

Biología floral y reproductiva de *Vaccinium meridionale* (Ericaceae) en los Andes orientales de Colombia

Fermín J. Chamorro & Guiomar Nates-Parra

Laboratorio de Investigaciones en Abejas-LABUN, Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Av. Carrera 30 # 45-03, Ciudad Universitaria, Edificio 421, Oficina 128, Bogotá, D.C., Colombia; ferminchamorro@gmail.com, mgnatesp@unal.edu.co

Recibido 04-II-2015. Corregido 10-VII-2015. Aceptado 04-VIII-2015.

Abstract: Floral and reproductive biology of *Vaccinium meridionale* (Ericaceae) in the Eastern Andes of Colombia. *Vaccinium meridionale* is a wild plant producing edible fruits in the mountain areas of Northern South America. However, the fruits of this species has been under an unsustainable extraction and there is a growing interest of establishing this species as a crop; nevertheless, the information about its breeding system is scarce, which is essential for its sustainable management and conservation. This research aimed to study the floral and reproductive biology of *V. meridionale* in natural conditions, and to analyze the importance of pollinators on its reproduction, in two wild populations of *V. meridionale* in the states of Cundinamarca and Boyacá, in the Oriental Cordillera of Colombia. For this, we have made different observations and experiments to describe its flower morphology, floral phenology, pollen viability, stigma receptivity, pollen-ovule ratio and nectar production. To study its reproductive system, we performed experiments of flower emasculation, pollinator exclusion and hand pollination (self-and cross-pollination). We found that although the flowers have poricidal anthers, the release of pollen could occur easily without vibration. *V. meridionale* shows a large floral display, long floral longevity and has female-biased nectar production. The pollen-ovule ratio was of 571 ± 133 , which classified the species as facultative xenogamy. This result agreed with the pollination experiments because the plants produced fruits by agamospermy, selfing and outcrossing. However, we registered a strong inbreeding depression, observed in high rates of fruit abortions, after self-pollination. Unlike of self-pollinating fruits, the plant retains those produced by cross-pollination since its formation. The floral traits showed by this species are mechanisms to favor a more diverse guild of floral visitors than only insects able to buzz-pollination. In addition, these floral traits may enhance the pollination probability, and reduce geitonogamy. Moreover, the inbreeding depression suggests that *V. meridionale* promotes outcrossing as its main reproductive strategy. Therefore, pollinators, particularly bees, are essential for this species reproduction and conservation, and are critical in the maintenance of its genetic variability and fruits production. Rev. Biol. Trop. 63 (4): 1197-1212. Epub 2015 December 01.

Key words: agamospermy, bees, buzz pollination, geitonogamy, inbreeding depression, nectar production, *Vaccinium meridionale*.

El género *Vaccinium* es mejor conocido por las especies denominadas arándanos, las cuales son de gran importancia comercial, principalmente en Norteamérica y Europa, con producciones de frutos provenientes de especies silvestres y cultivadas (MacKenzie, 2009; Nestby, Percival, Martinussen, Opstad, & Rohloff, 2011). Este género tiene una distribución más amplia y es uno de los pocos dentro de la familia Ericaceae con especies tanto en

zonas templadas como tropicales, incluyendo el neotrópico (40 especies) (Pedraza-Peñalosa & Luteyn, 2011). *Vaccinium meridionale* Sw. es uno de los parientes silvestres del género en el neotrópico y se distribuye en Colombia, Ecuador, Perú, Venezuela y Jamaica. En Colombia, se conoce como agraz o mortiño y es aprovechado por comunidades rurales que recolectan sus frutos de poblaciones silvestres que crecen en las cordilleras (2357-3 168

msnm). Los frutos son comercializados en mercados locales o vendidos a intermediarios que los llevan a las grandes ciudades. Tienen alto contenido de compuestos antioxidantes y son consumidos en fresco o en preparaciones como postres, mermeladas y jugos. Por lo anterior, el agraz ha sido reconocido como un cultivo promisorio (Ligarreto, 2009).

El incremento en la demanda de frutos de agraz ha ocasionado su extracción intensiva del medio natural, lo cual junto con la deforestación de los bosques, ha causado que la especie se encuentre en proceso de erosión genética (Medina et al., 2009; Ligarreto, Patiño, & Magnitskiy, 2011). En consecuencia, el conocimiento de la biología reproductiva de *V. meridionale* es fundamental para conservar su variabilidad genética, tanto con fines productivos, como de manejo sostenible de las poblaciones naturales. Para las especies de *Vaccinium* cultivadas y silvestres del hemisferio norte, se ha determinado que la polinización cruzada, particularmente por abejas, es importante en su reproducción. Incluso en las especies que son auto-compatibles, la polinización cruzada aumenta la producción, el tamaño de los frutos y disminuye el tiempo de maduración (Lang & Danka, 1991; Brevis, 2005; Usui, Kevan, & Obbard, 2005; MacKenzie, 2009). Sin embargo, para *V. meridionale* no hay suficiente información sobre su sistema reproductivo y dependencia de polinizadores. El crecimiento vegetativo (propagación clonal) se considera su principal estrategia reproductiva en hábitats naturales (Ligarreto et al., 2011), pero sus flores son visitadas frecuentemente por *Apis mellifera* (Linnaeus, 1758) y abejorros del género *Bombus* (*B. hortulanus* Friese, 1904; *B. rubicundus* Smith, 1854) (Pinilla, 2013). Aunque según Tanner (1982) sus flores también pueden ser autofértiles. En programas de conservación genética, es relevante entender el papel de los polinizadores en la reproducción, ya que como agentes de polinización y cruzamiento, afectan la estructuración de la diversidad entre y dentro de los cultivares locales (Ohara & Shimamoto, 2002).

Por otra parte, se ha identificado que el tamaño del fruto es útil dentro del potencial de propagación sexual de *V. meridionale*, dado que las semillas largas (más de 1.9 mm de longitud y 1.4 mm ancho) tienen altas tasas de germinación, y pueden ser obtenidas de frutos grandes (Valencia & Ramírez, 1993; Ligarreto, 2009). Para el agraz no se conoce el efecto del tipo de polinización (autopolinización, polinización cruzada) sobre las características morfológicas de los frutos y semillas, pero para especies de *Vaccinium* cultivadas (*V. ashei* Reade, *V. corymbosum* L.), se ha observado que al incrementar la polinización entre variedades, se produce un aumento en el tamaño de las semillas y de la producción de semillas aptas para germinar dentro del fruto, lo que da origen a un fruto de mayor tamaño (Gupton & Spiers, 1994; Mackenzie, 1997).

Los objetivos de este trabajo fueron estudiar la biología floral y reproductiva de *V. meridionale*, evaluar el efecto de la autopolinización y la polinización cruzada sobre las características de los frutos y semillas y analizar la importancia de los polinizadores en la reproducción de este frutal promisorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio: El estudio se realizó en 2012 y 2013 en dos localidades de la vertiente occidental de la cordillera Oriental de Colombia, durante las floraciones de enero-marzo y junio-agosto. La primera localidad se ubica en territorios de la Reserva Forestal Protectora El Robledal, al Norte del departamento de Cundinamarca, municipio de Guachetá, vereda Gachetá Alto (5°27'30" N - 73°39'39" W a 2 950 msnm). Es un área de conservación de roble *Quercus humboldtii* Bonpl. (Fagaceae), donde *V. meridionale* crece de forma silvestre en zonas de potrero abandonadas, matorrales y en bosques de roble. La segunda localidad se ubica en el municipio de San Miguel de Sema, al occidente del departamento de Boyacá, en la vereda Quintoque Centro (5°31'42" N - 73°42'52" W a 2 679 msnm). En esta localidad el agraz crece en medio de una plantación de

pino, parcialmente talada para aumentar la cantidad de luz a las plantas, rodeado de relictos de bosques de roble, aunque predominan los pastos arbolados con aliso *Alnus acuminata* Kunth. Las dos zonas son similares en su clima, tienen un régimen de lluvias bimodal (abril-mayo y septiembre-octubre), la precipitación media anual se encuentra entre 900 y 1 300 mm y la temperatura media anual entre 13 y 16 °C (Ligarreto, 2009).

Morfología y fenología floral: Se midieron y describieron en 200 flores de 15 plantas las siguientes características: longitud total de la flor, número de lóbulos de la corola, color de la corola, número de estambres y curvatura de los lóbulos de la corola. En 40 flores adicionales se midió la longitud de las estructuras de los estambres: anteras, filamento, túbulo y papila. Con el fin de determinar la longevidad floral se marcaron en 10 plantas, 50 botones florales, y se siguió su desarrollo diariamente desde la apertura hasta la senescencia. Se consideró como apertura floral, el inicio de la dehiscencia de la corola (lóbulos de la corola separados y rectos).

Con base en lo anterior, se procedió a caracterizar las flores a diferentes edades (de 1 a 8 días de edad), tanto en sus atributos morfológicos y funcionales (viabilidad de polen y receptividad de estigma) como de producción de néctar (ver más adelante). Se tomó como día 1 el día del inicio de la dehiscencia de la corola. Se caracterizaron las edades de la flor previas a la apertura completa de la corola ya que se observó que los polinizadores visitaban las flores en esas edades. Para la caracterización morfológica se marcaron 210 botones florales (en 25 plantas, entre 4 y 7 botones por planta), cada uno asignado a una edad floral diferente. Se realizó un seguimiento continuo del botón desde su marcación para registrar el inicio de su apertura, y una vez que llegó a la edad asignada, se retiró de la planta para medir la distancia antera-estigma, y la longitud del estilo, características que se observó cambiaban con la edad.

Viabilidad de polen: La viabilidad del polen se evaluó con germinación de polen “*in vitro*” (Dafni, Pacini, & Nepi, 2005). Como medio de cultivo se utilizó solución de sacarosa al 15 %, única concentración de cinco evaluadas (0, 15, 30, 45 y 60 %); con la que se registró crecimiento de tubos polínicos. Se sembró polen de 161 flores de 25 plantas. La siembra se realizó en placas de múltiples pozos para cultivo de células, que se dejaron en reposo a temperatura ambiente y después de 24 horas se les agregó una gota de azul de metileno para contar los granos de polen germinados y no germinados en microscopio óptico (10 x). Se contaron mínimo 100 tétradas, y se consideraron germinadas las que tenían al menos un grano de polen con tubo polínico, y que éste fuera más largo que el diámetro de la tétrada. A partir de los conteos se estimó el porcentaje de polen viable por edad de la flor.

Receptividad de estigma: Se evaluó con el método de polinización cruzada manual (Dafni et al., 2005). Se polinizaron manualmente 135 flores (25 plantas), con una mezcla de polen de tres plantas externas al grupo experimental. Las flores se emascularon en estado de botón para evitar la deposición de polen de la misma flor y, estuvieron embolsadas con malla de tul antes y después de efectuada la polinización. A las 24 horas se retiraron los estilos de las flores y se fijaron en FAA (Formol: Alcohol: Ácido acético) con el fin de prepararlos según Martin (1959), y realizar conteos de tubos polínicos en el ápice del estilo en microscopio de fluorescencia.

Producción de néctar: Se midió el volumen (μL), concentración de azúcares (% brix) y cantidad de azúcar (mg). El volumen del néctar se midió con capilares calibrados de 10 μL y la concentración de azúcares, con un refractómetro de rango 0-90 %. Para estimar la cantidad de azúcar por flor, primero se calculó la cantidad de azúcar por μL de néctar (y) según Galetto & Bernardello (2005): $y = 0.00226 + (0.00937 x) + (0.0000585 x^2)$, donde x es la concentración de azúcares. Este

valor se multiplicó por el volumen total medido en la flor. La producción de néctar se evaluó por dos métodos: acumulativo (60 flores) y medidas repetidas (80 flores). El método acumulativo consiste en medir el néctar una sola vez, cuando la flor llega a la edad asignada; y el método de medidas repetidas, en medir una misma flor en diferentes momentos de su ciclo floral. La comparación de estos métodos permite evaluar el efecto de la remoción sobre la secreción de néctar (Ramírez & Ornelas, 2010). También se evaluó la producción de néctar en diferentes momentos del día para determinar si hay reabsorción o acumulación. Para esto, se extrajo el néctar una sola vez a tres grupos de flores asignado a tres momentos del día: mañana (7 am), mediodía (12 m) y tarde (5 pm). Se utilizaron 60 flores en 10 plantas (6 por planta, 2 por grupo).

Relación polen/óvulo: Con el fin de complementar la descripción del sistema reproductivo se estimó la producción de polen y el número de óvulos por flor en 30 botones florales. Una antera de cada botón se colocó en un tubo de micro centrifuga con 0.5 mL de KOH (1 N) a baño maría por 10 minutos, y con ayuda de una aguja, se maceró la antera para asegurarse de que saliera el polen. El contenido total del tubo se colocó en varias láminas portaobjetos para realizar el conteo de la cantidad de polen por antera. Al mismo botón de donde se extraía la antera, también se le contaba el número de anteras y el número de óvulos. Para el conteo de los óvulos, el ovario se colocó en un tubo de micro centrifuga con 1.5 mL de KOH (1 N) a baño maría por 10 minutos, y después se hizo un “squash” en una lámina portaobjetos. Los conteos de óvulos se realizaron en microscopio óptico a 4x. La estimación de la cantidad de polen por flor se obtuvo al multiplicar la cantidad de tétradas por cuatro y por el número de anteras por flor. Con los valores obtenidos se obtuvo la relación polen/ovulo según Cruden (1977).

Experimentos de polinización: Para determinar el sistema reproductivo y dependencia de

polinizadores de *V. meridionale* se marcaron ramas y en cada rama 30 botones florales. Cada rama se tomó como una sola réplica y se asignó a uno de los siguientes tratamientos:

- *Apomixis:* para evaluar la formación de frutos sin semillas (partenocarpia) y/o formación de frutos y semillas (agamosperma) de forma asexual. Se emascularon botones florales y se aisló la rama de los polinizadores. Debido a que la emasculación resultó difícil por el tamaño de flor y podía quedar polen en el estigma durante su manipulación, en la localidad de San Miguel se evaluó un segundo tratamiento de apomixis con la remoción de estigmas, con el fin de comprobar la formación de semillas sin participación de polen. Así que se evaluó apomixis con estimas (Guachetá y San Miguel) y apomixis sin estigmas (San Miguel).
- *Autopolinización espontánea:* Se aisló la rama de los polinizadores sin recibir ningún otro tipo de manipulación. De este modo, sólo el polen de la misma flor pudo polinizar las flores.
- *Geitonogamia:* para evaluar la existencia de auto-compatibilidad, es decir si el polen de la misma planta es capaz de germinar en el estima, crecer en el estilo y fecundar los óvulos. También para evaluar el efecto del polen propio sobre la formación de frutos y semillas. Se emascularon los botones florales, se aisló la rama de los polinizadores y las flores se polinizaron manualmente con polen viable producido por flores de la misma planta.
- *Xenogamia:* para evaluar el efecto del polen externo sobre la formación de frutos y semillas. Los botones florales se emascularon, la rama se aisló de los polinizadores y las flores se polinizaron manualmente con polen viable de otras plantas (4-5) diferentes del grupo experimental.
- *Polinización abierta:* para evaluar polinización natural la rama se dejó expuesta a los polinizadores sin recibir ningún otro tipo de manipulación.

La exclusión de polinizadores se hizo con bolsas de tul y las polinizaciones manuales con ayuda de palillos de dientes en el momento de mayor receptividad de estigma. Después de la polinización, la rama se embolsó nuevamente. Veinte días después de aplicados los tratamientos se revisaron las ramas para registrar si ocurrió o no formación de frutos (retención inicial) y se removieron las bolsas de tul y, 140 días después de la primera revisión, se contaron los frutos cercanos a la madurez (retención final). Estos se retiraron de las ramas para medirlos con un calibrador (alto y ancho), pesarlos, contar el número de semillas y medir las semillas (alto y ancho). Para extraer las semillas, los frutos se maceraron suavemente y con ayuda de pinzas se separaron las semillas y se eliminaron los restos del pericarpio. Las semillas se midieron en microscopio óptico a 4 x (con el posterior ajuste de tamaño).

El efecto de la edad de la flor sobre las características morfológicas (longitud del estilo, distancia antera-estigma) se evaluó con análisis de multivariado de la varianza (MANOVA) y, sobre la receptividad de estigma (número de tubos polínicos en el ápice del estilo) y viabilidad de polen (% de germinación del polen) con análisis de varianza de un factor (edad). Se analizó la relación entre receptividad de estigma, distancia antera-estigma y longitud del estilo con el coeficiente de correlación de Pearson. Se evaluó el efecto de la edad de la flor y de la primera remoción en el día (am, m, pm) sobre la producción de néctar con una prueba de Kruskal-Wallis.

La retención inicial y final de frutos se expresó en términos de proporción: número de frutos formados en la rama/número de flores tratadas en la rama. Con base en la proporción inicial y final de frutos, se calculó la proporción de frutos abortados (retención inicial-retención final/retención inicial). Para evaluar el efecto del tratamiento sobre la retención inicial, retención final y proporción de frutos abortados, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Cuando la prueba resultó significativa se realizaron comparaciones múltiples de rangos medios para identificar diferencias entre pares

de tratamientos (Siegel & Castellan, 1988). Los datos de peso, alto y ancho de frutos, número, alto y ancho de semillas se agruparon por réplica de cada tratamiento, y se evaluó el efecto del tratamiento con un MANOVA. Se realizó por separado para cada localidad ya que para San Miguel se aplicó un tratamiento adicional (apomixis sin estigmas) y no se incluyó el tratamiento de polinización abierta, dado que solamente se formaron frutos en una sola réplica. Todos los análisis estadísticos se realizaron en STATISTICA (StatSoft, 2011).

Con base en la retención final de frutos se calcularon los índices de autofertilidad (AF) y autocompatibilidad (AC) según Lloyd and Schoen (1992). La autofertilidad mide la capacidad de las flores para autopolinizarse en ausencia de polinizadores, y la auto-compatibilidad, la capacidad de una planta para producir cigotos después de ser polinizada con polen de la misma flor o planta, con relación a polinización cruzada. También se calculó la tasa de autogamia (S) y la depresión por endogamia (δ) según Charlesworth & Charlesworth (1987). La tasa de autogamia mide la proporción de producción de frutos atribuibles a autopolinización y la depresión por endogamia la reducción en la progenie endogámica en relación con aquella proveniente de polinización cruzada. Las fórmulas utilizadas para calcular los índices fueron: $AF = \text{Aut}/\text{Xen}$; $AC = \text{Gei}/\text{Xen}$; $S = \text{Xen-Exp}/\text{Xen-Gei}$; $\delta = 1 - (\text{Gei}/\text{Xen})$, donde Aut es la retención final del tratamiento autopolinización espontánea, Xen es la retención final del tratamiento xenogamia, Gei es la retención final del tratamiento geitonogamia y Exp es la retención final del tratamiento polinización abierta.

RESULTADOS

Biología floral: Las flores son péndulas y se encuentran agrupadas en inflorescencias racimosas (Fig. 1A). Miden 7.2 ± 0.5 mm de largo y son completas y perfectas. Presentan un pedicelo glabro, un cáliz gamosépalo, con lóbulos verdes e hipanto cilíndrico. La corola es gamopétala de forma urceolada con cuatro o cinco lóbulos, a veces en la misma planta, de

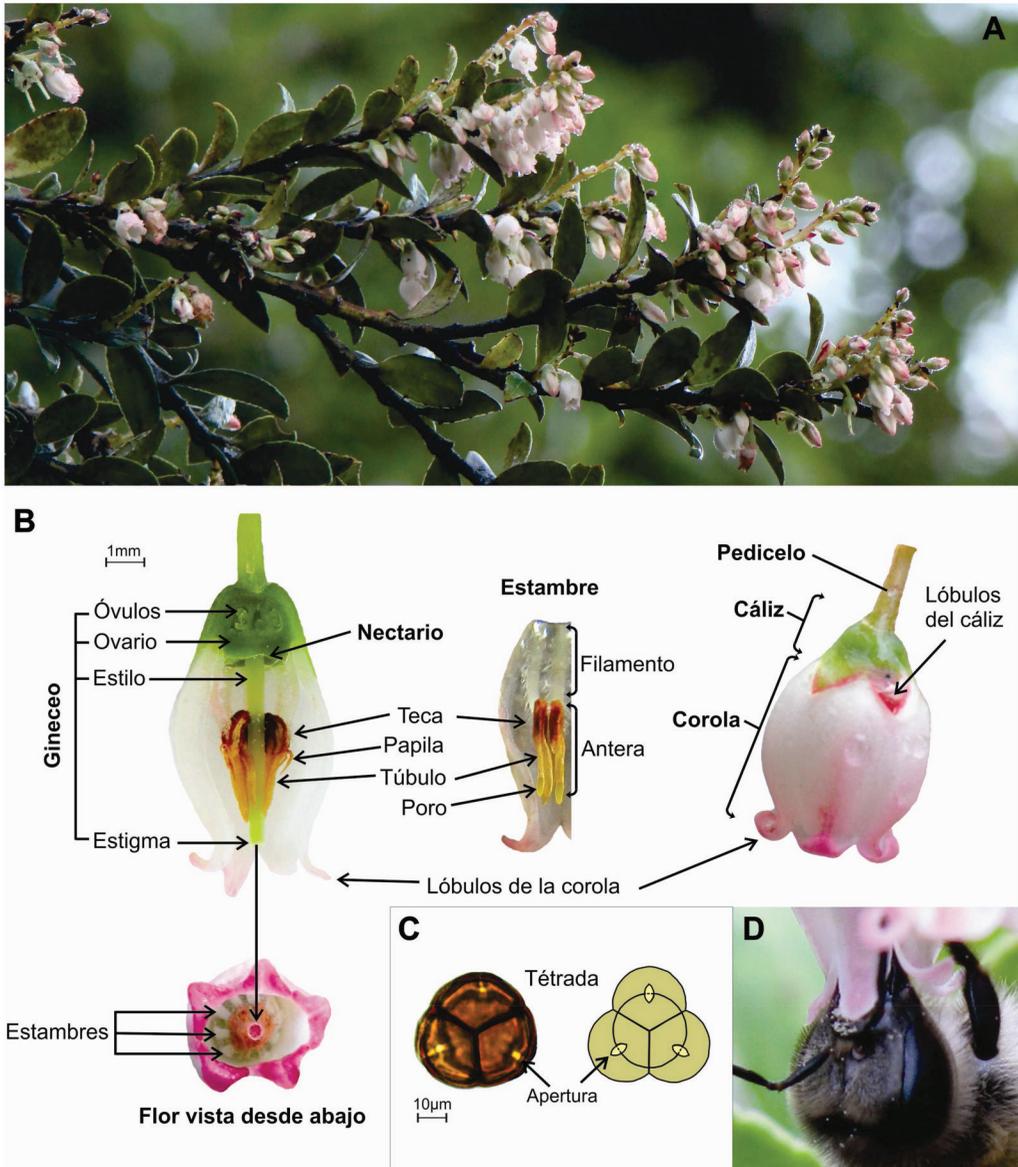


Fig. 1. Inflorescencia (A), morfología de flor (B) y grano de polen (C) de *Vaccinium meridionale*. Deposition of pollen on the head of *Apis mellifera*, species that cannot vibrate the anthers for pollen release (D).

Fig. 1. Inflorescence (A), flower morphology (B) and pollen grain (C) of *Vaccinium meridionale*. Pollen deposition on *Apis mellifera* head, this species is unable to do vibrating the anthers for pollen release (D).

color blanco o rosado claro a intenso. El gineceo se compone de un estilo glabro y ovario ínfero y el androceo de 9 ± 1 estambres, los cuales a su vez presentan un filamento piloso blanco de 2.37 ± 0.30 mm de largo y anteras de 3.68 ± 0.37 mm de largo, con papilas de 0.41 ± 0.16 mm de

largo y dos túbulos de 2.27 ± 0.26 mm de largo que terminan en poros oblicuos (Fig. 1B). El polen se presenta en forma de tétradas (Fig. 1C) y sale fácilmente sin vibración (Fig. 1D). En algunas plantas las flores presentan estambres completos pero las anteras no producen polen,

es decir, plantas con flores morfológicamente hermafroditas pero funcionalmente femeninas.

Un arbusto produce en promedio 385 ± 116 racimos y 12 ± 3 flores por racimo a lo largo de su floración, con un máximo de floración de ($1\ 128 \pm 1\ 020$ flores por planta) al inicio del periodo que disminuye a medida que avanza la

floración. El botón floral está listo para abrir aproximadamente 15 días después de que inicia su desarrollo (Fig. 2A), un día después inicia la apertura de la corola (Fig. 2B), y dos días después abre completamente (lóbulos de la corola curvados hacia arriba) (Fig. 2C y Fig. 2D). Desde el sexto día de apertura floral se

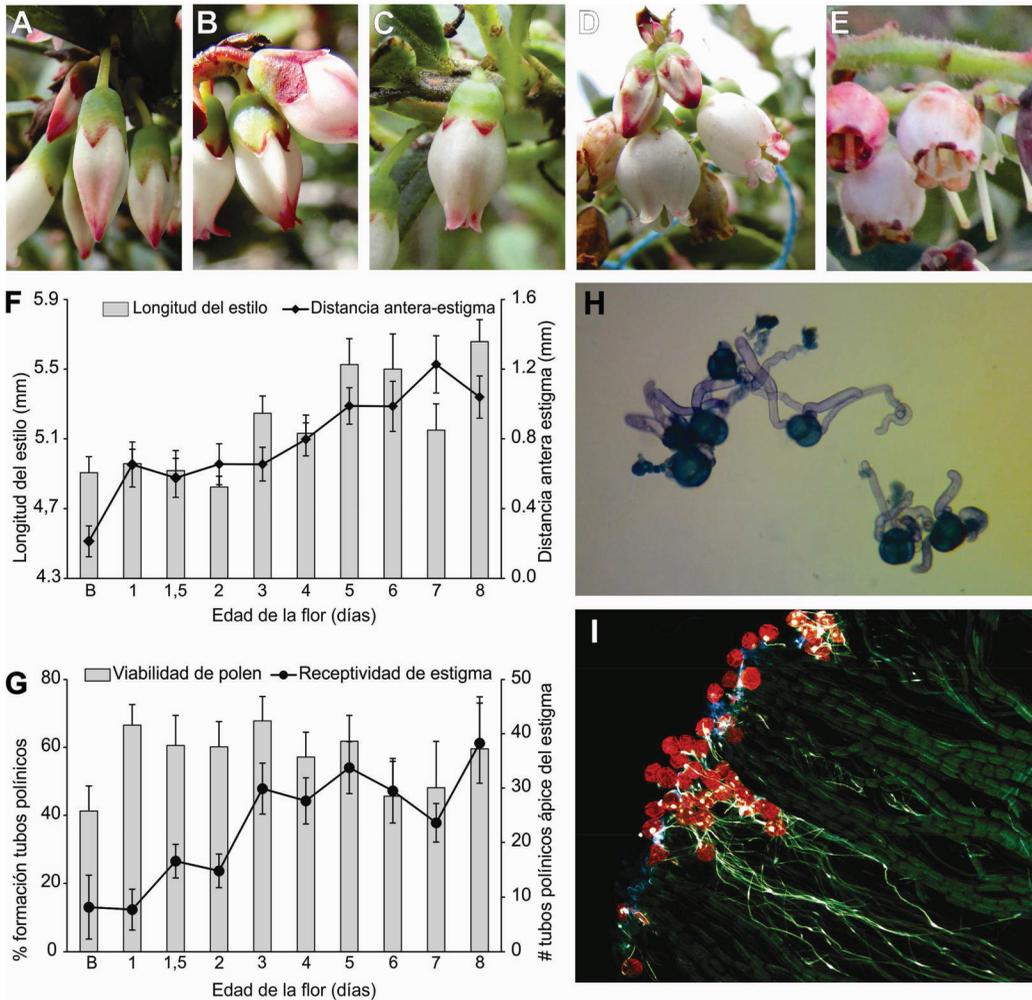


Fig. 2. Flores de *Vaccinium meridionale* en diferentes edades (A. Botón, B. 1 día, C. 1.5 días, D. 3 días, E. Flor senescente de 10 días). Características morfológicas (F. longitud del estilo y distancia antera-estigma) y funcionales (G. Receptividad de estigma y Viabilidad de polen) en diferentes edades de la flor. Granos de polen germinados en solución de sacarosa (15 %) para medir viabilidad de polen (H) y formación de tubos polínicos en el ápice del estilo para medir receptividad de estigma, observados en microscopio de fluorescencia (I). Las barras y líneas muestran promedio (\pm error estándar).

Fig. 2. *Vaccinium meridionale* flowers in different ages (A. Bud, B. 1 day, C. 1.5 days, D. 3 days, E. flower senescent). Morphological (F. style length and anther-stigma distance) and functional (G. stigma receptivity and pollen viability) characteristics of flowers in different ages. Pollen grains germinated in sucrose solution (15 %) to test for viability (H) and pollen tubes viewed with fluorescence microscope in the apical section of style to test for stigma receptivity (I). The bars and symbols on lines indicate mean (\pm SE).

registró senescencia, con pérdida de turgencia, manchas de color café y desprendimiento de la corola junto con los estambres (Fig. 2E). Se encontró un efecto significativo de la edad de la flor sobre la longitud del estilo y la distancia antera-estigma (Wilks= 0.40, $F_{18/192} = 6.107$, $p < 0.001$). En el estado de botón, las anteras y el estigma se encuentran casi en un mismo plano (DAE= 0.21 ± 0.34 mm) pero a partir del cuarto día pueden estar separadas hasta por más de un milímetro, debido a que se alarga el estilo (Fig. 2F). Desde el estado de botón se registró viabilidad de polen, la cual se mantuvo relativamente constante durante los dos primeros días de apertura floral, con un descenso a partir del tercer día, por lo que el efecto de la edad fue significativo ($F_{9/152} = 2.50$, $p = 0.011$) (Fig. 2G, Fig. 2I). No obstante, la receptividad del estigma aumentó a medida que avanzaban los días, siendo relativamente alta a partir del cuarto día ($F_{9/133} = 3.53$, $p = 0.001$) (Fig. 2A). Aun que no se encontró una correlación fuerte

entre la receptividad del estigma y el incremento de la longitud del estilo ($r = 0.33$, $p < 0.001$) y la distancia antera-estigma ($r = 0.42$, $p < 0.001$), se puede observar que a medida que se alarga el estilo y aumenta la separación de las anteras y el estigma, incrementa la receptividad del estigma (Fig. 2F, Fig. 2G).

El néctar se produce en la base del estilo y los filamentos de los estambres ayudan a su retención (Fig. 1B). La producción de néctar incrementa con la edad de la flor (Fig. 3A), con un efecto significativo sobre el volumen (acumulativo: $H = 21.96$, $gl = 5$, $p < 0.001$), la concentración de azúcares (acumulativo: $H = 25.73$, $gl = 5$, $p < 0.001$) y la cantidad de azúcar producido por flor (acumulativo: $H = 31.85$, $gl = 5$, $p < 0.001$). En general, la producción de néctar fue más baja en las flores sometidas a medidas repetidas comparadas con aquellas que se dejaron que acumularan néctar durante un periodo de tiempo (Fig. 3A). Hay mayor disponibilidad de néctar en las horas de la

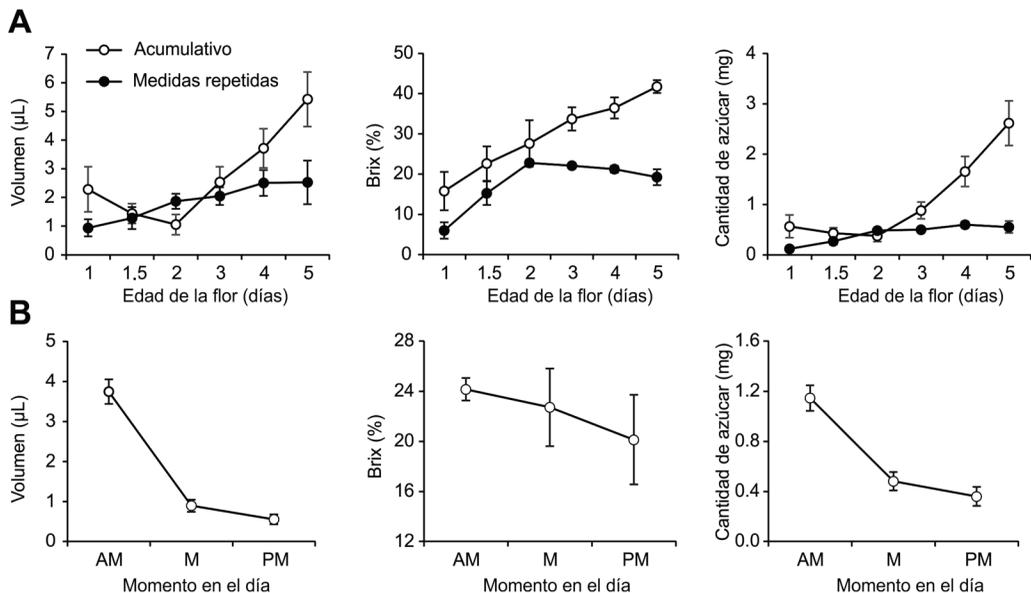


Fig. 3. Volumen, concentración y cantidad de azúcar del néctar de *Vaccinium meridionale* en diferentes edades de la flor (A) y momentos del día (B). La producción de néctar se evaluó por dos métodos: medidas repetidas (varias medidas del mismo grupo de flores) y acumulativo (cada medida en diferentes grupos de flores). Se presenta promedio (\pm error estándar).
Fig. 3. Volume, concentration and sugar quantity of nectar in different ages (A) and day moments (B) of *Vaccinium meridionale* flower. We measured nectar production by two methods: repeat measures, closed circles (several measurements in the same group of flowers) and accumulative, open circles (each measurement in different groups of flowers). The circles on line indicate mean (\pm SE).

mañana, con reabsorción activa durante el día. El volumen y la cantidad de azúcar son significativamente más altos en la mañana (Volumen: $H=72.84$, $gl=2$, $p<0.001$; Azúcar: $H=40.11$, $gl=2$, $p<0.001$), pero la concentración se mantiene constante ($H=0.65$, $gl=2$, $p=0.721$) (Fig. 3B).

Sistema reproductivo y dependencia de polinizadores: Se produjeron frutos con todos los tratamientos evaluados. Sin embargo, la producción fue relativamente baja con todos los tratamientos y en las dos localidades estudiadas (Cuadro 1). La retención inicial difirió entre tratamientos de polinización en las dos localidades (Guachetá: $H=12.05$, $gl=4$, $p=0.017$; San Miguel: $H=39.06$, $gl=5$, $p<0.001$) (Cuadro 1). Los tratamientos de apomixis con estigmas y autopolinización espontánea registraron la proporción más alta de formación de frutos (Guachetá y San Miguel, respectivamente). En Guachetá, para polinización abierta la retención inicial fue similar a las registradas con autopolinización espontánea y xenogamia, pero en San Miguel, ésta registró

los valores más bajos junto el tratamiento de geitonogamia. En las dos localidades con el tratamiento de geitonogamia la formación de frutos fue significativamente baja.

La retención final de frutos fue diferente en las dos localidades. En la localidad de Guachetá no se encontraron diferencias entre los tratamientos de polinización ($H=4.46$, $gl=4$, $p=0.347$), pero en San Miguel fue significativamente más alta con los tratamientos de apomixis con estigmas y autopolinización espontánea ($H=24.62$, $gl=5$, $p<0.001$). Con los tratamientos geitonogamia y polinización abierta se obtuvieron los valores más bajos de retención. Los tratamientos de apomixis sin estigmas y xenogamia no difirieron entre ellos en la formación de frutos pero ésta fue más alta con relación a geitonogamia y polinización abierta y cercana a la registrada con apomixis con estigmas y autopolinización espontánea (Cuadro 1).

La proporción de frutos abortados fue más alta en San Miguel que en Guachetá. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos (Guachetá: $H=7.58$, $gl=$

CUADRO 1
Retención y aborto de frutos registrada con los tratamientos de polinización evaluados en dos poblaciones de *Vaccinium meridionale*

TABLE 1
Fruit set and abortion registered with the pollination treatments evaluated in two populations of *Vaccinium meridionale*

Localidad/Tratamiento	R	F	Retención		Aborto
			Inicial (20 días)	Final (140 días)	
Guachetá (Subtotal)	94	3930	0.24±0.27	0.14±0.18	0.31±0.36
Apomixis con estigmas	19	512	0.41±0.06a	0.19±0.04a	0.41±0.10a
Autopolinización espontánea	18	963	0.24±0.05ab	0.11±0.02a	0.38±0.09a
Polinización Abierta	26	1726	0.23±0.06ab	0.15±0.05a	0.38±0.09a
Geitonogamia	13	303	0.11±0.04b	0.07±0.03a	0.14±0.10a
Xenogamia	18	426	0.19±0.05ab	0.15±0.04a	0.15±0.05a
San Miguel (Subtotal)	96	2876	0.22±0.25	0.09±0.15	0.64±0.35
Apomixis con estigmas	19	566	0.34±0.05ab	0.15±0.04a	0.59±0.06a
Apomixis sin estigmas	16	480	0.19±0.05bc	0.07±0.03ab	0.75±0.10a
Autopolinización espontánea	16	480	0.44±0.05a	0.12±0.03a	0.73±0.07a
Polinización abierta	16	480	0.07±0.05c	0.04±0.04b	0.72±0.24a
Geitonogamia	13	390	0.07±0.03c	0.02±0.01b	0.70±0.15a
Xenogamia	16	480	0.17±0.07bc	0.12±0.06ab	0.39±0.14a
Total	190	6806	0.23±0.26	0.12±0.17	0.46±0.39

4, $p=0.108$; San Miguel: $H=7.16$, $gl=5$, $p=0.209$), con el tratamiento de xenogamia se registró la proporción más baja de aborto de frutos. Además el porcentaje de frutos formados a partir de polinización cruzada manual y natural fue similar a los 20 días y a los 140 días de formación. Con autopolinización espontánea y apomixis, el porcentaje de frutos formados fue alto a los 20 días, pero más de la mitad de los frutos fueron abortados y a los 140 días quedaba un porcentaje similar al obtenido con polinización cruzada (Cuadro 1).

Se produjeron semillas con todos los tratamientos evaluados, incluido apomixis sin estigmas. Las características de frutos y semillas no fueron estadísticamente diferentes entre tratamientos (Guachetá: Wilks= 0.69, $F_{24/172}=0.80$, $p=0.735$; San Miguel: Wilks= 0.54, $F_{24/102}=0.82$, $p=0.708$). No obstante, para Guachetá con el tratamiento de xenogamia se registró en promedio los valores más altos para peso,

alto y ancho de los frutos y alto y ancho de las semillas (Cuadro 2).

Relación polen óvulo e índices relacionados con el sistema reproductivo: Se estimó un promedio de 26290 ± 5881 granos de polen y 47 ± 7 óvulos por flor, con una relación polen/óvulo de 571 ± 133 , lo que clasifica a la especie como xenógama facultativa. El valor del índice de auto-compatibilidad fue 0.50 para la población de Guachetá y 0.17 para la de San Miguel, lo que indica que la especie es parcialmente auto-compatible. El valor del índice de auto-fertilidad fue 0.71 para la población de Guachetá y 0.99 para la de San Miguel. La tasa de autogamia fue de 0.04 para la población de Guachetá y 0.74 para la localidad de San Miguel. La depresión por endogamia fue 0.50 para la población de Guachetá y 0.83 para San Miguel.

CUADRO 2

Características de frutos y semillas obtenidos con los diferentes tratamientos de polinización evaluados en dos poblaciones de *Vaccinium meridionale*

TABLE 2
Fruit and seed characteristics registered with the pollination treatments evaluated in two populations of *Vaccinium meridionale*

Localidad/tratamiento	R	N	Frutos			Semillas		
			Peso (g)	Alto (mm)	Ancho (mm)	No.	Ancho (mm)	Alto (mm)
Guachetá								
Apomixis con estigmas	13	86	0.22±0.02	6.16±0.22	7.01±0.25	24±3	1.00±0.03	1.37±0.04
Autopolinización	12	78	0.23±0.03	6.20±0.32	7.17±0.40	22±3	0.99±0.02	1.45±0.04
Polinización abierta	13	92	0.20±0.03	5.87±0.28	6.78±0.32	18±3	1.00±0.03	1.45±0.04
Geitonogamia	8	24	0.21±0.05	5.99±0.55	6.78±0.55	20±3	0.94±0.04	1.39±0.08
Xenogamia	12	60	0.28±0.03	6.80±0.29	7.84±0.32	16±3	1.02±0.03	1.49±0.03
San Miguel								
Apomixis con estigmas	13	47	0.26±0.04	6.61±0.35	7.30±0.35	28±2	0.95±0.02	1.37±0.04
Apomixis sin estigmas	6	22	0.32±0.05	7.28±0.52	7.75±0.57	27±2	1.01±0.03	1.42±0.05
Autopolinización	10	41	0.26±0.03	6.62±0.35	7.27±0.33	23±3	0.96±0.03	1.32±0.05
Polinización abierta	1	6	0.21	6.60	6.98	46	0.85	1.20
Geitonogamia	4	16	0.32±0.07	7.17±0.77	7.92±0.66	24±7	0.99±0.09	1.41±0.12
Xenogamia	5	21	0.34±0.11	7.14±0.63	7.86±0.84	28±5	1.07±0.10	1.38±0.08

R= Número de ramas en las cuales se registró producción. N= número de frutos medidos. Se presenta el promedio (\pm error estándar) agrupado de las ramas.

R= numbers of branch with fruit production. N= number of fruits measured. Data are mean (\pm SE) grouped by branch.

DISCUSIÓN

Los rasgos florales de *V. meridionale* sugieren que la especie busca favorecer la polinización por vibración, en particular por abejas del género *Bombus*. Las flores urceoladas, péndulas y con anteras poricidas que rodean el estigma, obligan a las abejas a colgarse de las flores y entrar en contacto con el estigma cuando van por polen. Las papilas de los estambres facilitan que las abejas puedan presionar las anteras durante la vibración y junto con los tricomas en los filamentos, actúan como mecanismo de barrera para que las abejas que van por néctar no lo tomen desde el espacio entre la corola y los estambres. Tienen que introducir su lengua por entre las anteras y de esta forma reciben polen sin vibración (Stephens, Levesque, & Davis, 2012). Esto último se observó durante el estudio, cuando *A. mellifera* y *B. hortulanus* visitaban las flores en busca de néctar. También se registró que hay mayor disponibilidad de néctar en la mañana y reabsorción activa durante el día, lo cual responde a las visitas de *Bombus*, que llegan a las flores desde muy temprano, incluso bajo condiciones de baja temperatura (Pinilla, 2013). Sin embargo, la oferta de néctar y la liberación del polen sin vibración contrastan con el síndrome de polinización por zumbido, y se consideran estrategias para favorecer un gremio más diverso de visitantes florales, que sólo los insectos capaces de polinización por vibración (Cane, Eickwort, Wesley, & Spielholz, 1985; Larson & Barret, 1999). Para el área de estudio, se conoce que aparte de *Bombus* y *A. mellifera*, las flores son visitadas por otras abejas (*Thygater*, Halictidae), moscas, mariposas, polillas y avispa (Pinilla, 2013; Chamorro, 2014). Además, *A. mellifera*, que no tiene la capacidad de vibración, es un polinizador eficiente de *V. meridionale*, ya que con una sola visita de una abeja melífera hay formación de frutos (Chamorro, 2014).

V. meridionale presenta un gran despliegue y una larga longevidad floral, que se consideran mecanismos compensatorios para aumentar la atracción de polinizadores y aumentar la

probabilidad de fecundación cruzada, en particular en especies de montaña (Rathcke, 2003; Torres-Díaz et al., 2011). Pero también es auto-compatible y las abejas visitan entre 10 y 20 flores de forma secuencial en una misma rama, lo cual podría incrementar la geitonogamia y llevaría a altas tasas de depresión por endogamia y a una reducción en el éxito reproductivo femenino (fertilización de óvulos, producción de frutos y semillas) (Rathcke, 2003). Se conoce que los abejorros del género *Bombus* y *A. mellifera*, causan altos niveles de geitonogamia en plantas con grandes despliegues florales (Mitchell, Karron, Holmquist, & Bell, 2004; Howard & Barrows, 2014). Asimismo, dado que la liberación de polen se da fácilmente sin vibración y este permanece viable cuando el estigma se vuelve receptivo, puede ocurrir deposición de polen de la misma flor facilitada por insectos (autogamia facilitada, Lloyd & Schoen, 1992). Sin embargo, para aumentar los beneficios de un gran despliegue floral y evitar los costos de la geitonogamia, la especie ha desarrollado cierto grado de separación espacial (hercogamia) y temporal (dicogamia) en las funciones sexuales de sus flores. Esto puede reducir su interferencia e incrementar la cantidad de polen disperso hacia otros individuos (éxito masculino), y de esta forma prevenir la auto-polinización y promover la polinización cruzada (Harder & Barret, 1995; Barret, 2002). Además, las plantas pueden presentar heterogeneidad en su oferta de néctar, dado que hay mayor secreción cuando el estigma está completamente receptivo (sesgo femenino, Carlson & Harms, 2006) y las flores disminuyen su producción después de ser visitadas por los polinizadores (menor producción en flores sometidas a medidas repetidas). Los polinizadores, en particular las abejas, pueden discriminar entre flores con altas y bajas recompensas florales, lo cual beneficia la transferencia de polen porque las abejas tendrían que visitar diferentes flores en diferentes plantas con el fin de satisfacer sus necesidades metabólicas (Heinrich, 1975). En resumen, la geitonogamia es una negativa pero inevitable consecuencia de mantener el entrecruzamiento en el proceso de exportar e

importar polen e incrementar el éxito reproductivo masculino y femenino (Harder & Barret, 1995; Mitchell et al., 2004).

La importancia de la polinización cruzada sugerida por la biología floral para *V. meridionale*, fue confirmada por los experimentos de polinización y con la relación polen/óvulo. No obstante, las plantas también produjeron frutos y semillas por autogamia y agamosperma (apomixis), lo que indica que *V. meridionale* presenta un sistema reproductivo mixto (xenogamia facultativa). A excepción de la agamosperma, estos resultados están de acuerdo con lo registrado para otras especies de *Vaccinium* (Jacquemart & Thompson, 1996; Stephens et al., 2012) y en general para las Ericaceae (Jacquemart, 2003). La autogamia ocurre debido a la proximidad de los poros de las anteras con el estigma. Cuando las flores son movidas por las abejas y por las corrientes de aire, hay liberación de polen y parte de este queda en el estigma. La autopolinización facilitada por el viento se considera que tiene un papel importante en la autogamia de varias especies de *Vaccinium* (Hagerup, 1954). La xenogamia facultativa concuerda con Luteyn (2002), quien propone que ericáceas de hábito leñoso y colonizadoras, como *V. meridionale*, son facultativamente auto-compatibles. Además, en ambientes donde los polinizadores pueden ser escasos, como áreas en regeneración, las plantas colonizadoras han beneficiado sistemas reproductivos que requieren de un polinizador pero hay auto-compatibilidad y autogamia, como mecanismo de aseguramiento reproductivo (Cruden, 1977). En consecuencia, la apomixis no sería una estrategia reproductiva inusual en *V. meridionale*, dado que en un escenario de colonización es una ventaja reproductiva (Richards, 2003).

En las dos localidades estudiadas se registró una producción de frutos relativamente baja (14 % para Guachetá y 9 % para San Miguel) con relación a la cantidad de flores utilizada en los experimentos y registrada en las plantas. Al respecto, se han planteado múltiples hipótesis, las cuales no son mutuamente excluyentes y no responden necesariamente a una insuficiente polinización: 1) las estructuras reproductivas

“excedentes” pueden ser una reserva en caso de alta mortalidad, y permiten que la producción de frutos y semillas se ajuste a las fluctuaciones en los niveles de recursos; 2) abortos selectivos de óvulos y frutos pueden mejorar la calidad de la descendencia, al eliminarse embriones de baja calidad producto de endogamia o de recursos limitados y, 3) las flores extras pueden tener un papel en la atracción de polinizadores o para la contribución masculina al éxito reproductivo (Stephenson, 1981). Los resultados de este trabajo aportan evidencia para la segunda y tercera hipótesis, dado que hubo mayor aborto de frutos con los tratamientos de autopolinización espontánea y apomixis, que con el tratamiento de xenogamia, y la mayor parte de los frutos provenientes de polinización cruzada (manual y natural) fueron retenidos por la planta desde su formación. Además se estimó una alta depresión por endogamia en las dos poblaciones estudiadas (Guachetá= 0.50, San Miguel= 0.83). La depresión por endogamia es la mayor fuerza que se opone a la evolución de la autopolinización (Charlesworth & Charlesworth, 1987). Según Lande & Schemske (1985), si la depresión por endogamia es menor de 0.5, se favorece la autogamia, pero si es superior a este valor, se favorece el entrecruzamiento. En *Vaccinium* la depresión por endogamia es común, debido a que son perennes y muchas son clonales (Nuortila, Tuomi, Aspi, & Laine, 2006). Por lo tanto, *V. meridionale* produce exceso de flores para permitir el aborto de frutos que provienen de autopolinización y retener los frutos de polinización cruzada.

La clonalidad puede aumentar la depresión por endogamia dado que hay una mayor probabilidad de geitonogamia. La clonalidad da lugar a la producción de ramets, es decir, unidades potencialmente independientes que son genéticamente idénticas a la planta progenitora (genet). En consecuencia, la expansión de clones en especies xenógamas representa una desventaja en comparación con la expansión de clones en las especies autógamas, ya que la propagación clonal puede interferir con los patrones de dispersión de polen, afectando las oportunidades de apareamiento de los

genets (cruzas geitonogámicas intra-ramet e inter-ramet de un mismo genet) (Mandujano-Sánchez, 2007). La geitonogamia en especies autoincompatibles resultaría en la nula producción de frutos y semillas, mientras que en las especies autocompatibles llevaría a una reducción en la producción de frutos y semillas por depresión endogámica. Por lo tanto, una posible razón para la baja producción de frutos con polinización abierta en la localidad de San Miguel fue alto flujo de polen genéticamente similar entre los individuos de la población o por la baja autocompatibilidad expresada por *V. meridionale* en esta localidad (0.17). Según los resultados de la tasa de autogamia y la depresión por endogamia (0.74 y 0.83, respectivamente), ambos eventos pudieron haber ocurrido, ya sea por autopolinización facilitada por polinizadores (geitonogamia, autogamia,) y/o por el viento, como se describió anteriormente.

Otro aspecto que indica que *V. meridionale* busca promover el entrecruzamiento y disminuir la autogamia, fue el registro en las dos poblaciones estudiadas de plantas con flores morfológicamente hermafroditas pero funcionalmente femeninas. En otras palabras, plantas con esterilidad masculina. Cuando esta mutación se mantiene en una población y se encuentran plantas “femeninas” junto con plantas hermafroditas, la población se denomina ginodioica. La ginodioecia ya se ha registrado para otras ericáceas como *Gaultheria* en Nueva Zelanda (9 especies, Delph, Lively, & Webb, 2006) y Ecuador (Middleton, 1991) y *V. angustifolium* Aiton (Myra, MacKenzie, & Vander Kloet, 2004; Bell, Drummond, & Rowland, 2012). La ginodioecia se considera un estado de transición hacia la dioecia (separación de sexos) y las condiciones más favorables para su establecimiento se dan cuando hay una alta tasa de autogamia y de depresión por endogamia (Charlesworth & Charlesworth, 1978), ambas condiciones observadas en *V. meridionale*. La esterilidad masculina se establece en una población porque las plantas femeninas compensan su falta de producción de polen incrementando la producción de óvulos, como resultado de la asignación de los recursos disponibles para la

reproducción (Charlesworth & Charlesworth, 1978). En *V. meridionale* se observó una alta retención de frutos en las plantas femeninas. La esterilidad masculina libera a la planta de los efectos negativos de geitonogamia. Por lo tanto, un aumento en la producción de frutos en plantas con esterilidad masculina puede ser debido tanto a la reducción de la geitonogamia y a los costos ahorrados en la producción de polen. Además, debido a que las plantas femeninas son incapaces de autopolinizarse, son menos propensas a experimentar endogamia comparada con las plantas hermafroditas. En consecuencia, una severa depresión endogámica podría conferir una ventaja selectiva para las plantas femeninas y así contribuir a su permanencia en las poblaciones naturales (Ashman, 2006).

El tipo de polinización (autopolinización, polinización cruzada) parece no tener relación con las características de los frutos y semillas en *V. meridionale*. Incluso con apomixis se obtuvieron resultados similares a los registrados con xenogamia (polinización abierta y polinización manual externa). Aunque con este último tratamiento se obtuvieron frutos y semillas de mayor tamaño, la diferencia con respecto a los otros tratamientos no fue lo suficiente grande para afirmar que el origen del polen si tiene un efecto positivo o negativo sobre estas características. En un estudio de 20 poblaciones de *V. meridionale* el tamaño del fruto no mostró variación fenotípica, por lo que se considera que está determinado genéticamente y no por el ambiente (Ligarreto et al., 2011). El tamaño de las semillas podría estar relacionado con el número de semillas y el espacio para su desarrollo dentro del fruto (Castro, Olarte, Rache, & Pacheco, 2012).

En conclusión, los polinizadores, particularmente las abejas, son fundamentales para la reproducción de *V. meridionale*, lo cual se refleja en los mecanismos florales desarrollados por la especie, para aumentar la probabilidad de polinización y disminuir la geitonogamia (flores péndulas, anteras poricidas, sesgo femenino en la producción de néctar, gran despliegue floral y larga longevidad

floral). Igualmente, la especie busca promover el entrecruzamiento y disminuir la autogamia, lo que se observa en una fuerte depresión por endogamia, manifestada en altas tasas de aborto de frutos producidos por autogamia, y en la coexistencia de plantas femeninas y plantas hermafroditas (poblaciones ginodioicas), con el fin de aumentar el éxito reproductivo femenino y masculino. Por lo tanto, la conservación de los polinizadores, que permitan un flujo de polen dentro y entre poblaciones, es una estrategia de manejo esencial para mantener la variabilidad genética y la oferta de frutos de la especie. Es importante, estudiar la ginodioecia en *V. meridionale*, dado que este puede ser un factor clave para el futuro establecimiento del agraz como cultivo. La producción de frutos se puede aumentar con la propagación de plantas femeninas, pero también se requiere que haya plantas que sirvan como donadores de polen.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte de la tesis de maestría de F. J. Chamorro. Agradecemos al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación - COLCIENCIAS y la Universidad Nacional que financiaron este trabajo a través del proyecto de investigación “Valoración de los servicios de polinización por abejas en algunos frutales promisorios de Colombia (Contrato 389-2011 a Guiomar Nates-Parra). A Ángela Rodríguez, Laura Calderón, Simón Pinilla, Daniela León, Paula Montoya, Mónica Henao, quienes colaboraron con el trabajo de campo.

RESUMEN

Vaccinium meridionale es una planta silvestre productora de frutos comestibles en las áreas montañosas del norte de Suramérica. Sin embargo, no hay información suficiente sobre su sistema reproductivo, lo cual es fundamental para su manejo y conservación dado que sus frutos son extraídos de forma no sostenible y hay un creciente interés en establecer la especie como cultivo. Los objetivos de este trabajo fueron estudiar la biología floral y reproductiva de *V. meridionale* en condiciones naturales y analizar la importancia de los polinizadores en su reproducción.

Para esto se realizaron observaciones y experimentos para describir su morfología y fenología floral, viabilidad de polen, receptividad de estigma, relación polen óvulo y producción de néctar. Para estudiar su sistema reproductivo se realizaron experimentos de emasculación, exclusión de polinizadores y polinización manual (autopolinización y polinización cruzada). El estudio se realizó con dos poblaciones silvestres de *V. meridionale* ubicadas en los departamentos de Cundinamarca y Boyacá, en la Cordillera Oriental de Colombia. Se encontró que aunque las flores tienen anteras poricidas la liberación del polen se da fácilmente sin vibración. *V. meridionale* presenta un gran despliegue y larga longevidad floral y hay un sesgo en la producción de néctar hacia la función femenina. Se estimó una relación polen/óvulo de 571 ± 133 , lo que clasifica a la especie como xenógama facultativa. Este resultado coincidió con los experimentos de polinización ya que en las dos poblaciones estudiadas las plantas produjeron frutos por agamosperma, autogamia y xenogamia. No obstante, se observó una fuerte depresión por endogamia manifestada en altas tasas de aborto de frutos producidos por autogamia a diferencia de los frutos provenientes de polinización cruzada que fueron retenidos por la planta desde su formación. Los rasgos florales presentados por la especie se consideran mecanismos para favorecer un gremio más diverso de visitantes florales que sólo los insectos capaces de polinización por vibración. Además, estos rasgos florales pueden aumentar la probabilidad de polinización y disminuir la geitonogamia. Igualmente la depresión por endogamia sugiere que la especie busca mantener el entrecruzamiento como su principal estrategia reproductiva. Por lo tanto, los polinizadores, en particular las abejas son fundamentales para la reproducción de *V. meridionale* y en consecuencia su conservación es esencial para mantener la variabilidad genética y oferta de frutos de esta especie.

Palabras clave: abejas, agamosperma, depresión por endogamia, geitonogamia, polinización por vibración, producción de néctar, *Vaccinium meridionale*.

REFERENCIAS

- Ashman, T. L. (2006). The evolution of separate sexes: a focus on the ecological context. In L. D. Harder & S. C. H. Barrett (Eds.), *Ecology and evolution of flowers* (pp. 204-222). Oxford: Oxford University Press.
- Barrett, S. C. H. (2002). Sexual interference of the floral kind. *Heredity*, 88, 154-159.
- Bell, D. J., Drummond, F. A., & Rowland, L. J. (2012). Evidence of functional gender polymorphisms in a population of the hermaphroditic lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*). *Botany*, 90, 393-399.
- Brevis, P. A. (2005). *Factors controlling fruit set of rabbiteye blueberry (Vaccinium ashei Reade)* (PhD. dissertation). University of Georgia, Athens, U.S.A.

- Cane, J. H., Eickwort, G. C., Wesley, F. R., & Spielholz, J. (1985). Pollination Ecology of *Vaccinium stamineum* (Ericaceae: Vaccinioideae). *American Journal of Botany*, 72(1), 135-142.
- Carlson, J. E., & Harms, K. E. (2006). The Evolution of Gender-Biased Nectar Production in Hermaphroditic Plants. *The Botanical Review*, 72(2), 179-205.
- Castro, C., Olarte, Y., Rache, L., & Pacheco, J. (2012). Development of a germination protocol for blueberry seeds (*Vaccinium meridionale* Swartz). *Agronomía Colombiana*, 30(2), 196-203.
- Chamorro, F. (2014). *Influencia de la polinización por abejas sobre la producción y características de frutos y semillas de Vaccinium meridionale Sw. (Ericaceae) en los Andes Orientales de Colombia* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia.
- Charlesworth, D., & Charlesworth, B. (1987). Inbreeding Depression and its Evolutionary Consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 237-268.
- Charlesworth, B., & Charlesworth, D. (1978). A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *The American Naturalist*, 112(988), 975-997.
- Cruden, R. W. (1977). Pollen-Ovule Ratios: A Conservative Indicator of Breeding Systems in Flowering Plants. *Evolution*, 31(1), 32-46.
- Dafni, A., Pacini, E., & Nepi, M. (2005). Pollen and stigma biology. In A. Dafni, P. G. Kevan, & B. C. Husband (Eds.), *Practical Pollination Ecology* (pp. 83-145). Cambridge: Enviroquest Ltd.
- Delph, L. F., Lively, C. M., & Webb, C. J. (2006). Gynodioecy in native New Zealand *Gaultheria* (Ericaceae). *New Zealand Journal of Botany*, 44(4), 415-420.
- Galetto, L., & Bernardello, G. (2005). Rewards in flowers: Nectar. In A. Dafni, P. G. Kevan, & B.C. Husband (Eds.), *Practical pollination ecology* (pp. 261-313). Cambridge: Enviroquest Ltd.
- Gupton, C. L., & Spiers, J. M. (1994). Interspecific and Intraspecific Pollination Effects in Rabbiteye and Southern Highbush Blueberry. *Hort Science*, 29(4), 324-326.
- Hagerup, O. (1954). Autogamy in some drooping bicornes flowers. *Botanisk Tidsskrift*, 51, 103-116.
- Harder, L. D., & Barrett, S. C. H. (1995) Mating cost of large floral displays in hermaphrodite plants. *Nature*, 373(9), 512-515.
- Heinrich, B. (1975). Energetics of Pollination. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 6, 139-170.
- Howard, A. F., & Barrows, E. M. (2014). Self-pollination rate and floral-display size in *Asclepias syriaca* (Common Milkweed) with regard to floral-visitor taxa. *BMC Evolutionary Biology*, 14, 144. doi:10.1186/1471-2148-14-144.
- Jacquemart, A. L., & Thompson, J. D. (1996). Floral and pollination biology of three sympatric *Vaccinium* (Ericaceae) species in the Upper Ardenne, Belgium. *Canadian Journal of Botany*, 74, 210-221.
- Jacquemart, A. L. (2003). Floral traits of belgian ericaceae species: are they good indicators to assess the breeding systems? *Belgian Journal of Botany*, 136(2), 154-164.
- Lande, R., & Schemske, D. W. (1985). The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic Models. *Evolution*, 39(1), 24-40.
- Lang, G. A., & Danka, R. G. (1991). Honey-bee-mediated Cross-versus Self-pollination of 'Sharpblue' Blueberry Increases Fruit Size and Hastens Ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(5), 770-773.
- Larson, B. M. H., & Barrett, S. C. H. (1999). The pollination ecology of buzz-pollinated *Rhexia virginica* (Melastomataceae). *American Journal of Botany*, 86(4), 502-511.
- Ligarreto, G. A. (Ed.). (2009). *Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño (Vaccinium meridionale Swartz) en la zona altoandina de Colombia*. Bogotá: Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia.
- Ligarreto, G. E., Patiño, M. P., & Magnitskiy, S. (2011). Phenotypic plasticity of *Vaccinium meridionale* (Ericaceae) in wild populations of mountain forests in Colombia. *Revista de Biología Tropical*, 59(2), 569-583.
- Lloyd, D. G., & Schoen, D. J. (1992). Self- and Cross-Fertilization in Plants. I. Functional Dimensions. *International Journal of Plant Sciences*, 153(3-Part 1), 358-369.
- Luteyn, J. (2002). Diversity, adaptation, and endemism in neotropical Ericaceae: Biogeographical patterns in the Vaccinieae. *The Botanical Review*, 68(1), 55-87.
- MacKenzie, K. (1997). Pollination requirements of three varieties of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.). *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 122(6), 891-896.
- MacKenzie, K. (2009). Pollination Practices and the Use of Bees in *Vaccinium* Crops. *Acta Horticulturae*, 810, 527-538.
- Mandujano-Sánchez, M. C. (2007). La clonalidad y sus efectos en la biología de poblaciones. In L. E. Eguiar-te, V. Souza, & X. Aguirre (Eds.), *Ecología Molecular* (pp. 215-250). México, D.F.: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.

- Martin, F. W. (1959). Staining and observing pollen tubes by means of fluorescence. *Stain Technology*, 34, 125-128.
- Medina, C. I., Lobo, M., Patiño, M. P., Ligarreto, G. A., Delgado, O. A., Lopera, S. A., & Toro, J. L. (2009). In G. A. Ligarreto (Ed.), *Perspectivas del cultivo de agraz o mortiño (Vaccinium meridionale Swartz) en la zona altoandina de Colombia* (pp. 57-74). Bogotá: Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia.
- Middleton, D. J. (1991). Ecology, reproductive biology and hybridization in *Gaultheria* L. *Edinburgh Journal of Botany*, 48, 81-89.
- Mitchell, R. J., Karron, J. D., Holmquist, K. G., & Bell, J. M. (2004). The influence of *Mimulus ringens* floral display size on pollinator visitation patterns. *Functional Ecology*, 18, 116-124.
- Myra, M., MacKenzie, K., & Vander Kloet, S. P. (2004). Investigation of a possible sexual function specialization in the lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium* Ait. Ericaceae). *Small Fruits Review*, 3(3-4), 313-324.
- Nestby, R., Percival, D., Martinussen, I., Opstad, N., & Rohloff, J. (2011). The European blueberry (*Vaccinium myrtillus*) and the potential for cultivation. A review. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 5(Special Issue 1), 5-16.
- Nuortila, C., Tuomi, J., Aspi, J., & Laine, K. (2006). Early-acting inbreeding depression in a clonal dwarf shrub, *Vaccinium myrtillus*, in a northern boreal forest. *Annales Botanici Fennici*, 43, 36-48.
- Ohara, M., & Shimamoto, Y. (2002). Importance of genetic characterization and conservation of plant genetic resources: the breeding system and genetic diversity of wild soybean (*Glycine soja*). *Plant Species Biology*, 17, 51-58.
- Pedraza-Peñalosa, P., & Luteyn, J. L. (2011). Andean *Vaccinium* (Ericaceae: Vaccinieae): Seven new species from South America. *Brittonia*, 63(2), 257-275.
- Pinilla, M. S. (2013). *Visitantes florales y polinizadores potenciales del agraz (Vaccinium meridionale) en Cundinamarca y Boyacá* (Trabajo de grado). Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, D.C., Colombia.
- Ramírez, M. M., & Ornelas, J. F. (2010). Pollination and nectar production of *Psittacanthus schiedeanus* (Loranthaceae) in central Veracruz, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 87, 61-67.
- Rathcke, B. J. (2003). Floral longevity and reproductive assurance: seasonal patterns and an experimental test with *Kalmia latifolia* (Ericaceae). *American Journal of Botany*, 90(9), 1328-1332.
- Richards, A. J. (2003). Apomixis in flowering plants: an overview. *Philosophical Transactions of Royal Society B Biological Sciences*, 358(1434), 1085-1093.
- Siegel, S., & Castellan, N. J. (1988) Stephens. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. New York: McGraw-Hill.
- Statsoft Inc. (2011). *Statistica* (versión 10 para Windows). Tulsa, Oklahoma: Statsoft Inc.
- Stephens, D. T., Levesque, D. E., & Davis, A. R. (2012). Pollen-ovule ratios in seven species of *Vaccinium* (Ericaceae) and stamen structure in *Vaccinium myrtilloides* and *Vaccinium vitis-idaea*. *Botany*, 90, 599-614.
- Stephenson, A. G. (1981). Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 12, 253-279.
- Tanner, E. V. J. (1982). Species diversity and reproductive mechanisms in Jamaican trees. *Biological Journal of the Linnean Society*, 18(3), 263-278.
- Torres-Díaz, C., Gómez-González, S., Stotz, G. C., Torres-Morales, P., Paredes, B., Pérez-Millaqueo, M., & Gianoli, E. (2011). Extremely Long-Lived Stigmas Allow Extended Cross-Pollination Opportunities in a High Andean Plant. *PlosONE*, 6(5), e19497. doi:10.1371/journal.pone.0019497.
- Usui, M., Kevan, P. G., & Obbard, M. (2005). Pollination and Breeding System of Lowbush Blueberries, *Vaccinium angustifolium* Ait. and *V. Myrtilloides* Michx. (Ericaceae), in the Boreal Forest. *The Canadian Field-Naturalist*, 119(1), 48-57.
- Valencia, M. L. C., & Ramírez, F. (1993). Notas sobre la morfología, anatomía y germinación del Agraz (*Vaccinium meridionale* Swartz.). *Agronomía Colombiana*, 10, 151-159.