, 114A00/11 (UNEX 35954)
 Spain. Sa: Arribes del Duero, Presa de Aldeadávila, 10.VI.2009, AOO & AB, 29A00/09 (UNEX 35968)

HQ130088 (Scheunert & Heubl, 2011)/-/
 KC692564/KC692663/-
 HQ130091 (Scheunert & Heubl, 2011)/-/
 HQ130082 (Scheunert & Heubl, 2011)/-/
 HQ130078 (Scheunert & Heubl, 2011)/-/
 HQ130073 (Scheunert & Heubl, 2011)/-/
 KC692565/KC692628/KC692702
 JF409909 (Attar & al., 2011)/-/
 KC692566/KC692649/-
 KC692567/KC692642/-
 KC692568/KC692617/-
 KC692569/KC692661/-
 KC692570/KC692608/-
 JF409910 (Attar & al., 2011)/-/
 HQ130086 (Scheunert & Heubl, 2011)/-/
 KC692571/KC692676/-
 KC692572/KC692652/-
 KC692573/KC692655/KC692711
 KC692574/KC692625/KC692705
 KC692575/KC692603/KC692707
 KC692576/KC692670/KC692714
 KC692577/KC692637/-
 KC692578/-/
 -/KC692634/-
 KC692579/KC692609/KC692697
 KC692580/KC692673/-
 -/KC692672/KC692681
 KC692581/KC692674/-
 KC692582/KC692610/KC692708
 HQ130083 (Scheunert & Heubl, 2011)/-/
 KC692583/KC692648/-
 -/KC692656/-
 JF409912 (Attar & al., 2011)/-/
 KC692584/KC692611/KC692698
 GU175286 (Han & al., 2009)/-/
 KC692585/KC692612/KC692709
 KC692586/KC692630/-
 KC692587/KC692635/KC692703
 KC692588/KC692615/KC692693
 KC692589/KC692675/KC692680
 KC692590/KC692604/KC692699
 JF409914 (Attar & al., 2011)/-/

<i>S. variegata</i> subsp. <i>rupestris</i> (M. Bieb.) Grau		JF409919 (Attar & al., 2011)/-/-
<i>S. variegata</i> M. Bieb. subsp. <i>variegata</i>		JF409915 (Attar & al., 2011)/-/-
<i>S. vernalis</i> subsp. <i>clausii</i> (Boiss. & Buhse) Grau		JF409916 (Attar & al., 2011)/-/-
<i>S. vernalis</i> L. subsp. <i>vernaliss</i>	Italy. AB: Abruzzo, L'Aquila, pr. Santo Stefano de Sessanio, 29.VI.2002, CA & al., 8085 (MA 698056)	KC692591/KC692678/-
<i>S. viciosoi</i> Ortega Oliv. & Devesa	Spain. Ma: Alfarnate, cerro del Sto. Cristo, 12.IV.2009, AOO, 12A00/09 (UNEX 35967)	KC692592/KC692613/KC692700
<i>S. villosa</i> Pennell		HQ130084 (Scheunert & Heubl, 2011)/-/-
<i>S. xanthoglossa</i> Boiss.	Israel. NOR: Kfar Yehoshua, 28.III.2010, AD & al., 43A00/10 (UNEX 36092)	KC692593/KC692633/-
<i>S. xylorrhiza</i> Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	Turkey. 63: de Hilvan a Sanliurfa, 30.V.2011, AOO & FJV, 99A00/11 (UNEX 36059)	KC692594/KC692632/KC692704
<i>S. yoshimurae</i> T. Yamaz.		HQ130072 (Scheunert & Heubl, 2011)/-/-
Outgroup		Accession numbers: ITS / trnL-F
<i>Antherothamnus pearsonii</i> N.E. Br.		AJ550575 (Kornhall & Bremer, 2004)/
		AJ608617 (Oxelman & al., 2005)
<i>Manulea glandulosa</i> E. Phillips		AJ550599 (Kornhall & Bremer, 2004)/
		AJ296520 (Kornhall & al., 2001)
<i>Selago myrtifolia</i> Rchb.		AJ584805 (Kornhall & Bremer, unpublished)/
		AJ586086 (Kornhall & Bremer, unpublished)
<i>Teedia lucida</i> Rudolphi		AF375148 (Wolfe & al., 2002)/
		AF380870 (Wallick & al., unpublished)
<i>Verbascum virgatum</i> Stokes	Spain. Ba: Badajoz, pr. Avda. Salvador Allende, 12.VII.2010, JL, 64A00/10 (UNEX 36067)	KC692522/KC692595/KC692716

^a It is indicated origin country, province abbreviations ●, locality (w.l. = without locality), collection date (w.d. = without date), collector ■, collection number (when known), herbarium number, between parenthesis, when available.

● Abbreviations of provinces, states, regions, governorates, and so on have been consulted in <http://www.statoids.com> (last access: 09/01/2013).

■ AB = A. Bejarano; ABO = A. Botello; AD = A. Dafni; AH = A. Herrero; AK = A. Krämer; AOO = A. Ortega-Olivencia; AQ = A. Quintanar; AR = A. Rad; ASM = A. Sánchez-Miranda; CA = C. Aedo; CM = C. Mayo; CN = C. Navarro; CSY = C.S. Ye; EL = E. López; EV = E. Valdés Bermejo; FB = F. Bueno; FC = F. Cabezas; FJV = F.J. Valtueña; FJVA = F.J. Valverde; FS = F. Schuhwerk; GMS = G.M. Schneeweiss; H = Herrero; HF = H. Frankenhäuser; J = Joharchi; JA = J. Aldasoro; JCS = J.C. Solomon; JFC = J. Fdez. Casas; JFG = J.F. Gaskin; JFO = J. Francisco-Ortega; JK = J. Klein; JL = J. López; JLP = J.L. Panero; KHR = K.H. Rechinger; L = Lansac; LM = L. Medina; M = Medina; MFW = M.F. Watson; ML = M. Luceño; MN = M. Navarro; MRP = M.R. Parishani; N = G. Nieto; PV = P. Vargas; RG = R. Gonzalo; S = Sch. Schethexauri; SC = S. Castroviejo; SCI = S. Cirujano; SM = S. Martín; SN = S. Nisa; TR = T. Rodríguez-Riaño; VB = V. Barkalov; VV = V. Valcárcel; WL = W. Lobin; Z = Zangouei.

^b References of outgroup and *Scrophularia* taxa obtained from GenBank

Attar & al. (2011) *Plant Biosyst.* 145: 1-9; Han & al. (2009) *Korean J. Plant Taxon* 39: 237-246; Kornhall & Bremer (2004) *Bot. J. Linn. Soc.* 146: 453-467; Kornhall & al. (2001) *Plant Syst. Evol.* 228: 199-218; Lee & al. (2010) *Genes Genomics* 32: 181-189; Oxelman & al. (2005) *Taxon* 54: 411-425; Scheunert & Heubl (2011) *Plant Syst. Evol.* 291: 69-89; Wolfe & al. (2002) *Syst. Bot.* 27: 138-148.

A dash in the last column indicates no accession.

Table S2. Species of Lamiales, excluding the family Scrophulariaceae, used in the relaxed molecular-clock analysis for temporal calibration of *ndhF* sequences.

Taxon	GenBank Accessions ^a
<i>Alonsoa meridionalis</i> Druce	AJ617612 (Oxelman & al., 2005)
<i>Anarrhinum bellidifolium</i> (L.) Willd.	AY731263 (Vargas & al., 2004)
<i>Androya decaryi</i> H. Perrier	AF027276 (Oxelman & al., 1999)
<i>Antherothamnus pearsonii</i> N.E.Br.	AJ401392 (Kornhall & al., 2001)
<i>Aptosimum indivisum</i> Burch. ex Benth.	AJ617594 (Oxelman & al., 2005)
<i>Bartsia alpina</i> L.	AF123678 (Olmstead & al., 2001)
<i>Bontia daphnoides</i> L.	AJ617613 (Oxelman & al., 2005)
<i>Buddleja davidii</i> Franch.	AF130143 (Olmstead & al., 2000)
<i>Calceolaria</i> sp.	AF123679 (Olmstead & al., 2001)
<i>Camptoloma lyperiiflorum</i> (Vatke) Hilliard	AJ401401 (Kornhall & al., 2001)
<i>Capraria biflora</i> L.	AJ617610 (Oxelman & al., 2005)
<i>Catalpa</i> sp.	L36397 (Olmstead & Reeves, 1995)
<i>Chelone obliqua</i> L.	AF123680 (Olmstead & al., 2001)
<i>Dermatobotrys saundersii</i> Bolus	AJ617592 (Oxelman & al., 2005)
<i>Diascia capsularis</i> Benth.	AJ617593 (Oxelman & al., 2005)
<i>Diclis reptans</i> Benth.	AJ619557 (Oxelman & al., 2005)
<i>Emorya suaveolens</i> Torr.	AF027278 (Oxelman & al., 1999)
<i>Eremophila bignoniiflora</i> F. Muell.	AJ617609 (Oxelman & al., 2005)
<i>Fraxinus chinensis</i> Roxb.	DQ673275 (Lee & al., 2007)
<i>Gratiola pilosa</i> Michx.	AF188183 (Olmstead & al., 2001)
<i>Hemimeris montana</i> L. f.	AJ617596 (Oxelman & al., 1999)
<i>Ixianthes retzioides</i> Benth.	AJ617598 (Oxelman & al., 2005)
<i>Jasminum mesnyi</i> Hance	DQ673267 (Lee & al., 2007)
<i>Kigelia africana</i> (Lam.) Benth.	AF102632 (Spangler & Olmstead, 1999)
<i>Lamium purpureum</i> L.	U78694 (Wagstaff & al., 1998)
<i>Leucophyllum frutescens</i> (Berland.) I.M. Johnst.	AF123685 (Olmstead & al., 2001)
<i>Ligustrum vulgare</i> L.	AF130164 (Olmstead & al., 2000)
<i>Limosella macrantha</i> R.E.Fr.	AJ550553 (Kornhall & al., 2001)
<i>Lindenbergia philippensis</i> Benth.	AF123686 (Olmstead & al., 2001)
<i>Manuleopsis dinterii</i> Thell. ex Schinz	AJ401410 (Kornhall & al., 2001)
<i>Myoporum mauritianum</i> A. DC.	L36403 (Olmstead & Reeves, 1995)
<i>Nematanthus hirsutus</i> (Mart.) Wiehler	L36404 (Olmstead & Reeves, 1995)
<i>Nemesia cheiranthus</i> E. Mey. ex Benth.	AJ617605 (Oxelman & al., 2005)
<i>Nicodemia diversifolia</i> Ten.	L36405 (Olmstead & Reeves, 1995)
<i>Nuxia</i> sp.	AF027280 (Oxelman & al., 1999)
<i>Oftia africana</i> Bocq. ex Baill.	AJ617606 (Oxelman & al., 2005)
<i>Olea europaea</i> L.	DQ673278 (Lee & al., 2007)
<i>Oreosolen unguiculatus</i> Hemsl.	AJ617607 (Oxelman & al., 2005)
<i>Pedicularis foliosa</i> L.	AF123689 (Olmstead & al., 2001)
<i>Phryma leptostachya</i> L.	AJ429118 (Bremer & al., 2002)
<i>Phygelius capensis</i> E. Mey. ex Benth.	AJ617608 (Oxelman & al., 2005)
<i>Plantago lanceolata</i> L.	AF130151 (Olmstead & al., 2000)
<i>Plocosperma buxifolium</i> Benth.	AJ011985 (Oxelman & al., 1999)
<i>Proboscidea louisianica</i> (Mill.) Thell.	AF123690 (Olmstead & al., 2001)
<i>Selago corymbosa</i> L.	AJ401434 (Kornhall & al., 2001)
<i>Sesamum indicum</i> L.	L36413 (Olmstead & Reeves, 1995)
<i>Stemodia suffruticosa</i> Kunth	EF527455 (Estes & Small, 2008)
<i>Streptocarpus holstii</i> Engl.	L36415 (Olmstead & Reeves, 1995)
<i>Teedia lucida</i> Rudolphi	AJ617582 (Oxelman & al., 2005)
<i>Teucrium fruticans</i> L.	U78686 (Wagstaff & al., 1998)
<i>Thunbergia alata</i> Bojer ex Sims	U12667 (Scotland & al., 1995)
<i>Torenia baillonii</i> Godefroy ex André	AJ617583 (Oxelman & al., 2005)

<i>Verbascum thapsus</i> L.	L36417 (Olmstead & Reeves, 1995)
<i>Verbascum virgatum</i> Stokes	KC692716
<i>Verbena bracteata</i> Lag. & Rodr.	L36418 (Olmstead & Reeves, 1995)
<i>Veronica persica</i> Poir. in Lam.	L36419 (Olmstead & Reeves, 1995)
<i>Zaluzianskya glareosa</i> Hilliard & B.L. Burt	AJ401424 (Kornhall & al., 2001)

^a References:

Bremer & al. (2002) *Mol. Phylogenet. Evol.* 24: 274-301; Estes & Small (2008) *Syst. Bot.* 33: 176-182; Kornhall & al. (2001) *Plant Syst. Evol.* 228: 199-218; Lee & al. (2007) *Mol. Biol. Evol.* 24: 1161-1180; Olmstead & al. (2001) *Am. J. Bot.* 88: 348-361; Olmstead & al. (2000) *Mol. Phylogenet. Evol.* 16: 96-112; Olmstead & Reeves (1995) *Ann. Mo. Bot. Gard.* 82: 176-193; Oxelman & al. (1999) *Syst. Bot.* 24: 164-182; Oxelman & al. (2005) *Taxon* 54: 411-425; Scotland & al. (1995) *Am. J. Bot.* 82: 266-275; Spangler & Olmstead (1999) *Ann. Mo. Bot. Gard.* 86: 33-46; Vargas & al. (2004) *Plant Syst. Evol.* 249: 151-172; Wagstaff & al. (1998) *Plant Syst. Evol.* 209: 265-274.

Table S3. Pollination systems (PS) of the 77 taxa of *Scrophularia*.

Taxon	PS ^{a,b}	Distribution
<i>S. aestivalis</i>	W	C Balkan Peninsula
<i>S. alpestris</i> (1)	W	SE France and N Iberian Peninsula
<i>S. altaica</i>	?	W and E Siberia, Mongolia
<i>S. arguta</i>	?	Macaronesia, N Africa, Arabia, SE and CW Spain
<i>S. auriculata</i> subsp. <i>auriculata</i> (1,2)	W	W and SW Europe, Italy, Morocco; introduced in Mexico and New York
<i>S. bourgaeana</i>	W	C and CW Iberian Peninsula
<i>S. californica</i> subsp. <i>californica</i>	W	USA (California)
<i>S. calliantha</i> *	MVI	Canary Islands: Gran Canaria
<i>S. canina</i> subsp. <i>bicolor</i>	H	SW Asia, C and S Europe
<i>S. canina</i> subsp. <i>canina</i> * (1,3,4)	H	S and C Europe, S Russia, N Africa, SW Asia; introduced in New Jersey
<i>S. canina</i> subsp. <i>ramosissima</i>	H	West of the Mediterranean region
<i>S. catariifolia</i>	W	SW Asia
<i>S. chrysantha</i>	?	NE and E Turkey, Caucasus
<i>S. cinerascens</i>	H	E Turkey, Iran, Russia, Pakistan, Armenia, Georgia
<i>S. crassipedunculata</i>	W	Iran
<i>S. crassiuscula</i>	?	W Iran
<i>S. deserti</i>	H	Egypt, Palestine, Syria, Iraq, Arabia, Iran, Pakistan
<i>S. desertorum</i> (3)	W	USA (California, Nevada)
<i>S. eriocalyx</i>	W	Morocco (W and C Rif)
<i>S. floribunda</i>	H	W and SW Turkey
<i>S. fontqueri</i>	W	Morocco (W Rif)
<i>S. frutescens</i> var. <i>latifolia</i> *	H	Coast W Iberian Peninsula
<i>S. gracilis</i> (5)	?	Iraq and Turkey
<i>S. grandiflora</i> *	MVI	CW Portugal
<i>S. grayana</i>	W	Japan, China, E Russia
<i>S. herminii</i>	W	NW Iberian Peninsula
<i>S. heterophylla</i> subsp. <i>heterophylla</i>	W	S Greece, Aegean region
<i>S. heterophylla</i> subsp. <i>laciniata</i>	W	Greece, Aegean region, Balkans, Romania, Russia
<i>S. hirta</i>	W	Madeira island
<i>S. hypericifolia</i>	H	Syria, Iraq, Jordan, Palestine, Algeria, Libya
<i>S. ilwensis</i>	W	NE and C Turkey, S Caucasus
<i>S. jallui</i>	W	Morocco (C High Atlas)
<i>S. kurdica</i> subsp. <i>glabra</i>	W	SW Asia (E Turkey, N Iraq, NW Iran)
<i>S. laevigata</i> var. <i>pubescens</i>	W	NW Africa
<i>S. lanceolata</i>	W	USA and Canada
<i>S. laxiflora</i>	W	S Spain (Cádiz) and N Morocco (Tangier)
<i>S. lepidota</i>	?	C Turkey, Armenia

<i>S. libanotica</i> subsp. <i>libanotica</i>	H	SW Asia and Egypt (Sinai)
<i>S. lowei</i>	?	Madeira, Desertas and Porto Santo
<i>S. lucida</i>	W	SW Asia and S Europe (from France to Greece)
<i>S. lunariifolia</i>	?	Asia Minor (W and E Caucasus)
<i>S. lyrata</i> *	W	Iberian Peninsula, Mediterranean islands and NW Africa (Morocco, Algeria)
<i>S. macrantha</i>	B	USA (New Mexico)
<i>S. marilandica</i>	W	E USA and Canada
<i>S. megalantha</i>	?	Iran
<i>S. minima</i>	?	Caucasus
<i>S. myriophylla</i>	W	NW and S Turkey, S Greece
<i>S. ningpoensis</i>	W	China
<i>S. nodosa</i> (1,5,6,7,8,9,10)	W	Europe, W, C and E Siberia; introduced in USA
<i>S. olympica</i>	W	SW Asia (Crimea, Caucasus, Turkey, Iran)
<i>S. orientalis</i> (1)	W	SW, C and N Asia
<i>S. oxyrhyncha</i>	W	SW Spain
<i>S. pauciflora</i>	?	China, Bhutan, India, Nepal
<i>S. peregrina</i> (3)	?	Mediterranean region, SW Asia; introduced in California
<i>S. peyronii</i>	H	SW Asia
<i>S. pinardii</i>	H	S and SW Turkey, Israel
<i>S. reuteri</i>	W	CW Spain
<i>S. rimarum</i>	?	C and S Turkey
<i>S. rosulata</i>	H	Turkmenistan, NW Afghanistan, NE and E Iran
<i>S. rubricaulis</i> *	W	Syria, Lebanon, Palestine
<i>S. sambucifolia</i> subsp. <i>sambucifolia</i> *	MVI	SW Iberian Peninsula and NW Africa
<i>S. scopolii</i> var. <i>adenocalyx</i>	W	N and W Iran, Caucasus, Turkey
<i>S. scopolii</i> var. <i>smyrnaea</i>	W	Islands and W Turkey
<i>S. scorodonia</i> *	W	W and SW Europe, Macaronesia, NW Morocco
<i>S. smithii</i> subsp. <i>smithii</i>	W	Canary Islands (NE Tenerife)
<i>S. striata</i>	H	SW and C Asia
<i>S. sublyrata</i>	W	W Iberian Peninsula
<i>S. tanacetifolia</i>	W	E and SE Iberian Peninsula
<i>S. thesioides</i>	H	S Caucasus
<i>S. trichopoda</i>	?	S Turkey
<i>S. trifoliata</i> *	MVI	Tirrenian islands (Corsica, Sardinia, Gorgona Island)
<i>S. umbrosa</i> subsp. <i>umbrosa</i> (1,11)	W	Europe (included Sardinia, Corsica, Sicily), W and C Asia, China; introduced in USA
<i>S. valdesii</i>	W	W Iberian Peninsula
<i>S. vernalis</i> subsp. <i>vernalis</i> (1)	?	C and S Europe, C Russia; introduced in Britain
<i>S. viciosoi</i>	W	S Spain (Málaga)
<i>S. xanthoglossa</i>	H	Egypt, Lebanon, Syria, Palestine, Iran, C Asia
<i>S. xylorrhiza</i>	H	S and E Turkey, Syria, Palestine Jordan, Libya

^a Pollination systems were inferred from pollination syndrome, except for several species which derived either from experimental pollination studies (*) or literature review of visitors from field observations (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

*: Ortega-Olivencia & al. (2012) *Ann. Bot.* 109: 153-167; Valtueña & al. (2013) *Plant Biol.* 15: 328-334; Rodríguez-Riaño & al., unpublished results; personal observations.

1: Knuth (1894) *Handbuch der Blütenbiologie* vol. 2, 142-146; 2: Corbet & al. (1981) *Oecologia* 51: 79-83; 3: Shaw (1962) *Aliso* 5: 147-178; 4: Schremmer (1959) *Österr. Bot. Z.* 106: 187-193; 5: Fateryga (2010) *Entomol. Rev.* 90: 698-705; 6: Trelease (1881) *Bull. Torrey Bot. Club* 8: 133-140; 7: Müller (1883) *The fertilization of flowers*; 8: Robertson (1891) *Trans. Acad. Sci. St. Louis* 5: 569-598; 9: Hoffmann & Kwak (2005) *Biodiversity and pollination*; 10: De Vos (1983) *Acta Bot. Neerl.* 32: 345; 11: Brodmann & al. (2012) *Plant Biol.* 14: 500-505.

^b Pollination system.- W: wasp, H: hoverfly, MVI: mixed vertebrate-insect, B: bird, ?: unknown.

Capítulo 6

Multiple windows of colonization to Macaronesia since late Miocene by the dispersal-unspecialized *Scrophularia*

Enviado a *Plant Ecology, Evolution and Systematics*:

Navarro-Pérez M.L., M. Fernández-Mazuecos, J. López, F.J. Valtueña, A. Ortega-Olivencia & P. Vargas.

ABSTRACT

Biogeography of the Macaronesian flora has been the subject of numerous studies given the uniqueness that entails the geographic isolation of volcanic islands. Phylogenetic analyses, divergence time estimations and biogeographic reconstructions of *Scrophularia* species and subspecies distributed in Macaronesia and adjacent regions have been conducted in order to investigate their spatio-temporal occurrence on the islands. The Colonization Window Hypothesis (CWH) and the Relictual Series Hypothesis (RSH) were tested. Analyses were based on one nuclear (ITS) and three plastid (*trnL-trnF*, *psbA-trnH*, *trnQ-rps16*) DNA regions. Phylogenetic relationships were inferred using Bayesian inference and maximum likelihood methods. Biogeographic inferences were based on maximum-likelihood (DEC) and parsimony-based (S-DIVA) models. Our results supported at least five independent colonization events of *Scrophularia* lineages from the W Mediterranean mainland to Macaronesian archipelagos. These events were the result of long-distance dispersal over sea barriers despite the unspecialized dispersal syndrome of the genus. The colonization history of Macaronesian lineages of *Scrophularia* supports the Colonization Window Hypothesis based on the geographical proximity of Macaronesian-W Mediterranean sister groups and the wide range of their divergence times.

RESUMEN

La biogeografía de la flora macaronésica ha sido objeto de numerosos estudios dada la singularidad que entraña el aislamiento geográfico de las islas volcánicas. En este capítulo se han realizado análisis filogenéticos, estimación de tiempos de divergencia y reconstrucciones biogeográficas de las especies y subespecies de *Scrophularia* distribuidas en Macaronesia y regiones adyacentes, con el fin de investigar su ocurrencia espacio-temporal en las islas. Se ha examinado la Hipótesis de las Ventanas de Colonización (HVC) y la Hipótesis de Series Relícticas (HSR). Los análisis se han llevado a cabo en una región de ADN nuclear (ITS) y tres plastidiales (*trnL-trnF*, *psbA-trnH*, *trnQ-rps16*). Las relaciones filogenéticas han sido inferidas usando los métodos de inferencia Bayesiana y de máxima probabilidad. Las inferencias biogeográficas se han basado en los modelos de máxima probabilidad (DEC) y de parsimonia (S-DIVA). Nuestros resultados apoyan al menos 5 eventos independientes de colonización de los linajes de *Scrophularia* desde el W del Mediterráneo hasta los archipiélagos macaronésicos. Estos eventos son el resultado de la dispersión a larga distancia sobre la barrera marina a pesar de la falta de síndrome de dispersión en el género. La historia de la colonización de los linajes macaronésicos de *Scrophularia* apoya la Hipótesis de las Ventanas de Colonización basada en la proximidad geográfica que existe entre los grupos hermanos macaronésicos - mediterráneos

occidentales y en el amplio rango de sus tiempos de divergencia.

INTRODUCTION

Islands arguably provide the best spatio-temporal framework to reconstruct speciation based on biogeographic methods and the theory of island biogeography. Island systems display a number of features which allow researchers to isolate particular factors and processes and explore their effects (Whittaker & Fernández-Palacios, 2007). Their context of isolation with well-defined boundaries, small geographical size and peculiar habitats are some causes behind the singular species diversity present in islands (Emerson, 2002). Singularity is especially significant on oceanic islands due to its geological formation (generally resulting from volcanic activity), initial lack of life and continued isolation from the mainland (Whittaker & Fernández-Palacios, 2007). This is the case of the North Atlantic archipelagos. These volcanic archipelagos, including Azores, Madeira, Selvagens, Canaries and Cape Verde (Macaronesia), are located to the W of the Iberian Peninsula and NW of Africa, as closer as 96 km and as far as 1500 km from them. The oldest extant island, Selvagem Grande, attains a maximum age of 27 Ma (Fernández-Palacios & al., 2011, and references therein).

Biogeography has been transformed from a descriptive discipline to a hypothetico-deductive science due to the availability of large biogeographic databases, palaeontological data and molecular markers to infer phylogenetic relationships (Sanmartín, 2012). New methods allow testing explicit biogeographic hypotheses, particularly those related to where and when ancestors of the extant species colonised new territories and evolved (Crisp & al., 2011; Ronquist & Sanmartín, 2011). Regarding Atlantic Islands, Cronk (1992) stated a Relictual Series Hypothesis (RSH) in which he related different events of continental extinction and change of African vegetation since the Miocene to the different ages of island relicts and their degree of geographical disjunction respect to their sister taxa. An alternative explanation, the Colonization Window Hypothesis (CWH) (Carine, 2005), stresses island establishment as a result of limited colonization opportunities to explain some distributional patterns not accounted for by the RSH. The CWH highlights island establishment rather than continental extinction and predicts that opportunities for colonization into Macaronesia have been temporally constrained to discrete windows of colonization (Carine, 2005).

Scrophularieae is the only tribe belonging to Scrophulariaceae s.s. (Olmstead & al., 2001) that appears to have radiated in the N Hemisphere (Tank & al., 2006). This predominantly north temperate distribution is shared by the two Scrophularieae genera with the largest numbers of species, *Scrophularia* and *Verbascum*, along with *Oreosolen* (Oxelman & al., 2005). *Scrophularia* consists of about 270 species (200 according to Mabberley, 1997), which have been subject to floristic or taxonomic studies in W USA (e.g. Shaw, 1962), Europe (Richardson, 1972), Asia (e.g. USSR, Gorshkova, 1955; Turkey, Lall & Mill, 1978; Iran, Grau, 1981a, Attar, 2006; Pakistan, Qaiser & al., 1988; Japan, Yamazaki, 1993; China, Deyouan & al., 1998, among others), N Africa (e.g. Algeria, Quézel & Santa, 1963; Tunisia, Pottier-Alapetite, 1981; Libya, Qaiser, 1982; Egypte, Boulos, 2002; Morocco, Ortega-Olivencia & Devesa, 2002; Ibn Tattou, 2007) and Macaronesia (Dalgaard, 1979).

Scrophularia species are classified into two sections both occurring mainly in the N hemisphere: sect. *Scrophularia* distributed in both the Old and New World; and sect. *Caninae* G. Don distributed only in the Old World. Due to high concentration of taxa found in Asia Minor, the Iraq plateau, Afghanistan, the Himalayas and the mountain ranges of W Tibet, Stiefelhagen (1910) considered this region as the center of diversification of the genus, a hypothesis later supported by Ortega-Olivencia & Devesa (1993a). According to Ortega-Olivencia & Devesa (1993a), there are two secondary centers of diversity in Europe based on the number of taxa: one located in the Balkan region, where Grau (1981b) estimated 15 taxa, and another in the Iberian Peninsula with 29 taxa (12 endemic species). Both authors also indicated that Iberian taxa are closely related to those of the Macaronesian region, where a large majority of them are endemic (eight, Dalgaard, 1979), as well as to those of Morocco (five, Ibn Tattou, 2007; Ortega-Olivencia & Devesa, 2002). The W Mediterranean region harbours 28 endemic species and subspecies.

Dalgaard (1979) performed the most complete study about biosystematics of the Macaronesian species and subspecies of *Scrophularia*. This author determined the cross-compatibility and relationships between endemic and non-endemic Macaronesian taxa (Table 1) by means of crossing experiments. Scheunert & Heubl (2011) hypothesized the origin and biogeographic history of mainly New World *Scrophularia* species based on phylogenetic inferences. However, the number of species sampled (29) was not representative in order to obtain conclusive results about the complete genus, and no species from Macaronesia was included. More recent phylogenetic studies

showed several Macaronesian species included in different subclades but they did not support common ancestry for all current Macaronesian taxa of *Scrophularia* (Navarro-Pérez & al., 2013; Scheunert & Heubl, 2014). The evolution of *Scrophularia* in the W Mediterranean and Macaronesian regions was the subject of a recent study where biogeographic patterns were assessed by Bayesian binary MCMC (BBM) analysis (Scheunert & Heubl, 2014).

Table 1. Distribution area of Macaronesian species and subspecies of *Scrophularia*.

Species and subspecies	Macaronesia	Other places
<i>S. arguta</i>	Salvage Island, Canary Islands, Cape Verde Islands	SE and CW Spain, N Africa, Arabia
<i>S. auriculata</i>	Azores	W and SW Europe and Morocco
<i>S. calliantha</i>	Canary Islands (Gran Canaria)	
<i>S. glabrata</i>	Canary Islands (Tenerife, La Palma)	
<i>S. hirta</i>	Madeira	
<i>S. lowei</i>	Madeira	
<i>S. racemosa</i>	Madeira	
<i>S. smithii</i> subsp. <i>hierrensis</i>	Canary Islands (El Hierro)	
<i>S. smithii</i> subsp. <i>langeana</i>	Canary Islands (Tenerife, La Gomera, La Palma)	
<i>S. smithii</i> subsp. <i>smithii</i>	Canary Islands (Tenerife)	
<i>S. scorodonia</i>	Azores, Madeira	W and SW Europe, NW Morocco

In the present paper we have gathered the best sampling of *Scrophularia* taxa to date in order to present a reliable dated phylogeny of the genus based on sequences of three noncoding regions of the chloroplast genome and the internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA. Our working hypotheses predict that Macaronesian *Scrophularia* lineages are the result of spatio-temporal discrete windows of colonization (Colonization Window Hypothesis; Carine, 2005) and/or constitute a relictual series (Relictual Series Hypothesis; Cronk, 1992). To test these hypotheses three objectives were specifically addressed: (1) to estimate divergence times between Macaronesian and mainland lineages; (2) to reconstruct ancestral areas and biogeographic relationships of primarily Macaronesian and W Mediterranean clades; and (3) to explore the tempo of speciation Macaronesian islands.

MATERIALS AND METHODS

This paper is built upon previous datasets. In particular, we integrated molecular data

from other studies (Attar & al., 2011; Scheunert & Heubl, 2011, 2014; Navarro & al., 2013) and increased the number of DNA regions sequenced (*rps16-trnQ* and *trnH-psbA* in addition to ITS and *trnL-trnF*) and the number of sampled specimens and locations (15 new specimens, including 3 of newly sequenced species and subspecies).

TAXON SAMPLING

We sampled a total of 86 taxa, 83 of them belonging to *Scrophularia*, including representatives of the sections *Scrophularia* and *Caninae* described by Stiefelhagen (1910), and three outgroup taxa, including two species of *Verbascum* and one of *Teedia* based on their known phylogenetic relationships (Oxelman & al., 2005). Of 83 taxa of *Scrophularia* included in the analyses (see Table S1), 59 belong to the section *Scrophularia* and 24 to sect. *Caninae*. The whole distribution of the genus was covered, and, specifically, all centers of diversity mentioned above. Except for *S. arguta*, for widespread species distributed both in mainland and in Macaronesian islands, two individuals, one from mainland and another from a Macaronesian island, were included. This was the case of *S. auriculata* and *S. scorodonia*. In total, 167 sequences of *Scrophularia* (17 for ITS, 17 for *trnL-trnF*, 66 for *psbA-trnH*, 67 for *trnQ-rps16*) were newly generated. A total of 102 sequences of *Scrophularia* and two of *Verbascum* from both ITS and *trnL-trnF* regions were obtained from our previous study (Navarro & al., 2013). 61 additional ITS, *psbA-trnH* and *trnQ-rps16* sequences of *Scrophularia* were recovered from the GenBank database (Attar & al., 2011; Han & al., 2009; Lee & al., 2010; Scheunert & Heubl, 2011, 2014), while for the related genera *Teedia*, *Manulea*, *Selago*, *Antherothamnus* and *Verbascum* a total of twelve sequences were obtained (Kornhall & al., 2001; Wolfe & al., 2002; Kornhall & Bremer, 2004; Oxelman & al., 2005; Scheunert & Heubl, 2011, 2014) (see Table S1 for accession numbers).

All newly-generated sequences were submitted to the GenBank database (see Table S1 for accession numbers). The sampling covered c. 75 % of *Scrophularia* species from the W Mediterranean region (including Italy) and Macaronesia; from this last region 91 % of species and subspecies were included in this study.

DNA EXTRACTION AND SEQUENCING

DNA was extracted from silica-dried plant material collected in the field or obtained from herbarium specimens (COA, E, MA, MO, SALA, UNEX). The manufacturer's

protocol of DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN Inc., California) was used.

After surveying variation in several chloroplast DNA sequences, the three most variable regions (*trnL-trnF*, *psbA-trnH* and *trnQ-rps16* intergenic spacers) were selected for sequencing. In order to provide higher resolution, a nuclear ribosomal DNA region, the internal transcribed spacer (ITS), was also sequenced.

Chloroplast regions were amplified using standard primers (Shaw & al., 2005; Shaw & al., 2007) whereas the ITS region was amplified using the primers 17SE and 26SE (Sun & al., 1994). DNA amplification was carried out following the protocol described in Guzmán & Vargas (2005) with minor modifications. Concretely, 25 µL of the polymerase chain reaction (PCR) mix, using kit TAKARA Ex Taq (plus BSA and/or DMSO in certain reactions to improve the efficiency of amplification), were run in an Eppendorf Mastercycler Ep gradient S or a XP thermal cycler for 1 min of pretreatment at 94 °C, followed by 30 cycles of 30s-1 min at 94 °C (denaturation), 30s-1 min at 48-55 °C (annealing) and 1-2 min at 72 °C (elongation), and a final extension cycle at 72 °C for 10 min. Amplified products were submitted to Macrogen Inc. (Seoul, South Korea or Amsterdam, The Netherlands) for sequencing.

The ITS and *psbA-trnH* regions were sequenced bidirectionally, while the *trnL-trnF* and *trnQ-rps16* regions were sequenced using a single primer. A large deletion in the *trnQ-rps16* intergenic spacer prevented the complete sequencing of this region. Therefore, only the most variable segment found in the pilot study was sequenced using the reverse primer (*rps16*). Sequences were edited using Geneious Pro v 5.1.7 (Drummond & al., 2010).

PHYLOGENETIC RECONSTRUCTION AND DIVERGENCE TIME ESTIMATION

Each region was aligned using MAFFT 6 (Katoh & Toh, 2008) with default parameters. The resulting alignment was visually inspected in order to perform further adjustments. Characteristics of DNA sequence datasets are summarized in Table 2.

Phylogenetic reconstruction based on the combined dataset was performed by maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI). The three plastid datasets were concatenated and together with the nuclear (ITS) region were then combined in a single nexus file comprising two partitions (ITS and plastid DNA).

ML analyses were conducted using RAxML GUI (Silvestro & Michalak, 2012), a graphical front-end for RAxML-VI-HPC (Randomized Axelerated Maximum Likelihood;

Table 2. Characteristics of DNA sequence datasets.

	ITS	<i>trnL-trnF</i>	<i>psbA-trnH</i>	<i>trnQ-rps16</i>
Number of sequences	91	91	91	91
Aligned length (bp)	567	786	375	933
Ungapped length range	540-565	728-785	179-375	379-933
Pairwise % identity	93.7	73.7	76	67.6
Variable characters	213	154	118	183
Parsimony-informative character	139	54	78	87
Mean % G+C	60.4	33.4	20.8	26.6

Stamatakis, 2006). ML with the rapid bootstrap option was run from a starting random seed and 1000 nonparametric bootstrap replicates were generated. Two partitions (ITS and plastids) were included and ML analyses used the general time-reversible (GTR) with gamma model of rate heterogeneity.

Bayesian inference (BI) was performed in BEAST v1.8.0 (Drummond & al., 2006; Drummond & al., 2012) which allowed us to infer divergence times among *Scrophularia* lineages. Given that *Scrophularia* fossils have not been discovered to date, the genus root height was modelled as a normal distribution with mean 26.77 Ma (SD = 4.27 Ma). These values were obtained from a first temporal calibration of the *ndhF* phylogeny (Navarro-Pérez & al., 2013) which included minimum stem-age constraints for Lamiales families and tribes based on five fossils following Fernández-Mazuecos & Vargas (2011) and Vargas & al. (2014). The GTR+I+G and GTR+G models for ITS and concatenated plastid regions, respectively, were selected according to the Akaike Information Criterion (AIC) implemented in jModelTest 2.1.3 (Darriba & al., 2012). A relaxed uncorrelated lognormal clock was used and a birth-death tree prior was set. Other priors were set to default values. Four Monte Carlo Markov Chain (MCMC) (Drummond & al., 2002) analyses were initiated on a random starting tree with 20 millions of generations each and a sample frequency of 2000. Resulting trees were combined in LogCombiner 1.8.0 (Drummond & al., 2012) after discarding the first 10 % of sampled generations as burn-in. Adequate effective sample sizes (ESS) were confirmed in Tracer 1.5 (Drummond & Rambaut, 2007). The maximum clade credibility (MCC) tree was summarized in TreeAnnotator v1.8.0 (Drummond & al., 2012) with a posterior probability limit of 0.90.

BIOGEOGRAPHICAL RECONSTRUCTION

Two models were used to perform ancestral state reconstruction using the phylogenetic

results obtained in BEAST: DEC (Dispersal, Extinction and Cladogenesis) and S-DIVA (Statistical Dispersal-Vicariance Analyses). On the one hand, the maximum-likelihood DEC model (Ree & al., 2005; Ree & Smith, 2008) incorporates time calibrated phylogenetic data and thus, it enables a robust inference of dated biogeographical events. On the other hand, S-DIVA, a parsimony-based method, efficiently takes into account the influence of phylogenetic uncertainty on biogeographic reconstructions. Both methods present differences in the level of decisiveness (confidence) which generally causes higher maximum probabilities assigned to ancestral ranges at nodes in the DIVA results than in the DEC results (Buerki & al., 2011). Thus, both estimated ancestral range probabilities are not directly comparable.

Given the polytomy of several clades and species in the phylogenetic analysis of the full dataset (see below), we did not attempt a biogeographic reconstruction of *Scrophularia* using the complete phylogeny. Instead, we focused on the largest supported clade which included sect. *Caninae*. This clade included taxa mainly distributed across Macaronesia, the Mediterranean basin and adjacent regions. CACTUS 1.13 (Schwilk & Ackerly, 2001) was used in order to prune all other lineages from the trees.

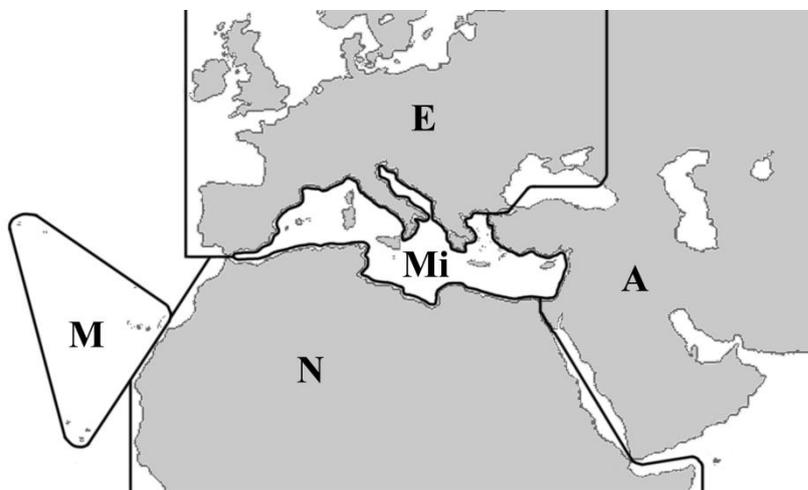


Figure 1. Geographical regions represented: E, Europe; A, Asia; M, Macaronesia; N, North Africa; Mi, Mediterranean islands.

In order to achieve our proposed aims, five geographic regions were delimited as unit areas based on current distributions of sampled taxa (Table 3) and marine barriers: (E) Europe, (A) Asia, (M) Macaronesia, (N) N Africa, (Mi) Mediterranean islands (see Fig. 1).

DEC modelling is based on a stochastic analysis of geographic range evolution involving dispersal, extinction and cladogenesis (DEC). This model, implemented in

Lagrange v. 2.0.1 (Ree & al., 2005; Ree & Smith, 2008), incorporates information on the timing of past geological events (e.g. area connections); therefore it is considered one of the most robust frameworks for the reconstruction of ancestral areas (Clark & al., 2008). We built a DEC model in which the maximum number of areas was unconstrained and dispersal rate was constant through time. The remaining instantaneous

Table 3. Distribution of *Scrophularia* taxa studied. Asterisks indicate those taxa used in biogeographic reconstruction.

Taxon	Distribution
<i>S. alpestris</i>	SE France and N Iberian Peninsula
<i>S. arguta</i> *	Macaronesia, N Africa, Arabia, SE and CW Spain
<i>S. atrata</i>	USA (California)
<i>S. auriculata</i> *	W and SW Europe, Azores Islands, Italy and Morocco; introduced in New Mexico and New York
<i>S. bourgaeana</i>	C and CW Iberian Peninsula
<i>S. californica</i> subsp. <i>californica</i>	USA (California)
<i>S. calliantha</i> *	Canary Islands
<i>S. canina</i> subsp. <i>bicolor</i> *	SW Asia, C and S Europe
<i>S. canina</i> subsp. <i>ramosissima</i> *	W Mediterranean region
<i>S. catariifolia</i> *	SW Asia
<i>S. chrysantha</i>	NE and E Turkey, Caucasus
<i>S. cinerascens</i> *	E Turkey, Iran, Russia, Pakistan, Armenia, Georgia
<i>S. crassipedunculata</i> *	Iran
<i>S. crassiuscula</i> *	W Iran
<i>S. deserti</i> *	Egypt, Palestine, Syria, Iraq, Arabia, Iran, Pakistan
<i>S. desertorum</i>	USA (California, Nevada)
<i>S. duplicatoserrata</i>	Japan
<i>S. eggersii</i>	Dominican Republic
<i>S. eriocalyx</i> *	Morocco (W and C Rif)
<i>S. floribunda</i> *	W and SW Turkey
<i>S. fontqueri</i> *	Morocco (W Rif)
<i>S. frutescens</i> var. <i>frutescens</i> *	Iberian Peninsula, NW Africa
<i>S. glabrata</i> *	Canary Islands
<i>S. grandiflora</i> *	CW Portugal
<i>S. grayana</i>	Japan, China, E Russia
<i>S. herminii</i>	NW Iberian Peninsula
<i>S. heterophylla</i> subsp. <i>heterophylla</i> *	S Greece, Aegean region
<i>S. heterophylla</i> subsp. <i>laciniata</i> *	Greece, Aegean region, Balkans, Romania, Russia
<i>S. hirta</i> *	Madeira
<i>S. hypericifolia</i> *	Syria, Iraq, Jordan, Palestine, Algeria, Libya
<i>S. ilwensis</i> *	NE and C Turkey, S Caucasus
<i>S. jallui</i> *	Morocco (C High Atlas)
<i>S. kakudensis</i>	China, Japan, Korea
<i>S. koraiensis</i>	Korea
<i>S. kurdica</i> subsp. <i>glabra</i>	SW Asia (E Turkey, N Iraq, NW Iran)
<i>S. laevigata</i> var. <i>pubescens</i> *	NW Africa
<i>S. laevis</i>	USA (New Mexico, Organ Mountains)
<i>S. lanceolata</i>	USA and Canada
<i>S. laxiflora</i> *	S Spain (Cádiz) and N Morocco (Tangier)
<i>S. lepidota</i> *	C Turkey, Armenia

<i>S. libanotica</i> subsp. <i>libanotica</i> *	SW Asia and Egypt (Sinai)
<i>S. lowei</i> *	Madeira
<i>S. lucida</i> *	SW Asia and S Europe (from France to Greece)
<i>S. lunariifolia</i>	Asia Minor (W and E Caucasus)
<i>S. lyrata</i> *	Iberian Peninsula, Mediterranean islands and NW Africa (Morocco, Algeria)
<i>S. macrantha</i>	USA (New Mexico)
<i>S. marilandica</i>	E USA and Canada
<i>S. megalantha</i> *	Iran
<i>S. micrantha</i>	Cuba-Haiti-Puerto Rico
<i>S. minutiflora</i>	Dominican Republic
<i>S. montana</i>	USA (New Mexico)
<i>S. multiflora</i>	USA (California)
<i>S. musashiensis</i>	Caucasus
<i>S. myriophylla</i> *	NW and S Turkey, S Greece
<i>S. ningpoensis</i>	China
<i>S. nodosa</i>	Europe, W, C and E Siberia; introduced in USA
<i>S. olympica</i> *	SW Asia (Crimea, Caucasus, Turkey, Iran)
<i>S. orientalis</i>	SW, C and N Asia
<i>S. oxyrhyncha</i> *	SW Spain
<i>S. parviflora</i>	USA (SW New Mexico, SE and C Arizona)
<i>S. pauciflora</i>	China, Bhutan, India, Nepal
<i>S. peregrina</i>	Mediterranean region and SW Asia (Crimea y Caucasus); introduced in California
<i>S. peyronii</i> *	SW Asia
<i>S. pinardii</i> *	S and SW Turkey, Israel
<i>S. racemosa</i> *	Madeira
<i>S. reuteri</i> *	CW Spain
<i>S. rosulata</i> *	Turkmenistan, NW Afghanistan, NE and E Iran
<i>S. sambucifolia</i> subsp. <i>sambucifolia</i> *	SW Iberian Peninsula and NW Africa
<i>S. scopolii</i> var. <i>scopolii</i>	N and W Iran, Caucasus, Turkey
<i>S. scopolii</i> var. <i>smyrnaea</i>	Islands and W Turkey
<i>S. scorodonia</i> *	W and SW Europe, Macaronesia, NW Morocco
<i>S. serrata</i>	USA (Idaho)
<i>S. smithii</i> subsp. <i>langeana</i> *	Canary Islands
<i>S. smithii</i> subsp. <i>smithii</i> *	Canary Islands
<i>S. sublyrata</i> *	W Iberian Peninsula
<i>S. tanacetifolia</i> *	E and SE Iberian Peninsula
<i>S. trichopoda</i> *	S Turkey
<i>S. trifoliata</i> *	Tirrenian islands (Corsica, Sardinia, Gorgona Island)
<i>S. umbrosa</i> subsp. <i>umbrosa</i>	Europe (included Sardinia, Corsica, Sicily), W and C Asia, China; introduced in USA
<i>S. valdesii</i> *	W Spain (Salamanca, Zamora)
<i>S. viciosoi</i> *	S Spain (Málaga)
<i>S. xylorrhiza</i> *	S and E Turkey, Syria, Palestine, Jordan, Libya
<i>S. yoshimurae</i>	China (Taiwan)

transition probabilities were otherwise left unmodified. The full dichotomous MCC pruned tree obtained in the BEAST analysis was required for this biogeographical reconstruction. As in Fernández-Mazuecos & Vargas (2011), due to lack of a reliable sister group to the study clade, we decided not to include any outgroup in the analysis,

although it has been recommended for DEC analysis (Kodandaramaiah, 2010).

S-DIVA (Yu & al., 2010) was implemented in RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies; Yu & al., 2011). This method rectifies the problems about uncertainty in phylogeny and in ancestral area optimization attached to the initial DIVA method (Ronquist, 1997), as previously proposed by Nylander & al. (2008) and Harris & Xiang (2009) in their Bayes-DIVA method. All (pruned) trees from the Bayesian distribution obtained from BEAST were analyzed to account for phylogenetic uncertainty, and results were summarized on the MCC tree. Four analyses were conducted with RASP to calculate the probabilities of ancestral ranges at nodes following Fernández-Mazuecos & Vargas (2011), with the “allow reconstruction” option in effect (Harris & Xiang, 2009) and without that option (Nylander & al., 2008), and, for both alternatives, setting the maximum number of areas in ancestral ranges to two or four.

RESULTS

PHYLOGENETIC ANALYSES AND DIVERGENCE TIME ESTIMATION

The aligned matrix of four combined DNA regions was 2,658 pb in length. The characteristics of single DNA sequence datasets are summarized in Table 2. Trees inferred by BI and ML showed no significant differences in their topologies. For all analyses, the *Scrophularia* clade was supported as monophyletic and robustly separated from the outgroup species. Section *Caninae* was also a monophyletic clade nested within *Scrophularia*. The supported clade in which biogeographic analyses were conducted (see Fig. 2) included species distributed in all regions recognized for the genus, except for the New World and E Asia (Table 3).

The time-calibrated phylogeny obtained in BEAST is shown in Fig. 2. Parameters analyzed in Tracer showed equilibrium and values of effective sample size (ESS) above 200 after discarding burn-in, hence a larger number of MCMC iterations was not necessary. The use of a relaxed molecular clock was supported by values of standard deviation of the uncorrelated lognormal relaxed clock and coefficient of variation (0.702 and 0.792, respectively) not abutting against zero (Drummond & al., 2007). The combined chronogram supported a crown age of *Scrophularia* around the Miocene (Fig. 2).

Within the studied clade, *S. megalantha* was recovered as the earliest diverging lineage (Fig. 2, 3). The first supported clade grouped the Madeiran *S. lowei* and the widespread *S. arguta*, which diverged around the Pliocene. The next clade included two sister clades that diversified since the late Miocene or Pliocene: the mainly Asian sect. *Caninae* lineage and a complex clade divided in three subclades. The first subclade only included Macaronesian endemic species and subspecies (Fig. 3: *S. smithii* subsp. *smithii*, *S. hirta*, *S. calliantha*, *S. glabrata* and *S. smithii* subsp. *langeana*). The second one was formed mainly by European species, while species of Africa, Europe, Macaronesia and Mediterranean islands constituted the third subclade. The second and third subclades included three Macaronesian species: *S. racemosa*, two different populations of *S. scorodonia* and two of *S. auriculata*.

In summary, the Macaronesian species included in this study (*S. arguta*, *S. auriculata*, *S. calliantha*, *S. glabrata*, *S. hirta*, *S. lowei*, *S. racemosa*, *S. scorodonia*, *S. smithii* subsp. *smithii*, and *S. smithii* subsp. *langeana*) did not form a monophyletic group and were included in different clades, indicating at least five independent origins of *Scrophularia* populations in Macaronesia.

BIOGEOGRAPHIC RECONSTRUCTION

The results of biogeographic reconstructions for the pruned clade are summarized in figure 3 and table 4. The DEC model produced log-likelihood = - 114.6 units for the optimal reconstruction, dispersal rate = 0.04569 and extinction rate = 4.285e-009. Maximum-likelihood scenarios of range inheritance for the root and supported nodes are shown in table 4. The most likely DEC scenario supported an Asian area for the root node. However, this node displayed a widespread distribution in the S-DIVA result, as it included all delimited areas except for Mediterranean islands. The sect. *Caninae* lineage inherited an Asian range which was maintained in the course of its diversification until the Pliocene, when dispersal events extended its distribution area towards Europe, N Africa and Mediterranean islands (Fig. 3; Table 4).

According to S-DIVA analyses, in the cladogenetic event at the base of clade 14 a widespread late Miocene ancestor yielded three daughter lineages with unresolved relationships, each of them inheriting mutually exclusive ranges that are strongly supported: Macaronesia for the ancestor of clade 15 (P = 1), Europe for the ancestor of clade 16 (P = 0.90), and N Africa for the ancestor of clade 19 (P = 0.26). Within clade 19,

Table 4. Summary of most likely scenarios of range inheritance tested by Lagrange (DEC model) and marginal probabilities of ancestral areas obtained by RASP (S-DIVA model). In addition, intervals of divergence times (95% highest posterior density intervals) are included.

Node	95% HPD intervals			DEC		S-DIVA
	Max.	Min.	Mean	Split	Rel. Prob.	Probability (%)
1	15.19	5.1	9.92	[A A]	0.1574	AEMN 61.65
2	5.5	0.43	2.63	[EAMN M]	0.4658	M 53.09
3	11.75	3.76	7.59	[A EMN]	0.215	AEN 31.32
4	9.75	2.97	6.23	[A A]	0.9374	A 96.88
5	6.75	1.94	4.18	[A A]	0.9997	A 100.00
6	5.52	1.54	3.38	[A A]	0.997	A 100.00
7	3.88	0.74	2.19	[A A]	1	A 100.00
8	3.65	0.57	2.04	[A A]	1	A 100.00
9	3.7	0.73	2.11	[A A]	0.8694	A 100.00
10	3.28	0.31	1.62	[A A]	1	A 100.00
11	3.95	0.61	2.18	[A A]	0.2406	A 52.38
12	4.14	0.94	2.43	[E E]	0.437	E 93.71
13	3.16	0.46	1.7	[E E]	0.5725	E 100.00
14	9.31	2.75	5.95	[M EN]	0.2645	EMN 51.33
15	5.84	1.3	3.37	[M M]	1	M 100.00
16	4.77	0.93	2.67	[E E]	0.8952	E 100.00
17	1.05	0.02	0.42	[E E]	1	E 100.00
18	1.33	0.1	0.61	[M EN]	0.639	EMN 50.00
19	6.9	1.95	4.29	[N EN]	0.2573	N 61.19
20	3.62	0.32	1.74	[N N]	1	N 100.00
21	3.49	0.51	1.87	[E M]	1	EM 100.00
22	4.06	0.98	2.41	[N N]	0.3294	N 78.50
23	2.72	0.22	1.33	[N N]	1	N 100.00
24	1.72	0.1	0.82	[M EN]	0.6796	EMN 43.15

Node: number of nodes is related with nodes of Figs. 2 and 3.

95% HPD intervals: means 95% highest posterior density intervals based on relaxed molecular-clock analysis of ITS+trnL-trnF+psbA-trnH+trnQ-rps16 sequences in BEAST.

DEC: splits separated by bar means that the area on the left the one inherited by the upper daughter branch and the area on the right the one inherited by the lower daughter branch. Relative probability (Rel. Prob.) is shown for a maximum of most likely scenarios within 2 log-likelihood units of the optimal reconstruction of each node.

S-DIVA: optimal reconstructions and probability (%) allowing for a maximum of four areas in ancestral ranges and without the option “allow reconstruction”, according to Nylander & al. (2008).

Areas: E, Europe; A, Asia; M, Macaronesia; N, North Africa.

a N African ancestor likely gave rise to *S. trifoliata*, isolated in Tyrrhenian Islands (Mi area), while *S. viciosoi*, exclusive to S Spain, and a sample of *S. auriculata* collected from a Macaronesian population (Azores) had a common European ancestor. Node 22 also showed an African ancestral area. In the course of diversification of this clade, Quaternary dispersal events to Europe, Macaronesia and Mediterranean islands were inferred. The Madeiran endemic *S. racemosa* was sister to the sample of *S. auriculata* from an Iberian population.

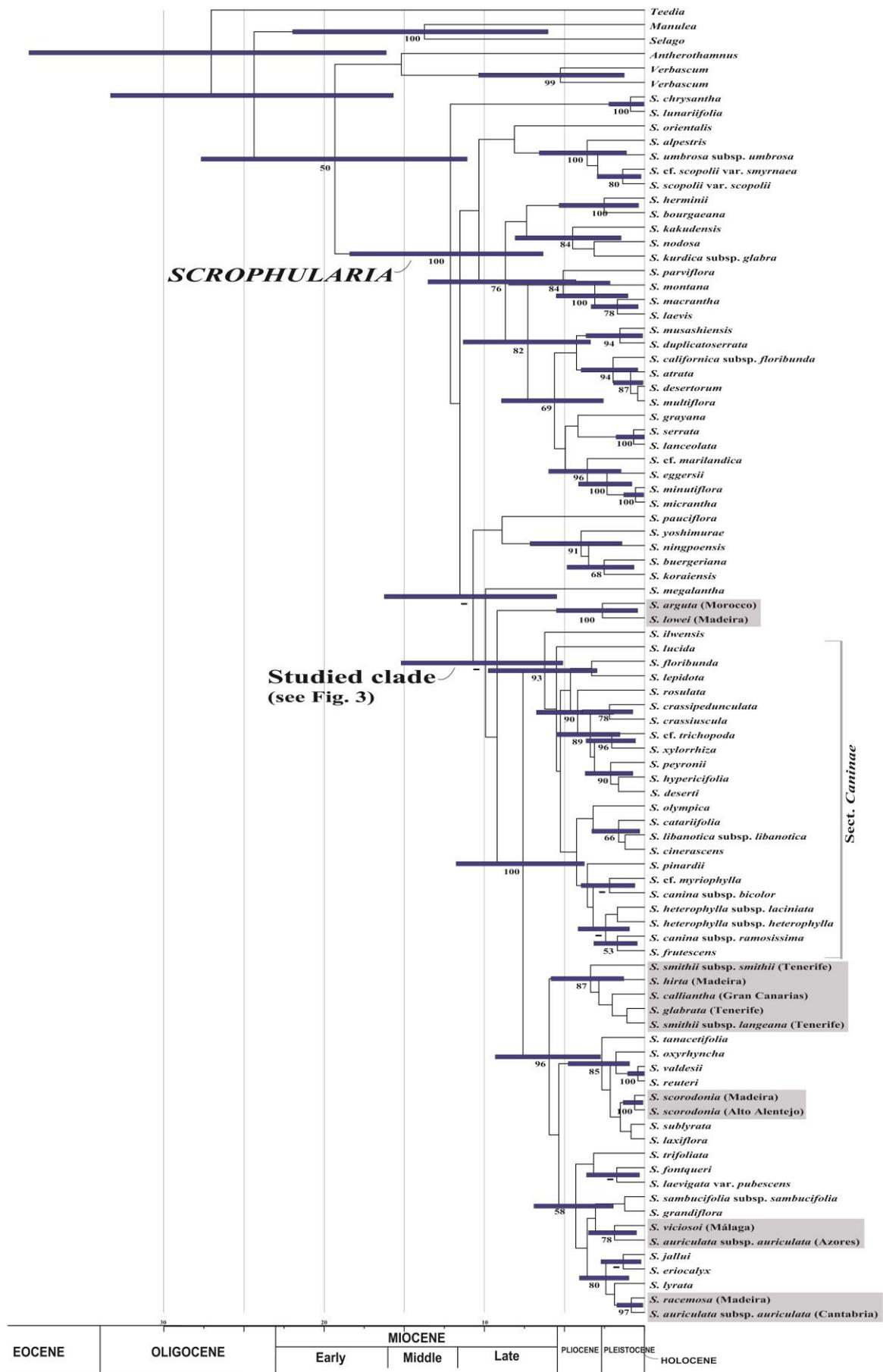


Figure 2. Molecular dating analysis. Phylogenetic relationships of 85 *Scrophularia* samples and six related taxa based on the combined analysis of nDNA region (ITS) and cpDNA regions (*trnL-trnF*, *psbA-trnH*, *trnQ-rps16*). Maximum clade credibility tree produced by relaxed molecular-clock analysis in BEAST is shown. Node bars represent the 95 % highest posterior density intervals for the divergence time estimates of clades with posterior probabilities above 0.90. Numbers below branches are maximum likelihood bootstrap percentages. A hyphen (-) indicates no bootstrap support over 50 %. Major clades of the study group are indicated. Macaronesian species and samples of *S. scorodonia*, *S. viciosoi* and *S. auriculata* have between parentheses the localization of the collected samples.

←

Although both methodologies are not directly comparable, results of S-DIVA analyses were mostly congruent with DEC inferences. The S-DIVA analysis that kept the number of maximum areas to four showed a higher congruence with DEC inferences (Fig. 3). In addition, there were no significant differences between S-DIVA analyses when selecting or not selecting the “allow reconstruction” option. In fact, the two S-DIVA models inferred the same optimal reconstruction in all except for node 3 (result not shown).

MULTIPLE COLONIZATIONS OF MACARONESIA

Results revealed the colonization of Macaronesia by five independent clades of *Scrophularia* (see Fig. 3). The four Madeiran samples (*S. lowei*, *S. hirta*, *S. scorodonia* and *S. racemosa*) were placed in four independent, well-supported clades revealing four colonizations of the same archipelago. A different scenario was reconstructed for the Canary Islands: four endemics species and subspecies of this archipelago (*S. smithii* subsp. *smithii* and subsp. *langeana*, *S. calliantha* and *S. glabrata*) were grouped in a supported clade together with the Madeiran *S. hirta*. These results evidence the biogeographic connection between the Canary Islands and Madeira.

Colonization events of oceanic islands were not always followed by speciation. Indeed, Macaronesia harbours *Scrophularia* endemics (*S. calliantha*, *S. glabrata*, *S. hirta*, *S. lowei*, *S. racemosa*, *S. smithii* subsp. *langeana* and subsp. *smithii*) together with widely distributed species (*S. arguta*, *S. auriculata* and *S. scorodonia*). Interestingly, this situation even occurs in sister species (*S. lowei* and *S. arguta*).

DISCUSSION

Lack of fossils (calibration points) and incomplete sampling (lineage diversity) within

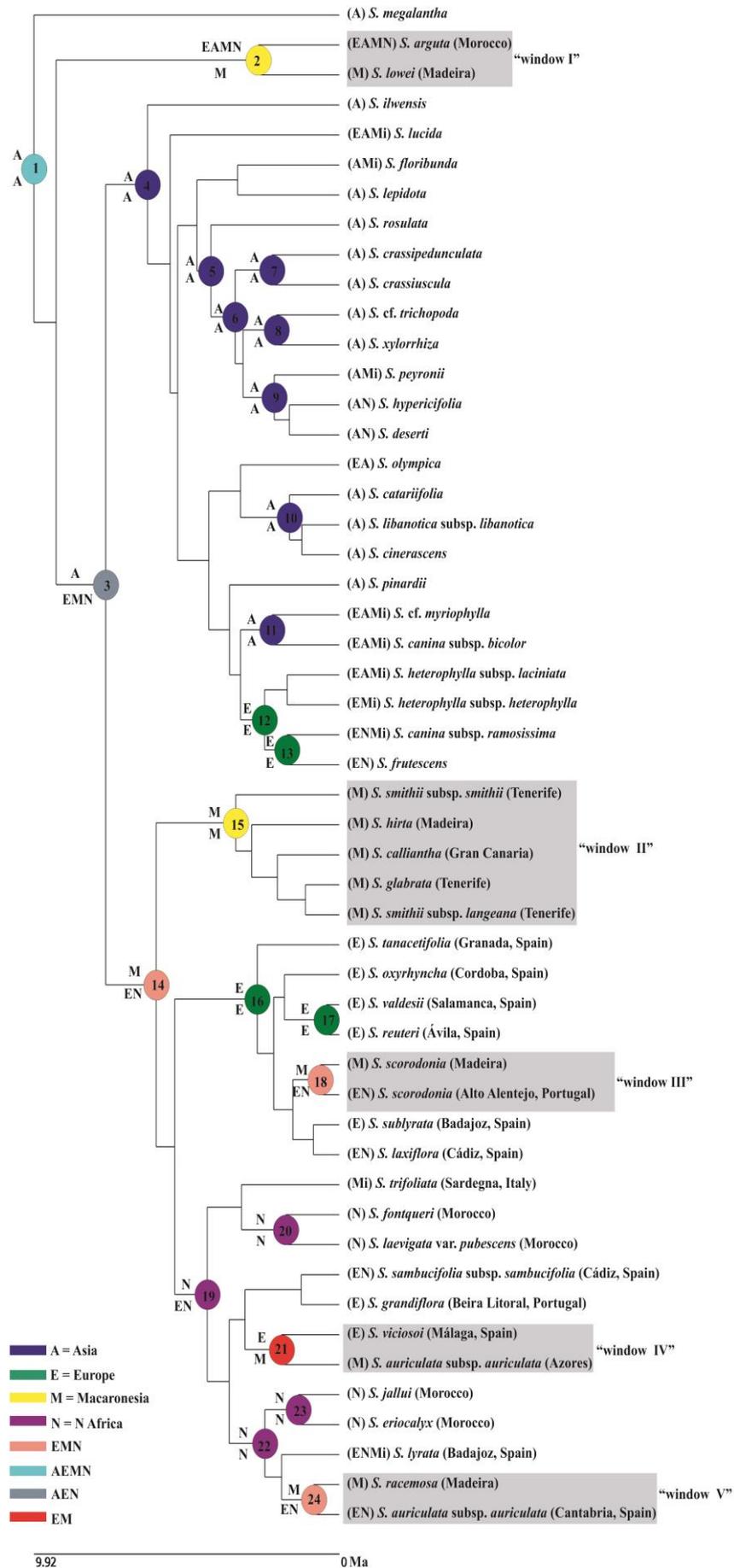


Figure 3. Statistical DIVA and dispersal-extinction-cladogenesis (DEC) analyses using the single MCC tree pruned from the BEAST analysis (Fig. 2). Only nodes with PP above 0.9 are represented with numbers within charts. Biogeographic reconstruction based on statistical dispersal-vicariance analysis as implemented in S-DIVA, with the maximum areas at ancestral nodes set to four and following Nylander & al. (2008). Pie charts at nodes represent most likely state for ancestral areas. Areas above and below branches represents maximum-likelihood range inheritance scenarios by the upper and the lower daughter branches reconstructed with Lagrange. Probabilities percentages of ancestral ranges of S-DIVA and relative probability (fraction of the global likelihood) for the optimal reconstruction of Lagrange analyses are summarized in Table 4. Areas defined: E, Europe; A, Asia; M, Macaronesia; N, N Africa; Mi, Mediterranean islands (see Fig. 1).

←

Scrophularia make estimates of divergence times less accurate, as already discussed by Scheunert & Heubl (2011) in their study about relationships among New World *Scrophularia*. In any case, secondary calibration points and a larger sample size allowed us to test the Colonization Window and Relictual Series hypotheses for Macaronesian lineages. The deeper sampling and higher number of DNA regions analyzed here probably underlie the differences in estimated ages between the present results and those of our previous study (Navarro-Pérez & al., 2013). We are presenting the best estimate of divergence times with available data, but limitations relating to sample size, large confidence intervals of ages, analyses bias and lack of a sister group still have to be taken into account when interpreting our results.

The crown-age of the tree supported diversification of *Scrophularia* around the Miocene (18.4-6.3 Ma, Fig. 2). According to Carine (2005), a correlation between size of disjunction and age of divergence is expected under the RSH, but not under the CWH. Our results indicate that all Macaronesian lineages of *Scrophularia* are closely related to geographically close W Mediterranean lineages, as previously suggested (Navarro-Pérez & al., 2013; Scheunert & Heubl, 2014). These phylogenetic results, together with the wide range of divergence times for Macaronesian-W Mediterranean sister group relationships, support the Colonization Window Hypothesis as the best explanation for the origin of Macaronesian lineages of *Scrophularia*.

MULTIPLE COLONIZATIONS OF MACARONESIA

At least five independent colonization events of *Scrophularia* lineages have occurred from the W Mediterranean mainland to Macaronesian archipelagos (Fig. 3). The divergence time obtained for each window of colonization is much younger than the geological age of the oldest islands (Salvagem Grande and Fuerteventura, 30-20 Ma),

located closer to N Africa (Fernández-Palacios & al., 2011). Window I (clade 2), includes *S. lowei*, endemic to Madeira, and the widely distributed *S. arguta*. Window II (clade 15) is formed by four Canarian endemic taxa (*S. calliantha*, *S. glabrata*, *S. smithii* subsp. *smithii* and subsp. *langeana*) and one species endemic to Madeira (*S. hirta*). Window III is related to the colonization of Madeira by the widely distributed *S. scorodonia* (clade 18). Azorean *S. auriculata* populations, related to the mainland *S. viciosoi*, constitute window IV (clade 21), while the Iberian population of *S. auriculata* was related to the Madeiran endemic *S. racemosa*, which constituted window V (clade 24).

Our phylogenetic results, like those previously obtained by Scheunert & Heubl (2014), are partially in agreement with the biosystematic study of Macaronesian *Scrophularia* taxa by Dalgaard (1979), who classified them in three groups based on morphological traits. The “*S. scorodonia* group” *sensu* Dalgaard included the same five species and subspecies included in our clade 15 plus *S. smithii* subsp. *hierrensis* (endemic to El Hierro Island and not included in our study) and the widely distributed *S. scorodonia*, which is included in a different well supported clade. Therefore, the strong support of clade 15 (including only Macaronesian species) and biogeographical reconstructions sustain a single colonization event by this group (window II), followed by *in situ* speciation processes. These speciation events could be related to geographical and/or topographical barriers, and the unresolved relationships within this lineage might be explained, among other causes, by hybridization. This is supported by the current absence of genetic barriers among the species included in this clade (Dalgaard, 1979). In addition, colonization window II supports a Madeira-Canary Islands biogeographic connection in the Pliocene, as previously inferred for the Madeiran-Canarian *Echium* (García-Maroto & al., 2009) and *Convolvulus* (Carine & al., 2004).

Our results did not include *S. scorodonia* within clade 15. In fact, it is suggested that the mainland-island distribution of *S. scorodonia* represents a different colonization event (window III). This lack of a close relationship is supported by crossing experiments which found strong genetic barriers between *S. scorodonia* and endemic Macaronesian species, while these barriers were absent between populations of *S. scorodonia* from Macaronesia and Europe (Dalgaard, 1979). According to our molecular-clock analysis, this colonization is not older than 1.33 Ma (Pleistocene), and therefore coincided with Quaternary glaciations (see below). *S. scorodonia* is also present on the Azores (Dalgaard, 1979) but no sample from this archipelago has been

included in phylogenetic analyses to date. Unfortunately, we failed to amplify and sequence DNA regions from Azorean *S. scorodonia* samples.

The widely distributed *S. auriculata* and the Madeiran endemic *S. racemosa* constitute the “*S. auriculata* group” sensu Dalgaard (1979). This group was supported by the existence of distinct barriers to gene exchange between these species and the rest of Macaronesian species (Dalgaard, 1979). In agreement with that, our results grouped *S. racemosa* and a mainland *S. auriculata* sample in the supported clade 24, separate from other Macaronesian clades. *S. racemosa* may have originated by peripatric speciation (Losos & Glor, 2003), as a result of colonization and establishment of a small population of *S. auriculata* in Madeira, followed by isolation and disruption of gene flow with the ancestor.

Crosses made between Iberian and Azorean populations of *S. auriculata* by Dalgaard (1979) found reduced pollen fertility in F₁ plants, which indicates the presence of reproductive barriers. Interestingly, the Azorean sample of *S. auriculata* was not closely related with the mainland sample of *S. auriculata* but with *S. viciosoi* (in clade 21), an endemic to SE Iberian Peninsula (Málaga) that may have been originated by hybridization between *S. auriculata* and *S. scorodonia* given its intermediate morphological features (Dalgaard, 1979; Ortega-Olivencia & Devesa, 1993a). This hypothesis was supported when the different DNA regions were independently analyzed. In the plastid tree, *S. scorodonia*, *S. viciosoi* and the Azorean population of *S. auriculata* constituted a well-supported clade separate from the continental population of *S. auriculata*, while in the ITS tree, these relationships were absent and the Azorean population of *S. auriculata* was related to the continental one (data not shown). Alternatively to the hybridization hypothesis, the Azorean population of *S. auriculata* could be a different species, but it is morphologically indistinguishable from the Iberian populations. Complex evolutionary processes may have been involved in the origin of these lineages, but they are beyond the scope of the present study.

Coinciding with our clade 2 (window I), the third group described by Dalgaard (1979) consists of two annuals species, *S. lowei* and *S. arguta*, which display significant crossing barriers with the other Macaronesian species (Dalgaard, 1979). Both species show cleistogamous flowers and $2n = 40$ chromosomes (cf. Dalgaard, 1979). While *S. lowei* is endemic to Madeira, *S. arguta* is widely distributed in several Macaronesian archipelagos (Salvage Islands, Canary Islands and Cape Verde Islands), SE and CW Spain, N Africa, Horn of Africa and Arabian Peninsula (Ortega-Olivencia, 2009). Once

again, peripatric speciation may explain the origin of the Maderian endemic *S. lowei* from a widespread ancestor. The widespread presence of *S. arguta* on three Macaronesian archipelagos may have been facilitated by its self-fertilizing breeding system. Self-fertilization facilitates colonization, as a single individual can establish a new population, as proposed by Baker's law (Baker, 1955; see also Guzmán & Vargas, 2010 for *Cistus*).

Current patterns of island and mainland speciation of *Scrophularia* lineages are in agreement with those of other large plant lineages distributed on both the Mediterranean and Macaronesian hotspots (Barber & al., 2002; Carine & al., 2004; García-Maroto & al., 2009; Mansion & al., 2009; Casimiro-Soriguer & al., 2010; Guzmán & Vargas, 2010; Salvo & al., 2010; Thiv & al., 2010; Migliore & al., 2012). Speciation events generally coincide with the end of constant warm and the onset of changeable harsh drought periods that ushered in the last great change in Mediterranean plant landscapes (Postigo Mijarra & al., 2009). Besides, as Kim & al. (2008) postulated for other Macaronesian groups, trade winds and intense volcanic activity which resulted in an increasing altitudinal gradient created a remarkable array of ecological habitats during the late Miocene and Pleistocene.

LONG-DISTANCE DISPERSAL DESPITE UNSPECIALIZED SYNDROMES

Biogeographic patterns are directly related to dispersal mechanisms of organisms. Because Macaronesia is formed by a set of five archipelagos of volcanic origin which have never been connected to the mainland (Fernández-Palacios & al., 2011), long-distance dispersal is required to explain the origin of Macaronesian plant lineages.

As many other genera of Macaronesia (Vargas, 2007) and other volcanic archipelagos (e.g. Galapagos, Vargas & al., 2012), diaspores of *Scrophularia* species do not display any evidence of a long-distance dispersal (LDD) syndrome, either biotic or abiotic. *Scrophularia* fruits are capsules that remain on the parental plant when they are mature, and its naked seeds are dispersed after dehiscence (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b). There are no studies about dispersal mechanisms, but seeds are presumably expelled from the interior of the capsules by gravity, wind and/or by the action of an animal when perching or brushing the stiff mature inflorescences. Ants may cut and transport entire mature capsules (Ortega-Olivencia & Devesa, 1993b), but this obviously does not involve LDD.

According to our phylogenetic reconstructions, at least five events of LDD colonization from mainland to Macaronesia have occurred. Exact number of LDD colonization events among islands and archipelagos is not possible to know with the present results due to incomplete sampling. In addition, LDD also has to be invoked for the disjunct distribution of clade 19 across the Strait of Gibraltar. The permeability of this sea barrier has been proved in other taxa, e.g. *Cistus* (Guzmán & Vargas, 2009; Fernández-Mazuecos & Vargas, 2010) and *Abies* (Terrab & al., 2007). The low sea level in the W Mediterranean region during Pleistocene glaciations may have favoured migration through emerged islands which provided ‘stepping stones’ (e.g. *Hypochaeris salzmanniana*, Ortiz & al., 2007). Similarly, events of LDD might have enabled colonization of Tyrrhenian islands, where the only continental island endemic of the genus, *S. trifoliata*, is distributed (Valsecchi, 1982).

In conclusion, *Scrophularia* offers a unique example of multiple windows of colonization to Macaronesia despite displaying no specialized diaspores to LDD. Nevertheless, broad adaptation to Macaronesian mesic environments may have favoured recurrent establishment in different archipelagos. This hypothesis has to be invoked to explain the high number of unspecialized plants not only in the flora of the Canary Islands (Vargas, 2007), but also in the floras of Galápagos (Vargas & al., 2012) and Azores (Heleno & Vargas, unpublished).

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation through Projects CGL2008-00123/BOS and CGL2011-24140, both co-financed by ERDF. Funding was also partially obtained from the Economy, Trade, and Innovation Council of Extremadura (CCV004). A FPI fellowship (BES-2009-011957) by the Spanish Ministry of Science and Innovation to the first author is greatly appreciated. The herbaria (COA, E, MA, MJG, MO, SALA, UNEX) gave permission for DNA extraction from some specimens, and M. Kintgen (Denver Bot. Gard.), A. Krämer (Bot. Gärt. Univ. Bonn), J. Terry (Kew, Roy. Bot. Gard.), A. Amini Rad (Iranian Res. Inst. Pl. Protection) and M. Sequeira kindly sent us *Scrophularia* samples. We thanks T. Rodríguez (Univ. of Extremadura) for help in the field, E. Cano for laboratory assistance, and I. Liberal and J.L. Blanco (Bot. Gard. of Madrid) helped with phylogenetic analyses.

REFERENCES

- Attar F.** (2006) Notes on the genus *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae) in Iran. *Iranian Journal of Botany* 12: 136-143.
- Attar F., M. Riahi, F. Daemi & F. Aghabeigi** (2011) Preliminary molecular phylogeny of Eurasian *Scrophularia* (Scrophulariaceae) based on DNA sequence data from *trnS-trnG* and ITS regions. *Plant Biosystems* 145: 857-865.
- Baker H.G.** (1955) Self-compatibility and establishment after "long-distance" dispersal. *Evolution* 9: 347-348.
- Barber J.C., J. Francisco-Ortega, A. Santos-Guerra, K.G. Turner & R.K. Jansen** (2002) Origin of Macaronesian *Sideritis* L. (Lamioideae: Lamiaceae) inferred from nuclear and chloroplast sequence datasets. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 293-306.
- Boulos L.** (2002) *Flora of Egypt (Verbenaceae-Compositae)* 3: 373. Al-Hadara Publishing, Cairo.
- Buerki S., F. Forest, N. Alvarez, J.A. Nylander, N. Arrigo & I. Sanmartín** (2011) An evaluation of new parsimony-based versus parametric inference methods in biogeography: A case study using the globally distributed plant family Sapindaceae. *Journal of Biogeography* 38: 531-550.
- Carine M.A.** (2005) Spatio-temporal relationships of the Macaronesian endemic flora: a relictual series or window of opportunity? *Taxon* 54: 895-903.
- Carine M.A., S.J. Russell, A. Santos-Guerra & J. Francisco-Ortega** (2004) Relationships of the Macaronesian and Mediterranean floras: Molecular evidence for multiple colonizations into Macaronesia and back-colonization of the continent in *Convolvulus* (Convolvulaceae). *American Journal of Botany* 91: 1070-1085.
- Casimiro-Soriguer R., M. Talavera, F. Balao, A. Terrab, J. Herrera & S. Talavera** (2010) Phylogeny and genetic structure of *Erophaca* (Leguminosae), a East-West Mediterranean disjunct genus from the Tertiary. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 441-450.
- Clark J.R., R.H. Ree, M.E. Alfaro, M.G. King, W.L. Wagner & E.H. Roalson** (2008) A comparative study in ancestral range reconstruction methods: Retracing the uncertain histories of insular lineages. *Systematic Biology* 57: 693-707.
- Crisp M.D., S.A. Trewick & L.G. Cook** (2011) Hypothesis testing in biogeography. *Trends in Ecology and Evolution* 26: 66-72.
- Cronk Q.C.B.** (1992) Relict floras of Atlantic islands: patterns assessed. *Botanical Journal of the Linnean Society* 46: 91-103.
- Dalgaard V.** (1979) Biosystematics of the Macaronesian species of *Scrophularia*. *Opera Botanica* 51: 3-64.
- Darriba D., G.L. Taboada, R. Doallo & D. Posada** (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- Deyuan H., Y. Hanbi, J. Cunli, N.H. Holmgren** (1998) *Scrophularia* L. In: Zheng-yi W. & P.H. Raven (Eds.) *Flora of China (Scrophulariaceae through Gesneriaceae)* 18: 12-21. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Drummond, A.J., B. Ashton, S. Buxton, M. Cheung, A. Cooper, J. Heled, M. Kearse, R. Moir, S. Stones-Havas & S. Sturrock** (2010) *Geneious v5.1*. Created by Biomatters. Available from <http://www.geneious.com/>.
- Drummond A.J., S.Y.W. Ho, M.J. Phillips & A. Rambaut** (2006) Relaxed phylogenetics and

- dating with confidence. *PLoS Biology* 4: 699-710.
- Drummond A.J., S.Y.W. Ho, N. Rawlence & A. Rambaut** (2007) *A rough guide to BEAST 1.4*. University of Auckland. Auckland. Website <http://code.google.com/p/blast-mcmc/downloads/list>.
- Drummond A.J., G.K. Nicholls, A.G. Rodrigo & W. Solomon** (2002) Estimating mutation parameters, population history and genealogy simultaneously from temporally spaced sequence data. *Genetics* 161: 1307-1320.
- Drummond A.J. & A. Rambaut** (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- Drummond A.J., M.A. Suchard, D. Xie & A. Rambaut** (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969-1973.
- Emerson B.C.** (2002) Evolution on oceanic islands: molecular phylogenetic approaches to understanding pattern and process. *Molecular Ecology* 11: 951-966.
- Fernández-Mazuecos M. & P. Vargas** (2010) Ecological rather than geographical isolation dominates Quaternary formation of Mediterranean *Cistus* species. *Molecular Ecology* 19: 1381-1395.
- Fernández-Mazuecos M. & P. Vargas** (2011) Historical isolation versus recent long-distance connections between Europe and Africa in bifid toadflaxes (*Linaria* sect. *Versicolores*). *PLoS ONE* 6: e22234.
- Fernández-Palacios J.M., L. de Nascimento, R. Otto, J.D. Delgado, E. García-del-Rey, J.R. Arévalo & R.J. Whittaker** (2011) A reconstruction of Palaeo-Macaronesia, with particular reference to the long-term biogeography of the Atlantic island laurel forests. *Journal of Biogeography* 38: 226-246.
- García-Maroto F., A. Mañas-Fernández, J.A. Garrido-Cárdenas, D.L. Alonso, J.L. Guillerro, B. Guzmán & P. Vargas** (2009) Desaturase sequence evidence for explosive Pliocene radiations within the adaptive radiation of Macaronesian *Echium* (Boraginaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 563-574.
- Gorshkova S.G.** (1955) *Scrophularia*. In: Shishkin B.K. & E.G. Bobrov (Eds.) *Flora of the USSR* 12: 264-349. Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR. Moskva-Leningrad. [Translated into English in 1994, Bishen Singh Mahendra Pal Singh and Koeltz Scientifica Books].
- Grau J.** (1981a) *Scrophularia* L. In: Rechinger K.H. (Ed.) *Flora Iranica* 147: 213-284. Akademische Druck- u. Verlagsanstalt. Graz.
- Grau J.** (1981b) Die Verwandtschaftsbeziehungen der balkanischen Scrophularien. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 102: 307-313.
- Guzmán B. & P. Vargas** (2005) Systematics, character evolution, and biogeography of *Cistus* L. (Cistaceae) based on ITS, *trnL-trnF*, and *matK* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37: 644-660.
- Guzmán B. & P. Vargas** (2009) Long-distance colonization of the Western Mediterranean by *Cistus ladanifer* (Cistaceae) despite the absence of special dispersal mechanisms. *Journal of Biogeography* 36: 954-968.
- Guzmán B. & P. Vargas** (2010) Unexpected synchronous differentiation in Mediterranean and Canarian *Cistus* (Cistaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 12: 163-174.
- Han K., S. So, C. Lee & M. Kim** (2009) Taxonomy of the genus *Scrophularia* (Scrophulariaceae) in Korea. *Korean Journal of Plant Taxonomy* 39: 237-246.
- Harris A.J. & Q.Y. Xiang** (2009) Estimating ancestral distributions of lineages with uncertain sister groups: A statistical approach to dispersal-vicariance analysis and a case using

- Aesculus* L. (Sapindaceae) including fossils. *Journal of Systematics and Evolution* 47: 349-368.
- Ibn Tattou M.** (2007) Scrophulariaceae. In: Fennane M., M. Ibn Tattou, J. Mathez, A. Ouyahya & J. El Oualidi (Eds.) *Flore pratique du Maroc. Manuel de détermination des plantes vasculaires—Angiospermae (Leguminosae-Lentibulariaceae)* 2: 514-520. Institut Scientifique, Université Mohammed V. Rabat.
- Katoh K. & H. Toh** (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Briefings in Bioinformatics* 9: 286-298.
- Kim S.C., M.R. McGowen, P. Lubinsky, J.C. Barber, M.E. Mort & A. Santos-Guerra** (2008) Timing and tempo of early and successive adaptive radiations in Macaronesia. *PLoS ONE* 3: e2139.
- Kodandaramaiah U.** (2010) Use of dispersal-vicariance analysis in biogeography - A critique. *Journal of Biogeography* 37: 3-11.
- Kornhall P. & B. Bremer** (2004) New circumscription of the tribe Limoselleae (Scrophulariaceae) that includes the taxa of the tribe Manuleeae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 146: 453-467.
- Kornhall P.N. Heidari & B. Bremer** (2001) Selagineae and Manuleeae, two tribes or one? Phylogenetic studies in the Scrophulariaceae. *Plant Systematics and Evolution* 228: 199-218.
- Lall S.S. & R.R. Mill** (1978) *Scrophularia* L. In: P.H. Davis (Ed.) *Flora of Turkey* 6: 603-647. Edinburgh University Press. Edinburgh.
- Lee G., E. Doh, M. Lee, B. Ko & S.-E. Oh** (2010) Discrimination of three *Scrophularia* plants utilizing 'Scrophularia Radix' by DNA markers based on internal transcribed spacer (ITS) sequences. *Genes & Genomics* 32: 181-189.
- Losos J.B. & R.E. Glor** (2003) Phylogenetic comparative methods and the geography of speciation. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 220-227.
- Mabberley D.J.** (1997) *The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants*. Cambridge University Press. Cambridge.
- Mansion G., F. Selvi, A. Guggisberg & E. Conti** (2009) Origin of Mediterranean insular endemics in the Boraginales: integrative evidence from molecular dating and ancestral area reconstruction. *Journal of Biogeography* 36: 1282-1296.
- Migliore J., A. Baumel, M. Juin & F. Médail** (2012) From Mediterranean shores to central Saharan mountains: Key phylogeographical insights from the genus *Myrtus*. *Journal of Biogeography* 39: 942-956.
- Navarro-Pérez M.L., J. López, M. Fernández-Mazuecos, T. Rodríguez-Riaño, P. Vargas & A. Ortega-Olivencia** (2013) The role of birds and insects in pollination shifts of *Scrophularia* (Scrophulariaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69: 239-254.
- Nylander J.A.A., U. Olsson, P. Alström & I. Sanmartín** (2008) Accounting for phylogenetic uncertainty in biogeography: A bayesian approach to dispersal-vicariance analysis of the thrushes (Aves: *Turdus*). *Systematic Biology* 57: 257-268.
- Olmstead R.G., C.W. Depamphilis, A.D. Wolfe, N.D. Young, W.J. Elisons & P.A. Reeves** (2001) Disintegration of the Scrophulariaceae. *American Journal of Botany* 88: 348-361.
- Ortega-Olivencia A.** (2009) *Scrophularia* L. In: Benedí C., E. Rico, J. Güemes & A. Herrero (Eds.) *Flora iberica* 13: 97-122. Real Jardín Botánico. C.S.I.C. Madrid.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993a) Revisión del género *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae) en la Península Ibérica e Islas Baleares. *Ruizia* 11: 1-157.

Monografías del Real Jardín Botánico de Madrid, CSIC. Madrid.

- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (1993b) Sexual reproduction in some *Scrophularia* species (Scrophulariaceae) from the Iberian Peninsula and the Balearic Islands. *Plant Systematics and Evolution* 184: 159-174.
- Ortega-Olivencia A. & J.A. Devesa** (2002) *Scrophularia* L. In: Valdés B., M. Rejdali, A. Achal El Kadmiri, J.L. Jury & J.M. Montserrat (Eds.) *Checklist of Vascular Plants of N Morocco with identification keys 2*: 560-565. CSIC. Madrid.
- Ortiz M.Á., K. Tremetsberger, S. Talavera, T. Stuessy & J.L. García-Castaño** (2007) Population structure of *Hypochaeris salzmanniana* DC. (Asteraceae), an endemic species to the Atlantic coast on both sides of the Strait of Gibraltar, in relation to Quaternary sea level changes. *Molecular Ecology* 16: 541-552.
- Oxelman B., P. Kornhall, R.G. Olmstead & B. Bremer** (2005) Further disintegration of Scrophulariaceae. *Taxon* 54: 411-425.
- Postigo Mijarra J.M., E. Barrón, F. Gómez Manzaneque & C. Morla** (2009) Floristic changes in the Iberian Peninsula and Balearic Islands (south-west Europe) during the Cenozoic. *Journal of Biogeography* 36: 2025-2043.
- Pottier-Alapetite G.** (1981) *Flore de la Tunisie. Angiospermes- dicotylédones, Gamopétales 2*: 655-1190. Programme flore et végétation tunisiennes. Tunis.
- Qaiser M.** (1982) *Scrophularia* L. In Jafri S.M.H. & A. El-Gadi (Eds.) *Flora of Libya* 88: 2-9. Faculty of Science, A1 Faateh University. Tripoli.
- Qaiser M., S. Khatoon & Hamidullah** (1988) The genus *Scrophularia* in Pakistan. *Willdenowia* 17: 129-146.
- Quézel P. & S. Santa** (1963) *Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales 2*: 848-849. Editions du Centre National de la Recherche Scientifique. Paris.
- Ree R.H., B.R. Moore, C.O. Webb & M.J. Donoghue** (2005) A likelihood framework for inferring the evolution of geographic range on phylogenetic trees. *Evolution* 59: 2299-2311.
- Ree R.H. & S.A. Smith** (2008) Maximum likelihood inference of geographic range evolution by dispersal, local extinction, and cladogenesis. *Systematic Biology* 57: 4-14.
- Richardson I.B.K** (1972) *Scrophularia* L. In: Tutin T.G., V.H. Heywood, N.A. Burges, D.H. Valentine, S.M. Walter & D.A. Webb (Eds.) *Flora Europaea* 3: 216-221. Cambridge University Press. Cambridge.
- Ronquist F.** (1997) Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. *Systematic Biology* 46: 195-203.
- Ronquist F. & I. Sanmartín** (2011) Phylogenetic methods in biogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 42: 441-464.
- Salvo G., S.Y.W. Ho, G. Rosenbaum, R. Ree & E. Conti** (2010) Tracing the temporal and spatial origins of island endemics in the Mediterranean region: A case study from the citrus family (*Ruta* L., Rutaceae). *Systematic Biology* 59: 705-722.
- Sanmartín I.** (2012) Biogeografía. In: Vargas P. & R. Zardoya (Eds.) *El árbol de la vida: sistemática y evolución de los seres vivos*, pp. 457-474. Reverté. Madrid.
- Scheunert A. & G. Heubl** (2011) Phylogenetic relationships among New World *Scrophularia* L. (Scrophulariaceae): New insights inferred from DNA sequence data. *Plant Systematics and Evolution* 291: 69-89.
- Scheunert A. & G. Heubl** (2014) Diversification of *Scrophularia* (Scrophulariaceae) in the

- Western Mediterranean and Macaronesia - Phylogenetic relationships, reticulate evolution and biogeographic patterns. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 70: 296-313.
- Schwilk D.W. & D.D. Ackerly** (2001) Flammability and serotiny as strategies: correlated evolution in pines. *Oikos* 94: 326-336.
- Shaw J.** (1962) The biosystematics of *Scrophularia* in Western North America. *Aliso* 5: 147-178.
- Shaw J., E.B. Lickey, J.T. Beck, S.B. Farmer, W. Liu, J. Miller, K.C. Siripun, C.T. Winder, E.E. Schilling & R.L. Small** (2005) The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142-166.
- Shaw J., E.B. Lickey, E.E. Schilling & R.L. Small** (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275-288.
- Silvestro D. & I. Michalak** (2012) RaxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity & Evolution*. 12: 335-337.
- Stamatakis A.** (2006) RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
- Stiefelhagen H.** (1910) Systematische und pflanzengeographische Studien zur Kenntnis der Gattung *Scrophularia*. Vorarbeiten zu einer Monographie. *Botanische Jahrbuecher fuer Systematik* 44: 406-496.
- Sun Y., D.Z. Skinner, G.H. Liang & S.H. Hulbert** (1994) Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 26-32.
- Tank D.C., P.M. Beardsley, S.A. Kelchner & R.G. Olmstead** (2006) Review of the systematics of Scrophulariaceae s.l. and their current disposition. *Australian Systematic Botany* 19: 289-307.
- Terrab A., S. Talavera, M. Arista, O. Paun, T.F. Stuessy & K. Tremetsberger** (2007) Genetic diversity at chloroplast microsatellites (cpSSRs) and geographic structure in endangered West Mediterranean firs (*Abies* spp., Pinaceae). *Taxon* 56: 409-416.
- Thiv M., M. Thulin, M. Hjertson, M. Kropf & H.P. Linder** (2010) Evidence for a vicariant origin of Macaronesian-Eritreo/Arabian disjunctions in *Campylanthus* Roth (Plantaginaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 607-616.
- Valsecchi F.** (1982) Le Piante endemiche della Sardegna: 115-117. *Bollettino della Società Sarda di Scienze Naturali* 21: 427-441.
- Vargas P.** (2007) Are Macaronesian islands refugia of relict plant lineages?: a molecular survey. In: Weiss S. & N. Ferrand (Eds.) *Phylogeography of southern European refugia*, pp. 297-314. Springer. Dordrecht.
- Vargas P., R. Heleno, A. Traveset & M. Nogales** (2012) Colonization of the Galápagos Islands by plants with no specific syndromes for long-distance dispersal: a new perspective. *Ecography* 35: 33-43.
- Vargas P., L.M. Valente, J.L. Blanco-Pastor, I. Liberal, B. Guzmán, E. Cano, A. Forrest & M. Fernández-Mazuecos** (2014) Testing the biogeographical congruence of palaeofloras using molecular phylogenetics: snapdragons and the Madrean-Tethyan flora. *Journal of Biogeography*, doi: 10.1111/jbi.12253.
- Whittaker R.J. & J.M. Fernández-Palacios** (2007) Island biogeography: ecology, evolution and conservation, 2nd edition. Oxford University Press. Oxford.

- Wolfe A.D., L.D. Shannon & C.P. Randle** (2002) A phylogenetic and biogeographic analysis of the *Cheloneae* (Scrophulariaceae) based on ITS and *matK* sequence data. *Systematic Botany* 27: 138-148.
- Yamazaki T.** (1993) Scrophulariaceae. *In*: Iwatsuki K., T. Yamazaki, D.E. Boufford & H. Ohba (Eds.) *Flora of Japan, Angiospermae Dicotyledoneae Sympetalae* 3a: 326-331. Kodansha Ltd. Tokyo.
- Yu Y., A.J. Harris & X. He** (2010) S-DIVA (Statistical Dispersal-Vicariance Analysis): A tool for inferring biogeographic histories. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 848-850.
- Yu Y., A.J. Harris & X.J. He** (2011) RASP (reconstruct ancestral state in phylogenies). Website <http://mnh.scu.edu.cn/soft/blog/RASP>.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Material studied.

Taxon	Population ^a	GenBank Accession ^b :			
		ITS	<i>trnL-trnF</i>	<i>psbA-trnH</i>	<i>trnQ-rps16</i>
<i>Scrophularia</i>					
<i>S. alpestris</i> J. Gay ex Benth. in DC.	France. 12: Aveyron, Laccusat, 11.VI.2009, FJV, AOO33/09 (UNEX 35945)	X	X	X	X
<i>S. arguta</i> Sol. in Aiton	Morocco. DA: Safi, cabo Safi, 28.IV.2011, AOO & FJV, 80AOO/11 (UNEX 36084)	KC692526	KC692598	X	X
<i>S. atrata</i> Pennell		HQ130081	-	HQ130111	HQ130051
<i>S. auriculata</i> L. subsp. <i>auriculata</i>	Spain. S: Puente del Arrudo, río Nansa, 2.VII.2007, PV, 76PV07 (MA)	KC692527	KC692599	-	X
<i>S. auriculata</i> L. subsp. <i>auriculata</i>	Portugal. Azores: Ilha de Faial, Jardim Botánico de Faial, 20.VI.2011, MLo & al., (COA 51832)	X	X	X	X
<i>S. buergeriana</i> Miq.		HQ130070	-	HQ130100	HQ130040
<i>S. bourgaeana</i> Lange in Willk. & Lange	Spain. Av: pr. Puerto de Peña Negra, Piedrahita 9.VI.2009, AOO & AB, 27AOO/09 (UNEX 35989)	KC692528	KC692650	X	X
<i>S. californica</i> subsp. <i>floribunda</i> (Greene) R.J. Shaw	USA. CA: Marin Co, Sausalito, 31.III.2001, PV, 73PV01 (MA)	X	X	X	X
<i>S. calliantha</i> Webb & Berthel.	Spain. GC: presa de Hornos, 1.V.2010, MN & al., 49AOO/10 (UNEX 35995)	KC692530	KC692646	X	X
<i>S. canina</i> subsp. <i>bicolor</i> (Sm.) Greuter	Turkey. 20: Denizli: 8 km de Bazagoc, 27.V.2011, AOO & FJV, 89AOO/11 (UNEX 36050)	KC692532	KC692626	X	X
<i>S. canina</i> subsp. <i>ramosissima</i> (Loisel.) P. Fourn.	Italy. SA: Palau, porto Pollo, 14.V.2010, MN & al., 54AOO/10 (UNEX 35911)	KC692533	KC692619	X	X
<i>S. catariifolia</i> Boiss. & Heldr.	Turkey. 58: Sivas, Dogançal, 2.VII.2001, JA & al., 2738 (MA 689885)	KC692534	KC692660	X	X
<i>S. chrysantha</i> Jaub. & Spach	Armenia. AG: monte Aragat, Ghazaravan, 30.VI.2005, M & al., 2552 (MA 742218)	KC692535	KC692666	X	X
<i>S. cinerascens</i> Boiss.	Turkey. 25: Erzurum, 8 km before Porto Gölyurt Geçidi, 29.VI.2001, SN & al., 1068 (MA 689573)	X	X	X	X
<i>S. crassipedunculata</i> Attar & Joharchi	Iran. KV: SE Neyshabour, Dizbad-e-oly, Ghojhar, 20.VIII.2003, J (UNEX 36019)	KC692537	KC692636	X	X
<i>S. crassiuscula</i> Grau	Iran. ES: Semirrom, Vanak, Cheshme-Naz, 12.VI.2004, MRP (MA 748751)	KC692538	KC692668	X	X
<i>S. deserti</i> Delile	Israel. WEB: ctra. nº 1 desde Jerusalem al Mar Muerto, 29.III.2010, TR & ABO, 45AOO/10 (UNEX 36094)	X	X	X	X
<i>S. desertorum</i> (Munz) R.J. Shaw	USA. CA: Modoc Co, Lava Beds National Monument, 15.V.2001, PV, 104PV01 (MA)		KC692643		X
<i>S. desertorum</i> (Munz) R.J. Shaw		HQ130087		HQ130117	
<i>S. duplicatoserrata</i> Makino		HQ130076	-	HQ130106	HQ130046
<i>S. eppersii</i> Urb.		HQ130090	-	HQ130119	HQ130060
<i>S. eriocalyx</i> Emb. & Maire	Morocco. TH: ctra. Bab Berret a Ketama, 30.IV.2011, AOO & FJV, 83AOO/11 (UNEX 36081)	KC692540	KC692600	X	X
<i>S. floribunda</i> Boiss. & Balansa	Turkey. 35: Kemalpaşa, Karabel, 27.V.2011, AOO & FJV, 88AOO/11 (UNEX 36049)	KC692541	KC692623	X	X
<i>S. fontqueri</i> Ortega Oliv. & Devesa	Morocco. TO: Xauen, Djebel Kelaa, Bab Lars, 24.IV.2004, PV, 173bPV04 (MA)	KC692542	KC692605	X	X
<i>S. frutescens</i> L. var. <i>frutescens</i>	Spain. Al: Roquetas de Mar, Punta Entinas-Pta. del Sabinar, 8.IV.2009, AOO, 11AOO/09 (UNEX 35988)	X	X	X	X
<i>S. glabrata</i> Aiton	Spain. TF: Icod de los Vinos. Entrada Cruz del Tronco por Bubango, 21.II.2013, TR & JL, 135AOO/13 (UNEX 36126)	X	X	X	X
<i>S. grandiflora</i> DC.	Portugal. BL: 6,2 km antes de Condeixa desde carretera de Tomar, 19.II.2009, AOO & TR, 01AOO/09 (UNEX 35932)	KC692545	KC692607	X	X
<i>S. grayana</i> Maxim. ex Kom.	Russia. PR: Khasadnoi Island, at SE of Astafyev Inlet, 9.IX.1993, JCS & VB, 19575 (MO 04629221)	KC692546	KC692644		
<i>S. grayana</i> Maxim. ex Kom.				HQ130104	HQ130044
<i>S. herminii</i> Hoffmanns. & Link	Spain. Za: San Martín de Castañeda, 10.VI.2009, AOO & AB, 31AOO/09 (UNEX 35986)	X	X	X	X
<i>S. heterophylla</i> Willd. subsp. <i>heterophylla</i>	Greece. IPI: Central Pindus range, Dracolimni, 28.VI.2007, RG & al., RG861 (MA 761867)	X	X	X	X
<i>S. heterophylla</i> subsp. <i>laciniata</i> (W & K.) Maire & Petitm.	Greece. NAF: Nafplio, 27.V.2011, TR & JL, 108AOO/11 (UNEX 35959)	X	X	X	X
<i>S. hirta</i> Lowe	Portugal. MAD: de San Vicente a Porto Moniz, c. túnel de João Delgado, 31.III.2011, TR & JL, 68AOO/11 (UNEX 36011)	KC692550	KC692647	X	X
<i>S. hypericifolia</i> Wydler	Israel. TAV: Tel-Aviv, Holon, dunas, junto a calle Menahem Begin, 29.III.2010, TR & ABO, 44AOO/11 (UNEX 36093)	KC692551	KC692669	X	X
<i>S. ilvensis</i> K. Koch	Armenia. KT: Tehenis mountain, 22.VI.2005, SC & al., 17740 (MA 742376)	X	X	X	X
<i>S. jallui</i> (Gattef. & Weiller) Ibn Tattou	Morocco. MK: Alto Atlas, Adrar-n-Oukaïmeden, 29.VI.2006, AH & al., AH 3093 (MA 746563)	KC692553	KC692601	X	X
<i>S. kakudensis</i> Franch.		GU175295	-	HQ130105	HQ130045

<i>S. koraiensis</i> Nakai		EU165340	-	HQ130099	HQ130039
<i>S. kurdica</i> subsp. <i>glabra</i> Grau	Iran. QM: Chalil Kuh, Azerbaijan occidentalis, 2.VII.1974, K.H. Rechinger Nr. 48719, cultivada en München Bot. Gat. Nr. Sc-246, VII.1996, FS (SALA 118667)	KC692640		X	X
<i>S. kurdica</i> subsp. <i>glabra</i>		JF409905			
<i>S. laevigata</i> var. <i>pubescens</i> Maire	Morocco. MT: Moyen Atlas, forêt de Bekrit, 4.VII.1996, SCI & al., R-10202 (MA 624994)	X	X	X	X
<i>S. laevis</i> Wooton & Standl.		HQ130077	-	HQ130107	HQ130107
<i>S. lanceolata</i> Pursh	USA. CO: Kintgen Steamboat Garden, 6.VII.2010. Originally collected in CO, Hinman Lake, Routt County, DBG acc. 082472 (UNEX 36017)	KC692555	KC692641	X	X
<i>S. laxiflora</i> Lange	Spain. Ca: El Jautor, pr. Alcalá de los Gazules, 4.IV.2009, AOO, 10AOO/09 (UNEX 35972)	KC692556			
<i>S. laxiflora</i> Lange	Spain. Ca: Puerto del Bujeo, pista hacia el Arroyo de la Miel, 28.II.2003, PV, 21PV03 (MA 711211)		X	X	X
<i>S. lepidota</i> Boiss.	Turkey. 58: Sivas, salida hacia Şarkışla, 31.V.2011, AOO & FJV, 104AOO/11 (UNEX 36064)	KC692557	KC692624	X	X
<i>S. libanotica</i> Boiss. subsp. <i>libanotica</i>	Turkey. 29: Gümüşhane, road Gümüşhane to Bayburt, 26.VI.2001, SN & al. (MA 687764)	KC692558	KC692614	X	X
<i>S. lowei</i> Dalggaard	Portugal. MAD: Caniço Baixo, 2.IV.2011, TR & JL, 69AOO/11 (UNEX 36010)	KC692559	KC692654	X	X
<i>S. lucida</i> L.	Greece. PEL: entre Sofikó y Angelokastro, 27.V.2011, TR & JL, 106AOO/11 (UNEX 35961)	KC692560	KC692621	X	X
<i>S. lunariifolia</i> Boiss. & Balansa ex Boiss.	Georgia. BT: E of Batumi, 21.VI.1999, JFG, 351 (MO 5578042)	KC692561	KC692667	X	X
<i>S. lyrata</i> Willd.	Spain. Ba: hacia Rincón de Caya, 8.VII.2007, AOO, 02AOO/07 (UNEX 35983)	X	X	X	X
<i>S. macrantha</i> Greene ex Stiefelh.	USA. CA: Kintgen Home Garden, 12.VII.2010, DBG Acc. 090231 (UNEX 36016)		KC692653	X	X
<i>S. macrantha</i>		AY880244			
<i>S. cf. marilandica</i> L.	USA. GA: N Carolina, Asheville, Richtung Busick, 5.VII.1986, HF, USA 147 (MJG 43)		KC692677		
<i>S. marilandica</i> L.		HQ130085		HQ130115	HQ130055
<i>S. megalantha</i> Rech. f.	Iran. MN: Mazandarán, Chalandar, 16.V.2010, AR (UNEX 36021)	KC692563	KC692645	X	X
<i>S. micrantha</i> Desv. ex Ham.		HQ130088	-	HQ130118	HQ130058
<i>S. minutiflora</i> Pennell		HQ130091	-	HQ130120	HQ130061
<i>S. montana</i> Wooton		HQ130082	-	HQ130112	HQ130052
<i>S. multiflora</i> Pennell		HQ130078	-	HQ130108	HQ130048
<i>S. musashiensis</i> Bonati		HQ130073	-	HQ130103	HQ130043
<i>S. cf. myriophylla</i> Boiss. & Heldr.	Greece. TC: de Arahova a Polydrosos, 28.V.2011, TR & JL, 111AOO/11 (UNEX 35962)	KC692565	KC692628	X	X
<i>S. ningpoensis</i> Hemsl.	China. XA: Jiang Xi Xiu Shui, 6.VIII.1996, CSY, 2035 (MO 5578042)	KC692566	KC692649	X	X
<i>S. nodosa</i> L.	Norway. 12: Bratland, camping (Bergen), 27.VIII.2010, FJV & al. (UNEX 35941)	KC692567	KC692642		X
<i>S. nodosa</i> L.	Germany. Bad-Sobernheim, Freilicht museum, 5.VIII.2010, FJV (UNEX 35940)			X	
<i>S. olympica</i> Boiss.	Turkey. 53: Rize, 8 km antes do Porto Ovit Dagi Geçidi, 29.VI.2001, SN & al., 949 (MA 689560)	KC692568	KC692617	X	X
<i>S. orientalis</i> L.	Armenia. KT: pr. Tsahkadzor, Tehenis mountain, 22.VI.2005, SC & al., 17688 (MA 743942)	KC692569	KC692661	X	X
<i>S. oxyrhyncha</i> Coincy	Spain. Co: Sta. Eufemia, repetidor de TV, 10.V.2009, AOO, 23AOO/09 (UNEX 35981)	KC692570	KC692608	X	X
<i>S. parviflora</i> Wooton & Standl.		HQ130086	-	HQ130116	HQ130056
<i>S. pauciflora</i> Benth.	Nepal. SO: Sagarmantha, Langmuche valley, 24.IX.2005, MFW & al. (E 246586)	KC692571	KC692676	X	X
<i>S. peyronii</i> Post	Turkey. 63: Sanliurfa, ctra. Sanliurfa-Hilvan, 30.V.2011, AOO & FJV, 97AOO/11 (UNEX 36057)	KC692573	KC692655	X	X
<i>S. pinardii</i> Boiss.	Turkey. 32: ctra. a Isparta desde Dinar, 27.V.2011, AOO & FJV, 91AOO/11 (UNEX 36052)	KC692574	KC692625	X	X
<i>S. racemosa</i> Lowe	Portugal. MAD: Funchal, Santo Antonio. Final da estrada, na margen da ribeira, 30.X.2013, MS, 7589 (UNEX 36125)	X	X	X	X
<i>S. reuteri</i> Daveau	Spain. Av: Navalanguilla, 9.VI.2009, AOO & AB, 25AOO/09 (UNEX 35978)	KC692575	KC692603	X	X
<i>S. rosulata</i> Stiefelh.	Iran. KS: NW Bojnurd, Emam-Darreh, 17.IV.2001, J & Z (UNEX 36020)	KC692577	KC692637	X	X

<i>S. sambucifolia</i> L. subsp. <i>sambucifolia</i>	Spain. Ca: Pruna, km 18 ctra. A363, 24.II.2009, AOO & TR, 06AOO/09 (UNEX 35974)	KC692579	KC692609	X	X
<i>S. scopolii</i> Hoppe ex Pers. var. <i>scopolii</i>	Italy. AB: Abruzzo, L'Aquila, valle Cortina, 29.VI.2002, CA & al., 8252 (MA 699632)	X	KC692672	X	X
<i>S. cf. scopolii</i> var. <i>smyrmaea</i> (Boiss.) Boiss.	Turkey. 35: ctra. a Yamanlar Dag, 27.V.2011, AOO & FJV, 87AOO/11 (UNEX 36048)	KC692581	KC692674	X	X
<i>S. scorodonia</i> L.	Portugal. AAL: Pombalinho, 1.V.2009, JL & TR, 20AOO/09 (UNEX 35930)	KC692582	KC692610	X	X
<i>S. scorodonia</i> L.	Portugal. MAD: ribeira de Santa Cruz. Márgenes de la ribera, 2.IV.2011, TR & JL, 65AOO/11 (UNEX 36014)	X	X	X	X
<i>S. serrata</i> Rydb.		HQ130083	-	HQ130113	HQ130053
<i>S. smithii</i> Hornem. subsp. <i>smithii</i>	Spain. TF: San Cristóbal de la Laguna, mirador de Jardina, 4.V.1997, JLPa & JFO, 7009 (MA 595601)	KC692583	KC692648	X	X
<i>S. smithii</i> Hornem. subsp. <i>langeana</i>		KF447298	-	-	KF447358
<i>S. sublyrata</i> Brot.	Spain. Ba: Alburquerque, finca El Hito, 12.IV.2009, TR, 19AOO/09 (UNEX 35970)	KC692584	KC692611	X	X
<i>S. tanacetifolia</i> Willd.	Spain. Gr: Albuñol, 29.II.2004, CA, 9757 (MA 713864)	KC692585	KC692612	X	X
<i>S. cf. trichopoda</i> Boiss. & Balansa	Turkey. 33: 10 km de Uzuncaburc, road Silifke-Kirobasi, 29.V.2011, AOO & FJV, 96AOO/11 (UNEX 36056)	KC692587	KC692635	X	X
<i>S. trifoliata</i> L.	Italy. SA: Nuoro, Desulo, ctra. a Foni, 16.V.2010, MN & al., 57AOO/10 (UNEX 35914)	KC692588	KC692615	X	X
<i>S. umbrosa</i> Dumort. subsp. <i>umbrosa</i>	Italy. SA: Nuoro, road Desulo-Foni, 16.V.2010, MN, AOO & FJV, 52AOO/10 (UNEX 35909)	X	X	X	X
<i>S. valdesii</i> Ortega Oliv. & Devesa	Spain. Sa: Arribes del Duero, Presa de Aldeadávila, 10.VI.2009, AOO & AB, 29AOO/09 (UNEX 35968)	KC692590	KC692604	X	X
<i>S. viciosoi</i> Ortega Oliv. & Devesa	Spain. Ma: Alfarnate, cerro del Sto. Cristo, 12.IV.2009, AOO, 12AOO/09 (UNEX 35967)	KC692592	KC692613	X	X
<i>S. xylorrhiza</i> Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	Turkey. 63: de Hilvan a Sanliurfa, 30.V.2011, AOO & FJV, 99AOO/11 (UNEX 36059)	KC692594	KC692632	X	X
<i>S. yoshimurae</i> T. Yamaz.		HQ130072	-	HQ130102	HQ130042
Outgroup					
<i>Antherothamnus pearsonii</i> N.E. Br.		AJ550575	AJ608617	-	-
<i>Manulea glandulosa</i> E. Phillips		AJ550599	AJ296520	-	-
<i>Selago myrtifolia</i> Rchb.		AJ584805	AJ586086	-	-
<i>Teedia lucida</i> Rudolphi		AF375148	AF380870	-	-
<i>Verbascum virgatum</i> Stokes	Spain. Ba: Badajoz, pr. Avda. Salvador Allende, 12.VII.2010, JL, 64AOO/10 (UNEX 36067)	KC692522	KC692595	X	X
<i>Verbascum nigrum</i> L.		HQ130064	AF118804	HQ130094	HQ130034

^a It is indicated origin country, province abbreviations ●, locality (w.l. = without locality), collection date (w.d. = without date), collector ■, collection number (when known), herbarium number, between parenthesis, when available.

● Abbreviations of provinces, states, regions, governorates, and so on have been consulted in <http://www.statoids.com> (last access: 27/08/2014).

■ AB = A. Bejarano; ABO = A. Botello; AH = A. Herrero; AOO = A. Ortega-Olivencia; AR = A. Rad; CA = C. Aedo; CSY = C.S. Ye; FJV = F.J. Valtueña; FS = F. Schuhwerk; HF = H. Frankenhäuser; J = Joharchi; JA = J. Aldasoro; JCS = J.C. Solomon; JFG = J.F. Gaskin; JFO = J. Francisco-Ortega; JL = J. López; JLPa = J.L. Panero; M = Medina; MFW = M.F. Watson; MLo = M. López; MN = M. Navarro; MRP = M.R. Parishani; MS = Miguel Sequeira; PV = P. Vargas; RG = R. Gonzalo; SC = S. Castroviejo; SCI = S. Cirujano; SN = S. Nisa; TR = T. Rodríguez-Riaño; VB = V. Barkalov; Z = Zangouei.

^b References of outgroup and *Scrophularia* taxa obtained from GenBank

Attar & al. (2011) Plant Biosyst. 145: 1–9; Han & al. (2009) Korean J. Plant Taxon. 39: 237–246; Kornhall & Bremer (2004) Bot. J. Linn. Soc. 146: 453–467; Kornhall & al. (2001) Plant Syst. Evol. 228: 199–218; Lee & al. (2010) Genes Genomics 32: 181–189; Oxelman & al. (2005) Taxon 54: 411–425; Scheunert & Heubl (2011) Plant Syst. Evol. 291: 69–89; Scheunert & Heubl (2014) Mol. Phylogenet. Evol. 70: 296–313; Wolfe & al. (2002) Syst. Bot. 27: 138–148.

A dash in the GenBank Accession columns indicate no accession.

X = To submit.

Conclusiones

1. Se ha demostrado la existencia de un sistema de polinización mixto entre aves e insectos en cuatro especies de flores grandes y vistosas del género *Scrophularia*, tres endémicas de la región mediterránea (*S. sambucifolia*, *S. grandiflora* y *S. trifoliata*) y una de las Islas Canarias (*S. calliantha*). En las tres primeras los principales polinizadores son himenópteros mientras que en la cuarta lo son aves paseriformes.
2. Los grupos funcionales de insectos más importantes en el sistema de polinización mixto fueron: abejas y avispa en *S. sambucifolia*, abejorros y avispa en *S. grandiflora*, avispa en *S. trifoliata* y una abejilla en *S. calliantha*. Las aves más importantes de las especies mediterráneas fueron currucas (*Sylvia melanocephala* y *S. atricapilla*), mientras que el mosquitero canario *Phylloscopus canariensis* lo fue en la especie macaronésica. A este último hay que añadir la interacción de individuos juveniles del lagarto canario (*Gallotia stehlini*) en el sistema de polinización mixto.
3. El gran tamaño y la robusta consistencia de las flores, junto con los vistosos colores, los cortos pedicelos florales y la alta producción de néctar son posiblemente los caracteres más importantes en el carácter ornitófilo de las cuatro especies citadas.
4. Mientras las currucas siempre acceden a las flores posándose en perchas, como las cimas o entrenudos de la inflorescencia o en tallos de plantas vecinas, los mosquiteros lo hacen mediante revoloteo, recordando algo al comportamiento de los colibríes.
5. La dicogamia intrafloral de tipo proterógino ha resultado ser altamente eficaz tanto en *S. sambucifolia* y *S. grandiflora*, como en la isleña *S. trifoliata*, reduciendo altamente la autogamia en sentido estricto al mínimo y evidenciando la necesidad del concurso de los polinizadores para que la reproducción sexual tenga éxito.
6. Junto a la proteroginia, la reducción de la autopolinización se ve favorecida por la existencia de hercogamia en *S. sambucifolia* y en *S. trifoliata* y, en menor medida, en *S. grandiflora*, al alcanzar el estilo mayor longitud que los estambres.
7. Las tres especies citadas son autocompatibles, con los mayores niveles en *S. trifoliata* y los menores en *S. sambucifolia*. Precisamente la autocompatibilidad junto al hecho de presentar numerosas flores abiertas al mismo tiempo por inflorescencia y en ambas fases sexuales propician la geitonogamia en dichas especies.
8. Tanto en *S. sambucifolia* como en *S. grandiflora*, se calcula que el potencial de geitonogamia discurre a lo largo de todo el período de floración, aunque disminuye con

la edad de la inflorescencia. Además, el nivel de geitonogamia no se relaciona con el tamaño de la misma, es decir, el porcentaje de visitas por los polinizadores no es mayor en las inflorescencias grandes frente a las pequeñas, como cabía esperar.

9. La producción de semillas por fruto en las citadas especies no varía entre las cimas de la inflorescencia, probablemente debido a la arquitectura de la misma que muestra un patrón de floración acrópeto.

10. Las dos grandes máculas presentes en el interior de la corola de *S. trifoliata* no parecen estar diseñadas para atraer a los insectos.

11. Tanto en las especies de *Scrophularia* de flores grandes y llamativas como en las de flores de menor tamaño y menos vistosas en coloración, el néctar es alto en sacarosa, excepto en la especie canaria *S. calliantha* donde está balanceado.

12. En las especies de flores grandes existe sesgo sexual en la composición de azúcares, con el porcentaje de sacarosa siendo mayor en las flores en fase femenina.

13. En las muestras de néctar floral estudiadas no existen levaduras ni en los botones florales ni en las flores no visitadas por animales, confirmando que su presencia en el mismo se debe a una contaminación de origen externo a la planta.

14. El análisis microbiano del néctar revela un bajo nivel de ocurrencia de levaduras, al tiempo que una escasa diversidad de las mismas.

15. Las levaduras más abundantes en el néctar pertenecen al género *Metschnikowia* y sus mayores densidades se han encontrado en flores de *S. grandiflora* embolsadas entre 6 y 24 horas desde la visita del insecto y en aquellas que se hallan en estado masculino, es decir, más envejecidas y, por tanto, con un mayor periodo de multiplicación celular y de exposición del néctar floral.

16. Aparte de Apidae y Bombinae, se pone de manifiesto la importancia de ciertas especies de Vespidae como vectores de transmisión de las levaduras al néctar floral.

17. De acuerdo con los análisis filogenéticos, los taxones de *Scrophularia* se agrupan dentro de un clado monofilético, con la sect. *Caninae* formando un grupo monofilético dentro de la sección *Scrophularia*.

18. Los análisis filogenéticos indican que la ornitofilia ha aparecido al menos tres veces en la evolución del género.

19. De los cuatro sistemas de polinización definidos en *Scrophularia* (por sírfidos, avispa, mixto vertebrado-insectos y aves) en función de las características florales y de los tipos de polinización conocidos experimentalmente, el sistema de tipo avispa sería el ancestral, a partir del cual habrían derivado los demás.

20. El sistema de polinización mixto se considera exitoso ya que fue adquirido independientemente cuatro veces en diferentes islas y continentes.

21. Mientras que la divergencia del género está datada en el Mioceno tardío, el fenómeno de la polinización por aves es en todos los casos reciente, ya que surge en el género en el Plioceno-Pleistoceno.

22. A pesar de que las especies de *Scrophularia* carecen de síndromes de dispersión a larga distancia, al menos hubo cinco eventos de colonización independientes desde el continente hasta los archipiélagos de Macaronesia, seguidos por eventos de especiación dentro de las islas.

23. Los linajes macaronésicos de *Scrophularia* divergieron a partir del Plioceno y son el resultado de diferentes ventanas espacio-temporales discretas de colonización desde el W del Mediterráneo, apoyando así la hipótesis de la ventana de colonización de Carine (2005).

Conclusions

1. The existence of a mixed pollination system between birds and insects has been demonstrated in four species of large and showy flowers in the genus *Scrophularia*, three endemic to the Mediterranean region (*S. sambucifolia*, *S. grandiflora* and *S. trifoliata*) and one to the Canary Islands (*S. calliantha*). In the first three species Hymenoptera are the main pollinators while in the fourth are passerine birds.

2. The most important insect-functional groups in the mixed pollination system were: honey-bees and wasps in *S. sambucifolia*; bumblebees and wasps in *S. grandiflora*; wasps in *S. trifoliata*; and a small bee in *S. calliantha*. The most important birds in the Mediterranean species were warblers (*Sylvia melanocephala* and *S. atricapilla*), while the Canarian chiffchaff *Phylloscopus canariensis* it was in the Macaronesian species. The mixed pollination system of the last one also includes the interaction with juveniles of the Canarian lizard *Gallotia stehlini*.

3. The large sizes and robustness of the flowers, combined with their showy colours, short flower pedicels and high production nectar are possibly the most important characters related with ornithophilous features of the four species aforementioned.

4. While warblers always foraged by perching, supporting themselves on the cymes or internodes of the inflorescence or on nearby branches of other plants, chiffchaffs did it by hovering resembling the behavior of hummingbirds.

5. The protogynous intrafloral dichogamy has proved to be highly effective in both *S. sambucifolia* and *S. grandiflora*, and in the island species *S. trifoliata*, greatly reducing autogamy to a minimum and demonstrating the need of the participation of pollinators for a successful sexual reproduction.

6. Together with proterogyny, the reduction of self-pollination is favored by the existence of herkogamy in *S. sambucifolia* and *S. trifoliata* and, to a lesser extent, in *S. grandiflora*, because the style reaches a greater length than stamens.

7. The three aforementioned species are self-compatible, with the highest levels in *S. trifoliata* and the lowest in *S. sambucifolia*. Precisely self-compatibility together with the great number of opened flowers at the same time and in both sexual phases within the same inflorescence favor geitonogamy in these species.

8. In both *S. sambucifolia* and *S. grandiflora*, it is estimated that potential of geitonogamy runs throughout all flowering period, but decreases with the age of the inflorescence. Furthermore, the level of geitonogamy is not related to the inflorescence size, that is, the percentage of visits by pollinators is not greater in large than small inflorescences, as it would be expected.

9. Seed production per fruit in those species does not vary among the cymes of the inflorescence, probably due to the architecture of the inflorescence showing an acropetal pattern of flowering.

10. The two great spots present inside of the corolla of *S. trifoliata* do not appear to be designed to attract insects.

11. In both *Scrophularia* species groups, those with large and showy flowers and those with smaller and lesser showy flowers, the nectar is high in sucrose, except in the Canary species *S. calliantha* in which it is balanced.

12. In the largest-flowered species there is gender bias in the composition of sugars, with higher sucrose percentage in the female phase flowers.

13. In floral nectar samples studied yeasts do not exist in flower buds or flowers not visited by animals, confirming that their presence in nectar is due to contamination from external sources to the plant.

14. Microbial analyses of nectar reveal a low level of yeast occurrence and a scarce diversity of them.

15. The most abundant yeasts in floral nectar belong to the genus *Metschnikowia* and its higher densities have been found in flowers of *S. grandiflora* bagged between 6 and 24 hours after the visit of insects, and in the male phase flowers, i.e., older ones and, therefore, with a longer period for cell multiplication and floral nectar exposure.

16. Apart from Apidae and Bombinae, it is evidenced the importance of certain species of Vespidae as transmission vectors of yeasts to floral nectar.

17. According to phylogenetic analyses, *Scrophularia* taxa are grouped within a monophyletic clade with sect. *Caninae* forming a monophyletic group nested within the section *Scrophularia*.

18. Phylogenetic analyses indicate that ornithophily has appeared at least three times in the evolution of the genus.

19. Of the four pollination systems defined for *Scrophularia* (hoverflies, wasps, mixed vertebrate-insects and birds) according to floral characters and pollination types experimentally known, wasp system would be the ancestral type from which others have been derived.

20. The mixed pollination system is considered successful since it was independently acquired four times on different islands and continents.

21. While the divergence of the genus is dated to the late Miocene, the phenomenon of pollination by birds is recent in all cases since it arises in the Pliocene-Pleistocene.

22. Although the species of *Scrophularia* do not have long-distance dispersal syndromes, there were at least five independent colonization events from the mainland to the Macaronesia archipelagos, followed by speciation events within the islands.

23. The Macaronesian lineages of *Scrophularia* diverged from Pliocene and are the result of different spatio-temporal discrete windows of colonization from the W Mediterranean region, thus supporting the Colonization Windows Hypothesis according to Carine (2005).