

BIOLOGÍA FLORAL, SISTEMA REPRODUCTIVO Y VISITANTES FLORALES DE *VITEX CYMOSA* (LAMIACEAE)

Juana De Egea Elsam^{1,2}  & María T. Amela García^{3,4} 

¹ Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Fundación Moisés Bertoni para la Conservación de la Naturaleza y Laboratorios Díaz-Gill, Manduvirá 635, Asunción, Paraguay. Investigador PRONII, CONACYT; juana.deegee@gmail.com (autora corresponsal).

² Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, Campus Universitario, San Lorenzo, Paraguay.

³ Laboratorio de Sistemática y Biología Reproductiva de Plantas Vasculares, Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, CABA, Argentina.

⁴ Instituto de Micología y Botánica (INMIBO), CONICET, Universidad de Buenos Aires, CABA, Argentina.

Abstract. De Egea Elsam, J. & M. T. Amela García. 2023. Floral biology, reproductive system and floral visitors of *Vitex cymosa* (Lamiaceae). *Darwiniana*, nueva serie 11(1): 246-264.

Vitex cymosa Bert. ex Spreng. (Lamiaceae) is a native species of tropical and subtropical Central and South America. Its medicinal, antioxidant, antifungal and antibacterial properties are noteworthy and widely studied. This study aims to contribute towards the knowledge of the reproductive biology of *V. cymosa*, through: the determination of the reproductive system; the description of reproductive morphological attributes (flower, fruit, pollen and nectary), attractants and floral phases, as well as the record and function of floral visitors. *Vitex cymosa* presents melitophilic floral traits: diurnal anthesis, bluish coloration, bilabiate structural type, presence of visual guides in the corolla indicating the location of the reward (nectar), and a soft, sweet and pleasant aroma to humans. The pollen has pollenkit and is deposited nototribically on the pollinators. The nectary is of gynoeceal origin, the nectar is released through nectarostomes located on the apex of the ovary, remaining available even after corolla abscission, as a post-floral nectary; such zone is distinguished by a purple coloration, different from that of the rest of this organ, which grows basipetally as the fruit develops. The reproductive system of *V. cymosa* is mixed, resulting in more than 75% of fructification, through both allogamy mediated by pollinators and spontaneous self-pollination, presenting a slight herkogamy that would contribute to cross-pollination. Eleven species of floral visitors were recorded, all belonging to the Class Insecta. Among these floral visitors, *Apis mellifera* was the most frequent species, and along with other species of native bees (of the genera *Bombus*, *Centris*, *Plebeia*, *Tetragonisca*, *Trigona*), wasps and butterflies, they would be pollinators when they visit legitimately (in the case of the hymenopterans, as some of them thief pollen). Despite this visitor assembly, the most important pollinators are the bees, which coincides with the melitophilic characteristics of the flowers. The nectar exposed in flowers where the corolla has already fallen, more accessible to some bees and to the wasps, would contribute to greater attraction to pollinators, as well as predatory insects of herbivores of the developing fruits.

Keywords. Floral and post-floral nectary; floral attractants; floral micromorphology; floral trichomes; floral visitors; flowering phenology; nectarostomes; reproductive system.

Resumen. De Egea Elsam, J. & M. T. Amela García. 2023. Biología floral, sistema reproductivo y visitantes florales de *Vitex cymosa* (Lamiaceae). *Darwiniana*, nueva serie 11(1): 246-264.

Vitex cymosa Bert. ex Spreng. (Lamiaceae) es una especie nativa de América Central y del Sur tropical y subtropical, reconocida por sus propiedades medicinales, antioxidantes, antimicóticas y antibacteriales, ampliamente estudiadas. El presente trabajo tiene por objetivo contribuir al conocimiento de la biología

reproductiva de *V. cymosa*, a través de: la determinación del sistema reproductivo; la descripción de atributos morfológicos reproductivos (flor, fruto, polen y nectario), atractivos y fases florales, así como el registro y función de los visitantes florales. *Vitex cymosa* presenta rasgos florales melitófilos: antesis diurna, coloración azulada, tipo estructural bilabiado, con guías visuales indicativas de la ubicación de la recompensa (néctar) y aroma suave, dulce y agradable al humano. El polen posee cemento polínico y se deposita en forma nototriba sobre los polinizadores. El nectario es de origen ginoecial, el néctar se libera a través de nectarostomas ubicados sobre el ápice del ovario, quedando disponible incluso después de abscisa la corola, a modo de nectario post-floral; dicha zona se distingue por una coloración púrpura, diferente a la del resto del gineceo, que crece hacia la base a medida que el fruto se desarrolla. El sistema reproductivo de *V. cymosa* es mixto, fructificando en más del 75%, tanto por alogamia mediada por polinizadores como por autopolinización espontánea, presentando una leve hercogamia que contribuiría a la polinización cruzada. Se registraron 11 especies de visitantes florales, todas pertenecientes a la Clase Insecta. De los visitantes florales, *Apis mellifera* fue la especie más frecuente, y junto a otras especies de abejas nativas registradas (de los géneros *Bombus*, *Centris*, *Plebeia*, *Tetragonisca*, *Trigona*), avispas y mariposas, serían polinizadores cuando visitan en forma legítima (en el caso de los himenópteros, ya que algunos hurtan polen). A pesar de este ensamble de visitantes, los polinizadores más importantes son las abejas, en coincidencia con los caracteres melitófilos de las flores. El néctar expuesto en flores donde ya se cayó la corola, más accesible a algunas abejas y a las avispas, contribuiría a una mayor atracción de los polinizadores, así como a insectos predadores de herbívoros de los frutos en desarrollo.

Palabras clave. Atractivos florales; floración; micromorfología floral; nectario floral y post-floral; nectarostomas; sistema reproductivo; tricomas florales; visitantes florales.

INTRODUCCIÓN

El género *Vitex* L., recientemente transferido de la Familia Verbenaceae a la Familia Lamiaceae (APG, 2016), incluye unas 205 especies, de distribución tropical y subtropical (POWO, 2021), la mayoría nativas de Asia, África y Australia, y unas pocas de América Central y del Sur (Kumar et al., 2017). Comprende árboles o arbustos inermes con hojas compuestas, digitadas, 3-7-folioladas, ocasionalmente reducidas a un único folíolo, generalmente caducas, con inflorescencias cimosas, flores zigomorfas y fruto drupáceo (Troncoso, 1974; França & O'Leary, 2018).

El género contiene numerosas especies muy apreciadas por sus propiedades maderables, ornamentales y medicinales (Troncoso, 1974), entre ellas *Vitex agnus-castus* L., la especie tipo, conocida en todo el mundo por sus propiedades para tratar problemas hormonales femeninos y dolores menstruales (Van Die et al., 2013; Cerqueira et al., 2017); *Vitex megapotamica* (Spreng.) Moldenke, utilizada en carpintería y como afrodisíaco en América del Sur (López et al., 2002); *Vitex pubescens* Vahl, usada en Indonesia para tratar diversos dolores y fiebre (CIFOR, 2021). Rani & Sharma (2013) realizaron una revisión exhaustiva sobre farmacología,

morfología, fitoconstituyentes, estudios clínicos y toxicología de las especies más conocidas.

En cuanto a la biología reproductiva, existen referencias principalmente sobre las especies paleotropicales y australianas: *Vitex negundo* L., nativa de Asia y este de África, ampliamente cultivada como ornamental y aromática en Asia, África, Australia, Europa y América del Norte, tiene flores homógamas, hercógamas y es xenógama facultativa (Kumar et al., 2017; Sun et al., 2020), con polinización entomófila (Khan et al., 2021); *Vitex lucens* Kirk., endémica de Nueva Zelanda, es autocompatible (Barrell et al., 1997), siendo polinizada en su estado silvestre por algunas especies de aves mieleras (*honeyeaters*; Familia Meliphagidae), también endémicas de esa isla (Anderson, 2003) y *Vitex agnus-castus*, originaria de la región Mediterránea e introducida en muchos países, fue objeto de estudios sobre visitantes florales fuera de su área de distribución natural (Mariano et al., 2017) y palinológicos (Trigo, 1993). Otros estudios sobre morfología polínica abarcan 129 especies del género, incluyendo *Vitex cymosa* Bertero ex Spreng. (Large & Mabberley, 1995), y especies africanas de la subfamilia Viticoideae (Cabral et al., 2008). Kumar et al. (2017) presentan una síntesis de los sistemas reproductivos y de los mecanismos

de dispersión de semillas para otras especies de *Vitex*; las flores son, por lo general, homógamas, alógamas y entomófilas, aunque en algunas especies se ha reportado hercogamia, dicogamia, autocompatibilidad y ornitofilia; en cuanto a las drupas, son generalmente carnosas y de dispersión principalmente zoocórica y antropocórica. Otras contribuciones tratan la utilización de recursos florales por ciertos polinizadores (Quiroz-García et al., 2011; Rech & Absy, 2011; Hawkins & Robacker, 2019). Respecto del nectario, sólo se ha investigado la anatomía y el desarrollo en *Vitex chinensis* Mill. (Yufang et al., 2000). Respecto de las características del fruto en el género *Vitex*, se ha referido su carácter drupáceo (Monteiro et al., 2018), más o menos carnoso (Troncoso, 1974), compuesto por 4 pirenas uniseminadas (França & O'Leary, 2018), sin señalar mayores diferencias entre especies.

Vitex cymosa es una especie nativa de América Central y del Sur tropical y subtropical (Trópicos, 2021); es una de las siete especies del género registradas en el sur de Brasil, en Paraguay y en el noreste de Argentina (Zuloaga et al., 2019), donde es conocida popularmente como *tarumá* (Lorenzi, 1998; López et al., 2002). En Argentina crece en las provincias de Formosa y Corrientes, y en Paraguay en los departamentos Alto Paraná, Alto Paraguay, Central, Concepción, Cordillera y Paraguari (Zuloaga et al., 2019), en ambos países dentro de las regiones biogeográficas paranaense y chaqueña (Cabrera & Willink, 1973; Morrone, 2014). Son árboles caducifolios, muy ornamentales, que alcanzan una altura de 10-20 m, de copa globosa y muy frondosa, con hojas palmadas, flores violeta-azuladas dispuestas en inflorescencias cimosas y drupas obovoides a globosas de color rojizo, violeta-negruzco a negro en la madurez, con pulpa succulenta (Lorenzi, 1998; França & O'Leary, 2018). Los frutos son comestibles para los humanos (Guevara et al., 2020; Meza Miranda et al., 2021) y muy apreciados por aves y peces (Lorenzi, 1998). Es una especie heliófila y se desarrolla preferentemente sobre suelos húmedos y fértiles. Presenta una fenología de floración extendida entre septiembre y octubre, y los frutos maduran entre noviembre y diciembre (Lorenzi, 1998). A pesar de sus flores llamativas y conspicuas, las descripciones en la literatura se

limitan a los caracteres diagnósticos y taxonómicos de las flores que definen la identidad de la especie, pero no profundizan sobre sus caracteres morfo-funcionales que contribuirían a la comprensión de la biología floral y reproductiva de la especie.

En correspondencia con el elevado interés en la farmacología del género, *Vitex cymosa* ha sido objeto de numerosos estudios químicos enfocados en las propiedades medicinales, antioxidantes, antimicóticas y antibacteriales de sus hojas y frutos (Dos Santos et al., 2001; Leitao et al., 2006, 2011; Guevara et al., 2020; Meza Miranda et al., 2021, entre otros). Sin embargo, aspectos relacionados con la biología reproductiva de esta especie no fueron aún abordados. Su conocimiento podría contribuir a un entendimiento mayor de la reproducción de este género, dadas las diferencias mencionadas más arriba entre las especies estudiadas, para poder inferir patrones evolutivos de sus caracteres, así como establecer manejos reproductivos adecuados de las especies con interés comercial.

El presente trabajo tiene por objetivo principal contribuir al conocimiento sobre la biología reproductiva de *Vitex cymosa* mediante la descripción detallada de los atributos de la flor, de las fases florales y del fruto, y la búsqueda de respuestas a las siguientes preguntas: ¿cuál es el sistema reproductivo?, ¿cuál es el grado de especialización o síndrome de polinización? y ¿cuáles son los visitantes florales y, entre ellos, los polinizadores?

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El estudio fue desarrollado en la ciudad de Mariano Roque Alonso, Departamento Central, Paraguay, en un área suburbana, residencial, con casas con jardín, esparcidas, dentro de una zona modificada a parque urbano hace menos de 15 años. La matriz vegetal de esta zona, de unas 10 hectáreas, está dominada por gramíneas cespitosas, herbáceas latifoliadas y árboles dispersos, algunos autóctonos espontáneos y otros cultivados con fines ornamentales. Los árboles estudiados son añejos, comunes en los alrededores y se encuentran dentro del área de distribución de la especie, por lo cual su ocurrencia en el sitio se consideró natural y anterior a la antropización.

Dentro del parque urbano crecían cuatro árboles de *Vitex cymosa*, de unos 15 m de altura, con copa frondosa, globosa a piramidal, separados unos 300 a 500 metros entre sí. Se colectó un ejemplar de herbario de uno de los individuos (25°12'12" S – 57°30'37" O) con el fin de corroborar la identidad de la especie (ejemplar *J. De Egea 1989*; original depositado en FCQ, duplicado en CTES). Las observaciones principales fueron realizadas del 11 de octubre al 1 de diciembre de 2021; observaciones adicionales se siguieron realizando hasta octubre de 2022, a fin de corroborar la maduración de los frutos y la ocurrencia de floraciones múltiples.

Atributos florales

Morfología de la flor. Se describieron las características y disposición de las piezas florales, determinando el tipo floral estructural, a través de la observación directa de flores frescas, disecciones de las piezas y uso de microscopio estereoscópico (ME). Para la descripción micromorfológica, se tomaron imágenes con microscopía electrónica de barrido (MEB), para lo cual flores frescas fueron fijadas en etanol 70%, posteriormente deshidratadas en una serie creciente de etanol (85% y 100%) y luego secadas a punto crítico (Sorrivas de Lozano & Morales, 1986). Las muestras fueron montadas en láminas de aluminio con cinta doble faz y luego metalizadas con oro utilizando un equipo Denton Vacuum Desk II. La observación del material se realizó en un microscopio electrónico de barrido JEOL 5800LV. Las imágenes fueron capturadas con un digitalizador Gatan model 788 Digiscan II. La terminología adoptada para la descripción de los tricomas siguió a Payne (1978).

Fenología, fases florales y desarrollo del fruto. Se registró la fenología de floración completa de los cuatro árboles. Para registrar el desarrollo de las fases florales, se marcaron diez botones florales de dos árboles y se observaron desde el amanecer hasta el atardecer, cada tres horas, desde la antesis hasta la senescencia floral. Posteriormente, se registró el desarrollo del fruto. Las observaciones fueron realizadas con lupa de mano.

Nectarios y néctar. Cinco botones florales próximos a la antesis, de dos árboles, fueron embolsados con tela de organza para evitar arribo

de los visitantes florales, a fin de permitir la acumulación de néctar. Las flores fueron colectadas durante el segundo día de antesis, antes de la marchitez, para constatar la presencia de néctar y la existencia y ubicación de estructuras secretoras. Para ello se disectaron las flores y se observaron con microscopio estereoscópico (ME).

Atractivos visuales. Se describió el patrón de coloración en el espectro visible mediante la inspección de 10 flores, a ojo desnudo y con lupa estereoscópica, usando la carta de Kelly (1965).

Atractivos olfativos. Para evaluar la emisión de compuestos volátiles se efectuó una prueba olfativa según Kearns & Inouye (1993). Para ello se cosecharon 140 flores en antesis (35 flores de cada uno de los cuatro árboles) y se separaron los distintos ciclos florales en contenedores que se cerraron herméticamente. Luego de transcurrida una hora, se percibió si se detectaba olor en alguno de los ciclos, describiendo sus características organolépticas.

Sistema reproductivo

El sistema reproductivo se determinó a través de un experimento de polinización controlada aplicando a 3 individuos los tratamientos detallados a continuación. Los botones florales (y las flores una vez tratadas) se aislaron de los visitantes florales, florívoros y frugívoros con bolsas de organza.

Autopolinización espontánea: se aislaron botones florales próximos a la antesis y no se realizó ningún tipo de polinización manual.

Geitonogamia manual: se aislaron botones florales próximos a la antesis; una vez iniciada la antesis, se retiró la bolsa, se transfirió manualmente polen desde anteras de otras flores de la misma planta hasta el estigma de las flores aisladas y se volvieron a embolsar.

Alogamia mediada por polinizadores: botones florales próximos a la antesis fueron emasculados y, una vez abiertas las flores, se dejaron expuestas a la acción de los polinizadores; finalizada la antesis, se volvieron a embolsar.

Polinización natural: se rotularon flores que se dejaron expuestas a la acción de los polinizadores; finalizada la antesis, fueron embolsadas.

Apomixis: botones florales próximos a la antesis fueron emasculados y embolsados.

En los días siguientes se monitoreó el desarrollo ovárico, midiendo la longitud desde la base hasta el ápice y se calculó su tasa de crecimiento, según la fórmula:

$$\sum_{i=1}^k \frac{(Xb_i - Xa_i)}{k}$$

Donde Xb es la longitud del ovario en el día b , Xa la longitud del ovario en el día anterior a , k es la cantidad de registros (días), la cual se promedió luego por la cantidad de ovarios medidos.

Las bolsas de organza fueron dejadas entre 12 y 15 días, hasta ya iniciado el desarrollo de los frutos, momento en que los productos de los tratamientos (flores abscisas o frutos en crecimiento) fueron colectados y fijados en alcohol 70%. Posteriormente se contaron los frutos en desarrollo obtenidos y se calculó el porcentaje de fructificación de cada tratamiento. Estos resultados fueron analizados mediante modelos lineales generalizados (GLMs) con el tratamiento de polinización como única variable explicatoria y asumiendo una distribución binomial de la variable respuesta; esto se realizó usando el software R (R Core Team, 2019).

Visitantes florales

Se registraron los visitantes florales en periodos de 15 minutos, cuatro veces al día (a las 7:00 hs, 10:30 hs, 14:00 hs y 17:30 hs). Los visitantes fueron registrados con fotografías y, cuando fue posible, se contó la cantidad de flores visitadas por minuto.

Para establecer la diferencia entre polinizadores y visitantes florales, se realizaron observaciones directas de los insectos que visitaron las flores. Se consideraron polinizadores a todos aquellos visitantes que realizaron visitas legítimas (según la definición de Faegri & van der Pijl, 1979), es decir, que accedieron a la recompensa introduciendo su aparato bucal por el tubo floral, y que además lograron el contacto con los órganos reproductivos de la flor, de manera tal que puedan intervenir efectivamente en la polinización. El resto de los insectos que interactuaron con las flores sin establecer dicho tipo de contacto, fueron considerados sólo visitantes florales (hurtadores o ladrones, de néctar o de polen, según corresponda, de acuerdo con las definiciones de Inouye (1980)).

RESULTADOS

Atributos florales

Morfología de la inflorescencia, de la flor y del fruto. Inflorescencias (Fig. 1A) en cimas dicasiales laxas, axilares a subterminales, de 20-40 mm de longitud, con brácteas y bractéolas hasta 2 mm, lanceoladas, caducas; pedúnculos hasta 20 mm de longitud, flores patente-péndulas, 5-8 abiertas simultáneamente. Flores (Fig. 1B) marcadamente zigomorfas, con pedicelos de 3-5 mm. Cáliz (Fig. 1C) de 3 mm de longitud, campanulado, con 5 dientes anchos, subiguales, tomentoso externamente y glabro en el interior. Corola (Fig. 1D-E) tubular-bilabiada; tubo 6-7 mm de largo, cilíndrico, algo ensanchado hacia el ápice; limbo oblicuo en relación al tubo, extendido, elíptico, con el eje mayor de 1,5 mm y el menor de 1,2 mm; labio superior 2-lobulado, el inferior 3-lobulado; los lóbulos finamente papilosos y con pubescencia glandular, redondeados, el central inferior mayor, orbicular, de unos 7 mm de diám., irregularmente crenulado, viloso, de color azul (muy pálido o muy claro) a azul purpúreo (muy pálido o muy claro), con una mácula blanca de forma bilobada en la entrada al tubo. Estambres 4, didínamos, 2 de 7 mm y 2 de 9 mm de largo, adnatos en su base al labio superior, emergiendo de la porción media del tubo corolino o un poco por debajo de este punto, levemente por encima del estigma, exertos; filamentos filiformes, hirsutos en la base y cubiertos de tricomas glandulares hacia el ápice (Fig. 1E-F); anteras de 1 mm de largo, dorsifijas, oblongas, de color azul purpúreo profundo, dehiscentes hacia el labio inferior (Fig. 1G). Ovario súpero de 1,5 mm de longitud, globoso, con el ápice púrpura y la zona media y basal blanco-amarillentas, 2-carpelar, los carpelos 2-loculares y 2-ovulados; estilo de 5 mm de longitud, terminal, filiforme (Fig. 1H); estigma cortamente bifido, con las ramas agudas, subiguales (Fig. 1I); estigma y ápice del estilo azul purpúreo, aclarándose hacia su base hasta blanco (Fig. 1H, I). Fruto drupa de 2-2,5 cm de largo, globosa a obovoide, de color rojo purpúreo oscuro y caedizo a la madurez, con cáliz persistente, cupuliforme, pulpa succulenta; pirena ósea única, 4-locular, 4-seminada (Fig. 5F).

Características epidérmicas de la corola y el androceo. Las células pavimentosas del limbo presentan papilas pequeñas (Fig. 2A-D), mientras que el interior del tubo corolino está completamente

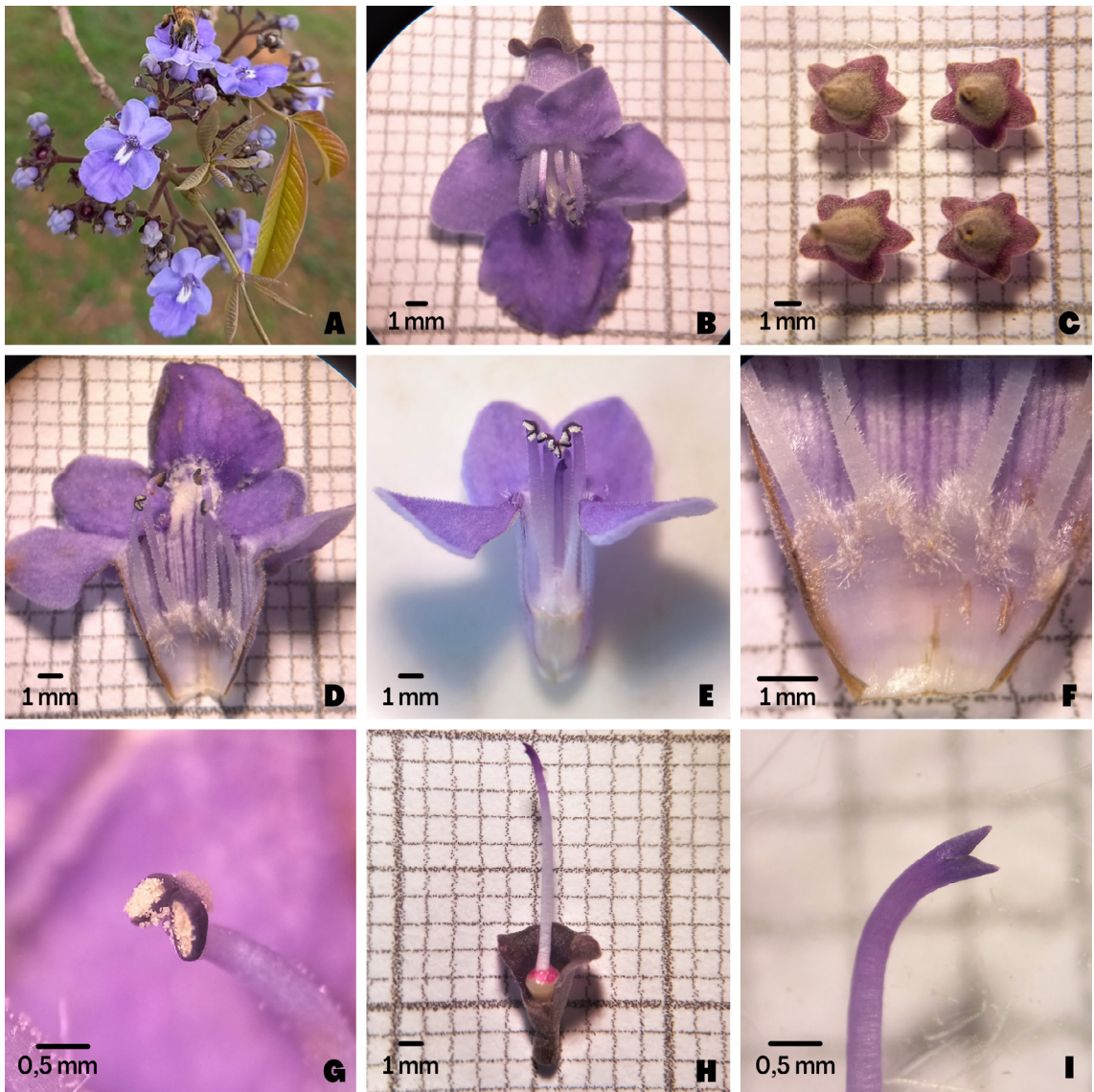


Fig. 1. Morfología floral de *Vitex cymosa*. **A**, inflorescencia. **B**, detalle del limbo de la corola, nótese los estambres adnatos al labio superior y exsertos (10x). **C**, vista inferior del cáliz zigomorfo, campanulado (10x). **D-E**, disección longitudinal mostrando los estambres didínamos (**D**) y la hercogamia leve, las anteras por encima del estigma (**E**) (20x). **F**, detalle de la base de los filamentos estaminales hirsutos (30x). **G**, apertura de las tecas y exposición del polen (40x). **H**, disección del cáliz (corola removida) mostrando el gineceo (10x). **I**, detalle del estigma bifido (40x). Figura en color en la versión en línea <http://www.ojs.darwin.edu.ar/index.php/darwiniana/article/view/1096/1296>

recubierto por papilas de mayor tamaño (Fig. 3A-B). Existen pelos en la superficie del limbo (Fig. 2A-D), en el interior del tubo corolino (Fig. 3A-B), a lo largo de los filamentos estaminales (Fig. 3C) y en la base de éstos (Fig. 3D). Los pelos de la superficie

del limbo son, en su mayoría, atenuados y algunos glandulares (Fig. 2A-B); todos tienen una hilera de células: los atenuados, conformados por 3-4 células, alcanzan 120 μm de longitud (Fig. 2C), mientras que los glandulares, con 4-7 células, alcanzan 90 μm

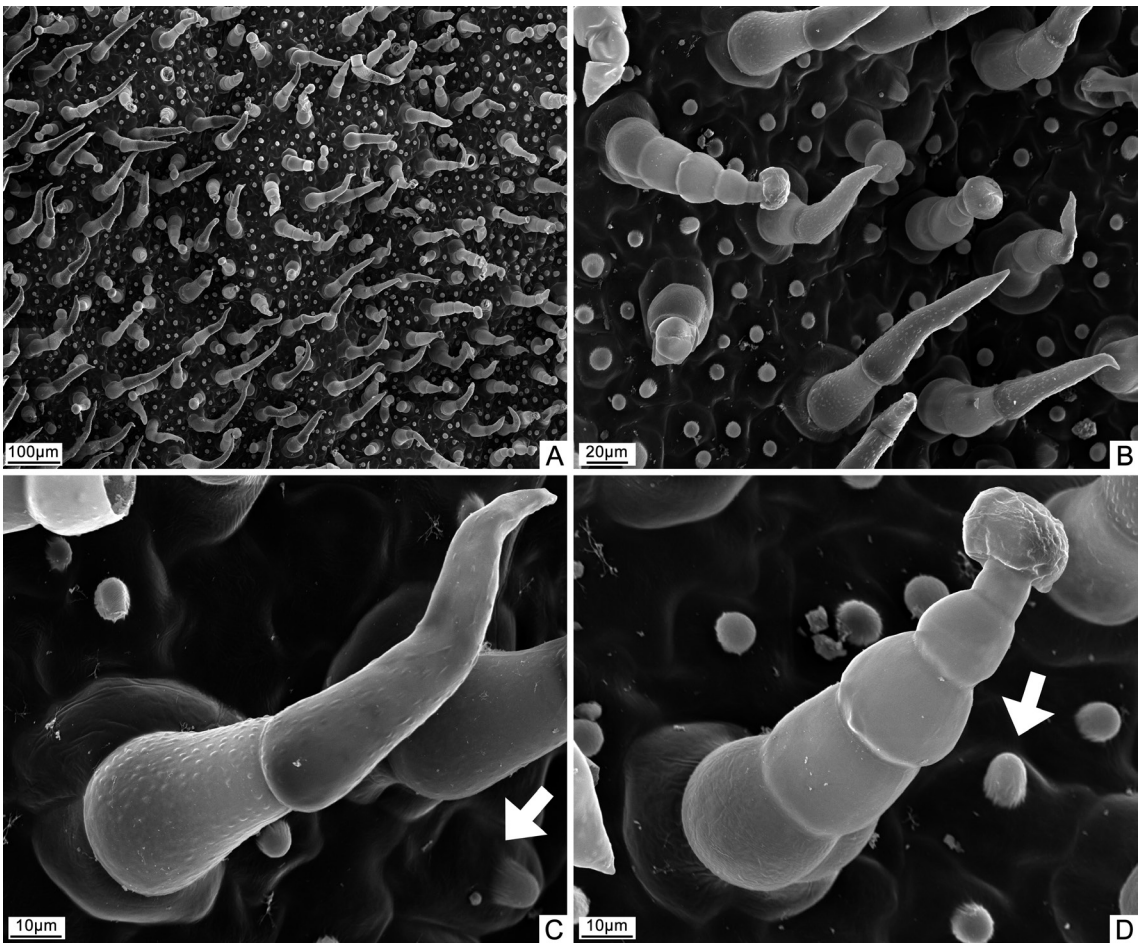


Fig. 2. Características de la epidermis del limbo. **A-B**, vista superficial de la epidermis, con células pavimentosas con papilas y tricomas atenuados y secretores. **C**, detalle de tricoma atenuado y papila de célula pavimentosa (flecha). **D**, detalle de tricoma secretor y papila de célula pavimentosa (flecha).

de longitud (Fig. 2D). Los pelos del interior del tubo corolino son escasos, tanto los atenuados (Fig. 3A) como los secretores (Fig. 3B), alcanzando una longitud de hasta 320 μm . Los filamentos estaminales están cubiertos de pelos glandulares dispersos, de 30-50 μm de longitud, conformados por 3-5 células (Fig. 3C), mientras que en su base existe un cúmulo de pelos atenuados de ca. 600 μm de longitud (Fig. 3D). Todos los estambres ofrecen polen: éste es prolado, de 20 μm de diámetro polar x 15 μm de diámetro ecuatorial, tricolpado, con perforaciones simples, más o menos circulares o elongadas (éstas últimas aparentemente coalescentes), algunas incompletas; presenta cemento polínico (Fig. 3E).

Fenología y fases florales. La floración comenzó los primeros días de octubre de 2021, coincidiendo con la ausencia casi total de hojas y terminó a mediados del mes de noviembre; el 10 de noviembre aún se encontraron algunas flores en antesis, aunque los árboles ya se hallaban en fructificación plena y con hojas nuevas. El patrón fue sincrónico entre todos los individuos de *V. cymosa* registrados en el área. Un segundo y mucho menor pico de floración, y en presencia de un denso follaje, también sincrónica, fue registrado durante mayo de 2022. Con base en las observaciones realizadas, se definieron 3 fases florales (Tabla 1, Fig. 4).

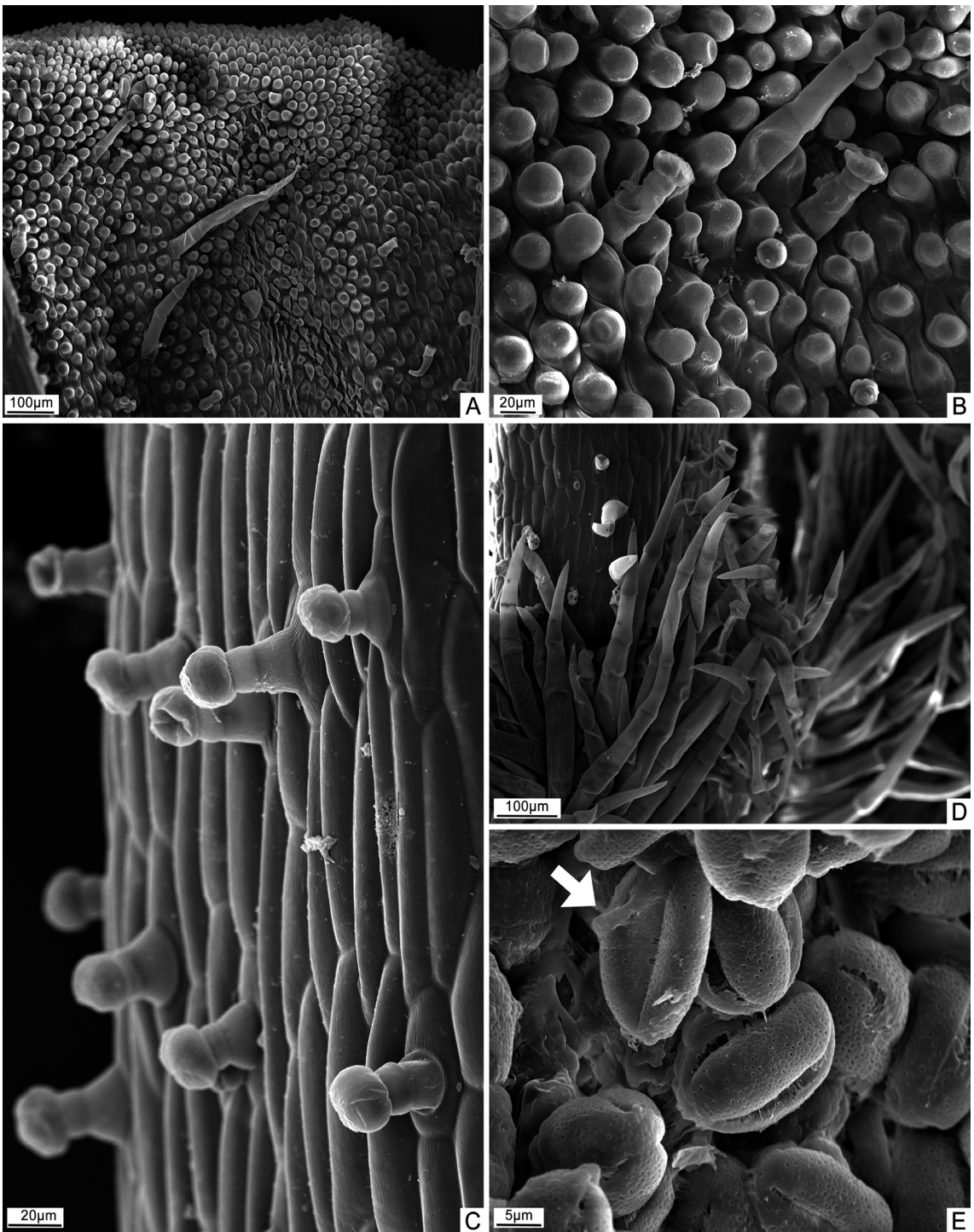


Fig. 3. Características de la epidermis del tubo corolino y del polen. **A-B**, vista superficial del interior del tubo corolino, cubierto por papilas, con tricomas atenuados (**A**, centro) y secretores (**B**). **C**, tricomas secretores en el filamento estaminal. **D**, tricomas atenuados en la base de los filamentos estaminales. **E**, polen con cemento polínico (flecha).



Fig. 4. Fases florales en *Vitex cymosa*. **A**, botones florales en diferente estado de desarrollo. **B**, fase 1: apertura progresiva del botón floral. **C**, fase 2: expansión total del limbo. **D**, fase 3: inicio de la marchitez. Figura en color en la versión en línea <http://www.ojs.darwin.edu.ar/index.php/darwiniana/article/view/1096/1296>

La primera implica la apertura gradual del botón floral; inicia con la salida del sol y se desarrolla durante 2-4 horas. Los lóbulos de la corola se abren sucesivamente: primero se separa el labio superior, y luego se extienden uno tras otro los lóbulos del labio inferior. La segunda fase, o antesis propiamente dicha, tiene una duración de dos días (con clima soleado o bien con lluvias leves y vientos moderados). El polen se expone durante toda la antesis y las tecas se deshidratan progresivamente. El estigma presenta sus ramas separadas durante todo este período, sugiriendo receptividad estigmática. La tercera y última fase implica la marchitez y caída de la corola; al final del segundo día de antesis, la corola se deshidrata progresivamente hasta su caída, quedando el cáliz persistente y el ovario expuesto, si hubo fecundación. En resumen, la longevidad floral es de dos días bajo condiciones meteorológicas favorables (permaneciendo las flores en fase 2 la mayor parte de ese tiempo, es decir, con capacidad de exportar y de recibir polen).

Después de la culminación de la antesis y cuando la fecundación fue exitosa, el cáliz contiene al ovario en crecimiento (Fig. 5A), cuya zona apical púrpura (Fig. 5B) se va expandiendo hacia la base, tornándose más clara, mientras la base se torna más oscura (Fig. 5C), adquiriendo una coloración homogénea, verde-amarillenta primero (Fig. 5D) y verde después (Fig. 5E), con máculas blancas. La tasa de crecimiento del fruto fue de $0,75 \pm 0,11$ mm ($n = 16$) por día; una vez que los frutos alcanzaron unos 18-20 mm de longitud comenzaron a adquirir mayor succulencia, pero sin aumentar su longitud. A los 50 días de iniciada la floración, los primeros frutos se encontraban aún verdes, pero ya con la longitud final. El desarrollo de succulencia y la maduración del fruto tuvo una duración aproximada de 25-30 días, hallándose frutos maduros entre finales de diciembre y principios de enero (Fig. 5F).

Nectarios y néctar. El néctar es secretado por la zona púrpura del ápice del ovario (Fig. 6A) en forma de gotas dispersas que eventualmente coalescen en gotas de mayor tamaño, y se acumula en la base del estilo, sobre el ovario (Fig. 6B), alcanzando en ocasiones la entrada del tubo; también puede encontrarse disponible y expuesto después de caída la corola. El tejido nectarífero estaría ubicado por

Tabla 1. Fases florales en *Vitex cymosa*.

	Fase	Evento	Duración
Antesis	1	Apertura gradual del botón floral	Desde la salida del sol, durante 2-4 horas.
	2	Exposición de los ciclos reproductivos	2 días (con sol o lluvias leves y vientos moderados). 1 día (con tormentas y vientos fuertes).
	3	Marchitez y caída de la corola	Al final del segundo día de antesis.

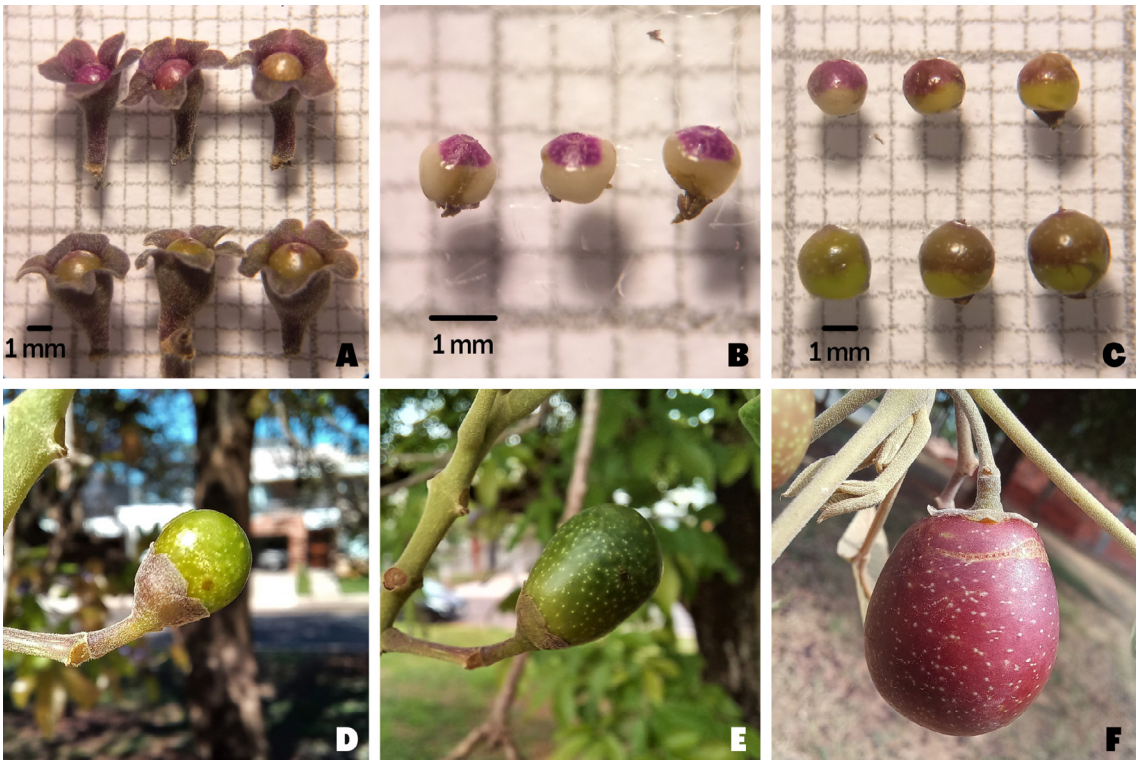


Fig. 5. Desarrollo del fruto en *Vitex cymosa*. **A.** primeros estadios del ovario fecundado en desarrollo, dentro del cáliz persistente (10x). **B.** ovarios de la flor en antesis, 1 mm de longitud base-ápice (20x). **C.** ovarios fecundados, primeros estadios de desarrollo, cáliz removido (10x). **D.** fruto en desarrollo, 10 mm de longitud. **E.** fruto en desarrollo, 16 mm de longitud. **F.** fruto en proceso de maduración, 19 mm de longitud. Figura en color en la versión en línea <http://www.ojs.darwin.edu.ar/index.php/darwiniana/article/view/1096/1296>

debajo de dicha zona (Fig. 6C). El néctar se libera a través de nectarostomas (puntos blancos en la zona púrpura; Figs. 6B y 7A), levemente elevados sobre la epidermis, no todos abiertos (Fig. 7B), de estructura paracítica (Fig. 7C-D).

Atractivos visuales y táctiles. En el espectro visible, las flores de *V. cymosa* varían desde azul (muy pálido o muy claro) a azul púrpureo (muy pálido o muy claro) (Fig. 8A-C); esto fue observado en diferentes flores en la misma fase

floral, en el mismo individuo; es decir, distintas flores presentaron distinto grado de saturación. Cualquiera fuera la saturación, ésta fue más o menos uniforme en toda la corola, con excepción de unas zonas, en apariencia más oscuras, producto de unos pliegues convergentes hacia el centro de la flor en los dos lóbulos del labio superior, así como en ambos hemilimbos del labio inferior (Fig. 8A-C). El interior del tubo corolino es blanco, con estrías longitudinales azul púrpureas (Fig. 8D).

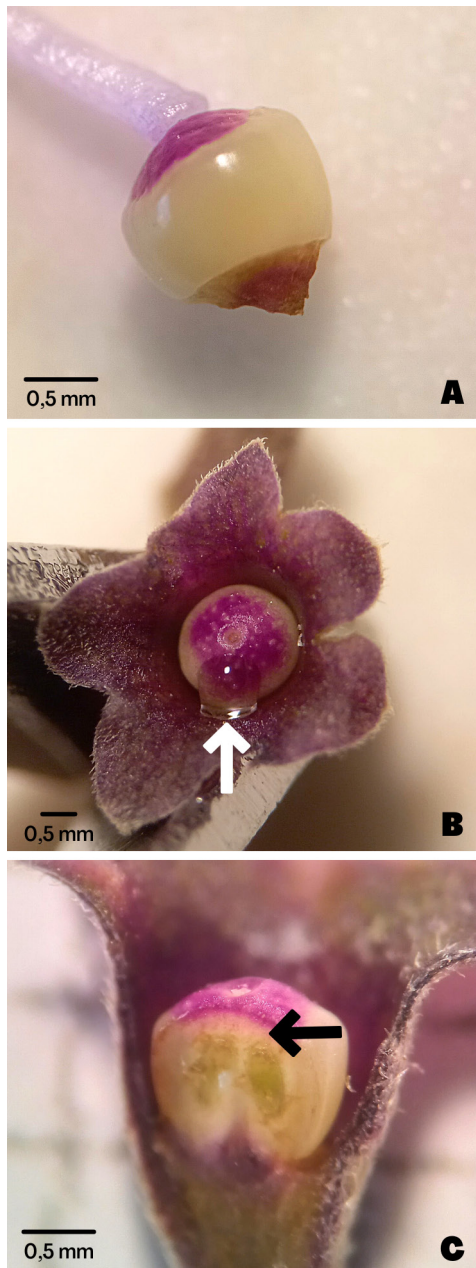


Fig. 6. Nectario de *Vitex cymosa*. **A**, vista lateral del ovario, en donde se destaca la zona secretora de néctar, de color violeta (30x). **B**, superficie apical del ovario, donde se observa la zona violácea secretora con puntos blanquecinos correspondientes a nectarostomas y el néctar acumulado (flecha), visible al retirar la corola, el androceo y el gineceo de una flor en antesis (20x). **C**, corte longitudinal del ovario, donde se ubicaría el tejido secretor (flecha) (30x). Figura en color en la versión en línea <http://www.ojs.darwin.edu.ar/index.php/darwiniana/article/view/1096/1296>

En la base del lóbulo mayor del labio inferior, justo a la entrada del tubo, se destaca una mácula blanca, notablemente vilosa, bilobada, en cada uno de los lóbulos buliformes (Fig. 8D). La coloración de las anteras (azul purpúreo profundo) contrasta con el limbo, sobre todo en las flores de tonalidad más clara (Figs. 8C, 4C), observándose el polen (blanco) a la dehiscencia (Fig. 1E, G).

Atractivos olfativos. Sólo se detectó aroma (leve, dulce, agradable) en la corola y en el androceo (más leve en este último).

Sistema reproductivo

Todos los tratamientos realizados para evaluar autocompatibilidad y alogamia superaron el 75% de fructificación, excepto el tratamiento para evaluar apomixis que alcanzó un 10% de fructificación (Tabla 2), difiriendo significativamente del resto ($\chi^2 = 31,512$; $p < 0,0001$).

Visitantes florales

Fueron registradas e identificadas 11 especies de visitantes florales (Tabla 3). Todas realizaron visitas legítimas, contactando los ciclos reproductivos; sin embargo, en algunas oportunidades, individuos de *Tetragonisca fiebrigi*, *Plebeia* sp. y las especies de avispas realizaron visitas ilegítimas.

Durante todo el período de floración las visitas fueron asiduas, desde el amanecer hasta el atardecer. El visitante floral más frecuente fue *Apis mellifera*, que libó legítimamente en promedio 11 flores por minuto, depositándose el polen en forma nototriba, sobre la cabeza (Fig. 9A). El segundo visitante floral más frecuente fue *Tetragonisca fiebrigi*; los individuos de esta especie, además de las visitas legítimas de libación, a veces libaban el néctar expuesto una vez caída la corola (Fig. 9B) o colectaban polen en forma ilegítima posados sobre las anteras (Fig. 9C). Los demás visitantes fueron registrados ocasionalmente: *Plebeia* sp., además de las visitas legítimas, realizó algunas visitas ilegítimas posándose sobre las anteras y colectando polen (Fig. 9D); *Trigona* sp. (Fig. 9E) visitó siempre en forma legítima. Las avispas (Fig. 9F-G), además de visitar las flores, tanto durante la antesis como luego de la abscisión de la corola, recorrían las inflorescencias.

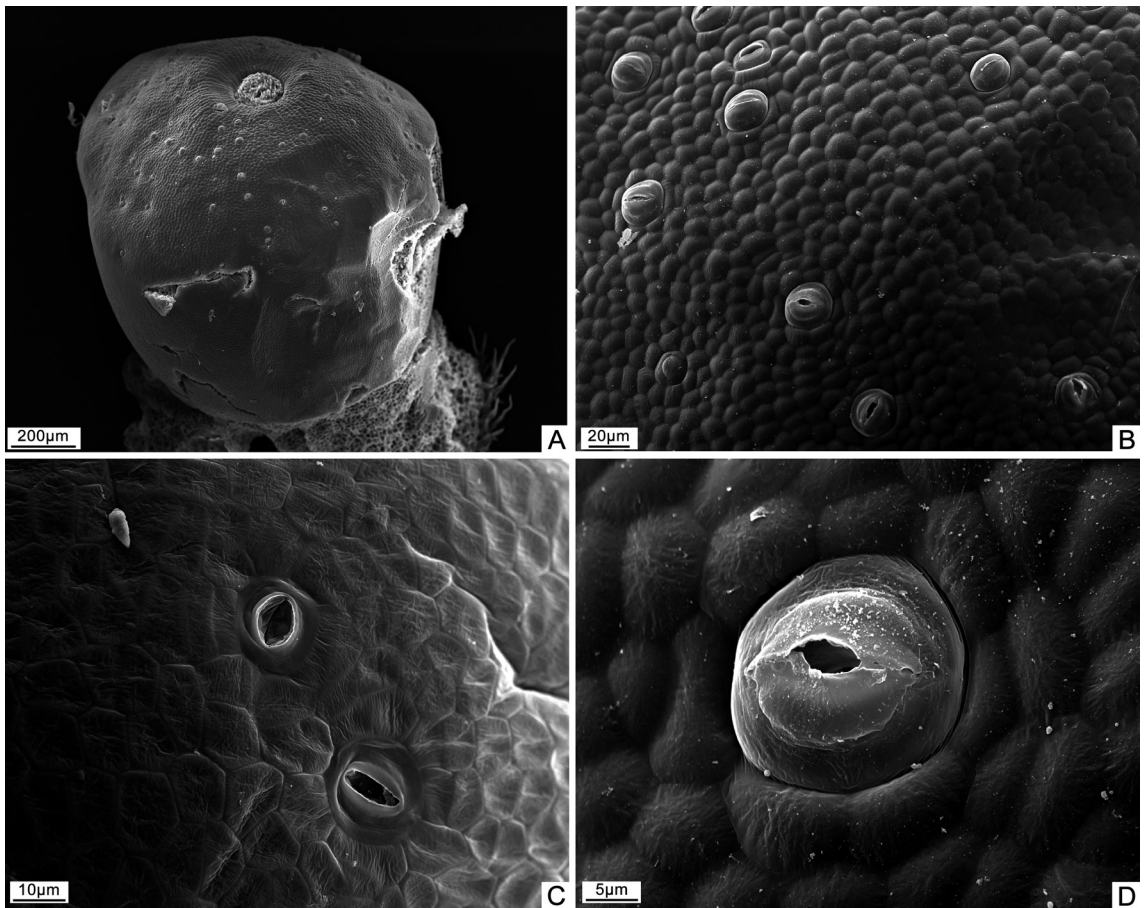


Fig. 7. Nectario en *Vitex cymosa*, visto con MEB. **A**, superficie apical del ovario con nectarostomas (70x). **B**, nectarostomas elevados sobre la epidermis (400x). **C-D**, detalle de nectarostomas abiertos, parásitos (2000x).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La floración de *Vitex cymosa*, caracterizada por gran cantidad de flores y con una duración de 40 días (considerando la floración principal de primavera), correspondería a la estrategia “cornucopia” de la clasificación de Gentry (1974), hallada en diversas especies tanto de regiones templadas como tropicales y polinizadas por gran variedad de animales, incluidas las abejas. Por otro lado, teniendo en cuenta el patrón bimodal, correspondería a la estrategia subanual de la clasificación de Newstrom et al. (1994). Pulsos en primavera y en otoño, con el primero mayor y el segundo menor, fueron reportados en varias especies de otras familias (Rama Devi et al., 1989; Galetto et al., 2000; Picó & Retana, 2001).

Vitex cymosa presenta numerosos atributos florales entomófilos y, en particular, melitófilos. La antesis diurna, el color azulado, la estructura morfo-funcional bilabiada, la presencia de guías visuales en la corola conducentes a la ubicación de la recompensa (néctar), el aroma leve, agradable (no frutal, ni rancio, ni fétido) y dulce, y la presencia de cemento polínico coinciden con las características de este síndrome floral. Los visitantes florales más frecuentes registrados confirman esta determinación. Este síndrome floral fue reportado para muchas otras especies del género (Quiroz-García et al., 2011; Rech & Absy, 2011; Hawkins & Robacker, 2019; Barrios & Ramírez, 2020; Khan et al., 2021), con la excepción de *Vitex lucens*, de polinización ornitófila (Anderson, 2003).

Tabla 2. Resultados del experimento de polinización controlada para la determinación del sistema reproductivo en *Vitex cymosa*. El tratamiento con asterisco difiere significativamente del resto ($p < 0,0001$).

Tratamiento	Cantidad de flores tratadas (cantidad de inflorescencias/cantidad de individuos)	% de frutos
Autopolinización espontánea	20 (3/3)	75
Geitonogamia manual	15 (2/2)	80
Alogamia mediada por polinizadores	8 (2/2)	88
Polinización natural	20 (3/3)	100
Apomixis	10 (2/2)	10 *

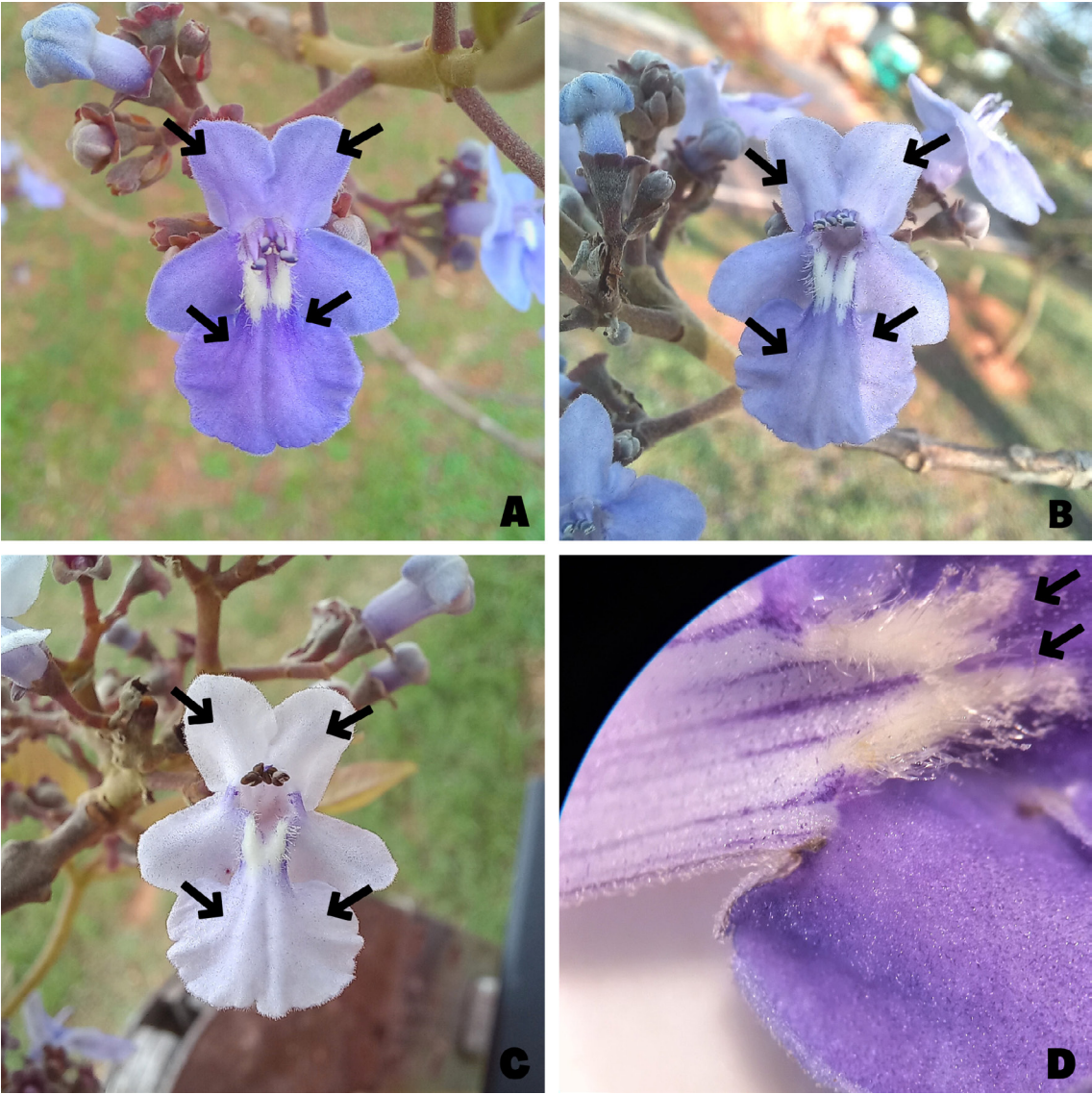


Fig. 8. Atractivos visuales de la flor de *Vitex cymosa*. **A-C**, coloración y diferentes grados de saturación de la corola en el espectro visible; nótese los pliegues convergentes hacia el centro de la flor (flechas). **D**, detalle del interior del tubo corolino, con estrías violetas y mácula blanca, bilobada y vilosa en la base del lóbulo medio inferior (flechas) (30x). Figura en color en la versión en línea <http://www.ojs.darwin.edu.ar/index.php/darwiniana/article/view/1096/1296>

No obstante, en otras especies melitófilas, también se registraron visitas de avispas y mariposas (Kumar et al., 2017). Los estambres, adnatos por su base al labio superior, y la disposición de la cara dehiscente de las anteras hacia el labio inferior, permiten el depósito del polen en forma nototriba. El néctar remanente en algunas flores después de la abscisión de la corola contribuiría a una mayor atracción general a cada planta: por un lado, a visitantes florales con función

polinizadora, como *Tetragonisca fiebrigi*; por otro, a visitantes con una función adicional, como las avispas, que es probable que usen este recurso más accesible una vez abscisa la corola y busquen presas tanto dentro como entre las flores; en este último caso, la disponibilidad del néctar sobre el ovario contenido sólo por el cáliz funcionaría como un nectario post-floral (Schmid, 1988 citado en Bernardello, 2007), atractivo de predadores de insectos herbívoros.



Fig. 9. Visitantes florales de *Vitex cymosa*. **A.** *Apis mellifera*. **B.** *Tetragonisca fiebrigi* libando el néctar luego de la abscisión de la corola (derecha), que queda expuesto sobre el ovario (izquierda). **C.** *T. fiebrigi* colectando polen. **D.** *Plebeia* sp. colectando polen. **E.** *Trigona* sp. **F.** *Polybia ignobilis*. **G.** *Polybia occidentalis*. Figura en color en la versión en línea <http://www.ojs.darwin.edu.ar/index.php/darwiniana/article/view/1096/1296>

Tabla 3. Visitantes florales y su actividad en las flores o inflorescencias.

Orden	Familia	Especie	Actividad	Contacto de anteras y estigma
Hymenoptera	Apidae (Apini)	<i>Apis mellifera</i>	Legítima	Si
	Apidae (Bombini)	<i>Bombus</i> sp.	Legítima	Si
	Apidae (Centridini)	<i>Centris</i> sp.	Legítima	Si
	Apidae (Meliponini)	<i>Plebeia</i> sp.	Legítima e ilegítima	Si
	Apidae (Meliponini)	<i>Tetragonisca fiebrigi</i>	Legítima e ilegítima	Si
	Apidae (Meliponini)	<i>Trigona</i> sp.	Legítima	Si
	Vespidae	<i>Polybia ignobilis</i>	Legítima e ilegítima	Si
	Vespidae	<i>Polybia occidentalis</i>	Legítima e ilegítima	Si
Lepidoptera	Hesperiidae	Hesperiidae sp. 1	Legítima	Si
	Hesperiidae	Hesperiidae sp. 2	Legítima	Si
	Nymphalidae	Nymphalidae sp. 1	Legítima	Si

El nectario de *V. cymosa* corresponde a un origen ginoecial (Bernardello, 2007) y el néctar es liberado a través de nectarostomas. Nectarostomas con ubicación similar (en la pared del ovario) y liberación del néctar a través de nectarostomas han sido descritos en *Vitex chinensis* (Yufang et al., 2000), en especies de otros géneros de la familia Lamiaceae, por ej., en *Mentha* L. (Bonzani et al., 2011) y en otras familias (citas en Nepi, 2007), tanto en nectarostomas con distinta morfología y origen, por ej. en el anular receptacular de *Passiflora* (Durkee et al., 1981), como en extraflorales, por ej., en la cara abaxial de tépalos (Galletto & Bernardello, 1992). Generalmente ocurren en forma agrupada, constituyendo “campos de poros” (*pore fields*; Vogel, 1998), como en este caso. Se ha mencionado que este tipo de estomas raramente cierran (Davis & Gunning, 1992) y que están elevados sobre la epidermis sólo en nectarostomas activos (citas en Nepi, 2007); sin embargo, en este trabajo se encontraron nectarostomas abiertos y cerrados en un mismo órgano de un mismo espécimen (por tanto, fijado en una misma instancia de secreción). En algunas especies se reportaron estomas inmaduros cerrados durante la fase secretora, y en otras se estimó que una proporción del total de estomas de un nectario es suficiente para liberar el néctar producido (citas en Nepi, 2007); por lo que es posible que no todos los nectarostomas observados del nectario de *V. cymosa* fueran funcionales.

Los pliegues del limbo, incluido el pliegue entre los dos hemilimbos del lóbulo mayor, conforman un patrón de guías radiales (visuales y táctiles) hacia el centro de la flor, que, en conjunto con la mácula del labio inferior a la entrada del tubo, y las estrías

longitudinales en éste, constituirían guías hacia el néctar, acumulado sobre el ovario en la base del tubo. La disposición y coloración de las anteras (agrupadas en la entrada del tubo y contrastantes con el limbo), también contribuirían a indicar el acceso al néctar. Es probable que este patrón visual se corresponda o complementa con guías en el espectro UV.

Si bien los pelos glandulares de los filamentos estaminales son más cortos y con menos células que los de la corola (tanto los del limbo como los del tubo), tienen forma similar; es posible que todos conformen osmóforos de tipo tricomático, liberando los compuestos volátiles que producen el aroma detectado en ambos ciclos.

Los resultados de los tratamientos del sistema reproductivo indican que *V. cymosa* es autocompatible en alto grado, comparando los porcentajes obtenidos con los valores citados por Dafni (1992), y no dependiente de polinizadores para la formación de frutos. Esto se deduce debido a la diferencia no significativa entre los resultados de los tratamientos de autopolinización espontánea y los tratamientos de geitonogamia manual, alogamia medida por polinizadores y polinización natural. A la vez, los polinizadores pudieron contribuir a la polinización cruzada o alogamia (ya sea geitonogamia o xenogamia, según el hábito de visita). La presencia de este sistema reproductivo mixto (que fructifica exitosamente, i.e., polinización natural = 100%) fue reportada en otras especies del género (Kumar et al., 2017). La leve hercogamia podría contribuir a la polinización cruzada; si bien, al ser la separación espacial corta, también es posible que se deposite polen de la propia flor (cuando ésta abre o con los movimientos del

viento sobre la inflorescencia, acercando las anteras, versátiles, y el estigma, como se observó en las flores embolsadas de autopolinización espontánea, que poseían polen depositado). Respecto al crecimiento ovárico por apomixis, a pesar de que ocurrió en baja frecuencia, como se han reportado sospechas de este fenómeno en *V. negundo* (Large & Mabberley, 1995), es probable que sea frecuente en el género y amerita estudios en mayor profundidad. Este modo de reproducción, aunque ha sido reportado en más de 300 especies, predomina en 3 familias: Asteraceae, Poaceae y Rosaceae (Pandey, 1997); no obstante, es posible que esté subexplorado (Richards et al., 1996); incluso, dentro de una misma especie, puede variar en distintas etapas serales (Richards, 1996).

Entre los visitantes florales registrados, *Apis mellifera* fue el más frecuente y contactó los ciclos reproductivos. *Apis mellifera* puede desempeñarse como polinizador de muchas especies debido a que se ha dispersado por todo el mundo y a su condición poliléctica y politrópica. Es necesario tener en cuenta que, si bien *A. mellifera* puede ser el visitante más frecuente respecto de los polinizadores nativos de una especie dada (ej., Eynard & Galetto, 2002), no siempre poliniza, y, aunque lo haga, no siempre es el polinizador más eficiente (ej., Baranzelli et al., 2020). Esto se puede deber a un desajuste en los tamaños relativos y fuerzas implicadas entre estas abejas y las flores que visita (Amela García & Hoc, 1997) o a la transferencia de polen geitonogámico, especialmente en especies autocompatibles, dada su constancia de forrajero (Tautz, 2010). Estos efectos se han observado no sólo a nivel específico, sino también comunitario (Agüero et al., 2018; Gualdoni Becerra et al., 2021), tanto en plantas silvestres (Gualdoni Becerra, 2022) como en cultivos (Garibaldi et al., 2013; Monzón & Ruz, 2018). Si bien para muchos cultivos extensivos, por la ventaja numérica frente a polinizadores nativos, si es el más eficiente (Abrol, 2012), es necesario estudiar y concluir al respecto sobre cada caso en particular. En el caso de *V. cymosa*, las numerosas visitas sucesivas a flores del mismo individuo en cada ronda de visitas transferirían polen geitonogámico que, en esta especie autocompatible, contribuiría a la producción de frutos, pero no al intercambio genético. Es ampliamente conocido que el intercambio genético (en el caso de las plantas, mediado por un agente polinizador) contribuye a la variabilidad y ésta a mayores probabilidades de

adaptación; por lo tanto, a la permanencia de las especies en ambientes cambiantes (Percival, 1965). Esta posibilidad de recombinación genética, y consecuente variación y capacidad de adaptación, adquiere más relevancia en el contexto del cambio climático actual; ya se comprobó que afecta diferentes rasgos funcionales, no sólo de las plantas, como proporción de sexos (Petry et al., 2016) y época de floración (Iler et al., 2013), sino también de los polinizadores, como actividad estacional (Stemkovski et al., 2020) y abundancia (Pardee et al., 2022).

El resto de las especies de abejas también polinizarían (en el caso de *Plebeia* sp. solamente cuando visita legítimamente las flores; cuando las visita ilegítimamente sería hurtador de polen). Estas abejas, a pesar de tener un tamaño menor que *Apis mellifera*, mediante sus movimientos durante las visitas legítimas contactaban las estructuras reproductivas. No obstante, dado que todas las especies de abejas reportadas son sociales y suelen visitar muchas flores de la misma planta, a excepción de *Centris*, estarían transfiriendo mayoritariamente polen geitonogámico y no estarían contribuyendo en gran medida a la polinización cruzada. También serían polinizadores las avispas, que lograrían acceder al néctar cuando gotas de éste se encuentran esparcidas a lo largo y en la entrada del tubo, a consecuencia de la orientación de la flor (patente-péndula), contactando así los ciclos reproductivos con el dorso de la cabeza). Kumar et al. (2017), en *V. negundo*, también observaron visitas legítimas de avispas (posándose sobre el labio inferior, contactando los ciclos reproductivos con el dorso de la parte anterior del cuerpo y accediendo al néctar). Las mariposas podrían polinizar, como lo harían en *V. negundo*, donde en forma equivalente visitan de manera legítima (Kumar et al., 2017).

Mediante el presente trabajo se logró describir en detalle los atributos florales de *Vitex cymosa*, determinar su sistema reproductivo y registrar visitantes florales y su función en una localidad dentro de su área de distribución. En estudios futuros, sobre la base del conocimiento de la biología floral aquí aportado, se prevé indagar en la anatomía, histología y funcionalidad post-floral del nectario así como en la presencia y eficiencia de los polinizadores (eventualmente éstos y/u otros) en poblaciones de *V. cymosa* en áreas sin antropización.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecemos muy especialmente el apoyo de los asistentes de campo, Richard, Patrick y Benjamin Elsam, así como del Dr. Bolívar Garcete por la identificación de los visitantes florales, del Ing. Juan M. De Egea por los cálculos matemáticos y del Lic. Andriy Basylenko por ayuda con el análisis estadístico. Agradecemos también al servicio de Microscopía Electrónica de Barrido de la Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrol, D. P. 2012. Pollination Biology: Biodiversity Conservation and Agricultural Production. Springer, NY.
- Agüero, J. I.; O. Rollin, J. P. Torretta, M. A. Aizen, F. Requiere & L. A. Garibaldi. 2018. Impactos de la abeja melífera sobre plantas y abejas silvestres en hábitats naturales. *Ecosistemas* 27(2): 60-69. DOI: <https://doi.org/10.7818/ECOS.1365>
- Amela García, M. T. & P. S. Hoc. 1997. Floral biology and reproductive system of *Passiflora caerulea* (Passifloraceae). *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* 70(1): 1-20.
- Anderson, S. H. 2003. The relative importance of birds and insects as pollinators of the New Zealand flora. *New Zealand Journal of Ecology* 27(2): 83-94.
- APG. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 1-20.
- Baranzelli, M. C.; S. Benítez-Vieyra, E. Glinos, A. Trenchi, S. Córdoba, J. Camina, L. Ashworth, A. N. Sérsic, A. A. Cocucci & J. Fornoni. 2020. Daily fluctuations in pollination effectiveness explain higher efficiency of native over exotic bees in *Lepechinia floribunda* (Lamiaceae). *Annals of Botany* 125: 509-520. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcz187>
- Barrell, P. J.; T. E. Richardson & R. C. Gardner. 1997. Molecular markers and experimental pollinations reveal self-fertility and high levels of natural inbreeding in the New Zealand endemic tree *Vitex lucens* (puriri). *New Zealand Journal of Botany* 35(4): 535-543. DOI: <https://doi.org/10.1080/0028825X.1987.10410177>
- Barrios, Y. & N. Ramírez. 2020. Biología floral y solapamiento fenológico de las angiospermas de un bosque inundable, cuenca del lago de Maracaibo, Venezuela. *Acta Botanica Mexicana* 127: e1704. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm127.2020.1704>
- Bernardello, G. 2007. A systematic survey of floral nectaries. En: Nicolson, S. W., Nepi, M. & Pacini, E. (eds.). *Nectaries and nectar*. Springer, Dordrecht, pp. 19-47. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5937-7_2
- Bonzani, N. E.; V. S. Bravi & G. E. Barboza. 2011. Estudios morfo-anatómicos de gineceo y fruto en especies de *Mentha* (Lamiaceae) de Argentina. *Caldasia* 33(2): 349-366.
- Cabral, C.; M. Möller & F. Sales. 2008. The Palynological Compass: A case study in Viticoideae (*Vitex* L.). *Microscopy and Microanalysis* 14(S3): 158-161. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1431927608089757>
- Cabrera, A. L. & A. Willink. 1973. Biogeografía de América Latina. Monografía 13, Serie de Biología, OEA, Washington, D.C., 120 pp
- Cerqueira, R. O.; B. N. Frey, E. Leclerc & E. Brietzke. 2017. *Vitex agnus-castus* for premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder: a systematic review. *Archives of women's mental health* 20(6): 713-719. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00737-017-0791-0>
- CIFOR. 2021. *Vitex pubescens*. Center for International Forestry Research (CIFOR). Disponible en <https://www.cifor.org/feature/energy-from-forests/vitex-pubescens/> (consultado 20 noviembre 2021).
- Dafni, A. 1992. Pollination ecology, a practical approach. Oxford University Press, Oxford.
- Davis, A. R. & B. E. S. Gunning. 1992. The modified stomata of the floral nectary of *Vicia faba* L. 1. Development, anatomy and ultrastructure. *Protoplasma* 166: 134-152.
- Dos Santos, T. C.; J. Schripsema, F. D. Monache & S. G. Leitao. 2001. Iridoids from *Vitex cymosa*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 12(6): 763-766.
- Durkee, L. T.; D. J. Gaal & W. H. Reisner. 1981. The floral and extrafloral nectaries of *Passiflora*. I. The floral nectary. *American Journal of Botany* 68: 453-462.
- Eynard, C. & L. Galetto. 2002. Pollination ecology of *Geoffroea decorticans* (Fabaceae) in central Argentine dry forest. *Journal of Arid Environments* 51: 79-88. DOI: <https://doi.org/10.1006/jare.2001.0923>
- Faegri, K. & L. van der Pijl. 1979. The Principles of Pollination Ecology. 3rd ed. rev. Pergamon Press. Oxford, England.
- França, F. & N. O'Leary. 2018. *Vitex* L. En: F. Zuloaga & A. Anton (eds), *Flora Argentina* Vol. 20(1): 275-276. Buenos Aires, Editorial Sigma.
- Galetto, L. & L. M. Bernardello. 1992. Extrafloral nectaries that attract ants in Bromeliaceae: structure and nectar composition. *Canadian Journal of Botany* 70: 1101-1106. DOI: <https://doi.org/10.1139/b92-136>
- Galetto, L.; G. Bernardello, I. C. Isele, J. Vesprini, G. Speroni & A. Berduc. 2000. Reproductive biology of *Erythrina cristagalli* (Fabaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 87(2): 127-145.

- Garibaldi, L. A.; I. Steffan-Dewenter, R. Winfree, M. A. Aizen, R. Bommarco & al. 2013. Wild pollinators enhance fruit set of crops regardless of honey bee abundance. *Science* 339(6127): 1608-1611.
- Gentry, A. H. 1974. Flowering phenology and diversity in tropical Bignoniaceae. *Biotropica* 6(1): 64-68.
- Gualdoni Becerra, A. L. 2022. Polinización de plantas nativas y exóticas en un ecosistema de reciente formación. Tesis de grado, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Gualdoni Becerra, A. L.; M. T. Amela García & H. Sirolli. 2021. Red de interacción planta-polinizador en un ambiente protegido en restauración. XIX Reunión Argentina de Ecología, Tucumán, Argentina.
- Guevara, M.; L. A. Valdés-Silverio, M. G. Granda-Albuja, G. Iturralde, T. Jaramillo-Vivanco, F. Giampieri, C. Santos-Buelga, A. M. González-Paramás, M. Battino & J. M. Álvarez-Suarez. 2020. Pechiche (*Vitex cymosa* Bertero ex Speng), a nontraditional fruit from Ecuador, is a dietary source of phenolic acids and nutrient minerals, in addition to efficiently counteracting the oxidative-induced damage in human dermal fibroblasts. *Antioxidants* 9: 109. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9020109>
- Hawkins, S. M. & C. D. Robacker. 2019. Attractiveness of species of *Vitex* (Chastetree) to pollinators. *Journal of Environmental Horticulture* 37(1): 24-29.
- Iler, A. M.; T. T. Høye, D. W. Inouye & N. M. Schmidt. 2013. Long-term trends mask variation in the direction and magnitude of short-term phenological shifts. *American Journal of Botany* 100(7): 1398-1406.
- Inouye, D. W. 1980. The terminology of floral larceny. *Ecology* 61: 1251-1253.
- Kearns, C. & W. Inouye. 1993. Techniques for Pollination Biologists. University Press, Colorado.
- Kelly, K. L. 1965. Inter-Society Color Council National Bureau of Standards color-name charts illustrated with centroid colors. Standard sample N° 2106 Supp. to Nat. Bur. Standards Cir. 553. U.S. Government Printing Office, Washington, D. C.
- Khan, S.; P. Kumari, I. A. Wani & S. Verma. 2021. Pollination biology and breeding system in *Vitex negundo* L. (Lamiaceae), an important medicinal plant. *The International Journal of Plant Reproductive Biology* 13(1): 77-82.
- Kumar, B. D.; D. S. Deepika & A. J. Solomon Raju. 2017. Reproductive ecology of the semi-evergreen tree *Vitex negundo* (Lamiaceae). *Phytologia Balcanica* 23(1): 39-53.
- Large, M. F. & D. J. Mabberley. 1995. An assessment of pollen morphology in the genus *Vitex* L. (Labiatae). *Grana* 34: 291-299.
- Leitao, S. G.; O. Castro, E. N. Fonseca & al. 2006. Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16(1): 6-11. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000100003>
- Leitao, S. G.; T. C. Dos Santos, F. D. Monache, M. E. Matheus, P. D. Fernandes & B. G. Marinho. 2011. Phytochemical profile and analgesic evaluation of *Vitex cymosa* leaf extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 21(5): 874-883. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000160>
- López, J. A.; E. L. Little Jr., G. Ritz, J. Rombold & W. Hahn. 2002. Árboles comunes del Paraguay; Ñande yvyra mata kuéra. Cuerpo de Paz, Colección e Intercambio de Información, Facultad de Ciencias Agrarias (UNA). 458p.
- Lorenzi, H. 1998. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2da. Ed. Nova Odessa, Editora Plantarum. Sao Paulo. 338p.
- Mariano, A. M. C.; K. P. dos Santos & M. F. Ribeiro. 2017. Visitantes florais da alfazema-do-campo (*Vitex agnus-castus*) em Petrolina, Pernambuco. Anais do Encontro de Apicultores e Meliponicultores de Ouricuri. *Caderno Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável* 7(1): 13-15.
- Meza Miranda, E. R.; A. Samudio, F. Ferreira, R. Gómez, B. Rojas, F. Fernández, R. Burgos, G. Cardozo, A. Pérez & F. Priego. 2021. Polyphenol content and antioxidant capacity of the Tarumá (*Vitex cymosa*) tree and the potential health benefits. *Journal of Excipients and Food Chemicals* 12(4): 87-92.
- Monteiro, F. K. S.; J. F. B. Pastore & J. I. M. Melo. 2018. The Flora of Paraíba State, Brazil: subfamilies Ajugoideae and Viticoideae (Lamiaceae). *Biota Neotropica* 18(3): e20170472. DOI: <https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2017-0472>
- Monzón, V. & L. Ruz. 2018. Estudio de Caso: Determinación del Servicio Ecosistémico de Polinización de Artrópodos Nativos en Agroecosistemas, de la Localidad de Caleu, Til-Til. MMA-ONU Medio Ambiente, Santiago, Chile.
- Morrone, J. J. 2014. Biogeographical regionalization of the Neotropical region. *Zootaxa* 3782(1): 1-110. DOI: <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3782.1.1>
- Nepi, M. 2007. Nectary structure and ultrastructure. En: Nicolson, S.W., M. Nepi & E. Pacini (eds.). Nectaries and nectar. Springer, Berlin, pp. 129-166.
- Newstrom, L. E.; G. W. Frankie & H. G. Baker. 1994. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical rain forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* 26: 141-159.
- Pandey, A. K. 1997. *Introduction to Embryology of Angiosperms*. CBS Publishers & Distributors, Nueva Delhi.

- Pardee, G. L.; S. R. Griffin, M. Stemkovski, T. Harrison, Z. M. Portman, M. R. Kazenel, J. S. Lynn, D. W. Inouye & R. E. Irwin. 2022. Life-history traits predict responses of wild bees to climate variation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 289: 20212697. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.2697>
- Payne, W. W. 1978. A glossary of plant hair terminology. *Brittonia* 30: 239-255.
- Percival, M. S. 1965. *Floral ecology*. Pergamon Press, Oxford.
- Petry, W. K.; J. D. Soule, A. M. Iler, A. Chicas-Mosier, D. W. Inouye, T. E. X. Miller & K. A. Mooney. 2016. Sex-specific responses to climate change in plants alter population sex ratio and performance. *Science* 353(6294): 69-71. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.aaf258>
- Picó, F. X. & J. Retana. 2001. The flowering pattern of the perennial herb *Lobularia maritima*: an unusual case in the Mediterranean basin. *Acta Oecologica* 22: 209-217.
- POWO. 2021. Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://www.plantsoftheworldonline.org/> (consultado 21 noviembre 2021).
- Quiroz-García, D. L.; M. L. Arreguín-Sánchez, R. Fernández-Nava & E. Martínez-Hernández. 2011. Patrones estacionales de utilización de recursos florales por *Scaptotrigona hellwegeri* en la Estación de Biología Chamela, Jalisco, México. *Polibotánica* 31: 89-119.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org/>
- Rama Devi, K.; J. B. Atluri & C. Subba Reddi. 1989. Pollination ecology of *Zizyphus mauritiana* (Rhamnaceae). *Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Plant Sciences)* 99(3): 223-239.
- Rani, A. & A. Sharma. 2013. The genus *Vitex*: a review. *Pharmacognosy Reviews* 7(14): 188-198.
- Rech, A. R. & M. L. Absy. 2011. Pollen sources used by species of Meliponini (Hymenoptera: Apidae) along the Rio Negro channel in Amazonas, Brazil. *Grana* 50(2): 150-161. DOI: <https://doi.org/10.1080/00173134.2011.579621>
- Richards, A. J. 1996. Breeding systems in flowering plants and the control of variability. *Folia Geobotanica Phytotaxonomica* 31(3): 283-293.
- Richards, A. J., J. Kirschner, J. Stepánek & K. Marhold. 1996. Apomixis and taxonomy: an introduction. *Folia Geobotanica Phytotaxonomica* 31(3): 283-282.
- Sorriavas de Lozano, V. & J. Morales. 1986. Introducción a la microscopia electrónica. CRIBABB. Bahía Blanca. Argentina.
- Stemkovski, M.; W. D. Pearse, S. R. Griffin, G. L. Pardee, J. Gibbs, T. Griswold, J. L. Neff, R. Oram, M. G. Rightmyer, C. S. Sheffield, K. Wright, B. D. Inouye, D. W. Inouye & R. E. Irwin. 2020. Bee phenology is predicted by climatic variation and functional traits. *Ecology Letters* 23(11): 1589-1598. DOI: <https://doi.org/10.1111/ele.13583>
- Sun, X.; F. Wang, R. Cui, X. Liu, X. Li, J. Dong, L. Sun, S. Qin, R. Wang, P. Zheng & H. Wang. 2020. Studies on reproductive strategies of *Vitex negundo* L. var. *heterophylla* (Franch.) Rehder (Lamiaceae) based on morphological characteristics and SSR markers. *Ecology and Evolution* 10: 5270-5280. DOI: <https://doi.org/10.1002/ece3.6271>
- Tautz, J. 2010. O fenômeno das abelhas. Artmed, Porto Alegre.
- Trigo, M. M. 1993. Contribución al estudio polínico de especies ornamentales: Acanthaceae y Verbenaceae. *Acta Botanica Malacitana* 18: 135-146.
- Troncoso, N. S. 1974. Los géneros de Verbenáceas de Sudamérica extratropical (Argentina, Chile, Bolivia, Paraguay, Uruguay y Sur de Brasil). *Darwiniana* 18(3-4): 295-412.
- Tropicos. 2021. *Vitex cymosa*. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <https://tropicos.org/name/33701046> (consultado 20 noviembre 2021).
- Van Die, M. D.; H. G. Burger, H. J. Teede & K. M. Bone. 2013. *Vitex agnus-castus* extracts for female reproductive disorders: a systematic review of clinical trials. *Planta medica* 79(7): 562-575. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0032-1327831>
- Vogel, S. 1998. Remarkable nectaries: structure, ecology, organophyletic perspectives. IV. Miscellaneous cases. *Flora* 193: 225-248.
- Yufang, C.; C. Qinggang, X. Hua, T. Shirong & L. Ruiyun. 2000. Developmental and anatomical studies on the floral nectary in *Vitex chinensis* Wuhan zhi wu xue yan jiu = *Wuhan Botanical Research* 18(5): 363-367.
- Zuloaga, F. O.; M. J. Belgrano & C. A. Zanotti, 2019. Actualización del Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. *Darwiniana, nueva serie* 7(2): 208-278. DOI: <https://doi.org/10.14522/darwiniana.2019.72.861>