

Limitación de polen y polinización especialista de *Rhytidophyllum lomense* (Gesneriaceae) en Topes de Collantes, Cuba

Pollen limitation and specialist pollination of *Rhytidophyllum lomense* (Gesneriaceae) in Topes de Collantes, Cuba

Lesly Díaz-Suárez^{1,*}, Michel Faife-Cabrera², Edgardo Díaz-Álvarez², Emma María Torres-Roche^{2,3} y Arnaldo Toledo-Sotolongo⁴

¹Centro de Investigaciones Agropecuarias, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní, km 5½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba. C.P. 54830. ²Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní, km 5½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba. C.P. 54830. ³Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana, Carretera "El Rocio" km 3½, Calabazar, Boyeros, La Habana, Cuba. C.P. 19230. ⁴Centro de Estudios Jardín Botánico de Villa Clara, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Carretera a Camajuaní, km 5½ Santa Clara, Villa Clara, Cuba. C.P. 54830. *Autor para correspondencia (e-mail: ldiaz@uclv.cu).

RESUMEN

La contribución de un polinizador al éxito reproductivo de una especie se efectúa a partir de la transferencia de polen, mediante la tasa de visitas, que varía de acuerdo a la expresión de determinados rasgos florales. *Rhytidophyllum lomense* (Gesneriaceae) es una especie endémica de Cuba con flores tubulares y otras características que permiten predecir el síndrome de polinización por colibríes. Otras especies de la tribu con este diseño de corola, evidencian bajo éxito reproductivo. El estudio estuvo dirigido a tres preguntas: ¿El diseño floral de *R. lomense* se corresponde con un sistema de polinización especialista?, ¿existen altos niveles de limitación de polen asociados a la ineficiencia del polinizador especialista? y ¿cómo la biología floral y los mecanismos de aseguramiento reproductivo determinan el éxito reproductivo? Los estudios se realizaron en tres poblaciones y 11 variables fueron utilizadas para describir la morfología floral. Se realizaron observaciones directas a las flores para determinar los polinizadores. La capacidad de autogamia se calculó a través del índice de auto-fertilización y, como medidas de la eficiencia de los polinizadores, se calcularon los índices de limitación polínica, frutos/flores y semillas/óvulos. *Chlorostilbon ricordii* es el único polinizador de *R. lomense* en concordancia a su biología floral. La baja tasa de visitas del colibrí y los valores de los índices calculados evidencian baja eficiencia del polinizador. Además, el bajo valor de índice de auto-fertilidad y los altos niveles de hercogamia y dicogamia, no evidencian que *R. lomense* se encuentre en un período de transición a un mecanismo de aseguramiento reproductivo como la auto-fertilización.

Palabras clave: autogamia, biología floral, especialización, Gesneriaceae

ABSTRACT

The pollinator contribution to the reproductive success of species is made from the transfer of pollen, through the visit rate, which varies according to the expression of certain floral features. *Rhytidophyllum lomense* (Gesneriaceae) is an endemic species of Cuba with tubular flowers and other characteristics that allow to predict the pollination syndrome by hummingbirds. Other species of the tribe with this corolla design, show low reproductive success. The study was directed to three questions: Does the floral design of *R. lomense* correspond to a specialist pollination system? Are there high levels of pollen limitation associated with the inefficiency of the specialist pollinator? and How does floral biology and reproductive assurance mechanisms determine reproductive success? The studies were carried out in three populations and 11 variables were used to describe the floral morphology. Direct observations were made to the flowers to determine the pollinators. The autogamy capacity was calculated through the self-fertilization index and, as pollinator efficiency measures, the indexes of pollen limitation, fruits/flowers and seeds/ovules were calculated. *Chlorostilbon ricordii* is the only *R. lomense* pollinator in concordance to its floral biology. The low visit rate of the hummingbird and the values of the calculated indexes show low efficiency of the pollinator. In addition, the low value of the index of self-fertility and the high levels of herkogamy and dicogamy do not show that *R. lomense* is in a period of transition a mechanism of reproductive assurance such as self-fertilization.

Keywords: autogamy, floral biology, specialization, Gesneriaceae

Citación: Díaz-Suárez, L., Faife-Cabrera, M., Díaz-Álvarez, E., Torres-Roche, E.M. & Toledo-Sotolongo, A. 2020. Limitación de polen y polinización especialista de *Rhytidophyllum lomense* (Gesneriaceae) en Topes de Collantes, Cuba. *Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana* 41: 131-140.

Recibido: 23 de noviembre de 2018. **Aceptado:** 25 de agosto de 2019. **Publicado en línea:** 28 de diciembre de 2020. **Editor encargado:** José Ángel García-Beltrán.

INTRODUCCIÓN

La selección de transferencia y recepción de polen efectiva es considerada como la fuerza principal en la evolución de las flores de las angiospermas (Stebbins 1970). Algunas especies han alcanzado una alta especialización y son polinizadas por un grupo funcional de polinizadores mientras que otras especies son visitadas por una gran variedad de polinizadores (Feinsinger 1983, Faegri & van der Pijl 2013). La especialización de una especie por un polinizador depende de su contribución relativa al éxito reproductivo de la planta. Dicha contribución se efectúa a partir de la transferencia de polen, y

a través de la variación que experimentan sus tasas de visitas y eficiencia de polinización en dependencia de la expresión de rasgos florales determinados (Schemske & Horvitz 1984, Herrera 1987, Wilson & Thomson 1991).

Numerosos estudios (Feinsinger 1983, Faegri & van der Pijl 2013) dictan que la especialización refleja selección por el cruzamiento, por lo que Zhang & *al.* (2011) plantean que la prevalencia de altos niveles de autogamia en especies con sistema de polinización especialista es inesperada. Sin embargo, en especies con flores especialistas y baja frecuencia

de visitas de sus polinizadores, se presenta alta limitación polínica, por lo cual se desarrollan mecanismos de aseguramiento reproductivo como la autogamia (Rosas-Guerrero & al. 2014). Por ejemplo, en la tribu *Gesnerieae* se presenta este mecanismo como respuesta a la baja tasa de visitas del polinizador especialista (Martén-Rodríguez & al. 2009, 2010).

Estudios realizados por Martén-Rodríguez & Fenster (2010) evidencian que en la tribu *Gesnerieae* se presentan dos diseños florales que responden a sistemas especialistas: flores tubulares polinizadas exclusivamente por colibríes y flores acampanadas polinizadas por murciélagos. Sin embargo, la habilidad de producir semillas de forma autónoma está asociada solo con las especies con sistema de polinización especialistas por colibríes. Los propios autores explican esto debido a dos razones fundamentales. La primera es la diferencia en la morfología floral de los diseños, teniendo en cuenta la mayor posibilidad de una autopolinización que se presenta en las corolas tubulares por la proximidad de anteras y estigma. La segunda razón es el hábito de crecimiento y la historia de vida de la especie.

En la tribu *Gesnerieae*, Martén-Rodríguez & al. (2010) sugieren la evolución hacia mecanismos de aseguramiento reproductivo como la autogamia y la generalización se dieron como respuesta a la limitación polínica. Martén-Rodríguez & Fenster (2010) plantean que dicha limitación polínica se encuentra solamente en el diseño tubular especialista por colibríes, debido a la baja frecuencia de visitas de los polinizadores. Estudios en otras familias de plantas (Burd & al. 2009, Larson & Barrett 2000, Vamosi & al. 2013, Lázaro & al. 2015) demuestran que las especies auto-incompatibles presentan más limitación de polen que las especies auto-compatibles. Además, la limitación de polen y el grado de dependencia del polinizador están positivamente relacionados (Merrett & al. 2007, González & Pérez 2010).

Gesnerieae es una de las tribus de la familia *Gesneriaceae* (Zimmer & al. 2002) y las Antillas Mayores se consideran el centro de diversificación de la misma (Roalson & al. 2005). En Cuba se encuentran 22 especies de *Gesneria* (18 endémicas) y nueve de *Rhytidophyllum*, todas endémicas, una subespecie endémica de *Pheidonocarpa* y una especie nativa de *Bellonia* (Clark & al. 2013). Numerosos estudios sobre la evolución floral de esta tribu se han realizado en Puerto Rico, República Dominicana, Jamaica y Santa Lucía (Martén-Rodríguez & al. 2010). Sin embargo, en Cuba, solamente se ha estudiado la biología floral y ecología de *Rhytidophyllum minus* Urb., endémica de la zona oriental del país (Martén-Rodríguez & al. 2009).

Rhytidophyllum lomense (Urb.) C. V. Morton, es una especie de la tribu *Gesnerieae*, endémica de Cuba y que presenta corola tubular (Alain 1957, Freiberg 2007). Este rasgo floral y otros, como color anaranjado brillante, permiten predecir el síndrome de polinización por colibríes. Las limitantes de este diseño en la tribu sugieren que la especie presenta bajo éxito reproductivo (Martén-Rodríguez & al. 2009, Martén-Rodríguez

& Fenster 2010). Por estas razones, con este trabajo se pretende dar respuesta a las interrogantes: ¿el diseño floral de *R. lomense* se corresponde con un sistema de polinización especialista?, ¿existen altos niveles de limitación de polen asociados a la ineficiencia del polinizador especialista? y ¿en qué medida la biología floral y los mecanismos de aseguramiento reproductivo determinan el éxito reproductivo?

MATERIALES Y MÉTODOS

La especie

Rhytidophyllum lomense es un arbusto pequeño, con tallos poco ramificados y hojas esparcidas. Las inflorescencias son plurifloras con las brácteas de lanceoladas a lineales de 5-10 mm, más anchas arriba de la base. El tubo y los lóbulos del cáliz son largos, los lóbulos son oblongo-lanceolado y erguidos, de 6-8 mm. La corola es anaranjada, tubular, de 2,5-3 cm, contraída en la garganta y el limbo es estrecho con los lóbulos erguidos algo desiguales (Alain 1957). Es una especie endémica de las Montañas de Trinidad, del Macizo Montañoso Guamuhaya (provincias Cienfuegos y Sancti Spíritus, Cuba) (Alain 1957, Clark & al. 2013). La especie presenta la categoría preliminar de Amenazada en la Lista Roja de la flora de Cuba (González-Torres & al. 2016). En Topes de Collantes, provincia Sancti Spíritus, se encuentran tres localidades y otras dos se localizan en San Blas y Carso de Buenos Aires en la provincia de Cienfuegos.

Área de estudio

El estudio fue realizado en el Paisaje Natural Protegido Topes de Collantes de la provincia Sancti Spíritus, Cuba, entre los meses de julio a octubre de los años 2015 y 2016. Las localidades estudiadas de *Rhytidophyllum lomense* son: (i) Sendero "Caburní" (21°55' lat. N y 80°0' long. W, 625 msm), (ii) Reparto "Jesús Menéndez" (21°53' lat. N y 80°0' long. W, 582 msm) y (iii) Mogote "Mi Retiro" (21°53' lat. N y 80°01' long. W, 625 msm). Los individuos se encuentran en grietas de paredones calizos con alta humedad y forman parte de la vegetación relicta de bosque siempreverde mesófilo (Figura 1A).

Biología floral

Para describir la morfología floral de la especie se realizó el análisis morfométrico de 150 flores (1 o 2 flores por planta) de las tres poblaciones de la especie en Topes de Collantes. Se consideraron 11 variables: longitud de la corola (LC), elongación del pistilo (EP), diámetro de la apertura de la corola (DAC), constricción de la corola (CC), longitud del pistilo (LP), longitud de los estambres (LE), hercogamia (H) (Figura 2), número de óvulos, simetría de la corola, color y presencia de manchas. Para cuantificar la cantidad de óvulos producidos por la especie se utilizaron cinco flores de diferentes individuos en cada población. El conteo se realizó directamente utilizando un contador de partículas a través de un microscopio Novel con un aumento de 400x.

Los valores de las variables independientes no mostraron normalidad ni homogeneidad de varianza. Por esta razón, estas variables se compararon entre las tres poblaciones a través de un análisis de varianza de clasificación simple por

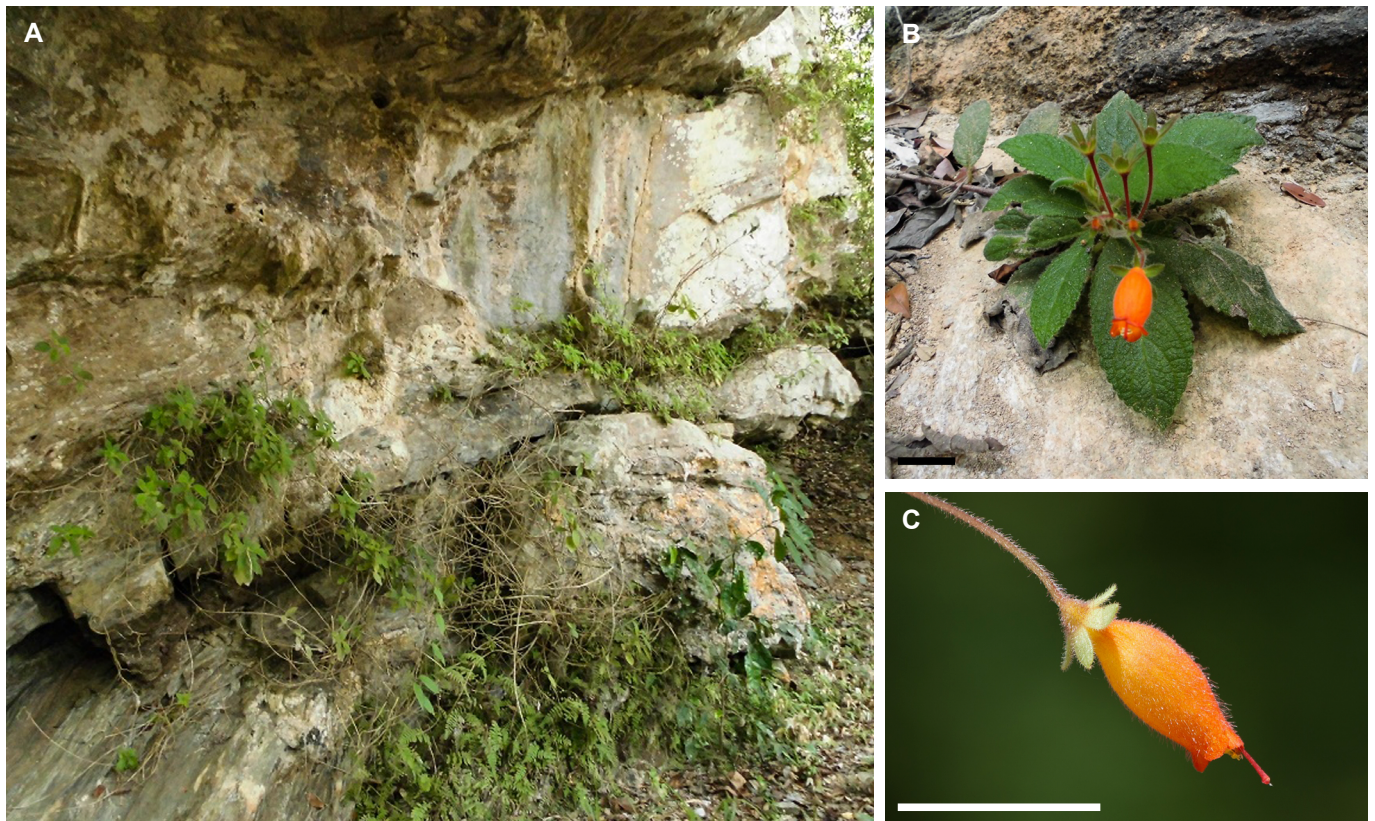


Fig. 1. *Rhytidophyllum lomense* en la población Mogote “Mi Retiro”, Topes de Collantes, Sancti Spíritus, Cuba central. **A.** Individuos en su hábitat, en los paredones calizos. **B.** Individuo florecido. **C.** Flor. Barras de escala: 3 cm. Fotos: L. Díaz-Suárez y A. Toledo-Sotolongo.

Fig. 1. *Rhytidophyllum lomense* in Mogote “Mi Retiro” population, Topes de Collantes, Sancti Spíritus, Central Cuba. **A.** Individuals in their habitat, in the limestone walls. **B.** Flowered individual. **C.** Flower. Scale bars: 3 cm. Photos: L. Díaz-Suárez and A. Toledo-Sotolongo.

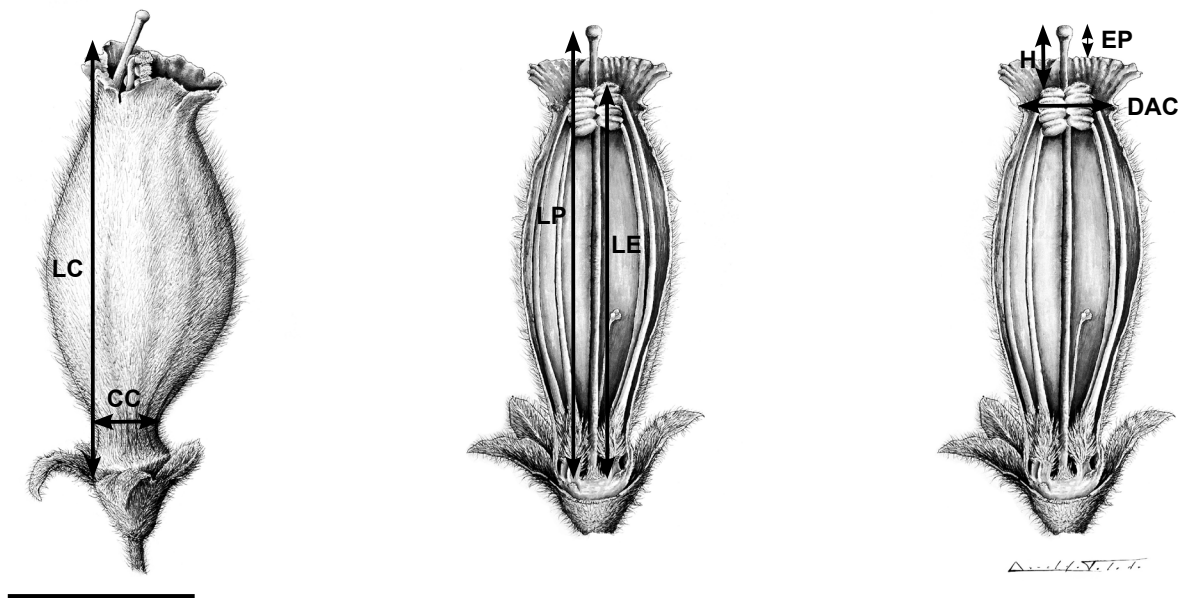


Fig. 2. Flores de *Rhytidophyllum lomense*. LC: longitud de la corola, CC: constricción de la corola, EP: elongación del pistilo, PL: longitud del pistilo, LE: longitud de los estambres, DAC: diámetro de la apertura de la corola, H: hercogamia. Barra de escala: 1 cm. Ilustración: A. Toledo-Sotolongo.

Fig. 2. Flowers of *Rhytidophyllum lomense*. LC: corolla length, CC: corolla constriction, EP: pistil elongation, PL: pistil length, LE: length of the stamens, DAC: corolla opening diameter, H: hercogamy. Scale bar: 1 cm. Illustration: A. Toledo-Sotolongo.

rangos de Kruskal-Wallis. La relación existente entre las variables morfológicas se determinó a través de una correlación por rangos de Spearman en cada población.

La longevidad floral se estudió a partir de 30 botones marcados en 10 individuos de cada población. Para ello, se realizó la observación de dichos botones, desde el momento de antesis hasta la senescencia de las flores.

En un estudio previo se identificaron 10 botones para evaluar la receptividad del estigma. Para esto se roció agua oxigenada sobre los estigmas para luego determinar a simple vista la receptividad por los cambios de coloración y tamaño del estigma en las flores destinadas al estudio de las fases femenina y masculina.

De estos botones marcados, 10 fueron utilizados para determinar la duración de las fases femenina y masculina. Para esto se comprobó el tiempo durante el cual está receptivo el estigma, el momento de apertura (dehiscencia) de las anteras y duración de las mismas a partir de observaciones cada dos horas a cada flor muestreada.

El tiempo de producción y el volumen de néctar se determinaron a través de 10 flores de diferentes plantas en cada población embolsadas con tela de tul blanco, desde el estado de botones, para prevenir el acceso de visitantes florales. A cada una de las flores se les extrajo el néctar producido cada una hora utilizando tubos microcapilares de 5 µl, según el método de Kearns & Inouye (1993).

Ecología de la polinización

Los estudios de polinización de la especie solo se realizaron en la población del Sendero "Caburní". Para determinar la frecuencia de visitas se observaron un total de 345 flores durante 105 horas, distribuidas en 23 días y 17 plantas. Las observaciones oscilaron entre el horario de las 6:00 horas y hasta las 18:00 horas con intervalos de 15 minutos cada media hora, en que se produce el cierre de las flores. Las observaciones se realizaron a simple vista a aproximadamente 3 metros de distancia de las flores. Se anotó por cada visitante: hora de la visita, especie visitante, número de flores visitadas y si el visitante hizo contacto con las anteras y/o el estigma.

Solo los visitantes que hicieron contacto con los órganos reproductivos de la flor se consideraron polinizadores legítimos. Sin embargo, los visitantes que nunca o rara vez hicieron contacto con los órganos reproductivos no se consideraron como polinizadores. Para cada hora, se calculó la tasa de visitas como el número total de visitas entre el número de flores observadas por horas de observación. Para determinar la tasa total de visitas por día a la especie se sumaron las tasas de visitas por horas. La eficiencia de la polinización se determinó a través de los índices: frutos producidos/flores marcadas (F/F), y semillas producidas/número de óvulos (S/O) (Inouye & al. 1994). Estos se calcularon a partir de la producción de frutos de 10 plantas de la población.

Niveles de autogamia y limitación de polen

Para determinar la capacidad de autogamia se utilizaron 30 flores en total, tres flores por planta y 10 flores por tratamiento. A cada flor se les aplicó uno de los tres tratamientos siguientes: (i) exclusión de polinizadores (ExP), (ii) polinización cruzada (PoC) o (iii) control (Co). El tratamiento de exclusión de polinizadores consistió solamente en embolsar a las flores desde la fase de botones. Para el tratamiento de polinización cruzada se emascularon las flores desde el estado de botones, luego de comprobar en cinco botones adicionales que este procedimiento no genera la marchitez. Luego se polinizaron manualmente las flores con polen proveniente de cinco individuos diferentes, alejados de las plantas estudiadas, para estimar la producción de frutos que la planta puede producir por xenogamia y se embolsaron. Por su parte, a las flores que se les aplicó el tratamiento control solamente se marcaron.

Dos meses después de aplicar los tratamientos se cuantificó la producción de frutos en las flores marcadas. Para determinar el potencial de autogamia, se calculó el índice de auto-fertilidad según la metodología planteada por Lloyd (1992). Para ello, se dividió el número de frutos provenientes del tratamiento de exclusión de polinizadores entre el número de frutos derivados de flores polinizadas manualmente en el tratamiento de polinización cruzada. Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas, en cuanto a la cantidad de semillas entre los tratamientos aplicados, se realizó un análisis de varianza de clasificación simple por rangos de Kruskal-Wallis y una comparación múltiple de medias no paramétrica (Prueba de Dunn).

Para calcular el índice de limitación polínica se siguió la metodología de Martén-Rodríguez & Fenster (2010). De esta forma, se marcaron 10 plantas de la población y se visitaron cada tres días durante un mes, de acuerdo al tiempo que demoran las flores desde la formación de los botones hasta el inicio de la fase femenina. Las plantas se seleccionaron por pares, las cuales tenían aproximadamente la misma cobertura. En una de las plantas del par se dejaron visitar libremente todas las flores producidas durante el mes de seguimiento. En la otra planta del par se aplicó polinización manual con polen de otras plantas de la población a todas las flores producidas durante el mes. Las flores muestreadas fueron marcadas y transcurridos dos meses se recolectaron los frutos y se contaron las semillas producidas por fruto. Se calculó el índice de limitación polínica (ILP), de la misma forma que los autores citados, a través de la metodología de de Larson & Barrett (2000). Dicho índice se define como: $ILP = 1 - (\text{producción de semillas total de las plantas control} / \text{producción de semillas total de las plantas exocruzadas})$.

RESULTADOS

Biología floral

Los caracteres florales de *Rhytidophyllum lomense* son similares en las tres localidades estudiadas (Tabla I). Por ejemplo, los valores máximos y mínimos de todas las variables presentaban muy poca variación.

TABLA I

Caracteres florales de *Rhytidophyllum lomense* en las poblaciones Sendero “Caburní”, Reparto “Jesús Menéndez” y Mogote “Mi Retiro” en Topes de Collantes, Sancti Spiritus, Cuba central

Se muestran los valores de media \pm desviación estándar (DE) de los caracteres florales analizados, el estadígrafo *H* y el valor de significación *p* según prueba de Kruskal-Wallis.

TABLE I

Floral characters of *Rhytidophyllum lomense* in the populations of the “Caburní” Path, “Jesús Menéndez” and Mogote “Mi Retiro” in Topes de Collantes, Sancti Spiritus, Central Cuba

The values of mean \pm standard deviation (SD) of the floral characters analyzed, the H statistic and the significance value *p* according to the Kruskal-Wallis test are shown.

Rasgos florales	Sendero “Caburní”	Reparto “Jesús Menéndez”	Mogote “Mi Retiro”	<i>H</i>	<i>p</i>
Longitud de la corola	2,28 \pm 0,26	2,32 \pm 0,31	2,35 \pm 0,32	1,20	0,55
Elongación del pistilo	0,36 \pm 0,11	0,37 \pm 0,12	0,34 \pm 0,1	0,69	0,71
Diámetro de apertura de la corola	0,34 \pm 0,16	0,41 \pm 0,15	0,38 \pm 0,17	4,60	0,10
Constricción de la corola	0,34 \pm 0,08	0,35 \pm 0,08	0,36 \pm 0,09	0,23	0,89
Longitud de los estambres	2,21 \pm 0,31	2,26 \pm 0,34	2,18 \pm 0,38	1,16	0,56
Longitud del pistilo	2,68 \pm 0,32	2,78 \pm 0,33	2,61 \pm 0,32	4,42	0,11
Hercogamia	0,43 \pm 0,14	0,52 \pm 0,28	0,44 \pm 0,28	1,60	0,45
Número de óvulos	1484 \pm 210	1553 \pm 134	1528 \pm 167	7,25	0,14

Se considera entonces que la biología floral ejerce la misma influencia sobre la biología reproductiva en las tres localidades de estudio, teniendo en cuenta la cercanía y las mismas condiciones climáticas de las tres localidades. Por esta razón solo se realizaron los estudios de biología reproductiva en la localidad Sendero Caburní.

Existen correlaciones positivas entre las variables morfológicas: CC-EP, CC-LE, CC-LP, CC-LC, DAC-LC, EP-LP, EP-LC, H-LP, LE-LP, LE-LC y LP-LC (Tabla II). La hercogamia (H) tiene correlaciones negativas con longitud de los estambres (LE) y la constricción de la corolla (CC).

La apertura de las flores de *Rhytidophyllum lomense* ocurre dos días después de la formación de los botones. La antesis fue diurna, desde las 6:00 h hasta las 18:00 h (\pm 1,3 horas). Durante siete días las flores abren cada mañana, luego de los cuales ocurre la marchitez y caída de la corola.

Las flores son protóginas, se mantienen en fase femenina por 10 horas (\pm 1,5 horas) después de la antesis. En la mañana del segundo día ocurre la apertura de las anteras y las flores tienen un periodo como hermafroditas de seis horas (\pm 2 horas), luego de las cuales comienza la fase masculina que puede extenderse hasta cuatro días. La mayor producción de néctar se encontró entre las 12:00 h y las 17:00 h en todas las poblaciones, mientras que los menores valores se encontraron en las primeras horas de la mañana (Figura 3).

Ecología de la polinización en la población Sendero “Caburní”

Se observaron solo cuatro visitantes florales: *Chlorostilbon ricordii* (Gervais), Hymenoptera sp., *Polistes major* (Pal. de Beauv.) y *Phoebis philea* (Linnaeus). La tasa de visitas total

en la población objeto de estudio fue de solo 0.11 visitas efectivas por flor por día. Los picos de visitas efectivas fueron localizados entre las 7:00-8:00 h y entre las 16:00-17:00 h (Figura 3). Los valores de tasas de visitas y volumen de néctar por horas no presentan correlación estadísticamente significativa ($r_s = 0,04$; $p = 0,91$).

Solo *Chlorostilbon ricordii* puede considerarse como polinizador de la especie en la población estudiada, ya que hizo contacto con ambos órganos reproductivos en el 100 % de las visitas. Por otra parte, la especie perteneciente a *Hymenoptera* realizó solo dos visitas, de ellas solo una fue efectiva. En dicha visita no extrajo ninguna de las recompensas florales. Las especies *Polistes major* y *Phoebis philea* no realizaron visitas efectivas. *Poites major* realizó solo una visita donde no hizo contacto con los órganos reproductivos. En el caso de *P. philea* realizó tres visitas a la especie en el tiempo de observación, pero solo en una de ellas hizo contacto con las anteras de la flor.

Las medias del índice de frutos producidos/flores producidas (F/F) de las plantas muestreadas en la población resultaron 0,43 (\pm 0,21). Por otro lado, el índice semillas producidas/número de óvulos (S/O) obtuvo un valor de 0,04 (\pm 0,01).

Niveles de autogamia

La producción de semillas muestra diferencias significativas entre los tratamientos de exclusión de polinizadores, polinización cruzada y control ($H = 29,893$; $p = 0,003$). La producción de semillas de las flores polinizadas manualmente, es superior a la producción de semillas provenientes de flores utilizadas como control y respecto a las flores del tratamiento de exclusión de polinizadores (Figura 4). El índice de autofertilidad resultó 0,077 y el de limitación de polen 0,32.

TABLA II

Coefficiente de correlación de Spearman entre los rasgos florales de *Rhytidophyllum lomense* en tres localidades de Topes de Collantes, Sancti Spiritus, Cuba central

LC: longitud de la corola, CC: constricción de la corola, DAC: diámetro de apertura de la corola, EP: elongación del pistilo, LE: longitud de los estambres, LP: longitud del pistilo y H: hercogamia. Los números con asteriscos indican valores con correlaciones significativas ($p < 0,05$).

TABLE II

Spearman correlation coefficient between the floral traits of *Rhytidophyllum lomense* in three localities of Topes de Collantes, Sancti Spiritus, central Cuba

LC: corolla length, CC: constriction of the corolla, DAC: opening diameter of the corolla, EP: elongation of the pistil, LE: length of the stamens, LP: length of the pistil and H: herkogamy. The numbers with asterisks indicate values with significant correlations ($p < 0.05$).

Rasgos florales	DAC	EP	H	LE	LP	LC
CC	0,16 (0,21)	0,52 ($< 0,001$)*	-0,05 (0,71)	0,37 (0,005)*	0,41 (0,002)*	0,53 ($< 0,001$)*
DAC		0,13 (0,30)	0,12 (0,35)	0,13 (0,30)	0,26 (0,05)	0,27 (0,04)*
EP			0,24 (0,06)	0,26 (0,05)	0,56 ($< 0,001$)*	0,46 ($< 0,001$)*
H				-0,40 (0,002)*	0,42 (0,002)*	0,21 (0,11)
LE					0,32 ($< 0,002$)*	0,56 (0,001)*
LP						0,55 ($< 0,001$)*

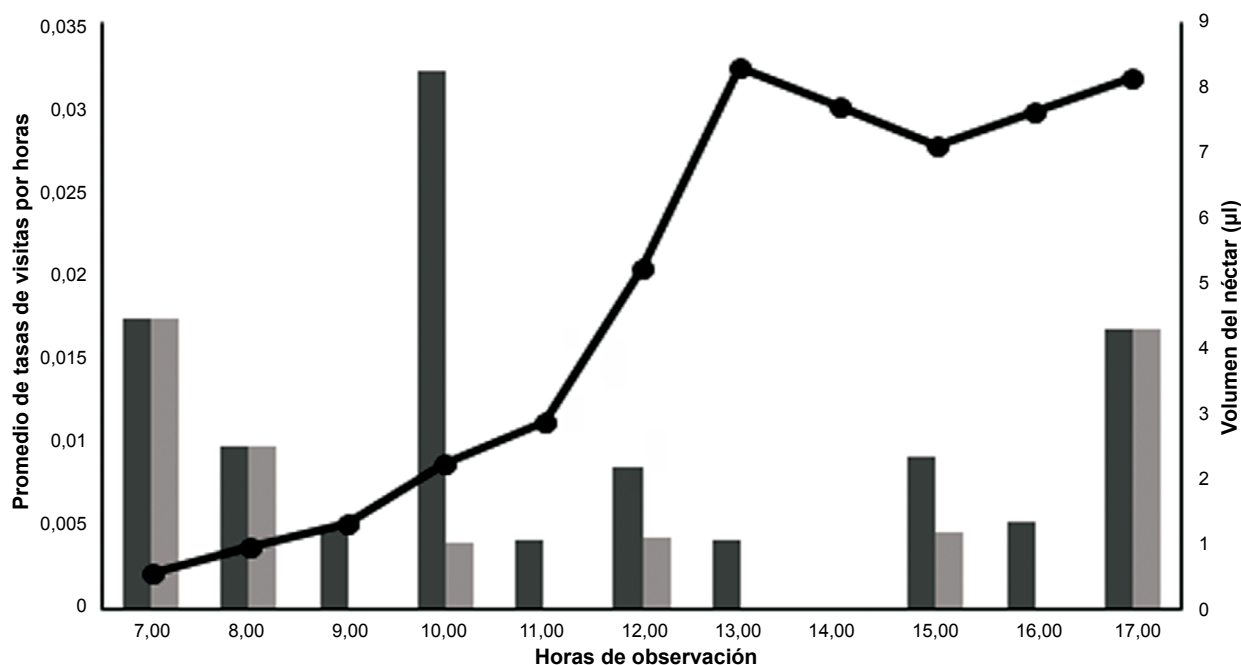


Fig. 3. Promedio de tasas de visitas efectivas por horas (tasa de visitas en gris oscuro y visitas efectivas en gris claro) y volumen de néctar producido (curva en negro) en la población de *Rhytidophyllum lomense* localizada en el Sendero "Caburni" en Topes de Collantes, Sancti Spiritus, Cuba central.

Fig. 3. Average of rates of effective visits per hour (rate of visits in dark gray and effective visits in light gray) and volume of nectar produced (curve in black) in the population of *Rhytidophyllum lomense* located on the "Caburni" path in Topes de Collantes, Sancti Spiritus, central Cuba.

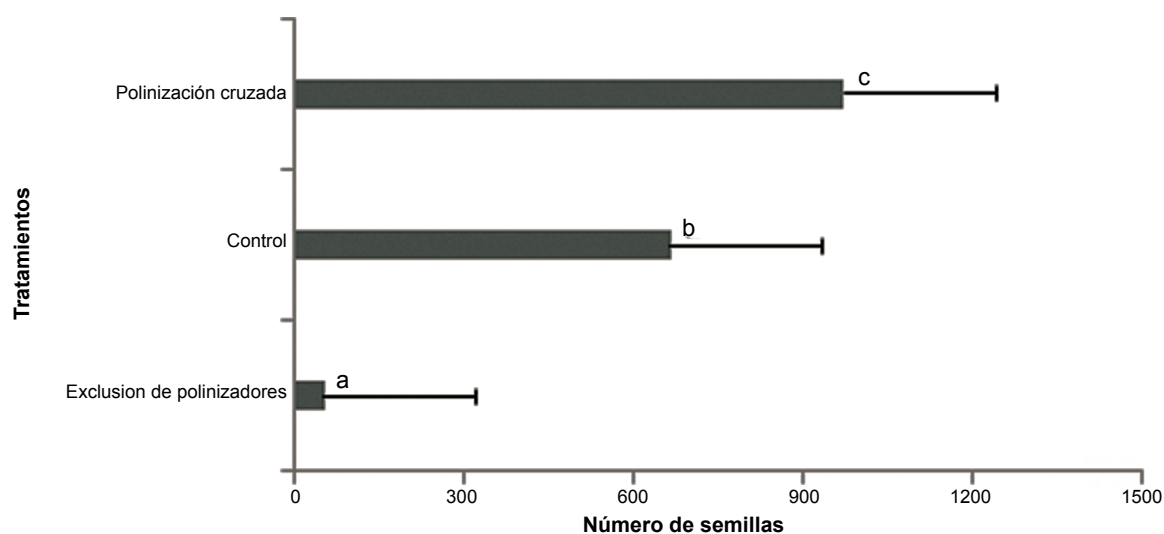


Fig. 4. Número de semillas producidas en cada tratamiento de polinización aplicado a flores de *Rhytidophyllum lomense* en la población Sendero “Caburní en Topes de Collantes, Sancti Spiritus, Cuba central. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores según prueba de Kruskal-Wallis.

Fig. 4. Number of seeds produced in each pollination treatment applied to flowers of *Rhytidophyllum lomense* in the population “Caburní Trail in Topes de Collantes, Sancti Spiritus, Central Cuba. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) between the values according to the Kruskal-Wallis test.

DISCUSIÓN

Influencia de la biología floral en la especialización de *Rhytidophyllum lomense*

Los rasgos florales de *Rhytidophyllum lomense* indican especialización por colibríes. Diferentes rasgos morfológicos y funcionales de esta especie (ejemplo: corola tubular anaranjada, anteras y estigma extendidos y anthesis y producción de néctar diurnos) corroboran lo planteado por varios autores al asegurar que son características típicas del síndrome especialista por colibríes (Fenster & al. 2004, Whittall & Hodges 2007, Faegri & van der Pijl 2013). Resultados similares se han encontrado en otras especies de la tribu *Gesnerieae*, a la que pertenece la especie estudiada (Martén-Rodríguez & al. 2009), por ejemplo: *Gesneria decapleura* Urb. y *G. pulverulenta* Alain.

Polinizadores y tasa de visitas

En la especie estudiada se presenta un alto nivel de correlación entre los rasgos florales referidos a las dimensiones de la corola, de los estambres y del pistilo. Es importante destacar que todas estas correlaciones son positivas, lo que indica un alto nivel de covariación entre estos caracteres florales.

Otra correlación importante se presenta entre la hercogamia y la longitud de los estambres, la cual es negativa. Según la propia morfología de la flor, se demuestra el alargamiento de estas estructuras y su acercamiento al estigma durante el proceso reproductivo de la planta. Este ocurre en numerosas especies de la familia *Gesneriaceae* (Martén-Rodríguez & Fenster, 2008, Martén-Rodríguez & al. 2009). Tal mecanismo de acercamiento de los estambres al estigma en especies protóginas posibilita la auto-fertilización de las flores cuando las especies son auto-compatibles (Bertin & Newman 1993, Kalisz & al. 2012).

De esta forma, el acercamiento de las estructuras reproductoras podría determinar la existencia de mecanismos de aseguramiento reproductivo como la autogamia (Brys & Jacquemyn 2011, Kalisz & al. 2012).

Los resultados encontrados en la medición de los caracteres florales estudiados y sus relaciones predicen que *Rhytidophyllum lomense* es especialista por colibríes. Además, solo *Chlorostilbon ricordii* hizo contacto con ambas estructuras reproductoras en cada visita observada por lo que se puede inferir que es el polinizador principal de la especie, mientras que los restantes visitantes son visitantes casuales.

La corola tubular presente en *Rhytidophyllum lomense*, así como el pequeño diámetro de apertura de la corola y la constricción de la misma, son características que restringen la entrada de los insectos y/o la extracción de recompensas por los mismos. De la misma forma, estos caracteres favorecen a los colibríes, y aumentan la deposición y remoción de polen en el estigma en las visitas de estas aves. Similares resultados fueron encontrados por Castellanos & al. (2004) en flores del género *Penstemon*. Estos rasgos florales presentes en *R. lomense* fueron descritos por Martén-Rodríguez & al. (2009, 2015) para otras especies ornitófilas de gesneriáceas antillanas, tales como *Gesneria reticulata* (Griseb.) Urb., *G. ventricosa* Sw. y *R. asperum* Alain.

Otro de los rasgos florales presente en *Rhytidophyllum lomense* que atrae poco a los insectos es el color anaranjado de la corola. Según Briscoe & Chittka (2001), esto se debe a que este grupo de animales tienen un sistema visual con poca sensibilidad hacia este color. Sin embargo, Hart & al. (2000) exponen que en los colibríes la visión está caracterizada por detectar longitudes de onda larga (rojo), media (amarilla)

y corta (azul). Resultados de numerosos estudios en la tribu *Gesnerieae* (Martén-Rodríguez & Fenster 2008, 2010, Martén-Rodríguez & al. 2009) señalan que las gesneriáceas de colores rojo y anaranjado son visitadas mayormente por colibríes. De esta forma, la especialización de estas gesneriáceas, incluyendo a *R. lomense*, se presenta como resultado de que los rasgos florales restringen la entrada de insectos y favorecen las visitas de colibríes. Esta situación permite afirmar que la especie estudiada tiene un sistema de polinización especialista por colibrí, lo que corrobora lo predicho por el síndrome de polinización.

La especie *Rhytidophyllum lomense* presenta solo 0,004 visitas por flor por día. En otras especies de gesneriáceas antillanas, Martén-Rodríguez & al. (2009) refieren que la baja tasa de visitas se debe a que estas plantas exhiben cortos períodos de floración y distribución restringida, mientras que los polinizadores presentan rangos geográficos más grandes. Los propios autores encontraron que en la tribu *Gesnerieae* las especies polinizadas exclusivamente por colibríes presentan un promedio de 1,0 ($\pm 1,5$) visita por flor por día, muy superior a *R. lomense*. Además, la tasa de visitas podría estar influenciada por la dinámica de producción de néctar, al tener en cuenta que esta es la recompensa buscada por los colibríes, según autores como McDade & Weeks (2004).

La mayor producción de néctar en *Rhytidophyllum lomense* se obtuvo en el horario comprendido entre las 12.00 h y las 15.00 h. Este horario podría estar en función de acumular néctar y de esta forma asegurar una mayor tasa de visitas de colibríes a finales de la tarde como sucede en otras especies de gesneriáceas antillanas con este sistema de polinización (Martén-Rodríguez & al. 2009). Sin embargo, la observación de polinizadores sugiere que no hay correlación entre estas dos variables.

Otro factor limitante en cuanto a la tasa de visitas es la baja producción media de néctar de *Rhytidophyllum lomense*, de solo 8 μ l. Este rasgo floral muestra resultados similares a otros estudios en especies de la tribu *Gesnerieae* distribuidas en Puerto Rico (Martén-Rodríguez & Fenster 2008). Estos autores concluyen que las especies de la tribu polinizadas solo por colibríes producen un volumen de néctar de aproximadamente 12,5 μ l ($\pm 3,99$). Resultados de Gass & Garrison (1999) demuestran que los colibríes tienen una buena memoria espacial y pueden recordar la localización de las plantas que les proveen tanto altos como bajos recursos de néctar, visitándolas más o menos frecuentemente.

Limitación de polen y eficiencia de la polinización

Las flores de *Rhytidophyllum lomense* tienen un número de óvulos considerado como alto si lo comparamos con otras especies del género. Knight & al. (2005) y Burd & al. (2009), señalan que en numerosas especies con bajo o impredecible servicio de polinizadores producen gran cantidad de óvulos para de esta forma asegurar la producción de semillas. Así mismo se presenta en la especie un índice de limitación

polínica similar a otros obtenidos en la tribu *Gesnerieae* por Martén-Rodríguez & Fenster (2010) en especies con síndrome especialista por colibríes como *Gesneria citrina* Urb. y *R. asperum*. Este valor de limitación polínica está determinado fundamentalmente por la baja tasa de visitas.

Sin embargo, en la especie estudiada los resultados arrojaron que el 43 % de las flores se convierten en frutos y solo el 4 % de los óvulos se convierten en semillas. Estos resultados sugieren que el colibrí no deposita en las flores suficiente polen o deposita polen de mala calidad en sus visitas como para fecundar la totalidad de los óvulos. Otra posible explicación es que la morfología del cuerpo de *Chlorostilbon ricordii* no concuerda con la morfología de la flor. Podría ser también que *Rhytidophyllum lomense* necesite más de una visita para satisfacer la cantidad de polen requerida para la fertilización de todos sus óvulos. Para comprobar cualquiera de estas hipótesis se necesitan más investigaciones de ecología de la polinización.

En las especies de flores tubulares de la tribu *Gesnerieae* estudiadas por Martén-Rodríguez & Fenster (2010) (e.g., *Gesneria citrina*, *G. reticulata*, *G. cuneifolia* (DC.) Fritsch, y *Rhytidophyllum asperum*), los colibríes polinizadores fueron eficientes, aun cuando se presenta limitación polínica y la tasa de visitas fue baja. Sin embargo, en el propio estudio se demuestra que estos polinizadores solo son eficientes bajo determinadas condiciones, por ejemplo cuando los recursos de otras especies son limitados. Como respuesta al bajo servicio de polinización y para asegurar la producción de semillas estas especies evolucionaron hacia la generalización o hacia la autogamia. En el caso de las especies insulares, como *Rhytidophyllum lomense*, lo más probable es que desarrollen la autofertilización antes de la generalización debido a la escasa diversidad de fauna polinizadora en las islas comparado con los continentes (Martén-Rodríguez & al. 2015).

Niveles de autogamia y éxito reproductivo

El valor obtenido de índice de auto-fertilidad en la población estudiada fue mucho menor que 0,75. Según resultados de Lloyd & Shoen (1992) en otras especies, este valor indica que *Rhytidophyllum lomense* no presenta auto-fertilización ni autogamia. Martén-Rodríguez & Fenster (2010) refieren que las especies con corola tubular de color anaranjado o rojo y anthesis diurna, son auto-compatibles y tienen la habilidad de producir semillas autónomamente, como respuesta a la baja e impredecible tasa de visitas de colibríes a flores de este diseño en el Caribe. La especie *R. lomense* concuerda con estas variables morfológicas y recibe escasas visitas de *Chlorostilbon ricordii*; sin embargo, no presenta un alto índice de auto-fertilidad.

El bajo índice de auto-fertilidad de *Rhytidophyllum lomense* puede estar influenciado por la separación en tiempo (dicogamia) y en espacio (hercogamia) de las estructuras reproductoras en la fase hermafrodita de la especie objeto de estudio. En *R. lomense* el periodo de coincidencia entre la fase femenina y masculina es de solo seis horas (± 2 horas), cuando aún

los estambres están aún muy distantes del estigma receptivo. Además, la forma de apertura de los mismos es pasiva por lo que no hay un mecanismo que posibilite la llegada del polen hacia el estigma.

En otras especies estudiadas de la tribu *Gesnerieae* con este diseño floral (*Gesneria citrina*, *G. cuneifolia*, *G. reticulata*, *Rhytidophyllum asperum*), la dicogamia es un periodo muy corto y se encuentra en las flores en fase hermafrodita en la mayor parte de su período reproductivo. Además, los estambres se elongan por lo que disminuye la hercogamia, de forma tal que al final del periodo reproductivo de la flor se asegura la reproducción si no ha ocurrido cruzamiento mediado por polinizadores.

Por ejemplo, en *Gesneria citrina*, con un índice de autofertilidad entre 0,07 y 0,19, la elongación de los estambres se acelera solo cuando la especie ya ha sido polinizada para evitar la auto-fertilización cuando aún la flor tiene posibilidades de cruzarse. De esta forma, en esta especie, la hercogamia actúa como reductor de la interferencia entre las funciones femenina y masculina (Chen & al. 2009). Algo similar podría ocurrir en *Rhytidophyllum lomense*, donde la auto-infertilidad determina que los altos valores de hercogamia y dicogamia solo funcionen para evitar la interferencia entre las funciones masculina y femenina en el momento de la polinización.

El bajo índice de auto-fertilidad y las separaciones en tiempo y espacio de las estructuras reproductivas aseguran la deposición de polen proveniente de otros individuos a través de los polinizadores en la especie objeto de estudio. Las anteras y el estigma extendido también evitan el contacto con algún polinizador que podría no ser eficiente en la transferencia de polen. Además, ello permite aumentar el traslado de polen por las aves, mecanismo este común en las flores polinizadas por colibríes según los resultados de Thomson (2003) y Wilson & al. (2004). Las especies que coinciden en el índice de limitación polínica con *Rhytidophyllum lomense* (*Gesneria citrina* y *R. asperum*) presentan un índice de auto-fertilidad de 0,38 y 0,17 respectivamente, este último no muy distante del obtenido para la especie estudiada (Martén-Rodríguez & Fenster 2010).

CONCLUSIONES

El diseño floral de *Rhytidophyllum lomense* predice el sistema de polinización especialista por colibríes, específicamente por *Chlorostilbon ricordii*. Pese a la baja tasa de visitas en las poblaciones estudiadas, con las que solo se fecunda el 4 % de los óvulos, el bajo índice de limitación polínica obtenido y el bajo índice de auto-fertilidad de la especie indica que el colibrí asegura la producción de semillas, y por tanto la persistencia de *Rhytidophyllum lomense* en su hábitat.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

L. Díaz-Suarez concibió la idea original, diseñó y coordinó la investigación, realizó los muestreos de campo, analizó los datos, diseñó las tablas y figuras, escribió la primera versión del manuscrito y corrigió las versiones posteriores. M. Faife-Cabrera concibió la idea original, dirigió el diseño metodológico, participó en el análisis de los datos y supervisó la investigación. E. Díaz-Alvarez participó en

el diseño metodológico y el análisis de los datos. E.M. Torres-Roche participó en análisis de los datos y la elaboración de las figuras. A. Toledo-Sotolongo participó en la elaboración de las figuras, fundamentalmente en el proceso de fotografía e ilustraciones. Todos los autores contribuyeron en la redacción, discusión de los resultados y revisión crítica del manuscrito.

CUMPLIMIENTO DE NORMAS ÉTICAS

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Aprobación de ética: Todos los autores han llevado a cabo el trabajo de campo y la generación de datos de forma ética, incluida la obtención de permisos adecuados.

Consentimiento para la publicación: Todos los autores han dado su consentimiento para publicar este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alain. 1957. Flora de Cuba IV. Dicotiledóneas: *Melastomataceae* a *Plantaginaceae*. *Contr. Ocas. Mus. Hist. Nat. Colegio "De La Salle"* 16.

Bertin, R.I. & Newman, C.M. 1993. Dichogamy in Angiosperms. *Bot. Rev.* 59:112-152.

Briscoe, A.D. & Chittka, L. 2001. The evolution of color vision in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 46: 471-510.

Brys, R. & Jacquemyn, H. 2011. Variation in the functioning of autonomous self-pollination, pollinator services and floral traits in three *Centaurium* species. *Ann. Bot.* 107: 917-925.

Burd, M., Ashman, T.L., Campbell, D.R., Dudash, M.R., Johnston, M.O., Knight, T.M., Mazer, S.J., Mitchell, R.J., Steets, J.A. & Vamosi, J.C. 2009. Ovule number per flower in a world of unpredictable pollination. *Am. J. Bot.* 96: 1159-1167.

Castellanos, M.C., Wilson, P. & Thomson, J.D. 2004. 'Anti-bee' and 'pro-bird' changes during the evolution of hummingbird pollination in *Penstemon* flowers. *J. Evol. Biol.* 17:876-885.

Chen, X.S., Martén-Rodríguez, S., Li, Q.J. & Fenster, C. 2009. Potential Autonomous Selfing in *Gesneria citrina* (*Gesneriaceae*), a Specialized Hummingbird Pollinated Species with Variable Expression of Herkogamy. *J. Integr. Plant. Biol.* 51:973-978.

Clark, J., Matos, J., Suárez, S., Ginzburg, S. & Skog, L.E. 2013. An annotated species list for the *Gesneriaceae* of Cuba. *Selbyana* 31:186-227.

Faegri, K. & Van der Pijl, L. 2013. The principles of pollination ecology. Third Edition. Elsevier. NY, USA.

Feinsinger, P. 1983. Coevolution y pollination. pp. 282-310. En: Futuyama, J.D. & Slatkin, M. (Eds.). *Coevolution*. Oxford University Press. Oxford, UK.

Fenster, C.B., Armbruster, W.S., Wilson, P., Dudash, M.R. & Thomson, J.D. 2004. Pollination syndromes y floral specialization. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 35: 375-403.

Freiberg, M. 2007. Evolutionary trends in pollination syndromes of Neotropical *Gesneriaceae*. *Phyton* 46: 207-209.

Gass, C.L. & Garrison, J.S. 1999. Energy regulation by traplining hummingbirds. *Funct. Ecol.* 13: 483-492.

González, A.V. & Pérez, F. 2010. Pollen limitation and reproductive assurance in the flora of the coastal Atacama Desert. *Int. J. Plant Sci.* 171: 607-614.

- González-Torres, L.R., Palmarola, A., González Oliva, L., Bécquer, E.R., Testé, E. & Barrios, D. (eds.). 2016. Lista roja de la flora de Cuba. *Bissea* 10 (número especial 1): 1-352.
- Hart, N.S., Partridge, J.C., Cuthill, I.C. & Bennett, A.T. 2000. Visual pigments, oil droplets, ocular media y cone photoreceptor distribution in two species of passerine bird: the Blue Tit (*Paruscaeruleus* L.) y the Blackbird (*Turdus merula* L.). *J. Comp. Physiol.* 186: 375-387.
- Herrera, C.M. 1987. Components of pollinator "quality": comparative analysis of a diverse insect assemblage. *Oikos* 50: 79-90.
- Inouye, D.W., Gill, D.E., Dudash, M.R. & Fenster, C.B. 1994. A model and lexicon for pollen fate. *Am. J. Bot.* 81: 1517-1530.
- Kalisz, S., Ryle, A., Chaiffetz, D., Faigeles, M., Butera, A. & Beight, C. 2012. Dichogamy correlates with outcrossing rate y defines the selfing syndrome in the mixed-mating genus *Collinsia*. *Ann. Bot.* 109: 571-582.
- Kearns, C.A. & Inouye, D.W. 1993. Techniques for pollination biologists. University Press of Colorado Press. Niwot, Colorado, USA.
- Knight, T., Steets, J., Vamosi, J., Mazer, S., Burd, M., Campbell, D., Dudash, M., Johnston, M., Mitchell, R. & Ashman, T. 2005. Pollen limitations of plant reproduction: pattern y process. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 36: 467-497.
- Larson, B.M. & Barrett, S. C. 2000. A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. *Biol. J. Linnean Soc.* 69: 503-520.
- Lázaro, A., Lundgren, R. & Totland, O. 2015. Pollen limitation, species' floral traits and pollinator visitation: different relationships in contrasting communities. *Oikos* 124: 174-186.
- Lloyd, D.G. & Schoen, D.J. 1992. Self and cross-fertilization in plants I. Functional dimensions. *Int. J. Pl. Sci.* 153(3): 58-369.
- Lloyd, D.G. 1992. Self- y cross-fertilization in plants. II. The selection of self-fertilization. *Int. J. Plant Sci.* 153(3): 370-380.
- Martín-Rodríguez, S. & Fenster, C.B. 2008. Pollination ecology and breeding systems of five *Gesneria* species from Puerto Rico. *Ann. Bot.* 102: 23-30.
- Martín-Rodríguez, S., Almarales-Castro, A. & Fenster, C.B. 2009. Evaluation of pollination syndromes in Antillean *Gesneriaceae*: evidence for bat, hummingbird y generalized flowers. *J. Ecol.* 97: 348-359.
- Martín-Rodríguez, S. & Fenster, C.B. 2010. Pollen limitation y reproductive assurance in Antillean *Gesneriaceae*: a specialists vs. generalist comparison. *Ecology* 91: 155-165.
- Martín-Rodríguez, S., Fenster, C., Agnarsson, I., Skog, L., & Zimmer E. 2010. Evolutionary breakdown of pollination specialization in a Caribbean plant radiation. *New Phytol.* 188: 403-417.
- Martín-Rodríguez, S., Quesada, M., Castro, A.A., Lopezaraiza-Mikel, M. & Fenster, C.B. 2015. A comparison of reproductive strategies between island and mainland Caribbean *Gesneriaceae*. *J. Ecol.* 103: 1190-1204.
- McDade, L.A. & Weeks, J.A. 2004. Nectar in hummingbird-pollinated Neotropical plants I: Patterns of production and variability in 12 species. *Biotropica* 36: 196-21.
- Merrett, M.F., Robertson, A.W. & Peterson, P.G. 2007. Pollination performance and vulnerability to pollination breakdown of sixteen native shrub species from New Zealand. *N.Z. J. Bot.* 45: 579-591.
- Roalson, E.H., Boggan, J.K., Skog, L.E. & Zimmer, E.A. 2005. Untangling *Gloxiniaceae* (*Gesneriaceae*). I. Phylogenetic patterns y generic boundaries inferred from nuclear, chloroplast, y morphological cladistics datasets. *Taxon.* 54: 389-410.
- Rosas-Guerrero, V., Aguilar, R., Martín-Rodríguez, S., Ashworth, L., Lopezaraiza-Mikel, M., Bastida, J.M. & Quesada, M. 2014. A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators. *Ecology Lett.* 17: 388-400.
- Schemske, D.W. & Horvitz, C.C. 1984. Variation among floral visitors in pollination ability: a precondition for mutualism specialization. *Science* 225: 519-521.
- Stebbins, G.L. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I. Pollination mechanisms. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1: 307-326.
- Thomson, J.D. 2003. When is it mutualism? *Am. Nat.* 162: 51-59.
- Vamosi, J.C., Steets, J.A., & Ashman, T.L. 2013. Drivers of pollen limitation: macroecological interactions between breeding system, rarity, and diversity. *Plant Ecol. Divers.* 6:171-180.
- Whittall, J.B. & Hodges, S.A. 2007. Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature* 447: 706-709.
- Wilson P., Castellanos, M.A., Hogue, J.N., Thomson, J.D. & Armbruster, S. 2004. A multivariate search for pollination syndromes among penstemons. *Oikos* 104: 345-361.
- Wilson, P. & Thomson, J.D. 1991. Heterogeneity among floral visitors leads to discordance between removal and deposition of pollen. *Ecology* 72: 1503-1507.
- Zhang, Z.Q., Zhang, Y.H. & Sun, H. 2011. The reproductive biology of *Stellera chamaejasme* (*Thymelaeaceae*): A self-incompatible weed with specialized flowers. *Flora* 206: 567-574.
- Zimmer, E.A., Roalson, E.H., Skog, L.E., Boggan, J.K. & Idnurm, A. 2002. Phylogenetic relationships in the *Gesnerioideae* (*Gesneriaceae*) based on nrDNA ITS and cpDNAtrnL-F and trnE-T spacer region sequences. *Am. J. Bot.* 89: 296-311.