

Nectarios septales, superficies nectaríferas, coléteres, y aspectos relacionados con la polinización en *Canna lineata* Ciciarelli (Cannaceae-Zingiberales)

María de las Mercedes Ciciarelli¹

Resumen: Ciciarelli, M. M. 2014. Nectarios septales, superficies nectaríferas, coléteres, y aspectos relacionados con la polinización en *Canna lineata* Ciciarelli (Cannaceae-Zingiberales). *Bot. Complut.* 38: 125-137.

Como parte de un estudio sobre la estructura y anatomía de las flores en *C. lineata*, se describen por primera vez las superficies nectaríferas, las guías de néctar de las piezas del androceo y los nectarios septales y coléteres del ovario. Hileras de papilas capitadas forman las guías de néctar del labelo mientras que papilas convexas y aplanadas las de los estaminodios y estambre petaloide. Se comprueba la presencia de prenéctar en las papilas de dichas piezas en donde la secreción de néctar se inicia en el floema de haces anficribales y en el parénquima asociado, para luego ser secretado por los poros cuticulares de la epidermis. En los nectarios septales, 1-3 capas de parénquima secretor y numerosos tricomas cilíndricos afinados en el ápice secretan néctar hacia los canales. El fluido se almacena en la cámara de néctar situada en el tubo floral, por encima del ovario. El análisis de la composición química del néctar permite confirmar la ornitofilia en *C. indica* y la entomofilia en *C. lineata*. Se discuten aspectos de la polinización y se propone que otras especies del género con flores nectaríferas de labels anchos y reflejos, que atraen tanto a insectos como a aves, podrían encuadrarse en un síndrome floral mixto. Se describen por primera vez la anatomía de los coléteres del tipo claviforme presentes en la pared externa del ovario y se propone que funcionarían como estructuras protectoras de los óvulos y posteriormente de las semillas en desarrollo. Los estudios se efectuaron en flores frescas con microscopio de luz y MEB.

Palabras clave: *Canna lineata*, nectarios septales, superficies nectaríferas, coléteres, néctar, polinización, entomofilia, ornitofilia.

Abstract: Ciciarelli, M. M. 2014. Septal nectaries, nectariferous surfaces, colleters and aspects related to pollination in *Canna lineata* Ciciarelli (Cannaceae-Zingiberales). *Bot. Complut.* 38: 125-137.

This manuscript encompasses part of a study carried out on the structure and anatomy of flowers in *C. lineata*. Glandular nectariferous epidermal surfaces, nectar guides of androecium pieces, septal nectaries and colleters of the ovary have been described for the first time. Rows of capitate papillae form nectar guides of labellum whereas convexed and flattened papillae constitute staminodes and petaloid stamen. Prenectar has been tested in papillae of all androecium pieces where nectar secretion starts in phloem of amphicribal vascular bundles and associate parenchyma to be secreted through cuticular pores of epidermis. In septal nectaries, 1-3 layers of parenchyma and numerous cylindrical trichomes narrowed in the apex secrete nectar towards the channels. The fluid is stored in the nectar chamber of the floral tube upon the ovary. Analysis of the chemical composition of nectar allowed us to confirm ornitophily in *C. indica* and entomophily in *C. lineata*. Pollination traits are discussed and it is proposed that other species of *Canna* with nectariferous flowers of wide and flattened labellum which attract both insects and birds, would conform a mixed floral syndrome. External wall of the ovary is composed by many colleters of the claviform type, it is proposed that they would function as protective structures of ovules and subsequently of the developing seeds. Studies have been carried out with fresh flowers under light microscope and SEM.

Key words: *Canna lineata*, septal nectaries, nectariferous surfaces, colleters, nectar, pollination, entomophily, ornitophily.

INTRODUCCIÓN

Los estudios sistemáticos del género *Canna* se han basado principalmente en la morfología floral (Kranzlin 1912, Winkler 1930). La estructura y organogénesis de las piezas florales ha llamado la atención de los autores (Rao 1963, Pai 1965, Kirchof 1983a, b; 1985), principalmente

porque las flores de *Canna* muestran modificaciones marcadas con respecto al patrón floral básico de las monocotiledóneas y de otros clados relacionados como las Bromeliales y las Commelinales (Judd *et al.* 2008).

Las flores de *Canna* poseen un perianto definido con 2 verticilos conspicuos con 3 sépalos y 3 pétalos radialmente simétricos; pero el mayor atractivo de las flores es-

¹ Laboratorio de Estudios de Anatomía Vegetal Evolutiva y Sistemática (LEAVES), Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata, 64 entre 120 y diagonal 113, B1904 DZB, Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina. mercedes.ciciarelli@yahoo.com.ar
Recibido: 15 febrero 2013. Aceptado: 13 septiembre 2013.

tá dado por el androceo petaloide muy colorido y el gineceo. El androceo comprende dos ciclos el interno formado por el estambre fértil petaloide con media antera reducida a una teca de posición lateral y el labelo, de posición ventral en la flor. El ciclo externo está formado por 2 o 3 estaminodios (Kunze 1984, Dalghren *et al.* 1985, Yeo 1993, Judd *et al.* 2008). El androceo es asimétrico en su desarrollo debido a la reducción en el número de piezas, en lugar de presentar 6 piezas, consiste de 2, 4 o 5 miembros petaloides, de ancho y dirección variables, según las especies. (Ciciarelli 1989, 1995, 2007, 2008, 2010, 2014a). El estilo es aplanado, carnoso, y también petaloide con un estigma marginal y un área estigmática apical (Schumann 1888, Kranzlin 1912). Glinos & Coccucci (2011) han estudiado la anatomía del estilo petaloide y denominaron a las 2 regiones estigmáticas del estilo como apical y lateral. Estos autores han indicado que sólo los tubos polínicos depositados sobre el área estigmática apical se desarrollan y llegan hasta el canal estilar, asimismo, efectuaron aportes al conocimiento de la biología floral y la polinización en *C. indica* L.

La producción de néctar en Monocotiledóneas de ovario ínfero ha sido atribuida hasta ahora a la actividad de los nectarios septales (NS) del ovario (Brown 1938, Esau 1965, Fahn 1979a, b; 1988). Para la familia *Musaceae*, Fahn (1988) describe los nectarios septales de *Musa* como tricomas pluricelulares que tapizan largos canales irregulares que surcan el ovario.

No se han encontrado estudios sobre la anatomía de los nectarios y su actividad secretora en el género *Canna* y tampoco se han analizado muestras de azúcares en el néctar. En el presente trabajo se abordan éstos aspectos con el objetivo de dilucidar los mecanismos de polinización y lograr una mejor caracterización del síndrome floral en *C. lineata* y *C. indica*.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo se efectuó con material fresco y se conserva material herborizado de referencia en el Herbario de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata (LP). Se efectuaron visitas de campo estacionales durante cinco años, para la observación y recolección de ejemplares. Parte de las plantas recolectadas se cultivaron a partir de rizomas en un predio experimental para constatar la repetida producción de frutos y semillas. Para registrar los tipos, agentes y periodos de polinización se efectuaron estancias de observación en los sitios de colonias silvestres localizadas y en etapa de floración. Los estudios morfológicos se realizaron con microscopio óptico y electrónico de barrido (MEB). Para estudios con microscopio óptico

co la epidermis de partes florales se aclararon con hipoclorito de sodio concentrado 1:2 y se colorearon con safranina-fast green. Las pruebas con azul de toluidina 1% acuoso en metacromasia, rojo de rutenio, sudán III en etanol 50% y solución de lugol se efectuaron en material no aclarado. Para estudios con MEB, trozos de estaminodios, labelos y estambres frescos, sin tratar, de 3 × 3 mm, se montaron sobre cinta adhesiva de doble faz y se cubrieron con oro paladio. Para estudio de piezas florales, especialmente androceo y nectarios septales el procesamiento se efectuó bajo vacío. Para observar las papilas secretoras del androceo, tricomas nectaríferos y coléteres, las muestras se fijaron en punto crítico y se procesaron en el Laboratorio de Investigaciones de Metalurgia Física de la Facultad de Ingeniería (UNLP) y se observaron y fotografiaron con MEB en el Centro de Investigación y desarrollo en Ciencias Aplicadas (CIN-DECA-UNLP). Las muestras de néctar de ambas especies se tomaron en pleno período de floración en horas del mediodía. La extracción del fluido se efectuó con extrema precaución para poder obtener el néctar desde la cámara, en el tubo floral utilizando una microjeringa Hamilton. La composición química del néctar se estudió por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) realizándose las determinaciones en el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecología de alimentos (CIDCA-UNLP-CONICET).

Se empleó HPLC para la identificación y cuantificación de azúcares en muestras de néctar, aplicando una elución isocrática con detección por índice de refracción. El análisis se realizó en una columna hypersil gold amino (dim. 250 × 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm, Thermo Scientific, USA), usando una mezcla de acetonitrilo y agua de grado HPLC (80:20) como fase móvil, con un caudal de 1,2 ml/min y un volumen de inyección de 0,020 ml. La temperatura se mantuvo constante en 40°C. Se realizó una calibración en base al área del pico cromatográfico de soluciones estándar de sacarosa, glucosa y fructosa. La muestra de néctar se diluyó 1/50 con agua grado HPLC, siendo filtrada con una membrana de 0,45 µm colocada en una jeringa, antes de la inyección.

RESULTADOS

Labelo. En las especies de *Canna* el labelo petaloide tiene contorno oblanceolado. La venación es flabelada (Ellys 1999), varias venas basales de igual calibre divergen radialmente con ángulos pequeños y se ramifican hacia el ápice. La base del labelo cubre y protege el tubo floral formado por las porciones adnatas del estambre y el estilo y está reforzada por la proximidad de las venas. Estas venas vistas en transcorte tienen una estructura anfricribal y presentan un notable desarrollo de los elementos xilemáticos, tanto en número como en diámetro. En la zona del tercio apical el labelo es reflejo y tiene su mayor ancho (1,4 cm). Allí las venas se encuentran más separadas que en la base, del mismo modo que hacia los márgenes

nes, donde disminuyen su tamaño. Las venas de menor calibre, presentan en transcorte 1-2 elementos de protoxilema anillados rodeados por células de floema. El mayor desarrollo del xilema junto a la mayor proximidad de las venas en la zona basal del labelo otorga la rigidez y sostén necesarios para actuar como «pista de aterrizaje» y dar sustentación a los insectos polinizadores. La disposición y el color del labelo varía en las especies, al igual que la longitud del tubo foral y de las flores (Ciciarelli *et al.* 2008). En *C. lineata* el labelo es reflejo, oblanceolado, discolor, anaranjado con líneas coloradas a rojizas sobre base amarillenta en la cara adaxial y en *C. indica* es oblanceolado, reflejo a circinado, concolor colorado, en la cara adaxial, y colorado en el ápice y la parte media, pero amarillo moteado de rojo en la base de la cara abaxial, rasgo visible sólo si se abren las piezas florales. Las flores de ésta especie son estrechas y tubulosas, porque la longitud del tubo floral es mayor en relación a la longitud total de la flor por el contrario en *C. lineata* la menor longitud del tubo floral en relación a la longitud total, hace que las flores no sean estrechas o tubulosas sino con piezas más abiertas y separadas. En *C. indica* las flores tienen una longitud total de 7-8 cm y el tubo floral mide de 4-4,5 cm, altura en donde el labelo se separa del tubo y se vuelve reflejo a circinado. En *C. lineata* las flores alcanzan una longitud de 10 cm pero la menor longitud del tubo floral (3,5 cm) hace que el labelo se extienda a una distancia menor desde la base para luego volverse reflejo (Fig. 1A, B). Salvo *C. paniculata* Ruiz et Pav. que presenta labelos y piezas florales erguidas, en las restantes especies los labelos son reflejos o circinados. La proyección del labelo y su posterior curvatura, depende entonces de la relación entre la longitud del tubo floral y la longitud total de la flor. Así las flores con tubos más cortos presentan labelos reflejos a menores distancias desde la base lo que les permite actuar como «pistas de aterrizaje» para los polinizadores, como ocurre en *C. lineata*.

Anatomía del labelo. Vistas con MO, las secciones transversales de labelos provenientes de flores frescas sin colorear, presentan una epidermis adaxial uniformemente glandular, formada por células activas con aspecto de papilas muy regulares, con paredes externas delgadas y curvas. No se observaron estomas o hidatodos. En ellas la pared apical es convexa y de espesor no uniforme debido a la presencia de invaginaciones parietales tal como las que existen en células de transferencia. El citoplasma es granular, denso y discolor por la presencia de pigmentos carotenoides de color amarillo brillante en cromoplastos del ápice y pigmentos antocianícos de color rosado a rojizos, del grupo de los flavonoides hidrosolubles, por de-

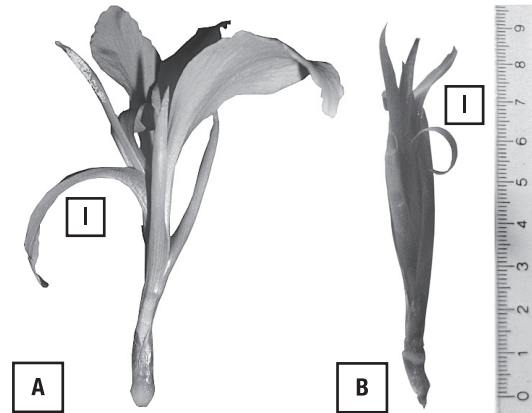


Fig. 1– Flores en especies de *Canna*. **A:** flores con tubo floral corto, estaminodios y labelo reflejos y lineados en *Canna lineata*. **B:** flores tubulosas, piezas erguidas y tubo floral largo en *Canna indica*. **I:** labelo.

bajo, ocupando gran parte del volumen celular (Fig. 2A). En vista superficial las papilas epidérmicas presentan abundantes granos de almidón y polifosfatos (test del lugol y azul de toluidina) en el citoplasma (Fig. 2B). En los cromoplastos los pigmentos carotenoides de color amarillo-anaranjado dan respuesta positiva a la prueba con sudán III. La hipodermis adaxial está compuesta por una capa de células subrectangulares que no dejan espacios intercelulares. La capa celular ubicada por debajo de la hipodermis corresponde al mesófilo y consta de células parenquimáticas alargadas que rodean los elementos del floema, estas células se disponen en forma radiada en dirección a la epidermis. Los haces vasculares son anficribales con escasos elementos de protoxilema rodeados por células floemáticas. El mesófilo abaxial es predominantemente homogéneo constituido por células parenquimáticas isodiamétricas, que dejan espacios intercelulares conformando un tejido más laxo. La hipodermis abaxial consiste también de un estrato de células subrectangulares dispuestas en forma compacta. La epidermis abaxial al igual que la adaxial consiste de una capa de papilas y tampoco se observan estomas o hidatodos (Fig. 2C).

Nectarios. En *C. lineata* se hallaron 2 tipos: los nectarios septales del ovario y las superficies glandulares nectaríferas de la epidermis adaxial de las piezas del androceo, por lo tanto se presentan 2 fuentes productoras de néctar en la flor: la primera procedente del ovario y la segunda del androceo. Si bien se describen en *C. lineata*, todas las especies silvestres estudiadas hasta el momento (Ciciarelli 1989, 1995, 2007; Ciciarelli *et al.* 2008, 2010a, b) presentan ambos tipos de nectarios.

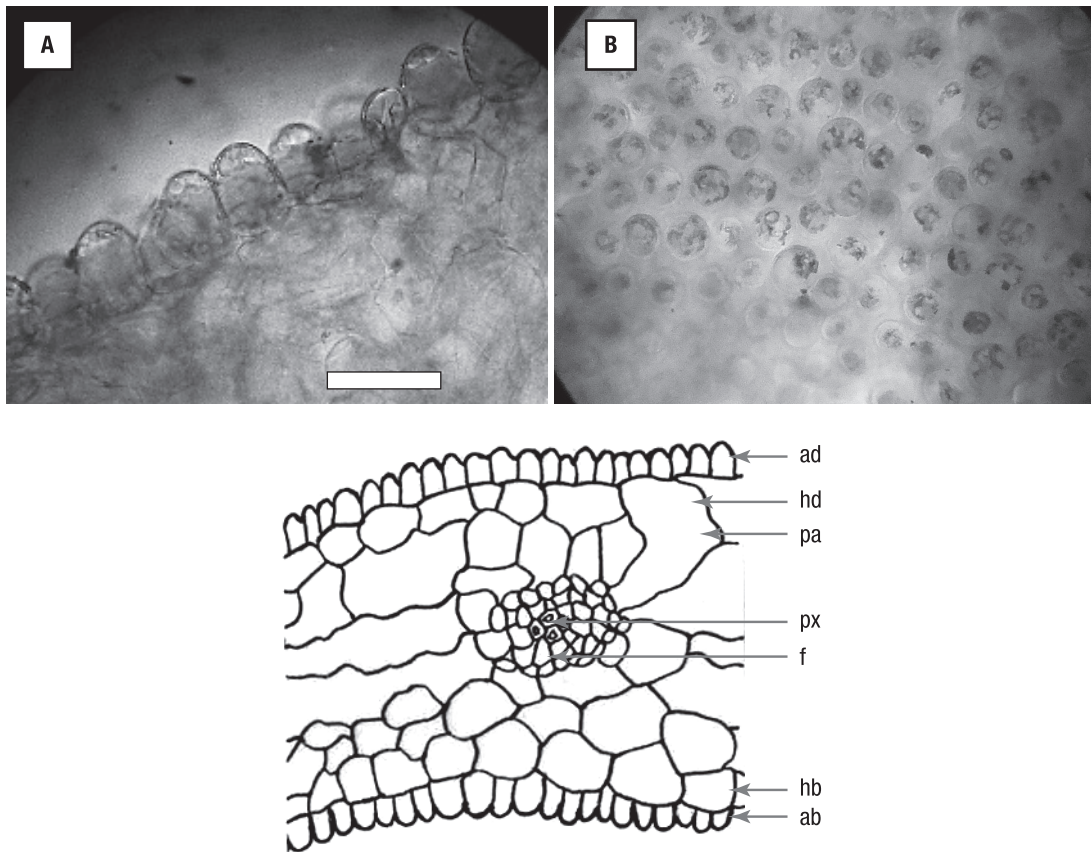


Fig. 2– Fotomicrografías de cortes histológicos de labelos. **A:** Papilas epidérmicas discolores. **B:** vista superficial de las papilas con abundante almidón en granos (test del lugol). **C:** histología del labelo, **ad:** epidermis adaxial, **f:** floema, **hb:** hipodermis abaxial, **hd:** hipodermis adaxial, **pa:** parenquima asociado al floema, **px:** protoxilema. Barra = 22 μm en A, B; 32 μm en C.

Guías de néctar y nectarios del androceo. Según Chittka & Radne (2006), las partes más oscuras de los pétalos y estaminodios son las que indican la presencia de néctar, mientras que las partes más claras no. Thompson *et al.* (1972) refieren que los pétalos de *Rudbeckia hirta*, amarillos concolores, contienen en la base glucósidos flavonoides que absorben y reflejan la luz ultravioleta, resultando oscuros y distinguibles para los polinizadores. En *C. lineata* las guías de néctar están situadas sobre la epidermis adaxial del estambre petaloide, estaminodios y labelos. Se observan como líneas rojas sobre un fondo amarillo, que sirven para orientar al polinizador hacia la superficie de las piezas del androceo. Se ha comprobado que al ser fotografiadas con luz UV las líneas rojas de los labelos y estaminodios de *C. lineata* se ven de color violeta, mientras que las zonas amarillas permanecen del mismo color. Por lo tanto las guías rojas absorben y reflejan el violeta que es el color visible para abejas, abejorros y

otros polinizadores nectarívoros como los colibríes (Ciciarelli 2014). Vistas con MEB, las papilas de los estaminodios y del estambre petaloide son convexas y aplanadas en sección transversal. En vista superficial presentan un contorno subrectangular extendido longitudinalmente. La cutícula es fina, lisa y aterciopelada pero las paredes convexas apicales presentan pliegues o invaginaciones de material parietal (Fig. 3A, B). Las guías de néctar se disponen siguiendo dos patrones: en líneas más o menos rectas y en grupos circulares o motas. Vistas con MEB se observan en el primer caso 5-8 hileras longitudinales de papilas capitadas, globosas, subsféricas muy próximas que se elevan por encima del tejido circundante (Fig. 4A, B), en el otro caso las papilas forman grupos circulares, lo que explica la presencia de motas o manchas rojizas o amarillas comunes en la base de los labelos de éstas y otras especies silvestres de *Canna* (Ciciarelli 2008). En labelos y estaminodios la cutícula es lisa y la pared externa presen-

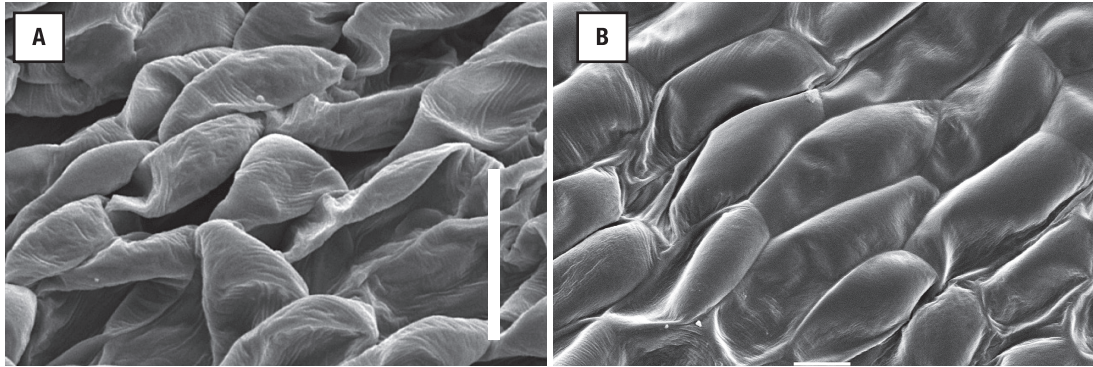


Fig. 3— Fotomicrografías de epidermis glandular nectarífera de estaminodios y estambre fértil en *C. lineata*. A: papilas aplanadas con pliegues parietales en estaminodios. B: papilas aplanadas con cutícula lisa y pliegues parietales poco marcados en estambre. Barra = 10 μm en A; 8 μm en B; 30 μm en C; 10 μm en D.

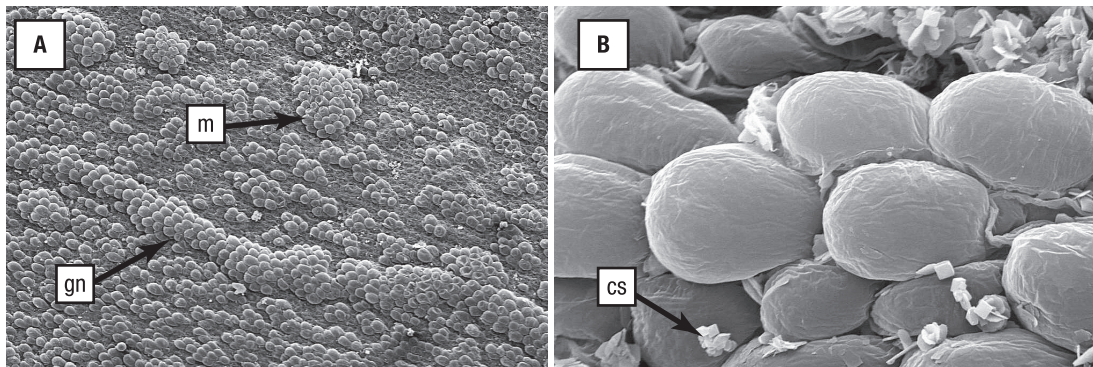


Fig. 4— Fotomicrografías de epidermis glandular nectarífera del labelo en *Canna lineata*. A: epidermis papilosa en vista panorámica, gn: guías de néctar, m: mota o mácula. B: detalle de papilas, cs: cristales de sacarosa. Barra = 150 μm en A; 8 μm en B.

ta un estriado variable con áreas adelgazadas que funcionarían como poros para secretar el néctar.

Secreción del néctar. El fluido se produce en el tejido nectarífero del androceo y constituye una fuente de alimento para el insecto visitante y en este sentido las flores podrían presentar un síndrome floral entomófilo. El polinizador se alimenta del néctar que se acumula en la cámara de néctar en el tubo floral. Las células secretoras son las propias papilas epidérmicas de los estaminodios, labelos y estambre, siendo el néctar secretado a través de poros que se abren en la cutícula. En las papilas epidérmicas del labelo y los estaminodios, la producción y reposición del néctar se produce desde el floema de haces anficribales, siendo transportado desde los tubos cribosos a células parenquimáticas asociadas que discurren radialmente hacia la epidermis. La gran cantidad de almidón de reserva que existe en el citoplasma de las papilas del androceo en ésta especie sería producto del transporte y la acumulación de prenéctar por parte del floema. Esa can-

tidad abundante de almidón en las papilas del estambre petaloide se utilizaría, luego de hidrolizado, como fuente de energía para la antesis. Por otra parte la presencia de almidón en estaminodios y labelos podría servir como reserva y posterior fuente de producción de néctar para ofrecer a insectos y colibríes. El líquido azucarado se secreta al exterior por vía apoplástica y queda depositado sobre las piezas en forma de gotas. El néctar puede permanecer sobre las piezas en forma líquida o sólida como cristales de sacarosa, una vez evaporada el agua. Las observaciones realizadas con MEB permitieron identificar numerosos cristales de sacarosa en la superficie de las papilas del labelo, dato que apoya la idea de que la secreción de néctar se produce hacia el exterior de la pieza. (Fig. 4B). Tal como la han indicado varios investigadores (Durkee *et al.* 1981, Zer & Fahn 1992, Belmonte *et al.* 1994, Nepi *et al.* 1996, Gaffal *et al.* 1998) la hidrólisis de los granos de almidón también en *C. lineata* constituiría el principal mecanismo formador de azúcar en el momento de la antesis.

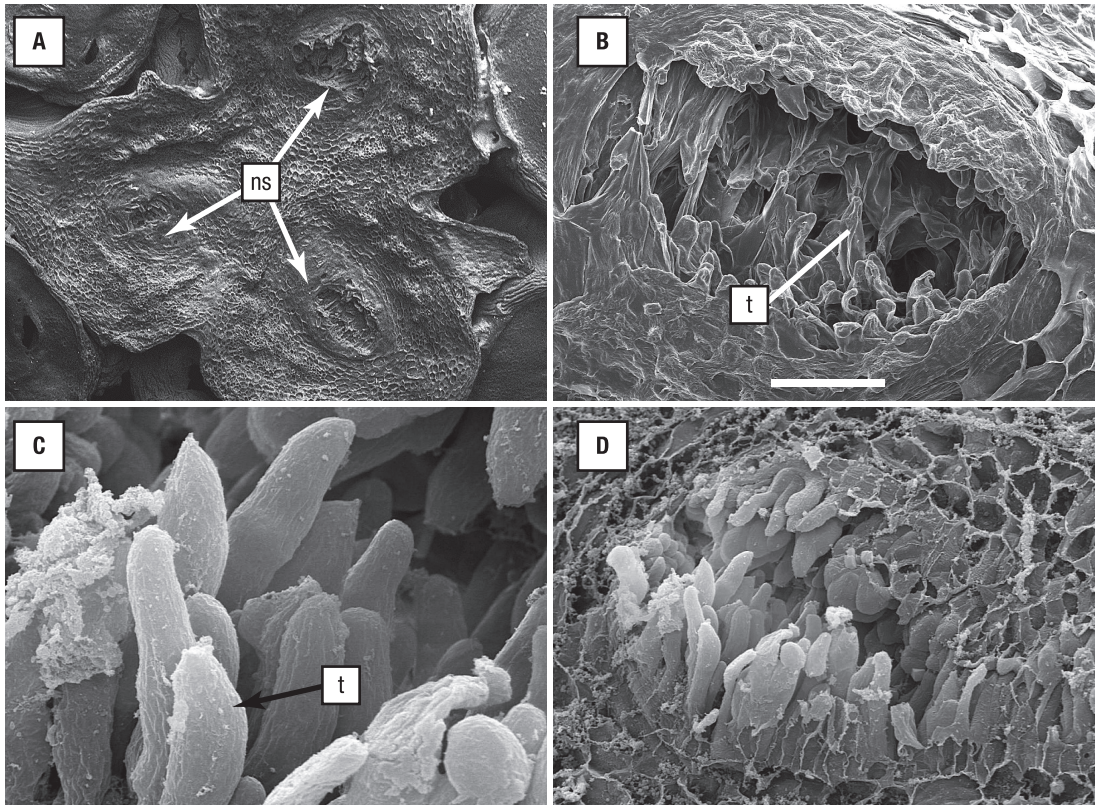


Fig. 5—Fotomicrografías de secciones transversales del ovario en *Canna lineata*, MEB. **A:** nectarios en septos del ovario. **B:** detalle de un nectario septal con tricomas secretores y parénquima secretor (bajo vacío). **C, D:** detalle de los tricomas nectaríferos pluricelulares, **ns:** nectario septal, **t:** tricoma nectarífero (en punto crítico). Barra = 200 μm en A; 30 μm en B; 20 μm en C; 50 μm en D.

Los **nectarios septales** están formados por 3 canales que se abren en la parte superior del ovario para almacenar el néctar en la cámara. Se encuentran en la zona central del ovario en el sitio de unión de los carpelos. En cortes transversales, se ven como 3 aberturas circulares situadas a 120° entre sí (Fig. 5A). En sección longitudinal forman canales o conductos tubulares largos a veces ramificados que se forman en zonas intercarpelares o partes de las paredes del ovario parcialmente soldadas que finalizan su recorrido acrópeto en la cámara de néctar en la base del tubo floral. Los nectarios septales (Fig. 5B) presentan un parénquima secretor que tapiza los conductos tubulares formado por 1-3 capas de células parenquimáticas que rematan en numerosos tricomas pluricelulares cilíndricos. Estos, afinados en el ápice, se proyectan hacia el interior de los canales donde vierten el néctar (Fig. 5B, C, D). De acuerdo a lo descrito por Fahn (1979) para *Musa*, en el citoplasma de los tricomas de dichos nectarios, el néctar proveniente del parénquima adyacente se

secreta tanto en el retículo endoplasmático rugoso (RER) como en los dictiosomas y sus vesículas, las que al fundirse con el plasmalema, difunden luego el néctar hacia la cámara septal.

Análisis de azúcares en néctar por HPLC. Las muestras de néctar analizadas por cromatografía se tomaron en verano, al mediodía y en plena floración de las plantas. El néctar fue fluido, abundante y de fácil extracción en ambas especies. Con fines comparativos se tomaron muestras durante el mes de octubre al inicio de la floración y en horas de la tarde (16 hs) pero dichas muestras no fueron analizadas mediante esta técnica pues el néctar fue poco fluido y de difícil extracción. En ambas especies la concentración de sacarosa expresada en mg/ml es más elevada en comparación con la concentración de los otros dos azúcares, siendo la glucosa la presente en menor concentración. La fructosa tiene valores relativamente bajos pero algo superiores al de la glucosa (Tabla 1). La proporción relativa de los tres azúcares analizados, esto es, sin

Tabla 1
Concentración volumétrica y proporción relativa de azúcares en el néctar de *Canna lineata* y *C. indica*.
*Valor aproximado estimado en base a una densidad de solución de 1 g/cm³

Néctar		Glucosa (G)	Fructosa (F) (F)	Sacarosa (S)	(G + F + S)*	
					mg/ml	g/100g
<i>C. lineata</i>	Concentración (mg/ml)	1,086	4,948	23,960	29,99	2,99
	Proporción relativa	3,62	16,50	79,88	—	—
<i>C. indica</i>	Concentración (mg/ml)	33,42	37,49	234,54	305,45	30,545
	Proporción relativa	10,94	12,27	76,78	—	—

considerar el agua y otros compuestos, es cercano al 80% de sacarosa en *C. lineata* y al 77% en *C. indica*. Estos valores muy próximos están indicando que a pesar de las diferencias de concentración de sacarosa en las dos especies, el néctar en ambas es proporcionalmente rico en sacarosa, y más abundante que la fructosa y la glucosa. Aunque la concentración de sacarosa, al igual que la concentración de glucosa y fructosa es mayor en el néctar de *C. indica* que en el de *C. lineata*, no se considera correcto decir que el néctar de una especie sea más fluido que el de la otra, ya que al efectuarse la toma de las muestras en el campo ambos néctares eran fluidos y la concentración de azúcares totales en éste rango no afectan sustancialmente la viscosidad. Es decir que el grado de fluidez del néctar no parece vincularse particularmente a la concentración en mg/ml de azúcares sino que depende de varios factores ambientales tales como: el grado de maduración de la flor, la temperatura, la humedad ambiente y la exposición al sol.

Del análisis de los datos surge que el néctar proveniente de las flores de *C. indica*, consumido preferentemente por los colibríes, es más concentrado en azúcares totales que el de *C. lineata*. Dicho fluido es 10 veces más concentrado en sacarosa, 7 veces más concentrado en fructosa y 30 veces más concentrado en glucosa que en la otra especie. Se puede decir que este néctar tiene relativamente un mayor valor energético o calórico que el de *C. lineata*. Aunque las proporciones relativas de los 3 azúcares muestran valores similares en ambas especies. Los valores obtenidos en las especies de *Canna* avalan la opinión de Freeman *et al.* (1984) y Proctor *et al.* (1996) quienes manifiestan la preferencia de los colibríes por un néctar rico en sacarosa, y la de Baker (cit. en Proctor *et al.* 1996) quien considera que en el néctar de flores ornitófilas los azúcares totales no deberían superar el 34% (g/100g) de los azúcares presentes, para permitir al colibrí una rápida toma con su len-

gua, dado que una mayor concentración de sacarosa aumentaría la viscosidad, especialmente a bajas temperaturas, y por lo tanto el gasto de energía para la extracción sería mucho mayor (Tamm & Gass 1986). En *C. lineata* y *C. indica* dichos valores serían de 2,99 g/100 g y *C. indica* de 30,4 g/100 g, respectivamente, valores comprendidos dentro del rango de variación mencionado por Baker. Por otra parte no se estaría de acuerdo con la opinión de Stiles (1981) en cuanto a que las flores polinizadas por aves presentan volúmenes usualmente más grandes de néctar menos concentrado que el de las flores polinizadas por insectos. En este caso se coincide con la opinión de Fabbri *et al.* (1998) en que no es conveniente restringir la preferencia de los colibríes a un determinado rango de concentración, considerando el amplio rango de concentraciones de néctar aceptado por estas aves y las variaciones ambientales en las cuales se realizan las mediciones.

En *C. lineata* y *C. indica* se registró que la proporción relativa de sacarosa es la más elevada de los 3 azúcares y se encuentran comprendidos en los rangos de variación considerados óptimos para los colibríes. A pesar de que *C. indica* es una especie visitada y polinizada por colibríes y *C. lineata* lo es por abejorros, dichos valores no parecen tener importancia en la preferencia de éstos animales, ya que ambos se alimentan del néctar de éstas especies y son visitantes asiduos de las restantes especies silvestres de *Canna* (Ciciarelli *et al.* 2008, 2010). Sin embargo el colibrí cuya demanda energética es elevada tiene preferencia por el néctar más concentrado en azúcares, es decir con mayor aporte calórico, como el de *C. indica* mientras que el abejorro consume ambos tipos de néctar pero es el polinizador efectivo de *C. lineata*, especie con un néctar más diluido. El análisis de los azúcares por HPLC permite avalar la idea de que *C. indica* se puede encuadrar en un síndrome floral ornitófilo y *C. lineata* en un síndrome floral entomófilo.

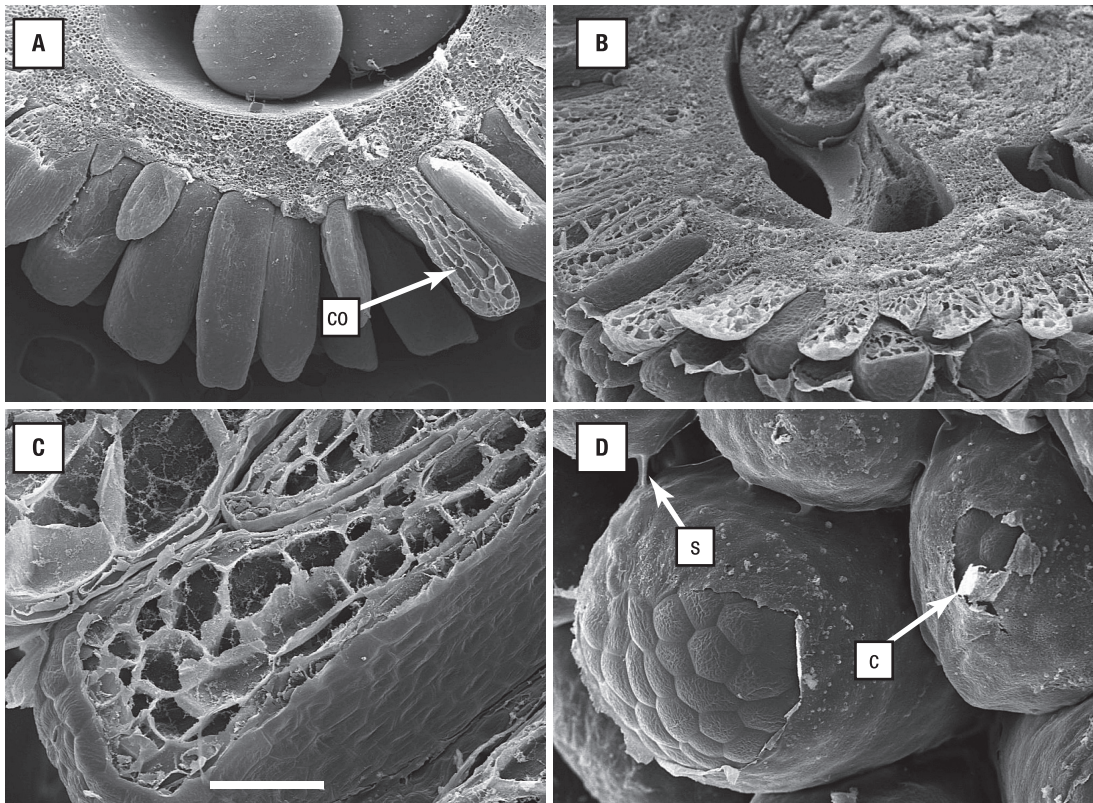


Fig. 6– Coléteres en *Canna lineata*. **A-B**: corona de coléteres formando la pared del ovario. **C**: detalle de coléter en sección transversal. **D**: coléter en vista distal, emergencias pluricelulares cubiertas por una cutícula que se desprende. **c**: cutícula, **co**: coléter, **s**: líquido secretado viscoso. Barra = 500 µm en A; 400 µm en B; 90 µm en C y D.

Coléteres. La pared del ovario tiene un espesor notable debido al desarrollo de una corona de coléteres, emergencias pluricelulares descritas aquí por primera vez para *Cannaceae* (Fig. 6A-D). Los coléteres en *C. lineata* corresponden al tipo claviforme (Lersten 1974). Constan de un eje pluriseriado de células alargadas revestidas por 1-2 capas de células epidérmicas adpresas de tipo en empalizada, cubiertas por una fina cutícula (Fig. 6C, D). Se forman a partir de los tejidos epidérmicos y subepidérmicos de los carpelos y carecen de haces vasculares. Las células secretoras producen un líquido viscoso, pruinoso, ceroso e insoluble en agua que se acumula bajo la cutícula. Una vez secretado el líquido, la cutícula se desprende parcialmente y las paredes celulares presentan invaginaciones en forma de pliegues (Fig. 6D). El conjunto de coléteres proporcionan protección a los óvulos en desarrollo y nectarios, y al mismo tiempo su exudado brinda impermeabilidad a la pared externa del ovario. Cuando cesa su actividad, se secan y desprenden, y esto coincide con la madurez de cápsulas y de semillas. De acuerdo con la

composición química del exudado, los coléteres se relacionan con la secreción de mucilagos, polisacáridos, lípidos y proteínas protectoras del tipo de las quitinasas (B-1,3 glucanasa y polifenoloxidasas), que parecen dañar compuestos químicos de microorganismos patógenos.

Polinización. Las observaciones de campo indican que luego de la antesis, el polen de la flor es depositado sobre el estilo en forma de pátina blanquecina que por lo general, no llega a la superficie estigmática apical. Este rasgo es común a las especies bonaerenses silvestres de *Canna* y también es citado por Yeo (1993), Maas & Maas (2008) y Glinos & Cocucci (2011) para otras especies del género; esos autores lo designan como presentación secundaria del polen, un comportamiento fisiológico que permitiría la fecundación cruzada. Según Glinos & Cocucci (2011), en *C. indica* los insectos no alcanzarían la superficie estigmática pero si serían, eventualmente, responsables de pérdida de polen. Si se considera la entomofilia como una condición presente en el género además de la ornitofilia (Glinos & Cocucci 2011) el agente poliniza-

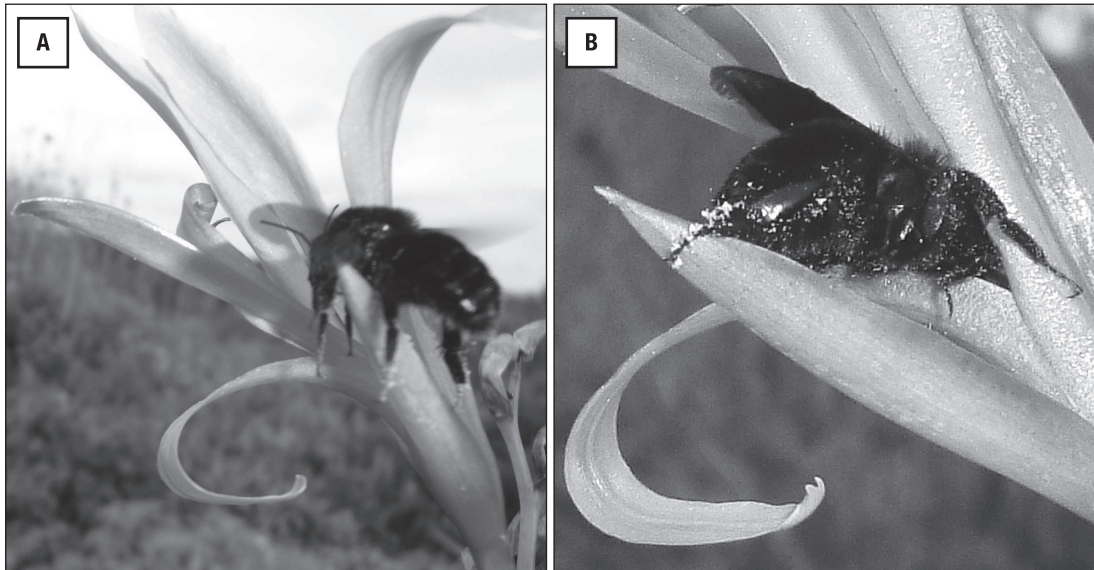


Fig. 7– Polinización en *Canna lineata*. **A:** llegada del insecto en vuelo a la flor. **B:** el abejorro se ubica sobre el labelo, el estilo asciendo y vuelve a su posición original.

dor *Bombus atratus* L. se alimenta del néctar que se encuentra en la cámara nectarífera y liba en diferentes flores de la colonia de *C. lineata* y de otras especies del género. No se ha registrado que este insecto ingiera polen, si lo transporta. En *C. lineata* tanto la presencia de abundante polen en masas blanquecinas sobre el estilo como las guías de néctar atraen al insecto que se posa sobre el labelo abriendo el tubo floral e introduce su cabeza y cuerpo hacia abajo en dirección a la cámara de néctar (Fig. 7A, B). En ésta especie el néctar producido en el tejido nectarífero del androceo constituye una fuente de alimento para el insecto visitante. El polinizador se alimenta del néctar que se acumula en la cámara situada en la base del tubo floral. El néctar proviene tanto del androceo como de los nectarios septales del ovario ínfero que se encuentra a más de 3 cm de la superficie del estaminodio y la lengua de éste insecto, es corta y difícilmente llegaría hasta los nectarios septales (Lucía, com. pers.), que es la otra fuente de néctar a la que acceden efectivamente los colibríes con sus largos picos. Se ha observado que otros insectos visitan las flores y puedan actuar en función de polinizadores, ya que las mariposas *Calpodés ethlius* Stoll y *Quinta cannae* Herrich-Schäffer, lepidópteros de la familia *Hesperiidae*, y avispas verdes *Chrysosphaera gemma* se han observado como visitantes de las flores de *C. lineata* y de las restantes especies silvestres del género. Aunque éstas últimas parecen vincularse al «robo» de néctar o polen.

Como ya se indicó el insecto *Bombus atratus* se posa y permanece sobre el labelo para libar el néctar de la cámara. El abejorro aborda la flor con sus patas impregnadas de polen de otra flor de la misma planta. Aún en vuelo, apoya cada una de sus patas anteriores sobre el labelo y el estilo, los separa y hace descender ambas piezas. (Fig. 7A). Con su cabeza se interna aún más separando el estambre del estilo, para posarse con el abdomen sobre éste último. El movimiento descendente del estilo favorecería el derrame de líquido estigmático reteniendo así parte de los granos de polen de la propia flor pegados por debajo del área estigmática apical. Una vez que el insecto concluye su giro, se ubica completamente sobre el labelo y en esa posición dirige su cabeza para libar el néctar de la cámara. Al mismo tiempo el estilo se libera y retorna a su posición erguida habitual. En esa situación entonces el polen de la propia flor adherido al área estigmática apical desarrolla el tubo polínico y éste ingresa por el canal estilar en dirección a los óvulos. En consecuencia el insecto hace contacto con las piezas fértiles y en el movimiento de giro que realiza en la flor para acceder al néctar favorecería la autopolinización. Es posible también que el insecto al abandonar la flor, roce con sus patas el estigma y deposite allí parte del polen proveniente de una flor previa favoreciendo la fecundación cruzada. Se ha podido observar que la zona apical del estigma secreta una sustancia mucilaginoso fluida que se derrama y adhiere allí a los granos de polen, lo que representa un recurso para favo-

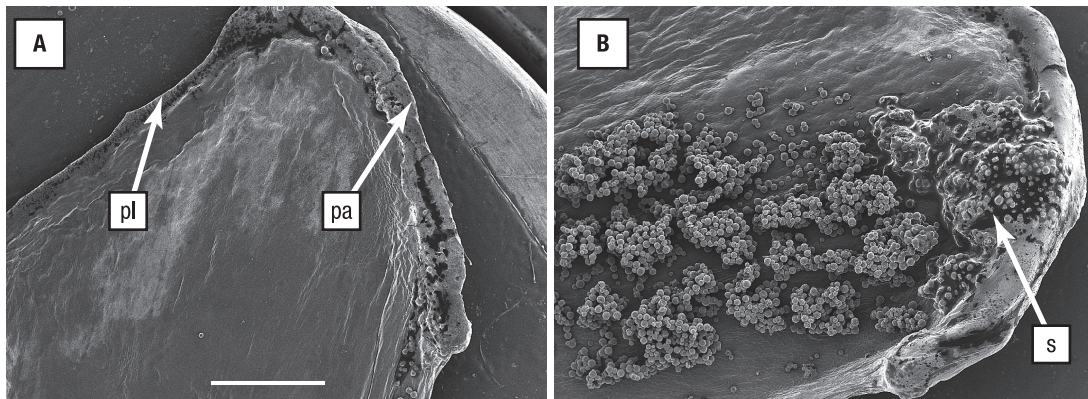


Fig. 8– Estilo y estigma secretor en *Canna lineata*. **A:** estilo con parte estigmática apical y lateral. **B:** presentación de los granos de polen sobre el estilo, granos embebidos en líquido estigmático de consistencia mucilaginososa. **pa:** parte estigmática apical, **pl:** parte estigmática lateral, **s:** secreción estigmática. Barra = 1 mm en A; 1,2 mm en B.

recer la fecundación (Fig. 8A, B) ya sea por autogamia o por fecundación cruzada. En flores frescas luego de la antesis, se han observado estilos cubiertos con cantidades variables de polen y la reducción de las pátinas de polen parece deberse más a su desplazamiento por el acarreo de las patas del insecto o su aleteo. Pese a la eventual pérdida, el polen adherido al cuerpo del insecto es transportado a otra flor de la misma planta, de la misma colonia o de otras cercanas, favoreciendo la fecundación cruzada.

Cruden (1977) establece que el número promedio de granos de polen por óvulo es un aspecto utilizado para determinar el tipo de fecundación: autofecundación, fecundación cruzada o ambas. Según este autor, el número promedio de granos de polen por óvulo es mucho más alto en plantas con fecundación cruzada que en plantas endógamas. Las cifras bajas (28-168) caracterizan a plantas autógamas mientras que las muy altas (5800-6000) a plantas con fecundación cruzada obligada. En estilos de especies de *Canna* se ha contado entre 700-1000 granos de polen por óvulo, por lo tanto dichos valores intermedios se corresponderían con ambos tipos de fecundación es decir ocurriría tanto autogamia como fecundación cruzada. Este es un argumento más en favor de la existencia de ambos tipos de fecundación en *C. lineata*. Las recompensas florales ofrecidas a los polinizadores y el polen excedente implican un alto costo energético para estas plantas pero parece verse compensado por la formación de semillas provenientes de ambos tipos de fecundación. La morfología del polen podría considerarse como una adaptación adicional a la entomofilia, debido a que por su exina equinada, puede adherirse a una superficie especialmente rugosa como los apéndices o las patas del insecto polinizador (Fig. 7B). Las espinas cónicas y su tono blanquecino reflejan la luz no só-

lo en la observación con MEB sino en las masas de polen que se observan como puntos blancos depositados sobre la superficie amarilla del estaminodio (Ciciarelli 2014).

DISCUSIÓN

En las guías de néctar de *C. lineata* se presentan pigmentos rojizos o rosados del grupo de las antocianinas en la base de las papilas y carotenoides en cromoplastos del ápice de las mismas. Srivastava & Vandar (2010) mediante análisis espectroscópicos en flores de *C. indica* determinaron la presencia de pigmentos antocianínicos del grupo de las cianidinas, aparte de licopeno y quercetina, a los que atribuyeron propiedades antioxidantes nutraceuticas. Utilizando ultrasonido y extracción con diferentes solventes, establecieron la presencia de polifenoles y flavonoides, también con propiedades antioxidantes. Hasta ahora en *Cannaceae* no se había mencionado más que la producción de néctar a partir de los nectarios septales del ovario, pero la observación detallada de la epidermis adaxial de los estaminodios, estambres y labelos en *C. lineata* muestra que el néctar también es secretado por estas piezas. La presencia de abundante almidón en las papilas de las piezas del androceo confirman la presencia de azúcares en forma de prenéctar que se podrá utilizar como fuente de energía para producir la antesis en el estambre petaloide o como reserva de néctar para ofrecer a los polinizadores en los estaminodios y labelos. La ausencia de estomas o hidatodos y la naturaleza papilosa de la epidermis indicarían que la secreción de néctar se produce vía floema y el parénquima asociado a él desde los hacesillos anficribales del mesófilo hacia la epidermis, para ser eliminada al exterior o acumularse como almidón

en las células. La secreción al exterior se produce en forma de gotas debido a la ruptura de la cutícula en el momento de la llegada del polinizador, o a través de los poros o áreas adelgazadas de la cutícula. En el caso del abejorro, éste se apoya en la superficie glandular cuyas células se rompen parcialmente y exudan el néctar en forma de microgotas que con frecuencia coalescen para formar gotas más grandes que se depositan sobre la superficie cerosa de las piezas del androceo. En el labelo la evaporación de las gotas deja cristales de azúcar. Se ha registrado la visita de abejorros al mediodía, en las horas de radiación solar más alta y máxima temperatura diaria.

Ante la existencia de nectarios septales y florales muy desarrollados y activos, es posible que en las especies de *Canna* haya más variabilidad en lo que respecta a su ecología reproductiva que la relacionada con la visita de insectos específicos. En especies de flores rojas, tubulares y estrechas como *C. indica* y *C. coccinea*, las flores están adaptadas a la polinización por aves, pero la visita de abejorros y de otros insectos complementaría la polinización ornitófila, algo que también se ha podido observar en especies con flores grandes como *C. ascendens* Ciciarelli, *C. variegatifolia* Ciciarelli *C. fuchsina* Ciciarelli y *C. glauca* L. en la que intervienen colibríes no así para *C. lineata*. Glinos *et al.* (2011) efectuaron un análisis detallado de los mecanismos de acceso de colibríes al polen procedente del estigma papiloso y consideran a estas aves como los agentes polinizadores predominantes para *C. indica*. Los colibríes o picaflores son principalmente nectarívoros y tienen una larga lengua que les permite succionar el fluido. Los colibríes visitan flores con tubos florales largos, abundante néctar y aunque pueden visitar flores diversas, generalmente se dirigen a las de colores rosados, anaranjados, o rojos, cuyos tubos florales se adaptan a la longitud de la curva de sus picos. En la provincia de Buenos Aires uno de los más comunes es *Chlorostilón aureoventris* Shaw, el colibrí común o colibrí de pecho esmeralda. En *C. fuchsina*, *C. glauca*, *C. indica* y se ha observado que éstos y otros colibríes visitan las flores e introducen su pico en el tubo floral. En *C. indica* se han observado perforaciones laterales en las base de los tubos florales, para extraer el néctar, aunque sin embargo no se han observado en las flores de *C. lineata*. En *C. glauca* el colibrí liba en el ovario en la zona de los nectarios septales y también en el tubo a la altura de la cámara de néctar. Como ya se indicó la visita de abejorros se ha registrado también para otras especies de la zona como *C. ascendens*, *C. coccinea*, *C. indica*, *C. variegatifolia* y *C. fuchsina*, de modo que el seguimiento efectuado para *C. lineata* podría ser válido para esas especies y todas en general, recibir diferentes polinizadores, comportándose a la vez como entomófilas y ornitófilas.

Los caracteres florales en el género, la diversificación y especialización en los tipos de secreción de néctar y el hecho de que la zona de humedales bonaerenses sea muy rica en variedad de fauna, permiten la coexistencia de las dos vías de polinización, aunque algunos agentes polinizadores sean más frecuentes que otros.

La evidencia sugiere que en especies como *C. indica* y *C. coccinea* con flores de colores vivos en las gamas del rojo, las corolas firmes tubulosas, de estaminodios más cortos y estrechos, los tubos florales largos y la producción de abundante néctar muy concentrado en azúcares como recompensa, se pueden caracterizar por un síndrome de ornitofilia. En *C. indica*, especie visitada y polinizada por colibríes (Glinos & Cocucci 2011), dicho valor es del 77% muy cercano al de la especie anterior. De acuerdo a los valores de la Tabla 1, la principal diferencia entre las especies se da en los valores de concentración de azúcares expresadas en mg/mL. En *C. indica* el néctar es más concentrado en azúcares totales, es decir que posee un mayor valor calórico que el de *C. lineata*, lo que sí se puede relacionar con un néctar de preferencia para los colibríes. *C. lineata* una especie con estaminodios y labelos más grandes, reflejos, guías de néctar conspicuas y un néctar menos concentrado en azúcares totales es decir más diluido mayormente visitada por abejorros, estaría encuadrada en un síndrome floral entomófilo.

En observaciones de campo se ha registrado que el grado de viscosidad del néctar disminuye con el aumento de la temperatura o exposición solar. En especies de *Canna* los abejorros liban las flores en horas de alta exposición solar o al mediodía. En el caso de los colibríes las visitas se dan repetidas veces en el día desde el amanecer hasta el atardecer. Estas aves visitan varias flores cuando llegan a las plantas pero dada la corta permanencia o contacto con las flores en parte de sus visitas es de suponer que no siempre obtienen néctar fluido. Otras veces permanecen en contacto con la flor durante más tiempo, ocasiones en que se aprecia claramente que liban el néctar.

La melitofilia es un rasgo común con especies de *Marantaceae* (Ley & Classen Bockhof 2009) familia que comparte con las *Cannaceae* ciertos rasgos florales como la presentación secundaria del polen y las guías o líneas de néctar.

CONCLUSIONES

En *Canna lineata* el labelo tiene varias funciones: atraer, indicar los depósitos de néctar y servir como «pista de aterrizaje» a polinizadores como *Bombus atratus*, este insecto al abordar la flor hace contacto con las piezas

fértiles, carga polen en sus patas al rozar el estilo y con su cuerpo apoyado sobre el labelo liba el néctar de la cámara, al retirarse de la flor, roza el estigma y deposita allí los granos de polen de la misma flor, de otra flor de la misma planta o de otra planta de la colonia. Se propone la existencia de autofecundación y fecundación cruzada por el acarreo de polen en las patas del insecto. No se registraron visitas de colibríes. *C. lineata* presenta caracteres florales relacionados con la entomofilia tales como tubos florales cortos, estaminodios y labelos reflejos, guías de néctar, nectarios florales bien desarrollados, presentación secundaria del polen equinado y néctar diluido.

Se hallaron 2 tipos de nectarios: los nectarios septales del ovario y las superficies glandulares nectaríferas de las piezas del androceo, por lo tanto se presentan 2 fuentes productoras de néctar en la flor. Los coléteres que forman la pared externa del ovario secretan un líquido viscoso, ceroso, insoluble en agua, que se acumula bajo la cutícula y se desprende parcialmente luego de la secreción. El conjunto de coléteres proporciona protección a los óvulos en desarrollo y su exudado brinda impermeabilidad a la pared externa del ovario, evitando el ataque fúngico.

En *C. indica*, una especie con flores rojas tubulares estrechas y piezas erguidas, se ha reportado la visita de colibríes *Chlorostilbon auroventris*, *Heliomaster furcifer*, como polinizadores asiduos y efectivos (Glinos & Cocucci 2011). De acuerdo a nuestros estudios el colibrí, cuya demanda energética para el vuelo es elevada, tiene preferencia por el néctar más concentrado en azúcares totales y de mayor aporte calórico producido por las flores de *C. indica* mientras que el abejorro aunque consume ambos

tipos de néctar, es el polinizador efectivo de *C. lineata*, especie que secreta un néctar más diluido. El análisis de azúcares y la evidencia morfológica permiten confirmar que la especie *C. indica* se encuadra en un síndrome floral ornitófilo mientras que *C. lineata* reúne características que la incluyen en un síndrome floral entomófilo.

Se ha observado que otras especies del género como *C. fuchsina* y *C. glauca* son visitadas tanto por colibríes (*Chlorostilbon auroventris*) como por abejorros. Estos insectos a su vez son asiduos visitantes de otras especies como *C. ascendens*, *C. coccinea*, *C. indica*, *C. variegatifolia*, y *C. fuchsina*, de modo que el seguimiento efectuado para *C. lineata* podría ser válido para aquellas especies con labelos anchos y reflejos que puedan sustentar al insecto como *C. ascendens*, *C. fuchsina*, *C. glauca* y *C. variegatifolia*.

En futuras investigaciones se ampliarán estos seguimientos aunque no se descarta la posibilidad de un síndrome floral mixto (Fernster *et al.* 2004, Rodríguez Gironés & Santamaría 2004) en las especies mencionadas. La combinación de diferentes síndromes podría reducir el «robo» de polen por parte de insectos (Altschuler 2003) y asegurar la fecundación y formación de semillas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el marco del Programa de Incentivos para Docentes Investigadores de la Universidad Nacional de La Plata (Argentina). Se agradece especialmente a la Dra. Cristina Rolleri por el apoyo brindado y el asesoramiento en temas anatómicos, el asesoramiento en aspectos entomológicos al Dr. Mariano Lucía y a la Lic. Silvana Demarchi por su aporte en las determinaciones cromatográficas de azúcares.

BIBLIOGRAFÍA

- ALTSCHULER, D. L. 2003. Flower color, hummingbird pollination, and habitat irradiance in four Neotropical forests. *Biotropica* 35(3): 344-355.
- BROWN, H. 1938. The bearing of nectaries on the phylogeny of flowerig plants. *Amer. Phil. Soc. Trans.* 79: 549-595.
- CHITKA, L. & RAINE, N. E. 2006. Recognition of flowers by pollinators. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 428-435.
- CICIARELLI, M. M. 1989. *Las Cannaceae Link argentinas*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Naturales y Museo de La Plata, Argentina.
- CICIARELLI, M. M. 1995. *Canna variegatifolia* Ciciarelli sp. nov. (*Cannaceae*-Zingiberales). *Rev. Museo La Plata, Bot.* 14: 333-341.
- CICIARELLI, M. M. 2007. *Canna ascendens* Ciciarelli (*Cannaceae*) una nueva especie de la provincia de Buenos Aires y comentarios de otras especies argentinas de este género. *Darwiniana* 45: 188-200.
- CICIARELLI M. M. & ROLLERI, C. H. 2008. Morfología, taxonomía y caracterización de siete especies neotropicales del género *Canna* (*Cannaceae*). *Bot. Complut.* 32: 157-184.
- CICIARELLI, M. M.; ROLLERI, C. H. & GONZÁLEZ DUBOX, M. C. 2010. *Canna fuchsina*, una especie nueva para la ciencia, sus relaciones con otras especies silvestres del género y con el grupo *C. x generalis* (*Cannaceae*-Zingiberales). *Bot. Complut.* 34: 49-55.
- CICIARELLI, M. M.; PASSARELLI, L. M. & ROLLERI, C. H. 2010. Morfología del polen en especies de *Canna* (*Cannaceae*, Zingiberales) y su implicancia sistemática. *Rev. Biol. Trop.* 58(1): 63-59.
- CRUDEN, R. W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31: 32-46.
- ESAU, K. 1965. *Anatomía Vegetal*. Omega, Barcelona.

- FABBRI, L. T. & VALLA, J. J. 1998. Aspectos de la biología reproductiva de *Tropaeolum pentaphyllum* (Tropaeolaceae). *Darwiniana* 36: 51-58.
- FAHN, A. 1979a. *Secretory tissues in vascular plants*. Academic Press, Nueva York.
- FAHN, A. 1979b. Ultrastructure of nectaries in relation to nectar secretion. *Amer. J. Bot.* 66: 977-985.
- FAHN, A. 1988. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol.* 108: 229-257.
- GLINOS, E. & COCUCCI, A. 2011. Pollination biology of *Canna indica* (Cannaceae) with particular reference to the functional morphology of the style. *Plant. Syst. Evol.* 291(1): 49-51.
- LERSTEN, N. R. 1974. Morphology and distribution of colleter and crystals in relation to the taxonomy and bacterial leaf nodule symbiosis of *Psychotria* (Rubiaceae). *Amer. J. Bot.* 61: 973-981.
- LEY, A. & CLASSEN BOCKHOF, R. 2009. Pollination síndromes in African *Marantaceae*. *Ann. Bot.* 104(1): 41-56.
- MAAS-VAN DE KAMER, H. & MAAS, P. J. M. 2008. The *Cannaceae* of the world. *Blumea* 53: 247-318.
- PROCTOR, M.; YEO, P. & LACK, A. 1996. *The natural history of pollination*. Timber Press, Portland, OR.
- RODRÍGUEZ-GIRONES, M. A. & SANTAMARIA, L. 2004. Why are so many bird flowers red- *PLoS Biol.* 2(10): e350. doi: 10.1371/journal.pbio.0020350.
- YEO, P. F. 1993. Secondary pollen presentation: form, function and evolution. *Pl. Syst. Evol. Suppl.* 6: 204-208.