

## BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE *COLOGANIA BROUSSONETII* (FABACEAE, FABOIDEAE)

Mariana L. Musicante<sup>1</sup> & Leonardo Galetto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigaciones Entomológicas de Córdoba, Universidad Nacional de Córdoba, Casilla de correo 495, 5000 Córdoba, Argentina; marymusi@hotmail.com (autor corresponsal).

<sup>2</sup>Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal, Universidad Nacional de Córdoba, Casilla de Correo 495, 5000 Córdoba, Argentina.

**Abstract.** Musicante, M. L. & L. Galetto. 2008. Reproductive biology of *Cologania broussonetii* (Fabaceae, Faboideae). *Darwiniana* 46(1): 7-16.

The breeding system, fruit set, seed set, floral visitors and pollination of *Cologania broussonetii* were studied. Four pollination treatments were applied: autogamy, geitonogamy, xenogamy, and natural pollination (flowers exposed to pollinators). The frequency of visits was recorded, and pollen grains deposited per stigma on bagged (self pollen deposition) and exposed flowers were counted. The results indicate that this species is self-compatible and autogamous. A small number of low quality fruits and seeds (lowest mass and germination capability) were obtained by spontaneous self-pollination. When fruits obtained by natural pollination were analyzed, a specific pattern of seed formation was detected: ovules were successively fertilized from the apical to the basal portion of the ovary. However, no pattern was observed for seed abortion. The frequency of visits of possible pollinators (species of *Bombus*) was very low. The number of pollen grains per stigma was similar on bagged and exposed flowers. Nevertheless, the comparison of quantity and quality of fruits and seeds obtained by natural and autonomous self-pollination suggests that the visits of pollinators contribute to increase the quality of seeds (higher mass and germination capability).

**Keywords.** Argentina, Chaco Serrano, *Cologania*, Fabaceae, reproduction, self-compatibility.

**Resumen.** Musicante, M. L. & L. Galetto. 2008. Biología reproductiva de *Cologania broussonetii* (Fabaceae, Faboideae). *Darwiniana* 46(1): 7-16.

Se estudió el sistema reproductivo, la producción natural de frutos y semillas, y el papel de los polinizadores en *Cologania broussonetii*. Se realizaron cuatro cruzamientos controlados: autopolinización espontánea, autopolinización manual, polinización cruzada y polinización natural (flores expuestas a los polinizadores). Se registró la frecuencia de visitas de los polinizadores y se cuantificó el número de granos de polen depositados en el estigma de flores expuestas a los polinizadores y en flores aisladas (autodepósito de polen). Los resultados obtenidos indican que esta especie es autocompatible y autógena. Los frutos y semillas obtenidos por autopolinización espontánea fueron pocos y los de menor calidad (menor masa y germinabilidad). Al analizar los frutos producidos por polinización abierta se infiere que las semillas se forman siguiendo un patrón determinado: primero son fertilizados los óvulos próximos al estigma y por último los más alejados. Sin embargo, no se encontró un patrón en el aborto de semillas dentro del fruto. La frecuencia de visita de los posibles polinizadores (especies de *Bombus*) fue muy baja. El número de granos de polen depositados en el estigma fue muy similar entre flores expuestas a los visitantes y aquellas aisladas. Sin embargo, al comparar la calidad y cantidad de frutos y semillas obtenidos por polinización abierta y por autopolinización se infiere que la visita de los polinizadores es importante para la producción de semillas de mejor calidad (mayor masa y germinabilidad).

**Palabras clave.** Argentina, autocompatibilidad, *Cologania*, Chaco Serrano, Fabaceae, reproducción.

## INTRODUCCIÓN

La polinización es una de las interacciones más importantes en el ciclo de vida de las plantas vasculares (Feinsinger, 1987), ya que la fructificación depende en gran medida de esta relación mutualista. Muchas flores zoófilas especializadas se han diversificado en correspondencia a los animales polinizadores, produciendo biotipos florales definidos que sugieren una relación especializada con un gremio particular de polinizadores (Vogel, 1990). La importancia relativa de una determinada interacción de polinización para la planta es proporcional a su frecuencia (e.g., tasa de visitas) y a la magnitud de las consecuencias reproductivas (e.g., producción de semillas; Herrera, 1989; Gutiérrez et al., 1993 y trabajos allí citados). Existen otros factores que limitan la eficacia biológica de una planta, como el número inicial de óvulos producidos por la flor (Herrera, 1987; Navarro, 1996), la cantidad de recursos disponibles para la maduración de las semillas (limitación por recursos), la incidencia de predación y herbivoría, enfermedades, entre otras (Lee, 1988; Stephenson, 1992).

El conocimiento del sistema reproductivo es esencial para la evaluación, entre otros aspectos, de la producción de semillas, de la tasa y tipo de polinización, que ayudan a la comprensión de los mecanismos de flujo génico dentro y entre poblaciones (Barrett & Eckert, 1990). La autoincompatibilidad es el principal y más efectivo mecanismo para la prevención de la autofertilización en plantas, al impedir la germinación del polen o la fertilización cuando el polen es del mismo individuo (e.g., Barrett, 1988; Dafni, 1992). Para muchas especies, la autofertilización suele ser considerada una condición desventajosa, ya que aumenta la probabilidad de que alelos recesivos que determinan menor eficacia biológica en la especie adquieran un estado homocigota (Wells, 1978). Por ejemplo, en algunas especies los frutos producidos por autopolinización tienen menor número de semillas, o son de menor tamaño, o poseen semillas con menor capacidad para germinar, o una mayor probabilidad de aborto que los frutos y semillas producidos por polinización cruzada (e.g., Stephenson, 1981; Lee, 1988). Sin embargo, la autocompatibilidad en flores hermafroditas podría resultar ventajosa en casos donde, por ejemplo, los polinizadores son escasos o poco confiables (Richards,

1986), en situaciones ambientales adversas que no permiten la dispersión del polen (lluvia constante, sequía, frío extremo), cuando nuevas poblaciones se fundan a partir de individuos aislados, o cuando el estado homocigota recesivo es ambientalmente más apto (Wells, 1978 y trabajos allí citados.).

Desde el punto de vista energético, el componente más importante del fruto es la semilla. Un incremento en el tamaño de las semillas puede tener un costo reproductivo para la planta, por ejemplo al producirse menos semillas por fruto o menos frutos por planta (Primack, 1987 y trabajos allí citados). En general, las semillas más grandes tienen mayor probabilidad de germinar y sobrevivir (Stephenson, 1992).

Asimismo, puede ocurrir que sólo una pequeña proporción de los óvulos disponibles resulte en la formación de semillas maduras (Hossaert & Valero, 1988 y trabajos allí citados; Bawa & Buckley, 1989). Los frutos lineares de algunas leguminosas ofrecen una oportunidad particular para estudiar la posible influencia de distintos factores que, de manifestarse, determinarán patrones opuestos en la maduración de semillas dentro del fruto. Si ese patrón está relacionado con la menor disponibilidad de recursos maternos, se esperaría que maduren más semillas cerca de la base del ovario y menos hacia el ápice (Bawa & Buckley, 1989). En cambio, si ese patrón está relacionado con el encuentro de los óvulos con los tubos polínicos, se esperaría que maduren más semillas cerca del ápice del ovario y menos hacia la base (Hossaert & Valero, 1988 y trabajos allí citados). En este sentido, dentro de Fabaceae se han observado patrones no al azar en la maduración de semillas (e.g., Bawa & Buckley, 1989).

*Cologania* (Fabaceae, Faboideae) es un género americano que se extiende desde Estados Unidos hasta Argentina central. *Cologania broussonetii* (Balb.) DC. es la única especie que crece en Argentina. Se distribuye desde la Provincia de San Luis, sierras de Córdoba, Jujuy y Tucumán hasta los Andes orientales en Bolivia (Burkart, 1952). Es una hierba perenne, cuyos tallos volubles alcanzan unos 150 centímetros de longitud. Sus flores miden de 17 a 22 mm de largo, son fucsias, vistosas, pediceladas y bracteadas; su estandarte es elíptico y emarginado, las alas oblongas, obtusas, con quilla obtusa, mucho menor que las alas. El cáliz es tubuloso-cilíndrico, giboso en la base e hirsuto.

Los estambres son diadelfos, el vexilar libre, con anteras elípticas, dorsifijas. El fruto es una legumbre linear, comprimida, dehiscente con elasticidad, bivalva, negruzca e hirsuta (Burkart, 1952). Esta especie presenta flores que viven dos días, que producen néctar con predominio de sacarosa y en una concentración del 17% (Musicante, 2002).

La indagación de algunos de los aspectos, factores y variables con relación a la reproducción de las plantas mencionados anteriormente, nos permitirá comprender mejor la capacidad reproductiva de esta especie y su relación con las interacciones de polinización. El objetivo general de este trabajo es estudiar la biología reproductiva de *C. broussonetii*. Los objetivos específicos son los siguientes: a) documentar el sistema reproductivo, b) determinar el éxito reproductivo, c) determinar la cantidad y calidad de frutos y semillas producidos a partir de diferentes tratamientos de polinización, d) determinar el patrón de formación de semillas en el fruto, e) establecer si existen variaciones en la masa de las semillas y su germinabilidad, según su ubicación relativa dentro del fruto y según el número de semillas producidas por fruto, y f) estudiar la relación existente entre la carga polínica encontrada en los estigmas con la frecuencia de visitas y la calidad de frutos producidos naturalmente.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio, fenología

El trabajo de campo fue llevado a cabo durante dos temporadas (años 2001 y 2002), en una comunidad del bosque Chaqueño Serrano, localizada al pie de las Sierras Chicas (faldeo Oriental) en la Reserva Hídrica y Natural La Quebrada, provincia de Córdoba, Argentina (ca. 10 ha; 31° 09' S, 64° 20' W). La región pertenece al piso de Bosque Serrano, distrito Chaqueño Serrano, Provincia Fitogeográfica Chaqueña (Cabrera, 1976). Se caracteriza por comunidades boscosas con un estrato arbóreo generalmente abierto (Luti et al., 1979). La vegetación natural incluye especies de árboles, pequeños arbustos espinosos, epífitas y lianas, siendo en general xerofítica. En el área de estudio, *Cologania broussonetii* florece desde comienzos de febrero hasta finales de marzo, período de floración que

coincidió durante los dos años de muestreo. En general, los individuos de una misma población florecen de manera sincrónica. Los muestreos fueron realizados sobre una misma población, la primera temporada de muestreo se llevó a cabo entre el 21 de febrero y el 31 de marzo de 2001, temporada en la que se realizó la totalidad de las observaciones de los visitantes florales y parte de los cruzamientos controlados. La segunda temporada se llevó a cabo entre el 16 de febrero y el 3 de marzo (fecha en la que se cosechó el último fruto maduro), en esta ocasión se realizaron únicamente cruzamientos controlados (Tabla 1). Los ejemplares de herbario se encuentran depositados en el Museo Botánico de Córdoba (CORD, Galetto 889).

### Sistema reproductivo

Los tratamientos para conocer el sistema reproductivo se realizaron en 428 botones florales de 99 individuos, aislados de los visitantes florales con bolsas de tul. Un primer grupo de flores, luego de producirse la apertura floral, se polinizó manualmente con polen del mismo individuo (de la misma u otra flor dependiendo de la disponibilidad de polen; autopolinización manual). Un segundo grupo de flores, cuyos estigmas no habían tenido contacto con polen de la misma flor (flores previamente emasculadas), fueron polinizadas con polen de otros individuos de la misma población (polinización cruzada; se utilizó polen depositado en un eppendorf, proveniente de anteras dehiscentes de flores coleccionadas de 3-5 individuos). Un tercer grupo de flores fue mantenido dentro de las bolsas de tul durante toda su vida, a fin de cuantificar la producción de frutos sin intervención de los polinizadores (autopolinización espontánea). Un último grupo de flores fue marcado y permaneció expuesto a los visitantes florales durante toda la antesis (polinización abierta). Las ramas floríferas de los primeros tratamientos fueron inmediatamente reembolsadas hasta la senescencia floral. Se realizó el seguimiento de los frutos durante su desarrollo, y fueron luego cosechados para analizar su calidad y la de sus semillas. El porcentaje de fructificación fue obtenido de la siguiente relación: número de frutos producidos sobre número de flores tratadas por cien ( $n^\circ \text{ frutos} / n^\circ \text{ flores} \times 100$ ). El número de botones florales, el de plantas utiliza-

das y la temporada en la que se realizó cada tratamiento se encuentran detallados en la Tabla 1.

El índice de autocompatibilidad (ISI) se obtuvo como la razón entre el porcentaje de frutos producidos por autopolinización manual y el porcentaje de frutos producidos por polinización cruzada; un ISI mayor o menor a 0,20 indicaría una especie autocompatible o autoincompatible, respectivamente (Ruiz & Arroyo, 1978). El índice de autopolinización espontánea (IAS) resulta de la razón entre el porcentaje de fructificación en los tratamientos de autopolinización espontánea y el porcentaje de fructificación por autopolinización manual (Ruiz & Arroyo, 1978).

### Éxito reproductivo

De acuerdo a lo sugerido por Dafni (1992) se estimó el éxito reproductivo para cada uno de los tratamientos [(número de frutos obtenidos / número de flores tratadas) x (número promedio de semillas obtenidas por fruto / número promedio de óvulos por flor)]. Para obtener el número promedio de óvulos por flor se seccionaron bajo una lupa estereoscópica Zeiss (40 x) ovarios de 89 flores tomadas al azar de distintos individuos (n = 35 individuos) de la primera temporada y conservadas en FAA.

### Calidad de frutos y semillas

Los frutos maduros obtenidos a través de los distintos tratamientos de polinización se cosecharon, se pesaron en balanza de precisión (Mettler Toledo, modelo PB153, límite de resolución 0,002 g, e: 10 mg, d: 1 mg) y fueron medidos utilizando un calibre digital. Todas las semillas de cada fruto fueron contadas, se pesaron individualmente y posteriormente se sembraron en cápsulas de Petri sobre papel de filtro embebido en agua. Luego las cápsulas se colocaron en cámara de germinación a 2600 - 2900 lux, con fotoperíodo de 12 horas de luz, a 22 °C. Las semillas fueron regadas periódicamente a fin de mantener constantes las condiciones de humedad. Se consideraron germinadas las semillas con radícula emergente. Las cajas fueron revisadas diariamente hasta 45 días después de haber sido sembradas. El porcentaje de germinación de las semillas se estimó como: (número de

semillas germinadas / número de semillas sembradas) x 100.

### Patrón de formación de semillas en el fruto

A fin de registrar el número de semillas formadas, el número de semillas abortadas y su ubicación relativa en el fruto, se cosecharon 73 frutos maduros provenientes de polinización abierta de 24 plantas tomadas al azar durante la primera temporada, se abrieron y se observaron bajo la lupa. Luego, las semillas provenientes de 43 frutos se pesaron individualmente y posteriormente se colocaron en cápsulas de Petri sobre papel de filtro donde se registraba la ubicación relativa de la semilla en el fruto. Se consideraron germinadas las semillas con radícula emergente. Las cajas fueron revisadas diariamente hasta 45 días después de haber sido sembradas. Las cajas fueron colocadas en una cámara de germinación bajo las mismas condiciones ambientales que fueron detalladas en el ensayo anterior.

Para determinar si existen deficiencias en la disponibilidad de recursos maternos, las semillas provenientes de la mitad inferior del fruto (posiciones 1 a 7) y superior (posiciones 8 a 15) fueron pesadas individualmente y se evaluó su germinabilidad, manteniéndolas bajo idénticas condiciones ambientales que en el primer ensayo de germinación.

Para evaluar si los frutos de *C. broussonetii* presentan algún tipo de balance en cuanto a los recursos disponibles para madurar semillas (i.e., si existe un patrón entre el número de semillas producidas por fruto y el peso de las mismas), se comparó la masa de semillas provenientes de frutos cortos (con hasta 6 semillas), con aquélla de semillas provenientes de frutos largos (con 7 o más semillas). En general, un mismo individuo presenta frutos cortos y largos, los que fueron tomados al azar (2-3 por planta, cómo se explicó más arriba).

### Carga polínica

Para estimar el número de granos de polen depositados sobre el estigma por los visitantes florales se colectaron 33 estilos provenientes de flo-

**Tabla 1.** Número de plantas, ramas floríferas, frutos obtenidos en relación al número de flores tratadas y porcentajes de fructificación de *C. broussonetii* para cada tratamiento de polinización durante dos temporadas.

Tratamiento de polinización	N° de plantas		N° de ramas		Frutos / Flores tratadas (2001)	Fructificación 2001 (%)	Frutos / Flores tratadas (2002)	Fructificación 2002 (%)	Frutos / Flores tratadas (total)	Fructificación total (%)
	2001	2002	2001	2002						
Autopolinización Espontánea	18	12	34	33	64 / 103	62,14	35 / 100	35,00	99 / 203	48,77
Autopolinización Manual	17	9	12	10	18 / 38	47,37	12 / 31	38,71	30 / 69	43,48
Polinización Cruzada	12	7	12	9	6 / 36	16,67	10 / 29	34,48	16 / 65	24,62
Polinización Abierta	24	0	30	0	65 / 91	71,43	0 / 0	0	65 / 91	71,43

res senescentes (N = 11 plantas) que permanecieron expuestas a los polinizadores. Asimismo a fin de evaluar si en esta especie se produce deposición espontánea de polen, se colectaron 55 estilos, de flores (N = 17 plantas) que permanecieron excluidas de los animales visitantes durante toda su vida. Ambas colectas se realizaron durante la primera temporada de muestreo. En el campo, los pistilos de cada uno de estos dos tratamientos fueron identificados y sujetos con cinta adhesiva a portaobjetos. Posteriormente, en el laboratorio, se tiñeron con azul de algodón y se llevó a cabo el recuento total de los granos de polen por estigma con la ayuda del microscopio.

#### Visitantes florales

Las observaciones se llevaron a cabo sobre ocho grupo de plantas de *C. broussonetii*; las mismas fueron realizadas por lapsos de 10 - 15 minutos, durante distintos momentos del día (de 9 a 19 hs.) y a lo largo de la primer temporada de floración. Cada "manchón de flores" fue observado una vez por día y cada día en un momento diferente (es decir, no se observó un mismo manchón dos veces en el mismo horario). El tiempo total de observación fue de 510 minutos distribuidos en 13 días.

A fin de determinar la tasa de visita de los polinizadores se contó el número de flores abiertas, se registraron las condiciones ambientales y se observaron los animales visitantes. Se identificó cada visitante y se registró el número de flores visitadas

y la duración de la actividad de pecoreo. Se calculó la tasa de visita como: (número de flores visitadas) / número de flores observadas x tiempo. La abundancia relativa se obtuvo dividiendo el número de visitantes florales de la categoría taxonómica menor a la que se llegó (especie, género o familia), sobre el número total de visitantes florales registrados.

#### Análisis estadístico

Los supuestos evaluados antes de cada análisis fueron: la independencia de los datos (prueba de "Runs"), homogeneidad de varianza (prueba de Levene) y normalidad de las distribuciones (Kolmogorov-Smirnov: Prueba de bondad de ajuste). Según el resultado obtenido por dichas pruebas, los resultados se analizaron de la siguiente manera, utilizando el programa SPSS: en los casos en los que se cumplieron los supuestos, se utilizó estadística paramétrica, aplicándose en los mismos la prueba T para la igualdad de medias, el análisis de varianza a un factor (ANOVA), contrastes multivariados (MANOVA) y análisis de correlación de Pearson. En algunas ocasiones resultó necesario transformar las variables (arcoseno o raíz cuadrada) a fin de cumplir con los supuestos. En el texto, cuadros y figuras se presentan siempre los valores de las distintas variables en la unidad de medida en la que fueron tomadas, a fin de facilitar la lectura y comprensión de los resultados. En los casos en que no se cumplió alguno de los supuestos, se utilizó estadística no paramétrica, aplicándose en los

**Tabla 2.** Calidad de frutos y semillas de *C. broussonetii* según los distintos tratamientos de polinización realizados. Abreviaturas: n, número de frutos estudiados para cada una de las variables presentadas.

Tratamiento de polinización	n	Semillas por fruto (n°)		Óvulos sin fecundar (n°)		Semillas abortivas (n°)		Masa del total de semillas por fruto (g)		Masa del fruto (g)		Largo del Fruto (mm)		Semillas germinadas (%)
		Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	
Autopolinización Espontánea	12	4,00	2,24	1,14	1,46	1,50	1,17	0,025	0,012	0,068	0,022	27,97	3,51	83,67
Autopolinización Manual	6	6,25	5,32	3,25	2,63	3,00	3,46	0,053	0,042	0,146	0,095	44,20	6,83	52,08
Polinización Cruzada	5	7,67	1,53	5,00	2,00	0,00	0,00	0,046	0,014	0,131	0,016	45,23	1,45	92,13
Polinización Abierta	62	6,97	3,05	1,97	1,97	0,18	0,43	0,057	0,029	0,136	0,050	37,39	9,03	90,71

los mismos la prueba de Mann-Whitney, para diferencia entre dos muestras, la prueba de Kruskal-Wallis para diferencia de medias entre tres o más tratamientos. Como pruebas a posteriori se utilizó la prueba de Bonferroni (Sokal & Rohlf 1995).

## RESULTADOS

### Sistema reproductivo

Los resultados de los cruzamientos controlados indican que *C. broussonetii* es una especie auto-compatible (ISI = 1,77) y produce frutos por autopolinización espontánea (en adelante AE), lo que indica que tiene la capacidad de producir semillas por autogamia (IAS = 1,12).

Los porcentajes de fructificación fueron significativamente diferentes entre los tratamientos de polinización (H = 8,1; p = 0,0327; Tabla 1). Los tratamientos de polinización abierta (PA) y AE (71,43% y 48,77% respectivamente) presentaron los mayores porcentajes de fructificación. El menor porcentaje de fructificación lo presentó el tratamiento de polinización cruzada (PC), mientras que la autopolinización manual (AM) no difirió del resto de tratamientos.

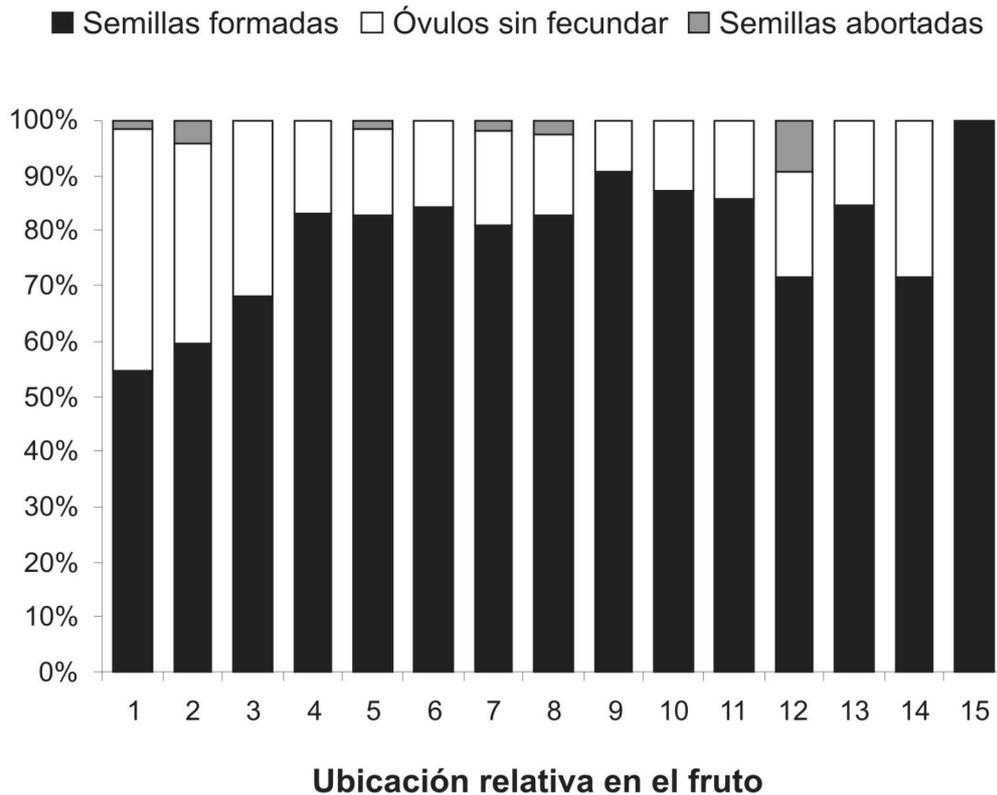
Los valores de éxito reproductivo fueron de 0,17, 0,23, 0,16 y 0,42 para los tratamientos AE, AM, PC y PA respectivamente.

Los frutos producidos por AE fueron los más

pequeños y livianos, y además presentaron el menor número y masa de semillas (Tabla 2), estas diferencias fueron estadísticamente significativas para los cuatro aspectos medidos (MANOVA,  $\lambda$  de Wilks = 2,9; p = 0,001). Los frutos obtenidos por AM fueron similares a los obtenidos por PC y por PA. Por otra parte, los porcentajes de germinación de las semillas resultaron equivalentes entre los cuatro tratamientos de polinización (H = 1,75; p = 0,62; Tabla 2).

### Patrón de formación de semillas en el fruto

El porcentaje de semillas formadas en relación al número de óvulos disponibles fue mayor para la mitad superior que para la mitad inferior de los frutos (84,2 % y 73,4 % respectivamente) sin embargo, estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas (t = -1,911; p = 0,08). Por otra parte, el porcentaje de óvulos sin fecundar fue menor para la mitad superior que para la inferior (14,3 % y 25,3 % respectivamente) siendo estas diferencias significativas (t = 2,15; p = 0,05). La proporción de semillas abortadas para ambas mitades del fruto resultaron semejantes (1,5% y 1,3 % mitades superior e inferior respectivamente; t = -0,18 p = 0,86). El porcentaje de semillas formadas en relación al número de óvulos disponibles así como el de semillas abortadas y el de óvulos no



**Fig. 1.** Proporción de semillas formadas, abortadas y de óvulos sin fecundar, para cada una de las posiciones posibles dentro del fruto. Las posiciones se numeraron desde la base del fruto (1) hacia el ápice (15). Número de frutos = 73.

fecundados según su posición relativa en el fruto se pueden observar en la figura 1.

Las porciones superior e inferior del fruto resultaron similares en cuanto a la masa promedio por semilla ( $0,0085 + 0,0026$  gr y  $0,0087 + 0,0024$  gr respectivamente;  $t = 0,54$ ;  $p = 0,59$ ) y a la germinabilidad de las mismas (0,90 y 0,86 respectivamente;  $t = 0,82$ ;  $p = 0,41$ ).

La masa promedio de las semillas provenientes de frutos cortos (con hasta 6 semillas) y largos (con 7 o más semillas) fueron similares ( $0,0078 + 0,0045$  gr y  $0,0087 + 0,0022$  gr respectivamente;  $t = -1,70$ ;  $p = 0,09$ ).

A medida que aumenta el largo del fruto, también se produce un incremento en el número total y masa de las semillas por fruto y, por lo tanto, un incremento en la masa total del fruto. Por otra parte, se observó que al aumentar el número de óvulos sin fecundar, se produce una disminución en el número y peso de las semillas maduras por fruto (Tabla 3).

### Visitantes Florales

En la población estudiada, las flores de *C. broussonetii* fueron muy poco visitadas. Se registró la visita de 12 insectos, 11 del género *Bombus* (Hymenoptera: Apidae), y un lepidóptero (Nymphalidae), para 510 minutos de observación. El lepidóptero fue observado por una única vez libando néctar de una flor, por lo que se lo consideró un visitante ocasional. Durante ese lapso de tiempo fueron vistos 58 *Bombus opifex* Smith y 18 *Bombus bellicosus* Smith atravesando las áreas de observación, aunque sin interactuar con *C. broussonetii*. El visitante más frecuente resultó ser *Bombus opifex*, con el 81,8 % del total de las visitas; el resto de las visitas fueron de *B. bellicosus*. *Bombus opifex* fue el insecto que presentó una mayor tasa de visita (0,025 flores / minuto) y el que visitó el mayor número de flores (11 flores). El tiempo medio de visita por flor para ambas especies de insectos fue de 10 segundos. No se encontraron

**Tabla 3.** Análisis de correlación de Pearson para las variables escogidas para evaluar la calidad de frutos y semillas obtenidos por polinización abierta en *C. broussonetii*. Abreviaturas: \*, significación al nivel 0,05; \*\*, significación al nivel 0,01. Número de frutos = 62.

	Nº de semillas por fruto	Nº de óvulos sin fecundar	Nº de semillas abortadas	Masa del total de semillas por fruto	Masa del fruto
Nº de óvulos sin fecundar	r = -0,275*				
Nº de semillas abortadas	r = 0,131	r = -0,208			
Masa del total de semillas por fruto	r = 0,861**	r = -0,302*	r = 0,159		
Masa del fruto	r = 0,883**	r = -0,155	r = 0,193	r = 0,897**	
Largo del fruto	r = 0,810**	r = 0,170	r = 0,107	r = 0,696**	r = 0,843**
Porcentaje de germinación	r = -0,198	r = 0,075	r = -0,086	r = -0,045	r = -0,164

diferencias significativas entre ninguna de las variables analizadas para las dos especies de insectos. Durante los días nublados no se registraron visitas a las flores disponibles de *C. broussonetii*.

El ciclo "inferior" de estambres presentó 1 260 (N = 6) granos de polen promedio en cada antera, mientras que el ciclo "superior" un promedio de 1 790 (N = 9), resultando un total de 15 250 granos de polen promedio por flor. El número de óvulos promedio encontrado en cada flor fue de 11,8 (N = 89 flores). La relación entre el número promedio de granos de polen encontrados en el estigma y el número promedio de óvulos por flor fue de 1,7 y 1,9 granos de polen por óvulo, para flores expuestas a los polinizadores y embolsadas respectivamente (N = 88 estigmas).

## DISCUSIÓN

A partir de los cruzamientos manuales se pudo determinar que *Cologania broussonetii* es una especie autocompatible y autógama. Sus flores perfectas son capaces de autofertilizarse, ya que las piezas fértiles están dispuestas de forma tal que en el momento de la dehiscencia de las anteras es posible el contacto entre el polen y el estigma (observaciones personales). Arroyo (1981), al comparar las tres subfamilias de Fabaceae, encon-

tró que Faboideae presenta la menor proporción de especies autoincompatibles. Los datos disponibles para la tribu Glycinae, a la que pertenece *C. broussonetii*, indican que este grupo no presenta especies autoincompatibles (Arroyo, 1981), lo cual podría estar relacionado con el hábito herbáceo que presentan las especies de esta tribu. Esta particularidad del grupo en el sistema de compatibilidad podría estar indicando una restricción filogenética.

En la población estudiada de *C. broussonetii* el porcentaje de fructificación natural es alto (el 75 % de las flores llega a producir frutos), lo que está de acuerdo con el patrón observado por Sutherland y Delph (1984), cuando analizaron el porcentaje promedio de fructificación en 126 especies autocompatibles (72,5%). Además, la mayoría de los óvulos producidos formó semillas maduras y lo hizo siguiendo un patrón característico dentro del fruto. Ya Bawa y Buckley (1989) habían observado para 13 de 14 especies de Fabaceae que estudiaron, que los óvulos más próximos al estilo tienen una mayor probabilidad de desarrollar semillas maduras. Este patrón sugiere que la formación de las semillas en muchas Fabaceae ocurre de la siguiente manera: los óvulos más próximos al estigma son fecundados primero y luego continúa la fertilización hacia la base del fruto. Por otro lado, el número de semillas abortadas fue notoriamente bajo; este rasgo es llamativo ya que para otras especies es durante esta

etapa demográfica cuando se produce mayor mortalidad (Rocha & Stephenson, 1990; Herrera, 1999). Otro rasgo que llama la atención es que en el fruto no se encontró ningún patrón definido para el aborto de semillas, ya que a veces suele estar relacionado con la posición del óvulo y con el orden de fertilización en el ovario (e. g. Rocha & Stephenson 1990; Tandon et al., 2003). Si bien un tercio de las flores expuestas a los polinizadores no darán frutos maduros, la baja proporción de semillas abortadas, la ausencia de un patrón de aborto dentro del fruto y la homogeneidad en el peso y germinabilidad de las semillas, indicarían que los recursos maternos no sería el factor central que estaría limitando la maduración de las semillas. Además, en *C. broussonetii* no se encontró una relación negativa entre la masa promedio por semilla y el número de semillas por fruto postulada por Primack (1987) bajo la hipótesis de limitación por recursos.

Al analizar la calidad de los frutos producidos por diferentes tratamientos de polinización, llama la atención las diferencias encontradas en los porcentajes de fructificación entre los distintos tratamientos. Por un lado, parecería que la polinización manual no es tan eficiente como la natural. Además, el bajo porcentaje de fructificación de la polinización manual cruzada podría indicar un efecto de exogamia que debe ser puesto a prueba experimentalmente. Por otro lado, el número de semillas producido por autopolinización espontánea resultó significativamente menor al observado para los tratamientos de polinización manual. Si las flores estuviesen limitadas por polen / polinizadores, se esperaría que tanto el número promedio de semillas por fruto y el porcentaje de fructificación aumentara a medida que se asegure la llegada de polen o se depositen mayores cantidades de polen en los estigmas. Sin embargo, los tratamientos de polinización manual no presentaron un aumento en la cantidad / calidad de los frutos en relación con los obtenidos por polinización abierta, lo cual indicaría que no es importante la limitación por polen / polinizadores en la población estudiada de esta especie. Entonces, el patrón observado en la proporción de semillas formadas dentro del fruto tal vez podría explicarse por particularidades en la deposición del polen sobre los estigmas, caracteres relacionados con la velocidad de germinación del polen en el estigma, o con el crecimiento de los tubos polínicos, o deberse a combinaciones letales de genes.

Para las especies herbáceas perennes de otras comunidades de bosque Chaqueño Serrano se ha observado que la relación entre la carga polínica estigmática y el número de óvulos por flor es de aproximadamente uno (Schenone, 1999); *C. broussonetii* supera esa relación, excediendo el umbral mínimo sugerido por Herrera (1987 y trabajos allí citados) para asegurar la producción de frutos y semillas. En la especie focal la fructificación puede ocurrir aun con mínimas intensidades de polinización, ya que el número mínimo de granos de polen requerido es igual o mayor al de óvulos.

El llamativo color fucsia de la flor, su forma, y estructura sugieren que *C. broussonetii* podría ser polinizada por abejas grandes y de trompa larga (Faegri y Van Der Pijl, 1966). Las observaciones realizadas mostraron que esta especie fue muy poco visitada y que los polinizadores legítimos serían solamente los abejorros.

Ahora bien, por un lado los datos muestran que las flores de *C. broussonetii* son muy poco visitadas, pero por otro lado encontramos que esta especie tiene la capacidad de producir frutos por autopolinización. Entonces, cabe la pregunta si la capacidad reproductiva de esta especie podría verse afectada si los polinizadores estuviesen completamente ausentes. Sin embargo, pese a la similitud entre el número de granos de polen depositados en el estigma de flores expuestas y aisladas de los polinizadores, la mayor calidad de los frutos obtenidos por polinización abierta indicaría que el papel de los polinizadores en la reproducción de *C. broussonetii* es importante. Sin embargo la polinización cruzada manual produjo el menor éxito reproductivo, y dada la capacidad de vuelo de los principales polinizadores de la especie focal es muy probable que la carga corporal de los visitantes contenga pólenes de diverso origen (Stout, 2000). Morales y Galetto (2003) encontraron que las especies autocompatibles de una comunidad del Chaco Serrano de Córdoba, incluso aquellas con un alto potencial de autofertilización, deben ser visitadas por polinizadores para alcanzar los niveles naturales de producción de frutos. La misma tendencia se ha observado para otras especies (Kron et al., 1993; Herrera et al., 2001). La autofertilización podría en este caso considerarse como una estrategia para garantizar la descendencia en condiciones de baja disponibilidad o eficacia de polinizadores (Schoen et al., 1997).

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a revisores anónimos por sus comentarios y sugerencias que mejoraron versiones anteriores de este trabajo. Este trabajo fue posible gracias al financiamiento que aportaron SECyT (UNC), FONCyT, CONICET y Agencia Córdoba Ciencia. LG es miembro de la Carrera del Investigador de CONICET y MLM es Becaria Doctoral de CONICET.

## REFERENCIAS

- Arroyo, M. T. K. 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae, en R. M. Polhill & P. H. Raven (eds.), *Advances in legume systematics*, pp. 723-741. Kew: Royal Botanical Gardens.
- Barrett, S. C. H. 1988. The evolution, maintenance, and loss of self-incompatibility systems, en J. Lovett Doust & L. Lovett Doust (eds.), *Plant reproductive ecology. Patterns and strategies*, pp. 98-124. New York: Oxford University Press.
- Barrett, S. C. H. & C. G. Eckert. 1990. Variation and evolution of mating systems in seed plants, en S. Kawano (ed.), *Biological approaches and evolutionary trends in plants*, pp. 229-254. London: Academic Press.
- Bawa, K. S. & D. P. Buckley. 1989. Seed: ovule ratios, selective seed abortion, and mating systems in Leguminosae, en C. H. Sturton, & J. L. Zarucchi (eds), *Advances in Legume Biology, Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard.* 29: 243-262..
- Burkart, A. 1952. *Las Leguminosas Argentinas*. Buenos Aires: Talleres gráficos Palumbo.
- Cabrera, A. L. 1976. *Regiones fitogeográficas Argentinas*. Buenos Aires: Acme.
- Dafni, A. 1992. *Pollination ecology, a practical approach*. Oxford: Oxford University Press.
- Faegri, K. & L. Van Der Pijl. 1966. *The principles of pollination biology*. London: Oxford Pergamon Press.
- Feinsinger, P. 1987. Effect of plant species on each other's pollination: is community structure influenced? *Trends Ecol. Evol.* 2: 123-126.
- Gutián, J.; P. Gutián & L. Navarro. 1993. Tamaño del núcleo de población y polinización en *Echium plantagineum*. *Anales Jardín Botánico de Madrid* 51: 65-72.
- Herrera, C. M. 1987. Components of pollinator "quality": comparative analysis of a diverse insect assemblage. *Oikos* 50: 79-90.
- Herrera, C. M. 1989. Pollinator abundance, morphology, and flower visitation rate. Analysis of the "quantity" component in a plant-pollinator system. *Oecologia* 81: 241-248.
- Herrera, C. M.; A. M. Sánchez-Lafuente, M. Medrano, J. Gutián, X. Cerda & P. Rey. 2001. Geographical variation in autonomous self-pollination levels unrelated to pollinator service in *Helleborus foetidus* (Ranunculaceae). *Amer. J. Bot.* 88: 1025-1032.
- Herrera, J. 1999. Fecundity above the species level: Ovule number and brood size in the Genisteae (Fabaceae: Papilionoideae). *Int. J. Plant Sci.* 160: 887-896.
- Hossaert, M. & M. Valero. 1988. Effect of ovule position in the pod on patterns of seed formation in two species of *Lathyrus* (Leguminosae: Papilionoideae). *Amer. J. Bot.* 75: 1714-1731.
- Kron, P.; S. C. Stewart & A. Back. 1993. Self-compatibility, autonomous self-pollination, and insect-mediated pollination in the clonal species *Iris versicolor*. *Can. J. Bot.* 71: 1503-1509.
- Lee, T. D. 1988. Patterns of fruit and seed production, en J. Lovett-doust, & L. Lovett-doust (eds.), *Plant reproductive ecology: patterns and strategies*, pp. 179-202. New York: Oxford University Press.
- Luti, R. F.; M. Galera & M. Bertraán De Solis. 1979. *Vegetación-geografía física de la provincia de Córdoba*. Córdoba: Banco Provincia de Córdoba.
- Morales, C. L. & L. Galetto. 2003. Influence of compatibility system and life form on plant reproductive success. *Plant Biology* 5: 1-7.
- Musicante, M. L. 2002. *Biología reproductiva de Cologania ovalifolia (Fabaceae: Papilionoideae)*. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba.
- Navarro, L. 1996. Fruit-set and seed weight variation in *Anthyllis vulneraria* subsp. *vulgaris* (Fabaceae). *Plant Syst. Evol.* 201: 139-148.
- Primack, R. B. 1987. Relationships among flowers, fruits and seeds. *Ann. Rev. Ecol. Sys.* 18: 409-430.
- Richards, A. J. 1986. *Plant breeding systems*. London: G. Allen & Unwin.
- Rocha, O. J. & A. G. Stephenson. 1990. Effect of ovule position on seed production, seed weight, and progeny performance in *Phaseolus coccineus* L. (Leguminosae). *Amer. J. Bot.* 77: 1320-1329.
- Ruiz, T. Z. & M. T. K. Arroyo. 1978. Plant reproductive ecology of secondary deciduous forest in Venezuela. *Biotropica* 19: 221-230.
- Schenone, M. A. 1999. *Estudio de las interacciones planta-polinizador en una comunidad del bosque chaqueño serrano*. Tesina de licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.
- Schoen, D. J.; M. T. Morgan & T. Bataillon. 1997. How does self-pollination evolve? Inferences from ecology and molecular genetic variation, en J. Silvertown; M. Franco & J. L. Harper (eds), *Plant Life Histories. Ecology, Phylogeny and Evolution*, pp. 77-101. Cambridge: Cambridge University Press.
- Sokal, R. R. & F. J. Rohlf. 1995. *Biometry*. New York: Freeman & Co.
- Stephenson, A. G. 1981. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Ann. Rev. Ecol. Sys.* 12: 253-279.
- Stephenson, A. G. 1992. The regulation of maternal investment in plants, en L. C. Marshall & J. Grace (eds.), *Fruit and seed production. Aspects of development, environmental physiology and ecology*, pp. 151-171. Cambridge: Cambridge University Press.
- Stout, J. C. 2000. Does size matter? Bumblebee behaviour and the pollination of *Cytisus scoparius* L. (Fabaceae). *Apidologie* 31: 129-139.
- Sutherland, S. & L. Delph. 1984. On the importance of male fitness in plants: patterns of fruit-set. *Ecology* 65: 1093-1104.
- Tandon, R.; K. R. Shivanna & H. Y. Mohan Ram. 2003. Reproductive biology of *Butea monosperma* (Fabaceae). *Ann. Bot.* 92: 715-723.
- Vogel, S. 1990. Radiación adaptativa del síndrome floral en las familias neotropicales. *Boletín de la Academia Nacional de Ciencias*. Córdoba 59: 5-30.
- Wells, H. 1978. Self-fertilization: advantageous or deleterious? *Evolution* 33: 252-255.