

Biología reproductiva y conservación del endemismo *Polygala vayredae*

S. Castro^{1,2,3}

(1) CESAM y Departamento de Biología de la Universidad de Aveiro, Campus Universitario de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

(2) Departamento de Biología Vegetal y Ciencias del Suelo, Facultad de Biología, Universidad de Vigo, As Lagoas-Marcosende 36200 Vigo, España

(3) Centre for Functional Ecology and Department of Life Sciences, Faculty of Science and Technology, University of Coimbra, Calçada Martins de Freitas 3001-455 Coimbra, Portugal.

➤ Recibido el 8 de enero de 2009, aceptado el 10 de enero de 2009.

Castro, S. (2009). Biología reproductiva y conservación del endemismo *Polygala vayredae*. *Ecosistemas* 18(1):78-84.

Existe un consenso generalizado de que el estudio de la biología reproductiva de especies endémicas, raras o amenazadas es esencial para comprender su estado actual y planificar el desarrollo de estrategias adecuadas de conservación in situ y ex situ. *Polygala vayredae* Costa (Polygalaceae) es una especie endémica de la cadena pre-Pirenaica oriental, clasificada como vulnerable según las categorías de la IUCN (Bañares et al. 2003). A pesar de su carácter de especie amenazada, la información disponible relativa a la biología de esta especie es escasa y limitada a trabajos antiguos (Bolós 1927, 1946; Bolós y Vayreda 1922). El principal objetivo de esta Tesis de Doctorado consistió en estudiar la biología reproductiva de *P. vayredae* evaluando de forma detallada los diferentes pasos del ciclo de vida de las plantas, para tratar de detectar las causas de su estado actual y aportar información de base, útil para programas futuros de conservación. Para alcanzar estos objetivos se estudiaron los siguientes tópicos: biología floral y sistema de reproducción de la especie, ecología de la polinización y mecanismos de dispersión.

Biología floral y sistema de reproducción: ¿cómo afectan al éxito reproductivo de esta planta?

Las flores son las estructuras directamente involucradas en la fecundación pero también en la atracción de los vectores de polinización. Así, sus características morfológicas y funcionales desempeñarán un papel fundamental en el éxito reproductivo de la planta. La estructura floral de *Polygala vayredae* reveló estar especialmente adaptada para la reproducción cruzada (xenogamia) y entomofilia (**Fig. 1**), encontrándose de acuerdo con el sistema de reproducción y auto-incompatibilidad observados en los experimentos de polinización controlada (**Fig. 2**). Sus flores papilionadas son extremadamente elaboradas, presentando los órganos sexuales encerrados en la corola. Anteras y estigmas quedan expuestos a los visitantes únicamente cuando se produce el movimiento de la quilla por acción del peso de un insecto mientras forrajea en busca de néctar y/o polen. La flor produce néctar en una glándula localizada en la base del largo tubo de la corola, siendo accesible apenas a insectos con largas probóscidas. Al contrario de lo observado en otras especies del género *Polygala* (Weekley y Brothers, 2006), no se observó un mecanismo que asegure la reproducción en ausencia de visitantes florales efectivos (i.e., *delay selfing*), por lo que esta especie depende estrictamente de vectores de polinización eficientes para producir frutos y semillas. Como consecuencia de las complicadas características florales, la escasez e imprevisibilidad de los polinizadores, así como la ineficiencia de la mayoría de visitantes florales, en condiciones naturales las tasas de producción de frutos y semillas son muy bajas y variables. Sin embargo, esta estrategia reproductiva previene los efectos negativos derivados de cruzamientos entre individuos emparentados (i.e., *depresión por endogamia*), siendo la planta capaz de sobrevivir a años de escasez de polinizadores debido a su hábito perenne.



Figura 1. **A.** Flor de *Polygala vayredae*; **B.** *Bombus pascuorum* visitando las flores de *P. vayredae* de forma eficiente y legítima; **C.** *Bombus terrestris* robando una flor de *P. vayredae* mediante una incisión realizada en la base del tubo de la corola.

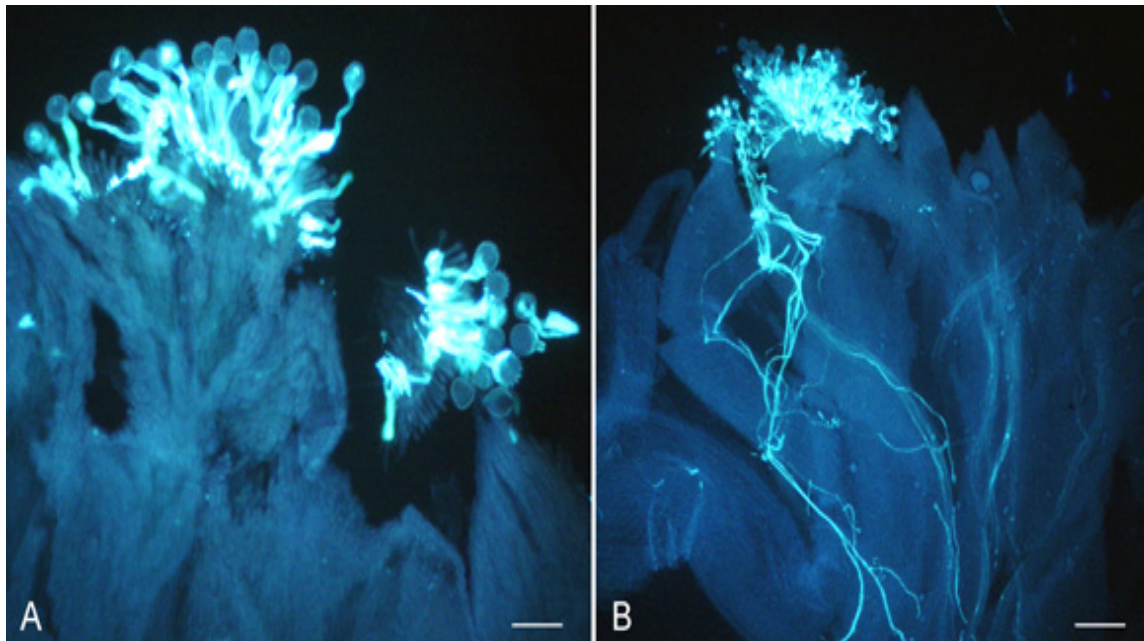


Figura 2. Desarrollo de tubos polínicos en los pistilos de *Polygala vayredae*. **A.** Auto-polinización (escala = 100 μ m). **B.** Polinización xenógama (escala = 200 μ m).

La longevidad floral es otro rasgo floral que influencia directa e indirectamente el éxito reproductivo de la planta, pudiendo afectar a la cantidad y calidad del polen exportado y recibido y contribuyendo a la capacidad de atracción de la planta (Ashman 2004). La longevidad floral ha sido descrita como el resultado de un *trade-off* entre el cumplimiento de las funciones masculina y femenina y el coste energético de mantener las flores abiertas o producir nuevas estructuras (Ashman y Schoen 1994, 1996). Sin embargo, mientras que el efecto de la polinización en la duración floral ha sido estudiado en diversas especies, las consecuencias de mantener las flores abiertas durante largos períodos de tiempo es un tópico que ha recibido escasa atención. En nuestro caso, tiene especial importancia al tratarse de plantas sometidas a limitación de polinizadores. Las flores de *P. vayredae* presentan longevidades florales largas y variables. De forma similar a los patrones descritos en otras especies (e.g., Stpiczynska 2003), se observó que la senescencia floral de *P. vayredae* es activada por la recepción de polen, pero es indiferente a su exportación. De esta forma, las flores de esta especie revelaron capacidad para reducir o incrementar su longevidad, dentro de determinados límites, en respuesta a la abundancia de polinizadores. En situaciones de escasez e imprevisibilidad de polinizadores, una longevidad floral larga puede mantener la oportunidad para la fertilización. Pero, los estudios que realizamos también revelaron un elevado coste reproductivo en la producción de descendencia, una vez que la producción de frutos y semillas decrece significativamente con el aumento de la edad en la cual la flor es polinizada. Una reducción del éxito femenino en estados tardíos de la vida de la flor podría alterar el balance coste-beneficio para mantener la flor abierta, en el sentido de promover longevidades más cortas, contrariando parcialmente la selección de longevidades florales largas mediadas por la escasez en los servicios de polinización.

La presentación secundaria de polen consiste en la recolocación y presentación del polen en otras estructuras florales diferentes de las anteras (Yeo 1993). Estas estructuras están frecuentemente localizadas en una zona próxima a la región estigmática. La presentación secundaria de polen ha sido propuesta como un mecanismo preciso de transferencia de polen debido a que aproxima los lugares de presentación y recepción de los gametos masculinos (Inouye et al. 1994). Sin embargo, no existen estudios experimentales que lo comprueben. *Polygala vayredae* presenta un mecanismo de presentación secundaria de polen en una estructura en forma de cesto cerca de la región estigmática fértil. Se observó que la recolocación del polen en esta estructura conduce a pérdidas significativas de polen (cerca del 49% del polen total producido por la flor). No obstante, esta estructura también permite la exportación de polen y en el global, las pérdidas totales fueron similares a las registradas en otras especies con presentación primaria de polen (e.g., Rademaker et al. 1997). Sin embargo, la localización próxima de las estructuras de presentación y recepción del polen, generó conflictos entre las funciones masculina y femenina (auto-interferencia), afectando significativamente al éxito reproductivo de la flor. A pesar de la presencia de un sistema de auto-incompatibilidad, el número de tubos polínicos creciendo en el estilo y la producción de frutos decreció significativamente en presencia de polen propio en las papilas estigmáticas depositado durante la visita del polinizador. La hercogamia ha sido descrita como un mecanismo implicado en la disminución de la auto-interferencia (Webb y Lloyd 1986) y en *P. vayredae* reveló estar positivamente correlacionada con el éxito femenino. Así, la presentación secundaria de polen podrá constituir un mecanismo preciso de transferencia de polen, pero también presenta sus costes. Estudios futuros deberán comparar especies emparentadas con y sin presentación secundaria de polen para evaluar las ventajas y desventajas de este mecanismo.

Después de la polinización, el crecimiento de los tubos polínicos y fecundación de los óvulos dependen de un complejo conjunto de interacciones físicas y fisiológicas entre el pistilo y los gametofitos masculinos que determinarán el éxito reproductivo final de la planta (e.g., Hormaza y Herrero 1996). Como las observaciones de campo indicaron una tasa de producción de semillas en flores polinizadas inferior a la esperada examinamos las barreras reproductivas que operan antes de la fecundación. Para ello se estudió la anatomía del pistilo, las sustancias de reserva disponibles para el crecimiento de los tubos polínicos, así como el desarrollo de los tubos polínicos a lo largo del pistilo después de polinizaciones xenógamas. Se observó que los granos de polen que llegan a las papilas estigmáticas entran en contacto con un exudado rico en lípidos, germinando fácilmente. A pesar del gran número de granos xenógamos depositados sobre las papilas estigmáticas, solo un reducido número de tubos polínicos fue observado creciendo a lo largo del estilo en dirección al ovario. El estilo presenta una morfología peculiar, presentando un canal estilar hueco que se inicia pocas células por debajo de las papilas estigmáticas, y que constituye el lugar donde crecen los tubos polínicos. Inicialmente este canal es estrecho y se encuentra recubierto por un mucilago rico en lípidos, pero se engrosa significativamente a lo largo del estilo en dirección al ovario. Respecto a la disponibilidad de nutrientes, no se encontraron sustancias de reserva significativas a lo largo del estilo. El área reducida de los espacios intercelulares que se encuentran inmediatamente debajo de las papilas estigmáticas y la reducida área del canal estilar en su inicio son sugeridos como los condicionantes físicos del número de tubos polínicos capaces de progresar en el estilo. En niveles posteriores no existen limitaciones físicas al desarrollo de tubos polínicos, aunque la falta de nutrientes puede estar relacionada con la disminución del número de tubos polínicos observada a lo largo del estilo. Finalmente, el número de tubos polínicos en la entrada del ovario es habitualmente superior al número de óvulos disponibles. Sin embargo, en este punto, el crecimiento de los tubos se torna errático conduciendo a una baja tasa de fertilización. Estos resultados sugieren que a pesar de las limitaciones físicas y fisiológicas impuestas por el estilo, las interacciones que ocurren en el ovario desempeñan también un papel fundamental y determinan el éxito reproductivo final de *P. vayredae*.

Polygala vayredae y sus visitantes florales

La diversidad de visitantes florales, así como su variabilidad en el tiempo y espacio, desempeñan un papel fundamental en el éxito reproductivo de la planta y en la evolución de sus caracteres florales (e.g., Herrera et al. 2002). Sabiendo que *Polygala vayredae* depende estrictamente de vectores de polinización para producir descendencia se reveló fundamental para su conservación determinar el espectro de visitantes florales, así como su comportamiento y eficiencia en el transporte del polen, teniendo en cuenta una escala espacial y temporal. Se observó que las flores son visitadas por más de 24 especies distintas de insectos (e.g., *Bombus pascuorum* y *B. terrestris*, **Fig. 1B y C**). Sin embargo, dada la complejidad de la flor, solo cuatro especies de insectos revelaron ser polinizadores eficientes. Para ello deben de bajar la quilla y entrar en contacto con los órganos sexuales mientras forrajean por néctar o polen. Las restantes especies se comportan como robadores de néctar que no participan en la polinización (contrariamente a lo que ha sido observado en otros sistemas, e.g., Navarro, 2000). Así, se observó que la eficiencia de los visitantes florales está íntimamente relacionada con las peculiares características morfológicas de la flor. Entre las especies de polinizadores eficientes fue posible identificar dos grupos distintos de acuerdo a su comportamiento: los nectarívoros *Bombus pascuorum* (reinas) y *Anthophora* sp., y los colectores de polen *Eucera longicornis* y *Halictus* sp. Considerando que estos insectos son generalistas en el sentido de que explotan un conjunto de especies muy diverso y teniendo en cuenta la estructura especializada de la corola de *P. vayredae*, la interacción entre esta planta y sus polinizadores muestra un patrón de especialización asimétrica. No se observaron diferencias significativas entre los polinizadores en la cantidad de polen depositada en los estigmas tras una visita. Sin embargo, el comportamiento general

de los dos grupos fue significativamente diferente (e.g., tiempo dedicado a cada flor, número de flores visitadas por parcela y distancia entre visitas). Esto, potencialmente puede influenciar la calidad del polen depositado. La cantidad de polen depositado sobre las papilas estigmáticas es superior a la necesaria para fecundar los dos óvulos, conduciendo a pérdidas significativas de gametos masculinos pos-deposición (Inouye et al. 1994). Respecto al espectro de visitantes florales, se observó una gran variabilidad espacio-temporal, con los visitantes eficientes siendo, en general, escasos (1.5% a 19.0% del total de visitas registradas) y los robadores de néctar abundantes (81% a 91%). En consecuencia, el éxito reproductivo resultó muy variable entre las poblaciones estudiadas y a lo largo de los años monitorizados.

Al producir néctar como recompensa floral las plantas atraen a un conjunto diverso de visitantes florales, algunos de ellos no adaptados a la morfología floral de la planta. Entre estos, y como se ha comentado anteriormente, destacan los robadores de néctar que en presencia de corolas tubulares largas y/o cerradas, al no poder acceder al néctar legítimamente, realizan incisiones en la base de la corola sin entrar en contacto con los órganos sexuales (Inouye 1980). A pesar de que apenas se han considerado los efectos de este comportamiento en la función materna, los estudios desarrollados hasta el momento revelan impactos significativos de este tipo de comportamiento (directa o indirectamente) en el éxito reproductivo de la planta (e.g., Irwin et al. 2001). En este estudio se evaluaron los efectos del robo de néctar en el éxito de las funciones masculina (medida como distancias de transporte de análogos de polen) y femenina (medida como producción de semillas). Se observó que el robo de néctar por abejorros es intenso y decrece significativamente la cantidad de néctar disponible, afectando a las funciones masculina y femenina de la flor. Se observaron diferencias significativas en la dispersión de polvos fluorescentes y en la producción de frutos entre flores robadas y flores no robadas. Las flores no robadas dispersaron su polvo fluorescente a distancias más largas y a mayor número de flores y produjeron significativamente más frutos que las flores robadas. Los resultados obtenidos sugieren que el intenso robo de néctar en *P. vayredae* presenta importantes efectos negativos en la fecundidad de la planta afectando a las funciones masculina y femenina, por una modificación del comportamiento de los visitantes legítimos que evitan visitar las flores robadas y/o abandonan la población, disminuyendo así el flujo de polen y el número de frutos y semillas producidos en la población.

La morfología floral se encuentra íntimamente correlacionada con sus vectores de polinización (Galen 1999). La selección de rasgos florales es un proceso dinámico mediado por los polinizadores, pero sujeto a presiones de otros factores también (e.g., Giles et al. 2006), entre los cuales se destaca el robo de néctar (Irwin 2006). Después de estudiar el espectro de visitantes florales y el efecto de los robadores de néctar en el comportamiento de los polinizadores surgió la cuestión de cómo interaccionan estos dos grupos en la selección de rasgos florales. Así, se estudió de qué forma la morfología de la flor, frecuencia de robo y producción de néctar afectan el comportamiento de los visitantes legítimos e ilegítimos. Para incorporar el néctar como variable se exploró la relación entre la dimensión de la glándula y la producción de néctar. Los resultados revelaron una correlación positiva y significativa entre ambas variables, indicando que la dimensión de la glándula es un buen estimador de la producción relativa de néctar de cada flor. Después de evaluar la variación de los diversos caracteres florales en las tres poblaciones principales de esta especie, se correlacionó el papel de cada rasgo floral con el éxito reproductivo femenino, incorporando en el análisis la frecuencia de robo de néctar. Las flores presentaron gran variabilidad en todos sus rasgos florales y, en general, las características florales medidas están positivamente correlacionadas. El néctar reveló una vez más ser una característica importante en las interacciones flor-visitante, con los visitantes legítimos estando fuertemente influenciados por esta característica. En dos de las poblaciones estudiadas se observó una correlación negativa entre la frecuencia de robo y las visitas legítimas, y en otra población una correlación positiva entre la dimensión de la flor y la frecuencia de robo. Estas observaciones parecen indicar la ocurrencia de una selección indirecta de determinados fenotipos florales mediada por los robadores de néctar.

Dispersión de las semillas

La dispersión de las diásporas constituye un importante estado de transición en el ciclo de vida de las plantas con semilla. Hasta el momento, varios experimentos de reintroducción han revelado que especies de distribución restringida pueden ocupar potencialmente áreas más extensas (e.g., Münzbergová y Herben 2004). Sin embargo, en muchos casos, su baja fecundidad y/o su reducida capacidad para la dispersión de sus semillas conducen a una distribución espacial agregada dentro de la población y área de distribución (e.g., Lavergne et al. 2004). Este estudio evaluó los mecanismos de dispersión de *Polygala vayredae* analizando el funcionamiento de sus síndromes de dispersión (anemocoria y mirmecocoria, **Fig. 3**), el espectro de dispersores y su variabilidad espacio-temporal, su comportamiento y capacidad de dispersión y el papel del elaiosoma en la atracción de las hormigas y en la germinación de las semillas. La dispersión de las diásporas se inicia cuando (1) la cápsula o la semilla caen debajo de la planta madre (barocoria) o (2) cuando las semillas son directamente recolectadas por hormigas en las mismas cápsulas (mirmecocoria, **Fig. 3B**). La adaptación funcional de las cápsulas aladas para la anemocoria se encuentra reducida, limitando la posibilidad de dispersión a largas distancias, siendo la planta esencialmente mirmecócora. Un conjunto de hormigas diverso fue observado interaccionando con las semillas de *P. vayredae*, y se mostró que el elaiosoma desempeña un papel fundamental en su atracción. Considerando la capacidad de las hormigas para manipular la semilla y las distancias de dispersión, se identificaron distintos grupos funcionales de hormigas. Desde el punto de vista de la planta, la mayoría de las hormigas presentan una interacción de dispersión positiva con las semillas, pero también se observaron interacciones neutras y negativas. En general, las distancias de dispersión son limitadas y mayoritariamente determinadas

por la dimensión de la hormiga. La frecuencia de interacción y el espectro de los grupos funcionales de hormigas varió significativamente en el contexto espacio-temporal y podría estar involucrado en la selección direccional o disruptiva en las características de las semillas. En general se observaron tasas bajas de depredación de semillas y la tasa de germinación entre semillas con y sin elaiosoma fue similar. La capacidad de esta planta para producir nuevas ramas a partir de caules subterráneos junto con un mecanismo que promueve la dispersión de semillas dentro de la población podrían ser algunos de los factores involucrados en la actual densidad y distribución localizada de *P. vayredae*.



Figura 3. **A.** Fruto de *Polygala vayredae* (cápsula alada con 2 semillas con elaiosoma); **B.** *Formica gagates* removiendo una semilla del fruto de *P. vayredae*.

En resumen, los resultados revelaron que (1) *P. vayredae* depende estrictamente de vectores de polinización para producir semillas, (2) sus características florales limitan el conjunto de polinizadores eficientes, (3) su longevidad floral favorece la transferencia de polen, pero presenta costes reproductivos significativos sobre el éxito femenino, (4) la presentación secundaria de polen presenta costes reproductivos sobre el éxito de las componentes masculina y femenina, (5) las flores de *P. vayredae* son visitadas por un conjunto de insectos diverso, de los cuales solo cuatro especies se comportan como polinizadores eficientes, (6) los polinizadores eficientes son frecuentemente escasos y variables en el tiempo y espacio, (7) los visitantes ineficientes ejercen un efecto negativo sobre el comportamiento de los polinizadores eficientes y, consecuentemente, sobre el éxito reproductor masculino y femenino de la planta, (8) la dispersión de los frutos alados a largas distancias se encuentra muy limitada, y finalmente, (9) la dispersión es mayoritariamente efectuada por hormigas que dispersan las semillas a distancias reducidas, con el conjunto de actores variando enormemente entre poblaciones y años de estudio. A la vista de estas observaciones podemos concluir que *P. vayredae* presenta los siguientes problemas reproductivos: limitación de polen/polinizadores y limitada distancia de dispersión de sus diasporas. Los programas futuros de conservación que consideren estos puntos, conservando la fauna polinizadora y dispersora del área y protegiendo las interacciones planta-animal, promoverán el mantenimiento de las poblaciones actuales y, consecuentemente, la conservación de esta especie.

Referencias

- Ashman, T.L. 2004. Floral longevity. En: Nooden, L. (ed). *Cell death in plants*, pp. 349-362. Elsevier, London. U.K.
- Ashman, T.L., Schoen, D.J. 1994. How long should flowers live?. *Nature* 371:788-791.
- Ashman, T.L., Schoen, D.J. 1996. Floral longevity: fitness consequences and resource costs. En: Lloyd, D.G., Barrett, S.C.H. (eds). *Floral Biology*, pp. 112-139. Chapman and Hall. New York. USA.
- Bañares, Á., Blanca, G., Güemes, J., Moreno, J.C., Ortiz, S. 2003. *Atlas y libro rojo de la flora vascular amenazada de España: taxones prioritarios*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza. Madrid. España.
- Bolós, A. 1927. L'area de dispersió de la *Polygala vayredae* Costa. *Revista Catalana de Ciència i Tecnologia* 12:3-8.
- Bolós, A. 1946. La *Polygala vayredae* Costa, endemismo pirenaico. *Collectanea Botanica* 1:7-93.

- Bolós, A., Vayreda, E. 1922. Nota sobre l'area de dispersió de la Ploygala vayredae. *Bulletin de la Institució Catalana d'Historia Natural* 2:50-51.
- Galen, C. 1999. Why do flowers vary? The functional ecology of variation in flower size and form within natural plant populations. *Bioscience* 49:631-640.
- Giles, B.E., Pettersson, T.M., Carlsson-Graner, U., Ingvarsson, P.K. 2006. Natural selection on floral traits of female Silene dioica by a sexually transmitted disease. *New Phytologist* 169:729-739.
- Herrera, C.M., Cerdá, X., García, M.B., Guitián, J., Medrano, M., Rey, P.J., Sánchez-Lafuente, A.M. 2002. Floral integration, phenotypic covariance structure and pollinator variation in bumblebee-pollinated Helleborus foetidus. *Journal of Evolutionary Biology* 15:108-121.
- Hormaza, J.I., Herrero, M. 1996. Dynamics of pollen tube growth under different competition regimes. *Sexual Plant Reproduction* 9:153-160.
- Inouye, D.W. 1980. The terminology of floral larceny. *Ecology* 61:1251-1253.
- Inouye, D.W., Gill, D.E., Dudash, M.R., Fenster, C.B. 1994. A model and lexicon for pollen fate. *American Journal of Botany* 81:1517-1530.
- Irwin, R.E. 2006. The consequences of direct versus indirect species interactions to selection on traits: pollination and nectar robbing in Ipomopsis aggregata. *American Naturalist* 167:315-328.
- Irwin, R.E., Brody, A.K., Waser, N.M. 2001. The impact of floral larceny on individuals, populations, and communities. *Oecologia* 129:161-168.
- Lavergne, S., Thompson, J.D., Garnier, E., Debussche, M. 2004. The biology and ecology of narrow endemic and widespread plants: a comparative study of trait variation in 20 congeneric pairs. *Oikos* 107:505-518.
- Münzbergová, Z., Herben, T. 2004. Identification of suitable unoccupied habitats in metapopulation studies using co-occurrence of species. *Oikos* 105:408-414.
- Navarro, L. 2000. Pollination ecology of Anthyllis vulneraria subsp. vulgaris (Fabaceae): nectar robbers as pollinators. *American Journal of Botany* 87:980-985.
- Rademaker, M.C.J., de Jong, T.J., Klinkhamer, P.G.L. 1997. Pollen dynamics of bumblebee visitation on Echium vulgare. *Functional Ecology* 11:554-563.
- Stpiczynska, M. 2003. Floral longevity and nectar secretion of Platanthera chlorantha (Custer) Rchb. (Orchidaceae). *Annals of Botany* 92:191-197.
- Webb, C.J., Lloyd, D.G. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in Angiosperms. 2. Hercogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24:163-178.
- Weekley, C.W., Brothers, A. 2006. Failure of reproductive assurance in the chasmogamous flowers of Polygala lewtonii (Polygalaceae), an endangered sandhill herb. *American Journal of Botany* 93:245-253.
- Yeo, P. 1993. *Secondary pollen presentation*. Springer Wien New York, USA.

SILVIA CASTRO

Biología reproductiva y conservación del endemismo Polygala vayredae

Tesis Doctoral

Departamento de Biología de la Universidad de Aveiro, Portugal.

Diciembre 2007.

Dirección: Paulo Silveira y Luis Navarro

Publicaciones resultantes de la tesis:

Castro S., Loureiro, J., Rodriguez, E., Silveira, P., Navarro, L., Santos, C. 2007. Evaluation of polysomaty and estimation of genome size in Polygala vayredae and P. calcarea using flow cytometry. *Plant Science* 172:1131-1137.

Castro, S., Silveira, P., Navarro, L. 2008. Consequences of nectar robbing in the fitness of a threatened plant species. *Plant Ecology* 199:201–208.

Castro, S., Silveira, P., Navarro, L. 2008. Effect of pollination on floral longevity and costs of delaying fertilization in the out-crossing Polygala vayredae Costa (Polygalaceae). *Annals of Botany* 102:1043–1048.

Castro, S., Silveira, P., Navarro, L. 2008. How does secondary pollen presentation affect the fitness of Polygala vayredae (Polygalaceae)? *American Journal of Botany*. 95:706–712.

Castro, S., Silveira, P., Navarro, L. 2008. How flower biology and breeding system affect the reproductive success of the narrow endemic Polygala vayredae Costa (Polygalaceae)? *Botanical Journal of the Linnean Society* 157:67–81.

Castro, S.; Silveira, P.; Navarro, L. 2009. Floral traits variation, legitimate pollination, and nectar robbing in Polygala vayredae (Polygalaceae). *Ecological Research* 24:47–55.

Castro, S.; Silva, S.; Stanescu, I.; Silveira, P.; Navarro, L. 2009, (en prensa). Pistil anatomy and pollen tube development in Polygala vayredae Costa (Polygalaceae). *Plant Biology* doi.:10.1111/j.1438-8677.2008.00126.x.