

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“ESTUDIO CUANTITATIVO DE LA ADAPTACIÓN A LOS POLINIZADORES
EN LA SUBFAMILIA LOASOIDEAE (LOASACEAE), A TRAVÉS DEL ESTUDIO
DE LA ALOMETRÍA Y LA ONTOGENIA, INTEGRANDO LOS ENFOQUES
EVO-DEVO Y FUNCIONAL”.**

Biól. Marina Micaela Strelin

Director: Dr. Andrea A. Cocucci

Co-director: Dr. Santiago M. Benitez-Vieyra

Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral. IMBiV CONICET –UNC



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, Argentina

2015

COMISIÓN ASESORA

Dr. Andrea A. Cocucci, Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral. IMBiV
CONICET - Universidad Nacional de Córdoba

Dr. Santiago M. Benítez -Vieyra, Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral.
IMBiV CONICET - Universidad Nacional de Córdoba

Dr. Marcelo A. Aizen, Centro Universitario Regional Bariloche, Universidad Nacional del
Comahue

Dra. Lorena Ashworth, IMBIV-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas Físicas y
Naturales, Universidad Nacional de Córdoba

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:.....

Aclaración:.....

Firma:.....

Aclaración:.....

Firma:.....

Aclaración:.....

A mis padres, Jorge Strelin y Úrsula Widmann

Dadas tus limitaciones...

“Dale estilo a tu carácter, un arte grandioso y difícil”

-Friedrich Nietzsche, La gaya ciencia

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis, Dr. Andrea A. Cocucci por la oportunidad de realizar el Doctorado en el Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral y por realizar aportes que enriquecieron este trabajo.

A mi co-director de tesis, Dr. Santiago M. Benitez-Vieyra, por sugerirme y enseñarme el uso de herramientas que fueron imprescindibles para llevar adelante esta tesis, por sus críticas constructivas y por aportarme conocimientos teóricos y metodológicos que constituyen la base sobre la cual podré seguir construyendo durante mi formación como bióloga.

Al resto de los miembros de mi comisión asesora, Dr. Marcelo A. Aizen y Dra. Lorena Ashworth, por sus críticas y sugerencias en las reuniones de comisión asesora. Pero lo más importante, les agradezco por interesarse en mi trabajo más allá de estas instancias formales, dedicando mucho tiempo extra a discutir y clarificar conceptos relacionados a mi tesis, sugiriéndome la lectura de artículos muy útiles e interesantes, y aconsejándome acerca de cómo organizarme para proceder estratégicamente con mi trabajo.

Al tribunal de tesis por sus sugerencias, comentarios y críticas constructivas: Dres. Francisco Ludueña-Almeida, Marcelo A. Aizen y Lorena Ashworth. Gracias por dedicar tiempo extra a discutir las correcciones realizadas en la tesis.

A los Dres. Mariano Ordano, Lawrence Harder, Juan Fornoni y Christian P. Klingenberg, por realizar desinteresadamente aportes teóricos y metodológicos que fueron imprescindibles para llevar adelante los objetivos de esta tesis doctoral.

A los Dres. Guillermo Amico, Markus Ackermann y Maximilian Weigend por aportarme muestras para llevar a cabo mi tesis doctoral.

A los Dres. Markus Ackermann y Maximilian Weigend por ofrecerme información acerca de la historia natural del sistema de estudio con el que trabajé en mi tesis doctoral.

A los directivos del Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBiV CONICET UNC) por el lugar de trabajo brindado. Al CONICET por el financiamiento que posibilitó

el desarrollo de este estudio. A distintas instituciones que aportaron financiamiento: FONCyT, CONICET, SECyT -Universidad Nacional de Córdoba.

A los integrantes del Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral, por los momentos de todo tipo que hemos compartido, los cuales marcan una etapa importante de mi vida, la cual recordaré siempre con nostalgia. Ali, Gabi, Sil, Santi, Mauri, Mati, Marce, Cristi, Vale, Andre, Salva, Coni, Totoy, Moni, Anita, Lula, Aimé, Marisú, Flor, Andrea, Marilina...: gracias por ser tan diversos en su forma de ser y de pensar, me llevo mucho de lo que compartí con ustedes a lo largo de estos años.

A mis padres y hermanos. Gracias por acompañarme incondicionalmente a lo largo de estos años y por alentarme en momentos en los que me sentí desamparada. Gracias por aceptarme como soy, independientemente de mis éxitos y de mis fracasos.

A Tami, Luz, Coti, Gabi y Ángela, gracias por hacerme ver que más allá del laburo y la racionalización que éste implica existen otras dos cosas muy valiosas en la vida: los sentimientos y el simplemente estar.

A los chicos del coro y a Tere, la directora, por contribuir a mi relax al brindarme la oportunidad de cantar después de la jornada laboral, lo que indirectamente también resultó imprescindible para llevar a cabo esta tesis doctoral.

A mi perro y a mis cuatro felinos domésticos monocromáticos, por alegrarme la llegada a casa después de días difíciles.

A mi querido y amado compañero Martin, por haberme acompañado ya sea desde cerca o desde lejos a lo largo de estos años y por bancarme las malas ondas de algunos momentos. Gracias también por hacerme pensar críticamente acerca de mi trabajo y otras cosas.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN GENERAL	5
Antecedentes	5
Sistema de estudio	7
Hipótesis	10
Objetivos generales	11
Objetivos particulares	11
METODOLOGÍA GENERAL	12
Muestreo	12
Obtención de variables morfogeométricas	13
CAPÍTULO I. El confinamiento espacio-temporal de la evolución floral	16
La diversidad floral es grande pero no ilimitada	17
Las flores forman parte de un continuo espacio-temporal	20
<i>El desarrollo floral: un condicionante temporal de la evolución morfológica en flores. La protandria como un ejemplo ilustrativo</i>	22
<i>La arquitectura de las inflorescencias. Un condicionante espacial de la evolución morfológica en flores. La dicogamia como ejemplo ilustrativo</i>	23
La contingencia espacio-temporal de la evolución floral y su posible efecto sobre la tasa y los patrones de diversificación floral en angiospermas	24
Conclusión y perspectivas	28

CAPÍTULO II. Evolución de la morfología floral en <i>Caiophora</i> (Loasoideae, Loasaceae) en el contexto de una radiación adaptativa	30
Introducción	30
Materiales y métodos	32
<i>Filogenia y reconstrucción de estrategias de polinización ancestrales</i>	32
<i>Selección de rasgos y análisis morfogeométricos</i>	33
<i>Modelado evolutivo de los rasgos florales</i>	34
Resultados	36
Discusión	42
Conclusión	44
CAPÍTULO III. Caminos hacia la forma óptima de la flor de <i>Caiophora</i> (Loasoideae, Loasaceae)	45
Introducción	45
<i>Sistema de estudio</i>	47
Materiales y métodos	50
<i>Obtención de variables morfogeométricas</i>	50
<i>El concepto de optimalidad de Pareto</i>	51
<i>Detectar y validar la frontera de Pareto</i>	53
Resultados	53
Discusión	56
CAPÍTULO IV. Desarrollo y diversificación floral. Parte I	59
Introducción	59
Materiales y métodos	62
<i>Obtención de variables morfogeométricas</i>	62

<i>Obtención de vectores ontogenéticos y cálculo de distancias</i>	62
<i>Concordancia entre vectores ontogenéticos y filogenia y entre vectores ontogenéticos y estrategia de polinización</i>	63
Resultados	64
Discusión	69
Conclusión	71
CAPÍTULO V. Desarrollo y diversificación floral. Parte II	72
Introducción	72
Materiales y métodos	75
<i>Análisis morfométrico</i>	75
Resultados	77
Discusión	80
DISCUSIÓN GENERAL	82
CONCLUSIONES PARTICULARES Y CONCLUSIÓN GENERAL	84
APORTES DE LA TESIS	85
BIBLIOGRAFÍA	86
APÉNDICE	96

RESUMEN

La morfología floral se expone a diferentes agentes selectivos a lo largo de la secuencia ontogenética que comprende al botón floral, a la flor funcional (esto es, la flor en condiciones de recibir y exportar polen) y al fruto. Dado que las morfologías expresadas en estos estadios se interrelacionan, se espera que la selección que afecta a un estadio puntual de la ontogenia tenga efectos colaterales sobre la adecuación de otras etapas ontogenéticas. Esta secuencia ontogenética toma a su vez lugar dentro de un contexto más amplio, la inflorescencia, donde las flores están sujetas a selección de manera colectiva. Se espera que dicha asociación funcional de las flores dentro de las inflorescencias, en conjunto con la interdependencia de la adecuación de distintos estadios del desarrollo, sesgue el material sobre el cual la selección puede actuar en las flores funcionales.

A pesar de estos sesgos ontogenéticos a los cuales podría estar sujeta la evolución floral, la diversidad floral es copiosa. Entender la relación entre la ontogenia floral y los patrones de diversificación floral es lo que motiva esta tesis. En particular, examiné esta pregunta en la subfamilia de angiospermas Loasoideae (Loasaceae), la cual se habría diversificado recientemente en los Andes Centrales en respuesta a cambios en el ambiente de polinizadores.

Para llevar adelante este trabajo en primer lugar clarifiqué el contexto adaptativo en el cual ocurrió la diversificación de la morfología floral de Loasoideae (Loasaceae). Para ello describí la forma floral con variables morfogeométricas y modelé estas variables utilizando técnicas novedosas de análisis comparativo. A través de ello establecí que la morfología floral en el género *Caiophora* (Loasoideae, Loasaceae) se habría diversificado en respuesta a cambios en ambiente de polinizadores, posiblemente en el contexto de una radiación adaptativa. También establecí que la optimización de la morfología floral de Loasoideae a diferentes estrategias de polinización estaría mediada por un *trade-off* (compensación) entre la polinización mediada por himenópteros y la mediada por colibríes. Esto me aportó un marco para abordar las siguientes preguntas: 1) La morfología floral en especies con la misma estrategia de polinización ¿posee un patrón de desarrollo común? 2) La diversificación adaptativa de *Caiophora* (Loasoideae, Loasaceae), ¿estuvo sesgada por la variación presente a lo largo de la trayectoria de desarrollo ancestral? Intenté responder a estas preguntas utilizando métodos adecuados recientemente propuestos, los cuales

permiten el análisis de datos morfogeométricos en estudios de evolución del desarrollo (informalmente “evo-devo”).

Los resultados de esta tesis sugieren que las asociaciones entre la forma y el tamaño presentes a lo largo de la trayectoria de desarrollo ancestral no habrían sesgado la diversificación morfológica de *Caiophora*. Sin embargo, algunas variantes de forma presentes a lo largo de la ontogenia ancestral habrían facilitado la adaptación a la polinización mediada por colibríes y a la polinización mediada por roedores en el género.

ABSTRACT

The morphology of the flower is exposed to different selective environments throughout the developmental sequence, which includes the flower bud, the functional flower and the fruit. Given that the morphologies associated to these developmental stages are related to each other, selection affecting one developmental stage of organ morphology may result in side effects that influence the fitness of other stages. The developmental sequence of the flower occurs in turn within a larger context, the inflorescence, where flowers are subject to selection as a group. Both this fact and interdependency among developmental stages affecting fitness may bias the possible material on which selection can act during the developmental stage that corresponds to the functional flower.

Despite the ontogenetic biases to which flower evolution may be subject to, flower diversity can be quite copious. The question of how flower ontogeny is related to flower diversity patterns is what motivates the current work. Specifically, I examine this question for the case of the angiosperm subfamily Loasoideae (Loasaceae), which diversified in the central Andes in response to changes in the pollinator environment.

In my work I first clarify the context in which the diversification of flower morphology of Loasoideae (Loasaceae) took place. I do this by describing flower shape with geometric morphometric variables and modelling them making use of state of the art techniques of comparative analysis. I provide evidence that flower morphology in the genus *Caiophora* (Loasoideae, Loasaceae) diversified in response to changes in the pollinator environment probably in the context of an adaptive radiation and that flower trait optimization is driven by a trade-off between hymenoptera and hummingbird pollination. This provides me with the framework to tackle the following questions: 1) Does flower morphology in species with the same pollination strategy have a common developmental pattern? 2) Was flower diversification in *Caiophora* (Loasoideae, Loasaceae) biased by the ancestral developmental pattern?

I investigate these questions via methods that have been proposed recently that allow analysing geometric morphometric data in the context of studies addressing the

evolution of development (or informally, evo-devo). My results suggest that size and shape relationships present along the ancestral developmental trajectory did not bias flower adaptive diversification in *Caiophora*. Nevertheless, some shape variants along the direction of the ancestral trajectory may have promoted the adaptation to hummingbird and rodent mediated pollination in this genus.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Antecedentes

La morfología de los organismos determina cuán bien éstos se adaptan a su ambiente. Se espera por lo tanto que las diferencias morfológicas entre organismos pertenecientes a distintos linajes (poblaciones, especies, etc.) reflejen variación en las interacciones funcionales establecidas entre estos organismos y el ambiente donde se encuentran. La convergencia morfológica, esto es la adquisición por parte de linajes independientes de una morfología similar en un mismo tipo de ambiente, es una evidencia contundente de adaptación morfológica (Losos, 2011).

Los órganos poseen una ontogenia a lo largo de la cual su morfología cambiante se expone a distintos ambientes selectivos. Un ejemplo extremo sería el aparato bucal de los insectos holometábolos, que poseen una fase dedicada exclusivamente a la alimentación y una fase reproductiva, en las cuales las dietas son marcadamente diferentes. Dado que las redes de interacción génica que intervienen en la morfogénesis pueden compartirse entre distintos estadios del desarrollo (Kingsolver et al., 2012; Donohue, 2013) y que a lo largo de la ontogenia se mantiene una interacción mecánica entre los tejidos (Hallgrímsson et al., 2009, Endress et al., 2006), es esperable que exista una cierta dependencia entre las morfologías presentes a lo largo de una trayectoria ontogenética (Donohue, 2013). En tal caso, es importante que la morfología de un órgano seleccionada para un momento determinado de su desarrollo (por ejemplo el adulto reproductivo) no impacte negativamente, en términos de adecuación, a la morfología de otros estadios ontogenéticos. Por otra parte, la morfología de un órgano determinado no sólo expresa adaptaciones a nivel del órgano en sí mismo, sino que la morfología de éste también responde a agentes selectivos que actúan a niveles de organización biológica inferiores y superiores (Wagner, 2001). Por ejemplo, la selección actúa sobre el modo en que un determinado órgano funciona en conjunto con otros órganos dentro del cuerpo del organismo. Como consecuencia de ello, la morfología de un órgano debe ser funcional no sólo en sí misma sino que también debe ser funcional a los niveles de organización biológica que lo rodean.

Dado este continuo espacio-temporal en el que estaría sumergido un órgano, el cual está conformado por todos los niveles de organización biológica que lo rodean y por la secuencia ontogenética del mismo, resulta relevante considerar que los distintos niveles de organización biológica y la ontogenia completa de un órgano requerirían funcionar como un todo integrado y que cualquier variación que interfiera con esta coordinación sería seleccionada en contra (Arthur, 2011a). Esto daría lugar a un condicionamiento espacio-temporal de las posibilidades morfológicas que pueden estar sujetas a la selección en un estadio ontogenético determinado y a un cierto nivel de organización biológica. Dicho condicionamiento sesgaría la variación disponible para la selección natural (Gould, 2004, Arthur, 2011a).

Algunos estudios han considerado el impacto de la ontogenia sobre la evolución de la morfología de los organismos y de sus órganos. Esto se ha hecho para animales (por ejemplo Kingsolver et al., 2012) y para plantas (Donohue, 2013). Sin embargo, la evolución de la morfología floral (refiriéndose a la flor funcional, en condiciones de liberar y de recibir polen) ha sido estudiada dejando de lado a su ontogenia (que incluye al botón floral y al fruto). También se ha dejado de lado el hecho de que las flores no interactúan de manera aislada con el ambiente, sino que lo hacen colectivamente, formando parte de inflorescencias (Harder y Prusinkiewicz, 2012).

Existen numerosas evidencias de diversificación floral en respuesta a distintos agentes selectivos, en especial en respuesta a los polinizadores (trabajos citados en Van der Niet y Johnson, 2014). Si bien los sesgos impuestos por el desarrollo pueden limitar la diversificación en ciertas direcciones del espacio morfológico, éstos pueden poner a disposición de la selección variación morfológica abundante en ciertas regiones de este espacio. Alteraciones muy simples del desarrollo, que no implican grandes reorganizaciones de éste (por ejemplo la multiplicación de estructuras florales dentro de un mismo anillo floral, la retención de características florales afines a las del pimpollo del ancestro en las flores funcionales de la especie derivada) pueden hacer accesibles nuevas variantes morfológicas a la selección (Becker et al., 2011). Dada esta situación resulta de interés, para una mejor comprensión de los procesos que determinan los patrones de diversidad floral, responder a preguntas como las siguientes 1) La morfología floral en especies con la misma estrategia de polinización ¿posee un patrón de desarrollo común? 2) La diversificación adaptativa de *Caiophora* (Loasoideae, Loasaceae), ¿estuvo sesgada por

la variación presente a lo largo de la trayectoria de desarrollo ancestral? Examiné estas dos últimas preguntas en la subfamilia Loasoideae (Loasaceae).

En el Capítulo I de esta tesis doctoral se realiza un análisis teórico acerca de cómo el confinamiento de la flor desplegada dentro de su ontogenia y dentro de la inflorescencia podría afectar a la diversificación floral. En el Capítulo II y en el Capítulo III se explora y se plantea el contexto adaptativo (sin considerar la ontogenia floral por el momento) en el cual ocurrió la diversificación de la morfología floral de Loasoideae. Mientras que en el Capítulo II se pone a prueba la hipótesis de que la morfología de las flores desplegadas del género *Caiophora* (Loasoideae, Loasaceae) evolucionó en el contexto de una radiación adaptativa, en el Capítulo III se explora si la optimización de la morfología floral de *Caiophora* para diferentes estrategias de polinización estuvo mediada por una compensación (o *trade-off*) entre la polinización mediada por himenópteros y la mediada por colibríes. En el Capítulo IV y en el Capítulo V se explora la relación entre la diversificación floral y la ontogenia de Loasoideae. En primer lugar se indagó si distintas especies con una misma estrategia de polinización presentan un patrón de desarrollo floral compartido (Capítulo IV). Luego se estableció si la diversificación adaptativa de *Caiophora* estuvo sesgada por la ontogenia del ancestro de este género (Capítulo V).

Sistema de estudio

Loasoideae (Loasaceae) es una subfamilia monofilética de Angiospermas mayoritariamente neotropical, la cual se caracteriza por su arquitectura floral compleja (fig. 1). A pesar de presentar flores radialmente simétricas (las cuales podrían ser consideradas como “simples”), las especies de Loasoideae presentan un ciclo adicional derivado del androceo, el cual actúa como contenedor de néctar (Brown y Kaul, 1981). Dado que las flores de Loasoideae son protándricas, las flores dependen de los polinizadores para el transporte del polen desde las flores en fase masculina hacia las flores en fase femenina (Brown y Kaul, 1981).

El género *Caiophora* (Loasoideae, Loasaceae) es monofilético y presenta polinización mediada por himenópteros, colibríes y roedores (Ackermann y Weigend, 2006). Esta variedad de estrategias de polinización contrasta con el hecho de que sus géneros basales, *Loasa*, *Blumenbachia* y *Scyphanthus*, presentan solamente polinización

mediada por himenópteros. El modo de dispersión de las semillas difiere entre las especies de los géneros *Loasa*, *Blumenbachia* y *Caiophora*. Mientras que en los géneros *Loasa* y *Blumenbachia* la dispersión de las semillas ocurre de manera espontánea ya sea a través de la dehiscencia o de la pudrición del fruto, la dispersión de las semillas en *Caiophora* es anemófila (Brown y Kaul, 1981).

El origen de *Caiophora* está preliminarmente datado para finales del Oligoceno (Schenk y Hufford, 2010), período coincidente con la llegada de los colibríes a Sudamérica (Mc.Guire et al., 2014). La variedad de estrategias de polinización de este género en comparación con sus géneros basales sugiere que *Caiophora* se originó en una radiación adaptativa. La asociación entre el fenotipo floral y la estrategia de polinización reportada para Loasoideae (incluyendo a *Caiophora*) (Ackermann y Weigend, 2006; Ackermann, 2012) así como el aparente valor funcional que las configuraciones de rasgos florales tienen en distintos ambientes de polinizadores (Ackermann y Weigend, 2006; Weigend, Ackermann y Henning, 2010; Ackermann, 2012) también contribuyen a sustentar la hipótesis de que el género *Caiophora* se originó en una radiación adaptativa.

Estructuras florales de Loasoideae (Loasaceae) y mecanismo de polinización.

Ackermann y Weigend (2006) ofrecen una descripción cualitativa de las morfologías florales de Loasoideae asociadas a distintas estrategias de polinización. Las morfologías florales correspondientes a cada estrategia de polinización se representan esquemáticamente en la fig. 1. Estos autores atribuyen una corola con forma de “estrella”, de “cuenco” o de “fuente” a las flores de las especies polinizadas por himenópteros y una corola con forma de “globo” o de “campana” a las flores de las especies polinizadas por colibríes. Las corolas con forma de “estrella”, “cuenco” o “fuente” son más abiertas que las corolas con forma de “globo” o “campana”. Dado que los colibríes revolotean alrededor de las flores mientras liban néctar y no aterrizan sobre ella, una corola angosta, con forma de “globo” o de “campana” podría estar forzando el ajuste flor-polinizador al restringir el movimiento del colibrí con respecto a las estructuras florales fértiles (Muchhala, 2007). Por otra parte, una corola más bien abierta, con forma de “estrella”, “cuenco” o “fuente” podría ofrecer una “plataforma de aterrizaje” apropiada para los himenópteros, los cuales requieren una superficie para reposar mientras se alimentan (Dafni, 1994). Además, una corola abierta permite que los polinizadores vean el complejo escama-estaminodios: en las

flores polinizadas por himenópteros, este complejo presenta colores conspicuos, los cuales serían una señal visual atractiva para estos polinizadores (Ackermann, comunicación personal). El complejo escama-estaminodios también está involucrado en el mecanismo de polinización de Loasoideae. Los himenópteros deben manipular la escama nectarífera y los estaminodios para poder acceder al néctar, y se sabe que esta manipulación activa la liberación de los estambres hacia el centro de la flor en muchas especies polinizadas por himenópteros de *Caiophora* y *Blumenbachia* (trabajos citados en Weigend et al., 2010). Esto promueve que la cantidad de polen expuesto sobre la flor sea proporcional al número de visitas por parte de polinizadores, constituyendo un mecanismo que disminuye la pérdida de polen (Weigend et al., 2010). Las flores que son típicamente polinizadas por colibríes y roedores carecen de este mecanismo de activación de estambres (Ackermann y Weigend, 2006). Sin embargo, los estaminodios cumplen una función importante en el mecanismo de polinización de las flores polinizadas por colibríes, ya que sus largos extremos (Cocucci y Sérsic, 1998) colaborarían con la corola angosta en forzar el ajuste flor-polinizador (Ackermann y Weigend, comunicación personal). La especie polinizada por roedores presenta estaminodios marcadamente reducidos, lo que se atribuye a que éstos son vestigiales en las flores polinizadas por roedores, donde el único rol del complejo escama-estaminodios es el de almacenar néctar (Cocucci y Sérsic, 1998; Ackermann y Weigend, comunicación personal). En el trabajo de Ackermann y Weigend (2006) también se reporta variación en el tamaño floral asociada a distintas estrategias de polinización. Mientras las flores de las especies polinizadas por himenópteros son de tamaño más bien pequeño, las flores de las especies polinizadas por colibríes son de mayor tamaño. Se ha observado que el largo del pétalo en *Caiophora* se correlaciona positivamente con la cantidad de azúcar en el néctar (Ackermann, 2012). Esta correlación también ha sido reportada en otras familias de Angiospermas (Ornelas et al., 2007). Se ha propuesto que la preferencia de los colibríes por flores de mayor tamaño es una consecuencia indirecta de que estos animales seleccionan néctares más energéticos (Fenster et al., 2006; Ornelas et al., 2007). Por otro lado, se ha propuesto que la selección puede favorecer indirectamente la evolución de flores más pequeñas en especies polinizadas por himenópteros: las flores con néctares menos energéticos y por ende más pequeñas, “filtrarían” a los polinizadores de gran tamaño (entre ellos los colibríes) ya que no satisfacen sus demandas energéticas (Ollerton et al., 2007), promoviéndose la especialización en polinizadores pequeños. Las flores de *Caiophora coronata*, la única especie polinizada por roedores de la subfamilia, son de gran tamaño, lo que podría atribuirse a las grandes demandas energéticas de estos

polinizadores y también al ajuste flor-polinizador con polinizadores de tamaño considerable.

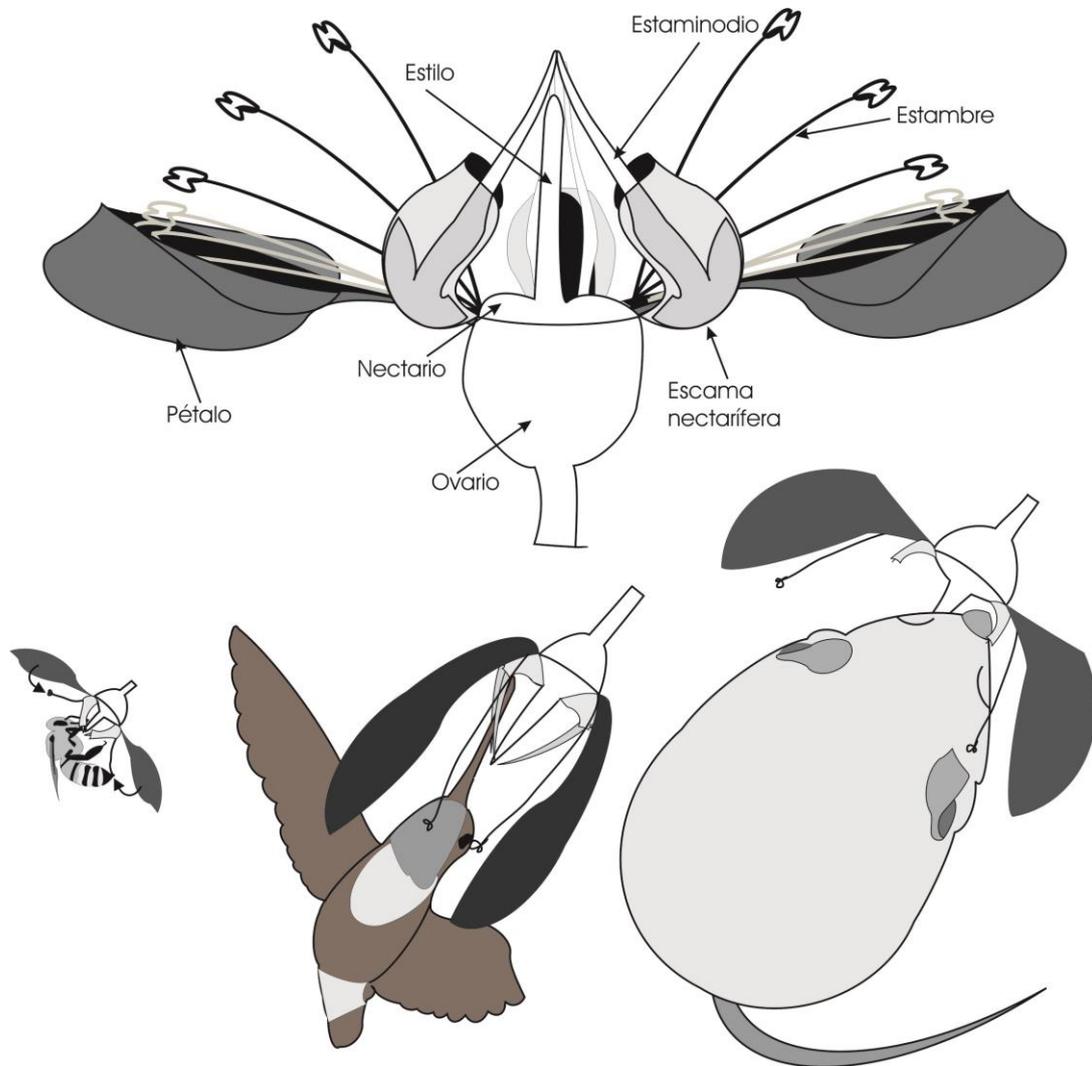


Fig. 1. Estructura básica de una flor de Loasoideae (arriba) y esquemas de las morfologías florales correspondientes a distintas estrategias de polinización (abajo). Las flechas en la flor polinizada por himenópteros indica el movimiento de los estambres hacia el centro de la flor.

Hipótesis

La ontogenia sesga los patrones de diversificación de la morfología floral en Loasoideae (Loasaceae).

Objetivos generales

1. Realizar una revisión bibliográfica acerca de cómo la ontogenia floral y la arquitectura de las inflorescencias afecta la evolución de la morfología floral **(Capítulo I)**
2. Establecer si la morfología de la flor desplegada de *Caiophora* (Loasoideae, Loasaceae) se diversificó en el contexto de una radiación adaptativa **(Capítulo II)**
3. Explorar si la optimización de los rasgos florales para la polinización por himenópteros y para la polinización por colibríes está mediada por una compensación (*trade-off*) morfológica entre estas estrategias de polinización **(Capítulo III)**
4. Establecer si la morfología floral en especies adaptadas a la misma estrategia de polinización presenta un patrón de desarrollo compartido en Loasoideae (Loasaceae) **(Capítulo IV)**.
5. Establecer si la diversificación adaptativa de *Caiophora* se vio sesgada por la variación morfológica a lo largo de la ontogenia floral ancestral **(Capítulo V)**.

Objetivos particulares

2.1. Establecer si la forma de dos estructuras florales que participan en el mecanismo de polinización, (la corola y el contenedor de néctar) en flores desplegadas de 14 especies de Loasoideae (Loasaceae), evoluciona hacia óptimos adaptativos correspondientes a distintas estrategias de polinización.

2.2. Establecer si la forma de esas dos estructuras involucradas en el mecanismo de polinización (en las 14 especies de Loasoideae (Loasaceae) consideradas), ha experimentado mayor diversificación en *Caiophora* que en sus grupos basales.

3.1. Establecer si la morfología floral de *Caiophora nivalis*, *Caiophora lateritia* y *Caiophora hibiscifolia* (Loasoideae, Loasaceae) se ajusta a un patrón de compensación o *trade-off* entre la polinización mediada por himenópteros y la mediada por colibríes.

4.1. Establecer si existe una correspondencia entre las estrategias de polinización y la ontogenia floral en 11 especies de Loasoideae (Loasaceae).

5.1. Establecer si la morfología de las flores desplegadas de *Caiophora* sigue la dirección de la ontogenia de las especies basales a este género (representativas de la condición ancestral).

METODOLOGÍA GENERAL

Muestreo

Se consideraron en este estudio flores funcionales de 14 especies de Loasoideae (Loasaceae) pertenecientes a los géneros *Loasa*, *Blumenbachia* y *Caiophora* y botones florales en distintos estadios ontogenéticos de un subgrupo de 11 de estas especies. El muestreo incluye dos morfotipos de la especie *C. chuquitensis*, (Heptamera y Macrocarpa). Las especies vegetales muestreadas (y morfotipo, en el caso de *C. chuquitensis*) se enumeran en la Tabla 1, junto a la localidad del muestreo, la georeferencia de ésta, el tamaño de muestra y el principal polinizador. Se intentó que el muestreo resultara representativo de dichos géneros, como así también de las estrategias de polinización reportadas para el grupo (Ackermann y Weigend, 2006). Se consideró a un agente como polinizador de una planta solamente si existían registros de que éste contactara efectivamente las estructuras fértiles de la flor. Tal información se basó en nuestras observaciones de campo y en las observaciones de los trabajos citados en Ackermann y Weigend (2006). Se muestrearon entre 6 y 25 individuos por población, dependiendo de la disponibilidad de individuos en el campo. Dado que *C. cernua* fue muestreada en el jardín botánico de la Universidad de Bonn, Alemania, de ella se pudieron obtener muestras de un solo individuo. Las flores y botones florales fueron conservados en Etanol 70%, luego diseccionados y fotografiados con un estereomicroscopio Leica M420 (Wetzlar, Alemania). Solamente en *C. cernua* se muestrearon 10 flores funcionales del único individuo disponible. La corola, el pétalo y la estructura conformada por la escama

nectarífera y los dos estaminodios que sobresalen por encima de ésta (fig.1) fueron fotografiadas en vista lateral. De aquí en adelante denominaremos a la estructura compuesta por la escama nectarífera y los estaminodios ‘complejo escama-estaminodios’. Para el Capítulo II se trabajó con flores funcionales de las 14 especies de Loasoideae. Una sola flor fue colectada por individuo. Para el Capítulo III se trabajó con flores funcionales de tres especies del género *Caiophora* (*C. hibiscifolia*, *C. lateritia* y *C. nivalis*). En el Capítulo IV se trabajó con flores funcionales y con botones florales de 11 especies de Loasoideae de los géneros *Caiophora*, *Loasa* y *Blumenbachia* (incluyendo los dos morfotipos de *C. chuquitensis*) y en el Capítulo V se trabajó con las flores funcionales de las 14 especies de Loasoideae muestreadas así como también con los botones florales de tres especies de Loasoideae basales al género *Caiophora* (*Loasa acerifolia*, *Blumenbachia hieronymii* y *Blumenbachia silvestris*). En cuanto al muestreo de flores y botones florales realizado para describir el desarrollo floral (Capítulos IV y V), para cada planta se muestreó una flor funcional y entre 3 y 4 botones florales, intentando cubrir la máxima variación posible en forma y tamaño floral a lo largo de la ontogenia.

Especie	Localidad	Latitud y longitud	n	Polinizador
<i>Blumenbachia hieronymii</i> Urb.	Pampa de Achala, provincia de Córdoba, Argentina	31°37'1"S; 64°52'34"O	22	himenópteros
<i>Blumenbachia silvestris</i> Poepp.	Cruce entre ruta 40 y río Carreri, provincia de Neuquén, Argentina	38°52'12"S; 70°27'36"O	14	himenópteros
<i>Caiophora cernua</i> (Griseb.) Urb. & Gilg ex Kurtz.*	Jardín Botánico de la Universidad de Bonn, Bonn, Alemania.	50°43'28"N; 7° 5'31"E	1	himenópteros
<i>Caiophora chuquitensis</i> (Meyen) Urb. & Gilg.(Morfotipo Heptámera)	El Angosto, provincia de Jujuy, Argentina	24° 0'56"S; 65°46'56"O	16	colibríes
<i>Caiophora chuquitensis</i> (Meyen) Urb. & Gilg.(Morfotipo Macrocarpa)	Humahuaca, provincia de Jujuy, Argentina	23°10'7"S; 65°22'13"O	20	colibríes
<i>Caiophora clavata</i> Urb. & Gilg.	Tafí del Valle, provincia de Tucumán, Argentina	26°45'39"S; 65°44'26"O	19	himenópteros
<i>Caiophora coronata</i> (Gillies ex Arn.) Hook. & Arn.	Los Túneles, provincia de Mendoza, Argentina	32°48'53"S; 70° 2'15"O	15	roedores
<i>Caiophora dumertorum</i> Urb. & Gilg.	Senda al Alto Calilegua, provincia de Jujuy, Argentina	23°37'12" S; 64°54'0"O	8	himenópteros
<i>Caiophora hibiscifolia</i> (Griseb.) Urb. & Gilg.	Senda al Alto Calilegua, provincia de Jujuy, Argentina	23°37'44"S; 64°56'14"O	23	colibríes
<i>Caiophora lateritia</i> Klotzsch.	Tafí del Valle, provincia de Tucumán, Argentina	26°50'8"S; 65°42'31"O	25	colibríes
<i>Caiophora nivalis</i> Lillo.	Vallecitos, provincia de Mendoza, Argentina	32°58'12"S; 69°21'36"O	17	himenópteros
<i>Loasa acerifolia</i> Dombey ex Juss.	Valdivia, región De los Ríos, Chile	38°52'12"S; 70°27'36"O	24	himenópteros
<i>Loasa bergii</i> Hieron.	PN. Nahuel Huapi, provincia de Río Negro, Argentina	40°59'42"S; 71°30'38"O	25	himenópteros
<i>Loasa heterophylla</i> Hook. & Arn.*	Jardín Botánico de la Universidad de Bonn, Bonn, Alemania.	50°43'28"N; 7° 5'31"E	10	himenópteros
<i>Loasa pallida</i> Gillies ex Arn.*	Jardín Botánico de la Universidad de Bonn, Bonn, Alemania.	50°43'28"N; 7° 5'31"E	6	himenópteros

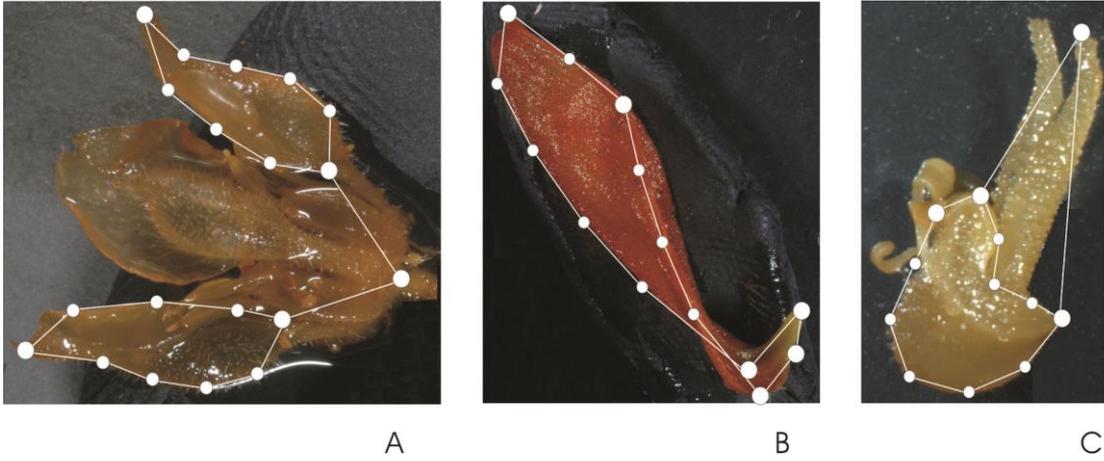
Tabla 1. Especies vegetales muestreadas (y morfotipo, en el caso de *C. chuquitensis*), localidad del muestreo, georeferencia correspondiente, tamaño de muestra y principal polinizador. Las especies para las que no fue posible tomar muestras del desarrollo y que por ende no fueron incluidas en el capítulo IV se indican con *.

Obtención de variables morfogeométricas

Se obtuvieron variables morfogeométricas que describen la forma de la corola (Capítulos II y III), del pétalo (Capítulos IV y V) y de la forma del complejo escama-estaminodios (Capítulos II, III, IV y V). También se obtuvieron variables morfogeométricas que describen el tamaño de estas estructuras. Como se vio más arriba, tanto la corola como el complejo escama-estaminodios juegan un rol clave en el mecanismo de polinización de Loasoideae. En los Capítulos IV y V se consideró la

morfología del pétalo en lugar de la morfología de la corola porque no fue posible describir la forma de la corola para estadios del desarrollo previos a la flor funcional. La morfología del pétalo se correlaciona de manera significativa con la morfología de la corola en las flores desplegadas de Loasoideae; ($r=0.62$, $p<0.05$, $n=15$). Las flores con coloras más abiertas presentan un pétalo con el unguículo (la parte inferior) más expandido, lo opuesto puede decirse de las corolas más cerradas.

En la obtención de variables morfogeométricas se utilizó el paquete TPS (Rohlf, 2009). En primer lugar se utilizó el programa tpsDig (Rohlf, 2009) para ubicar hitos sobre fotografías que muestran a la corola, al pétalo y al complejo escama-estaminodios en vista lateral. Estos hitos describen puntos anatómicos o matemáticos homologables entre muestras (*landmarks*, de aquí en adelante denominados LM) o describen el contorno de las estructuras (*semi-landmarks*, de aquí en adelante denominados SLM). Cinco LM y 14 SLM fueron ubicados sobre la corola (fig. 2A), cuatro LM y 10 SLM fueron ubicados sobre el pétalo (fig. 2B), mientras que cuatro LM y ocho SLM fueron ubicados sobre el complejo escama-estaminodios (fig. 2C). A estas coordenadas morfogeométricas se les realizó un ajuste de Procrustes. En este ajuste se descarta la variación entre las estructuras fotografiadas que está dada por diferencias de tamaño entre éstas y por el ángulo de rotación. Así se obtienen coordenadas de Procrustes y la variación entre dichas configuraciones de coordenadas de Procrustes representa variación debida puramente a la forma de las estructuras. Con las coordenadas de Procrustes así obtenidas se realizaron análisis de deformaciones relativas (*relative warp analyses*) (Capítulos II y IV), o estas fueron utilizadas de manera “cruda” en los análisis morfogeométricos de los capítulos IV y V. También se obtuvo el tamaño centroide de la corola (Capítulos II y III), el tamaño centroide del pétalo (Capítulos IV y V) y el tamaño centroide del complejo escama-estaminodios (Capítulos II, IV y V). El tamaño centroide es la medida de tamaño utilizada en morfometría geométrica y se calcula como la raíz cuadrada de la suma de las distancias euclídeas entre cada hito y el centroide de la configuración de hitos (Zelditch, 2012). El procesamiento de hitos morfogeométricos se realizó para los capítulos II y III con el programa tpsRelw (Rohlf, 2009) y para los capítulos IV y V con el programa MorphoJ (Klingenberg, 2011).



Fig

. 2. Se indican los LM (círculos grandes) y los SML (círculos pequeños) ubicados A, sobre la corola B, sobre el pétalo, C, sobre el complejo escama-estaminodios.

CAPÍTULO I

EL CONFINAMIENTO ESPACIO-TEMPORAL DE LA EVOLUCIÓN FLORAL

La morfología de los órganos es clave al permitir a los organismos funcionar en su ambiente, por ejemplo a través del movimiento en el caso de los animales o al determinar el grado de acople con el ambiente inmediato en el caso de las plantas. Se espera por lo tanto que las diferencias morfológicas observadas entre linajes reflejen distintas interacciones funcionales entre los órganos y el ambiente que habitan los organismos. La convergencia morfológica, esto es la adquisición independiente de una morfología similar en correspondencia con un ambiente selectivo común, se ha propuesto como una evidencia contundente de la adaptación (Losos, 2011).

Wagner (2001) propuso que los rasgos deberían ser considerados como los sujetos directos de la selección en los estudios de biología evolutiva. Los rasgos morfológicos se originan a través de la ontogenia y forman a la vez parte del cuerpo de un organismo. Por esta razón, un rasgo morfológico en un estadio determinado de la ontogenia no sólo refleja selección directa sobre el rasgo en ese estadio ontogenético, sino también selección sobre su trayectoria ontogenética y sobre el cuerpo que lo contiene (Wagner, 2001). La evolución de los rasgos morfológicos se entendería por ende mejor si éstos fueran considerados como un continuo espacio-temporal bajo selección y no como unidades aisladas que responden a la selección de manera independiente.

A pesar de que la incidencia de la ontogenia sobre la evolución ha sido considerada hasta ahora para animales (por ejemplo Kingsolver et al., 2012) y para rasgos de historia de vida en plantas (Donohue et al., 2014), la evolución de la morfología floral (en particular de las flores desplegadas) ha sido considerada en aislamiento del contexto espacio-temporal de la ontogenia floral. En este capítulo proponemos la adopción de una perspectiva más abarcadora, que permita entender la diversificación floral dando cuenta del contexto ontogenético en que evoluciona la morfología de estos órganos.

La diversidad floral es grande pero no ilimitada

A pesar de que las flores comparten una estructura básica, la cual consiste en un perianto y estructuras reproductivas, una gran diversidad ha evolucionado sobre este plan básico. Entre los muchos ejemplos de diversidad floral puede encontrarse variación en la apariencia y en el número de piezas del perianto, en la cantidad de estambres y de carpelos y en el tamaño y en la forma del perianto. Esta diversidad floral se sitúa generalmente dentro de inflorescencias, las cuales a su vez se diferencian de acuerdo al modo en que la morfología floral varía a lo largo de sus ejes (Harder y Prusinkiewicz, 2012). Esta variación en la morfología floral y en la de las inflorescencias puede tener distintas causas: puede estar dada por variación en la tasa o en la duración de la ontogenia floral (heterocronía), por variación ya sea en el crecimiento relativo de distintas partes de la flor o en la cantidad de estructuras que presenta un anillo floral (heterometría) y por variación en la arquitectura o ‘bauplan’ floral (heterotipía) (fig. 1). En casos extremos, tanto la heterocronía como la heterometría pueden llevar a la supresión del desarrollo de estructuras florales (si éstas culminan su desarrollo muy temprano en el primer caso o si se reduce de ‘n’ a 0 la cantidad de veces que la estructura se desarrolla sobre la flor en el segundo). La aparición de novedades evolutivas en las flores, por ejemplo la aparición de espolones nectaríferos (Hodges y Arnold, 1995) podría ser considerada como un ejemplo de heterotipía.

Es interesante destacar que dentro de una misma inflorescencia pueden encontrarse variantes heterocrónicas y heterométricas. La supresión, o no, de estructuras femeninas puede ser considerada como variación heterométrica o heterocrónica dentro de las inflorescencias, la cual depende de la posición que la flor ocupa a lo largo del eje de la inflorescencia (Diggle, 1997). El inicio del desarrollo floral y el momento en que cada flor comienza a marchitarse a lo largo de la inflorescencia también pueden presentar variación heterocrónica y tener valor adaptativo (Rogers, 2006; Harder y Prusinkiewicz, 2012). El desarrollo floral de *Dalechampia* (Euphorbiaceae) provee un ejemplo ilustrativo acerca de cómo la heterocronía diferida sobre las inflorescencias puede tener valor adaptativo (Armbruster, 2012). Las inflorescencias de *Dalechampia* poseen flores femeninas y masculinas. La adquisición de flores masculinas que no se llegan a abrir en el momento de la maduración de las anteras se logra en este género mediante la retención de

características morfológicas del botón floral en las flores masculinas una vez que éstas alcanzan la madurez reproductiva. Esta característica permitió al linaje evolucionar desde la polinización generalista (esto es, la polinización mediada por varios grupos funcionales de polinizadores) hacia la polinización especialista (esto es, la polinización mediada por una o pocas especies pertenecientes a un único grupo funcional de polinizadores). El conservar una morfología afín a la de un pimpollo en las flores masculinas de *Dalechampia* restringe el acceso a la recompensa (polen), permitiendo el acceso solamente a abejas especializadas en hacer vibrar las anteras para obtener polen como recompensa (“*buzz-pollinating*” bees) (Armbruster, 2012) (fig. 1).

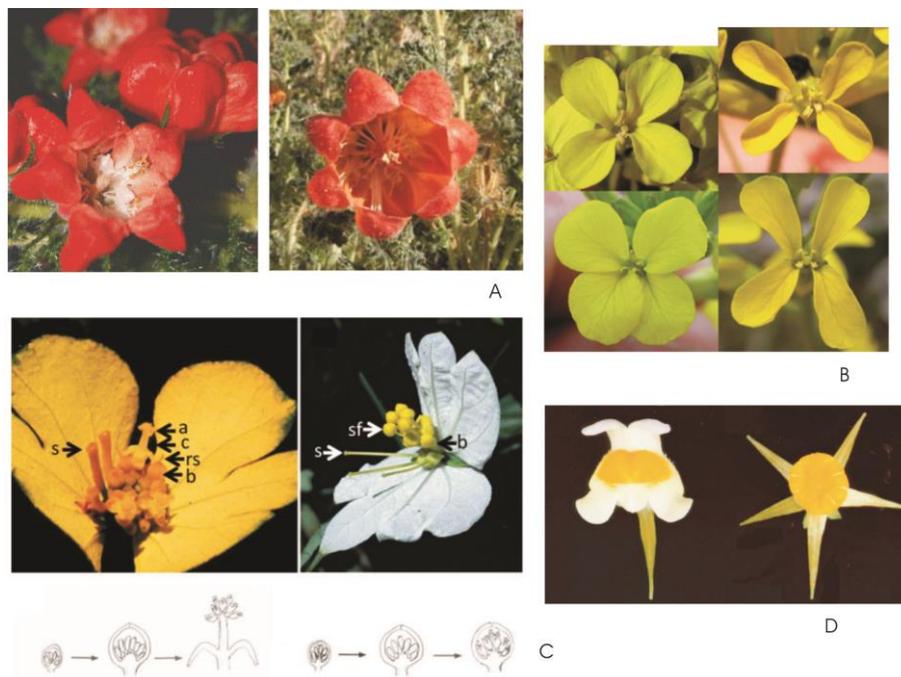


Fig.1. Variación del desarrollo que subyace a la diversidad floral. *A, B*, heterometría. *A*, *Caiophora chuquitensis* (Loasaceae) muestra variación inter-poblacional en el número de pétalos; *B*, *Erysimum mediohispanicum* (Brassicaceae) presenta polimorfismos intra-poblacionales en el crecimiento relativo de distintas partes del pétalo (la proporción ancho-largo del pétalo difiere entre individuos) (Gómez, Perfectti y Camacho, 2006). *C*, heterocronía en *Dalechampia* (Euphorbiaceae). Mientras *D. subternata* (izquierda) tiene flores masculinas abiertas (señalizadas con ‘a’), las flores masculinas de *Dalechampia* sp. nov. aff. *bernieri* (derecha) retienen una morfología floral similar a la de un pimpollo (señalizadas con ‘sf’). Esto posibilitó la especialización para la polinización mediada por abejas que vibran las anteras para acceder al polen en *Dalechampia* sp. nov. aff. *bernieri* (Armbruster, 2012). Las flores estiladas no presentan variación heterocronía y se señalan con ‘s’. Los botones florales se señalan con ‘b’. Debajo de la fotografía de cada especie se representó el desarrollo de las flores masculinas. Nótese la similitud morfológica entre los botones florales de *D. subternata* y las flores funcionales de *Dalechampia* sp. nov. aff. *Bernieri*. *D*, variación heterotípica en la morfología floral de una especie de *Antirrhinum majus* (conejo). La flor de la izquierda pertenece a un individuo de tipo silvestre, mientras que la de la derecha pertenece a un mutante pelórico. Estos últimos son mutantes que presentan una disrupción

de la simetría floral bilateral. Las imágenes mostradas en *B* fueron tomadas de Gómez, Perfectti y Camacho (2006). Las imágenes mostradas en *C* fueron tomadas de Armbruster (2012).

A pesar de la variabilidad de estos mecanismos, que proveen las bases para la diversificación floral (Becker et al., 2011), hay evidencia de que la evolución de la morfología floral ocurre a una tasa muy lenta y de que la variación floral es limitada. En primer lugar, a pesar de que en algunos linajes de Angiospermas evolucionaron morfologías florales novedosas, complejas y especializadas (flores con piezas soldadas, de simetría bilateral y con pocos estambres), las cuales permitieron la diversificación morfológica dentro de estos linajes gracias al fomento de un ajuste estricto con distintos grupos funcionales de polinizadores (y consecuentemente la especiación), la mayor parte de los linajes de Angiospermas presentan morfologías florales que podrían ser consideradas ancestrales debido a su estructura floral simple, accesible a distintos grupos funcionales de polinizadores, no lo suficientemente apta para el transporte eficiente de polen (flores con piezas no soldadas, de simetría radial con muchos estambres por ejemplo) (O'Meara et al., no publicado). En segundo lugar, las convergencias en la morfología floral son muy frecuentes y, a pesar de que dichas convergencias han sido consideradas como una evidencia contundente de adaptación, éstas podrían reflejar también la falta de posibilidades genéticas y del desarrollo para generar formas nuevas y quizá más beneficiosas (trabajos citados en Stayton, 2008).

Más allá de que el potencial de diversificación de la morfología floral podría ser en parte explicado por la variación genética disponible (fig. 2), este aspecto no será discutido en el presente capítulo. Las restricciones genéticas no son excluyentes de la morfología y están además extensamente descritas en la literatura (Walsh y Blow 2009; Klingenberg, 2010). Este capítulo se centra en considerar cómo el hecho de que la flor desplegada sea sólo una etapa de su propia trayectoria ontogenética (sujeta a otros agentes selectivos que afectan al botón floral y al fruto), la cual está a su vez contenida dentro de un nivel de organización biológica superior sujeto a selección (la inflorescencia) puede limitar la variación en las flores desplegadas accesible a la selección, por ende la evolución y la diversificación morfológica de la flor desplegada. A pesar de que la selección sobre el ciclo de vida completo de la planta también podría tener consecuencias sobre la diversificación de la morfología floral (Donohue, 2013), por simplicidad aquí consideraremos solamente aquellos estadios del desarrollo y niveles de organización

biológica de la planta que están en contacto directo con la flor desplegada. Esto significa que el desarrollo del botón floral, el despliegue floral y el desarrollo del fruto serán considerados dentro del contexto de la inflorescencia.

Las flores forman parte de un continuo espacio-temporal

Las flores desplegadas no están aisladas de otros estadios de su desarrollo y tampoco lo están de las estructuras que las soportan, las inflorescencias. Si bien la flor funcional es una estructura crucial para la aptitud reproductiva de la planta, a través del ajuste flor-polinizador, ésta es solamente un estado fenológico de una trayectoria de desarrollo que comprende a la activación del meristema floral, al desarrollo del pimpollo, al despliegue floral (el cual en el caso de las flores dicógamas puede incluir a su vez una separación entre la fase masculina y la femenina), a la senescencia de la flor y al posterior desarrollo de los frutos. Todos los pasos de esta secuencia deben estar bien adaptados para contribuir de manera positiva a la adecuación reproductiva de la planta. A su vez estos estadios son interdependientes, ya que comparten en mayor o menor medida determinantes genéticos y hormonales de la morfogénesis floral (Dornelas et al., 2012). También se encuentran interconectados por el hecho de que la morfología de un estadio del desarrollo interactúa mecánicamente con la morfología de estadios previos y posteriores. Por ejemplo, la adyacencia de tejidos o estructuras florales a lo largo del desarrollo deriva en una interacción mecánica entre éstos que se mantiene a lo largo de la ontogenia, independientemente de que existan conexiones regulatorias entre estadios ontogenéticos (Endress, 2006; Hallgrímsson et al., 2009). Es por ello que la selección sobre la morfología de un estadio determinado del desarrollo, por ejemplo la flor desplegada, podría tener consecuencias colaterales sobre la morfología de otros estadios, por ejemplo el botón floral y el fruto en desarrollo. A la par de este contexto temporal dentro del cual se sitúa la flor funcional, las flores generalmente se ubican dentro de inflorescencias, donde responden a la selección de manera colectiva (Harder y Prusinkiewicz, 2012).

El considerar a la flor desplegada en aislamiento del contexto espacio-temporal en que ésta se desarrolla deja la impresión de que son varias las trayectorias ontogenéticas posibles que pueden derivar en una flor desplegada apta para un determinado ambiente selectivo. De esto se desprende que la respuesta de la morfología de la flor funcional a la selección debería ser un proceso directo y relativamente rápido. Pero la vía que puede

adoptarse para arribar a una morfología determinada en el estadio de la flor desplegada podría estar condicionada por los agentes selectivos que actúan sobre toda la trayectoria ontogenética de la flor y también por los agentes selectivos que actúan sobre la inflorescencia (fig. 2). Esto sujeta a la morfología de la flor desplegada a una “negociación” con otros estadios del desarrollo y con otros niveles de organización biológica, lo cual le impediría evolucionar de manera eficiente en respuesta a las presiones selectivas a que está sujeta. ¿Hasta qué punto la morfología de las flores desplegadas puede evolucionar con independencia de otros estadios ontogenéticos?; ¿hasta qué punto la diversificación adaptativa de la morfología floral se asocian con una ruptura de patrones de desarrollo ancestrales y hasta qué punto la diversificación adaptativa de la morfología se favorece de la variación “contenida” o “provista a lo largo” de una trayectoria de desarrollo relativamente estable?; el grado de asociación funcional de las flores dentro de las inflorescencias, ¿determina el potencial de diversificación de distintos linajes de angiospermas? Preguntas como éstas permanecerán sin respuesta si el contexto espacio-temporal de la ontogenia floral no se incorpora a los estudios que abordan la adaptación y la evolución en flores.

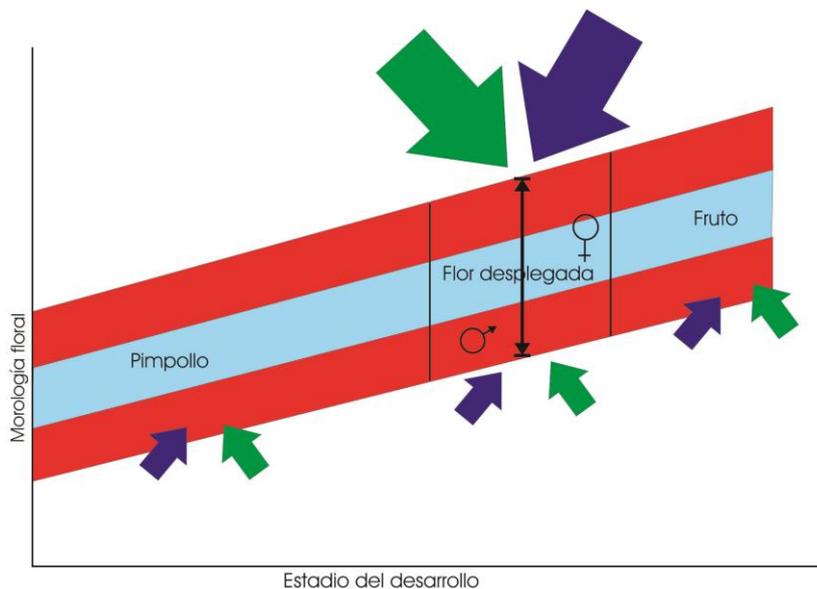


Fig. 2. Selección sobre distintos estadios del desarrollo floral y sobre la inflorescencia. Se señala con flechas pequeñas la selección sobre distintos estadios del desarrollo floral (botón floral, flor funcional con su fase masculina y femenina, y fruto). La selección ejercida sobre la morfología floral a través de la función colectiva de las flores en la inflorescencia se señala con flechas grandes. La selección sobre el desarrollo floral y sobre la arquitectura de la inflorescencia, actuando a nivel poblacional, determina la cantidad de variación morfológica accesible a la selección durante el estadio de la flor desplegada (la sección de la superficie celeste indica la fracción de la variación morfológica accesible a la selección en el

estadio de la flor desplegada). El segmento negro indica la cantidad de variación morfológica que estaría accesible a la selección de no estar la arquitectura de la inflorescencia y otros estadios ontogenéticos comprometiendo la selección sobre la flor desplegada. Las bandas rojas indican la porción de la variación morfológica que es seleccionada en contra por selección externa (flechas verdes) y por selección a favor de la integración interna (flechas azules).

***El desarrollo floral: un condicionante temporal de la evolución morfológica en flores.
La protandria como un ejemplo ilustrativo***

El período de desarrollo entre el momento en que aparece el meristema floral y la maduración del fruto se expone a distintos agentes selectivos, por ejemplo herbívoros, polinizadores y dispersores de semillas. A su vez, la morfología de diferentes estadios del desarrollo presenta conexiones regulatorias y mecánicas (Endress, 2006; Hallgrímsson et al., 2009; Dornelas et al., 2012). Por esta razón, es esperable que la evolución de la morfología de las flores funcionales no sea independiente de otras etapas del desarrollo. En lo que sigue se plantea un caso que ilustra dicha interdependencia entre estadios de la ontogenia floral.

La protandria, esto es la secuencia de maduración de las estructuras fértiles de la flor donde la maduración del androceo ocurre en una etapa previa a la del gineceo, es mucho más frecuente que la protoginia (la maduración del gineceo en una etapa previa a la del androceo). Una explicación del mayor éxito reproductivo de la protandria por sobre la protoginia se hace evidente solamente si se considera también el desarrollo del fruto: si el fruto comienza a desarrollarse en un momento previo al de la maduración de los estambres, éste interfiere con la funcionalidad del androceo restringiendo la remoción del polen (trabajos citados en Lloyd Webb, 1986).

Más allá de existir una influencia del ambiente externo sobre la trayectoria de desarrollo de la cual la flor funcional forma parte, la ontogenia en si misma posee un ambiente “interno” compuesto por las conexiones mecánicas y regulatorias entre diferentes estadios ontogenéticos. El requisito de mantener una coherencia interna a lo largo de la ontogenia que posibilite arribar al estadio de la flor desplegada y luego al del fruto maduro podría promover la selección en contra de aquellas variantes que entorpezcan u obstaculicen la continuación de la ontogenia, independientemente de la adecuación “externa” de tales variantes. Arthur (2011a) denomina a este proceso “selección a favor de la integración interna”. Dado que las variantes aberrantes son seleccionadas en contra, la

selección a favor de la integración interna guiaría a la evolución a lo largo de senderos seguros desde el punto de vista de la “dinámica interna” de la ontogenia (fig. 2). Por ejemplo, existe una secuencia que establece el orden de desarrollo de los diferentes anillos florales. En esta secuencia los anillos florales se desarrollan desde la periferia del botón floral hacia el centro, o sea, comienza a desarrollarse primero el cáliz, luego la corola, luego el androceo y por último el gineceo (Endress, 1990). Cambiar este orden implicaría una reorganización del desarrollo del meristema floral y se ha visto que los mutantes con reorganizaciones del meristema floral abortan el desarrollo en *Arabidopsis thaliana* (Laux, Mayer y Jürgens, 1996). En *Lacandonia schismatica* (Triuridaceae), el androceo, que ocupa una posición intercambiada con el gineceo, se desarrolla antes que el gineceo (Ambrose et al., 2006). Sin embargo, *Lacandonia schismatica* es el único linaje de angiospermas del cual se conoce esta inversión en el orden de desarrollo de los anillos florales. Un requisito interno de que la secuencia del desarrollo de los anillos florales sea centripeta podría ofrecer una explicación alternativa a la anterior (o complementaria) de la prevalencia de la protandria por sobre la protoginia.

La arquitectura de las inflorescencias. Una condicionante espacial de la evolución morfológica en flores. La dicogamia como ejemplo ilustrativo

En conjunto con la ontogenia floral y la del fruto, la función colectiva de las flores sobre la inflorescencia también puede condicionar la morfología floral. Las flores que componen una inflorescencia no son copias carbónicas una de la otra y la existencia de variación sistemática en la morfología floral a lo largo de la inflorescencia es parte de la arquitectura de las inflorescencias. Dicha variación sistemática en la morfología floral indica que esta variabilidad no representa simplemente inestabilidad del desarrollo sino que la variación en la arquitectura de las inflorescencias también puede ser funcional y estar por ende sujeta a selección (Harder y Prusinkiewicz, 2012).

La morfología de las flores individuales puede estar condicionada por la función colectiva que las flores desempeñan dentro de la inflorescencia. Esto puede ilustrarse mediante el ejemplo de la dicogamia diferida. La dicogamia es la condición en la que existe una separación temporal en la maduración de los sexos dentro de una misma flor. A pesar de que la dicogamia a nivel de la flor como unidad puede ser explicada como un mecanismo que previene la autofertilización (lo cual no es incorrecto), al situar a la flor

dentro del contexto de la inflorescencia se desprenden otros valores adaptativos de esta particularidad morfológica de las flores. La dicogamia puede ser diferida a lo largo del eje de la inflorescencia. Esto quiere decir que las flores en fase masculina ocupan posiciones apicales y las flores en fase femenina ocupan posiciones basales sobre el eje de la inflorescencia. Esta disposición de las flores en fase masculina y en fase femenina a lo largo del eje de la inflorescencia incrementa la eficiencia de la polinización, ya que las abejas tienden a visitar las inflorescencias en una dirección base-ápice, evitando el transporte de polen desde las flores en fase masculina hacia las flores en fase femenina de la misma planta, favoreciendo el transporte de polen desde las flores en fase masculina hacia las flores en fase femenina de otras plantas (Harder et al., 2000).

La contingencia espacio-temporal de la evolución floral y su posible efecto sobre la tasa y los patrones de diversificación floral en Angiospermas

De acuerdo a lo discutido a lo largo de este capítulo, podría decirse que ciertas variantes morfológicas de la flor desplegada podrían ser seleccionada en contra si desvían a la ontogenia de una terminación eficiente. Una terminación eficiente de la ontogenia podría verse obstaculizada tanto por los efectos negativos que la selección directa sobre una etapa dada del desarrollo puede tener sobre la adecuación de la morfología en otros estadios del desarrollo como por la obstaculización de los procesos internos que regulan la ontogenia (Arthur, 2011a). Las flores se integran a su vez funcionalmente dentro de inflorescencias, contribuyendo de manera colectiva a la adecuación reproductiva de la planta (Rogers et al., 2006, Harder y Prusinkiewicz, 2012). Esperamos que dicho confinamiento espacio-temporal de la flor desplegada restrinja la evolución de la morfología floral a unas pocas regiones del morfoespacio, las cuales no estarían en conflicto con la morfología en otros estadios del desarrollo, con el funcionamiento interno de la ontogenia que da lugar a la flor funcional y al fruto y con la función de la inflorescencia (fig. 2).

El confinamiento espacio-temporal de la flor desplegada podría estar explicando por qué la morfología floral de muchos linajes de Angiospermas conserva características ancestrales a pesar de la menor aptitud que confieren estas características (tanto desde el punto de vista de la eficiencia de la polinización como desde el punto de vista macroevolutivo, definido por el potencial de especiación del linaje) (O'Meara et al., no

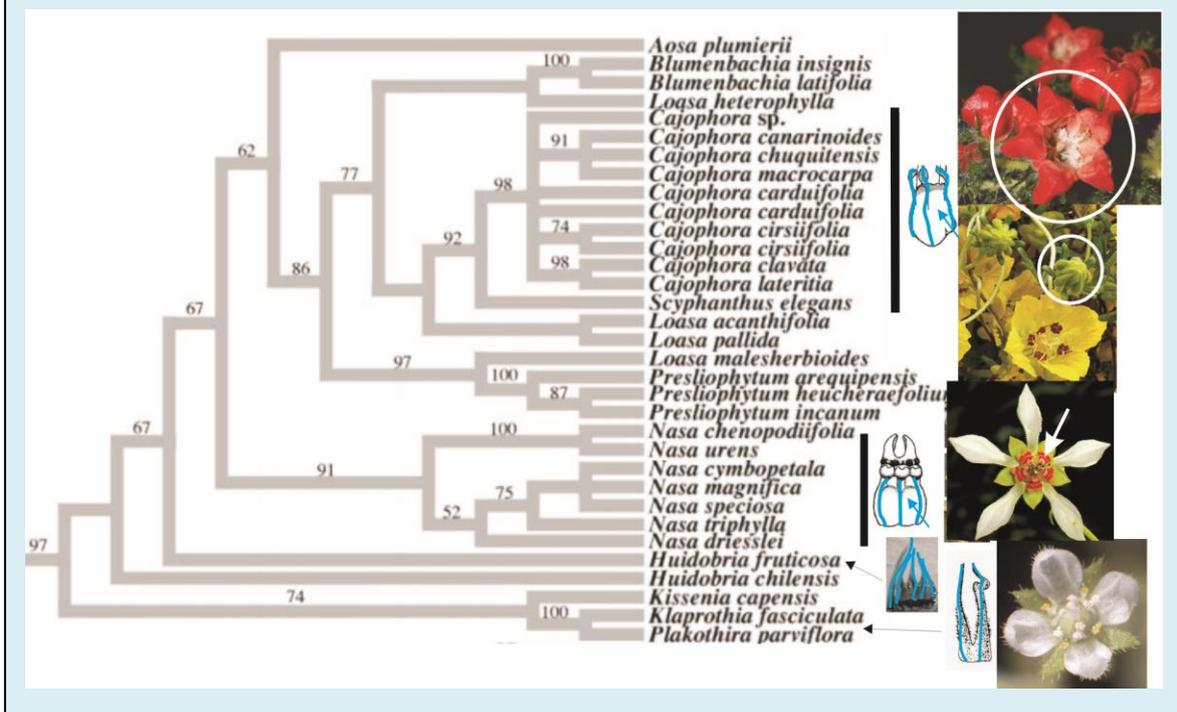
publicado). Si la flor funcional fuera en gran medida independiente de su propio desarrollo y de la inflorescencia que la porta, la flor podría evolucionar mecanismos de polinización altamente especializados, los cuales contribuirían tanto a la eficiencia de la polinización de esa planta como también a la aptitud macroevolutivo del linaje al que la especie pertenece. Pero no esperamos que esto sea la regla por dos razones. En primer lugar no existe una clara distinción entre diferentes estadios del desarrollo floral y por ende tampoco una clara independencia regulatoria (Dornelas et al., 2012), comparable a la que se observa por ejemplo en insectos holometábolos (larva-pupa-adulto) (Kingsolver et al., 2012). En segundo lugar, las flores en la mayoría de los linajes de Angiospermas se sitúan dentro de inflorescencias y existe evidencia de que la arquitectura de las inflorescencias tiene un mayor impacto sobre la polinización y sobre la producción de semillas que el fenotipo de las flores individuales (Harder y Prusinkiewicz, 2012).

La variación inter-poblacional de la morfología floral a veces puede ser heterotípica (por ende de gran magnitud). Por ejemplo, algunas especies con simetría floral bilateral de la familia Orchidaceae y de los órdenes Ranunculales, Geraniales, Lamiales, Asterales y Solanales presentan en sus poblaciones individuos con simetría floral radial (denominados ‘pelorios’). Dicha variación contribuyó eventualmente a la especiación (Rudall y Batemann, 2003). Sin embargo, aún no se ha reportado que las variantes heterotípicas intra-poblacionales contribuyan a los patrones macroevolutivos de diversidad floral. Por el contrario, el origen de estructuras florales que contribuyeran a la diversificación adaptativa en Angiospermas pareciera haber requerido más bien la acumulación progresiva de alteraciones morfológicas de poco impacto. Por ejemplo, la adquisición de flores bilateralmente simétricas con valor adaptativo desde el punto de vista de la polinización requiere la ocurrencia de mutaciones en numerosos genes que determinan la morfogénesis floral (Green et al., 2010).

La heterometría y la heterocronía implican cambios ya sea en la magnitud con la que se expresa un proceso de desarrollo ancestral o en los parámetros temporales que rigen el desarrollo ancestral (Arthur, 2011b). Es por ello que la evolución por heterocronía y heterometría evita grandes reorganizaciones internas durante la ontogenia. La heterocronía y la heterometría también podrían evitar una alteración dramática de la funcionalidad de la flor desplegada, así como también de la funcionalidad del fruto. La heterocronía es el mecanismo más reportado como mediador de la diversificación inter-específica en

Angiospermas (por ejemplo Guerrant Jr., 1982; Puzey et al., 2012; Armbruster, 2012). En flores, este mecanismo evolutivo supone solamente un adelanto o un atraso de la madurez reproductiva de las anteras y del ovario con respecto a los tejidos estériles de la flor. La heterocronía y la heterometría tampoco afectarían en gran medida a la funcionalidad de la inflorescencia, sobre la cual las variantes heterocrónicas y heterométricas son muy frecuentes e incluso contribuyen al valor adaptativo de esta estructura. La acumulación progresiva de alteraciones morfológicas de poco impacto tales como la heterocronía y la heterometría podría generar la variación heterotípica observada en angiospermas a escalas evolutivas más amplias. En Loasoideae (Loasaceae) la adquisición de escamas nectaríferas se logró de manera progresiva a través de la acumulación de alteraciones heterométricas que afectaron al androceo (Hufford, 2003) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Transformación progresiva de la morfología floral a través de heterocronía y heterometría en Loasoideae (Loasaceae). La heterometría subyace al origen de una novedad evolutiva, un contenedor de néctar, en Loasoideae (Loasaceae). En la esquina superior derecha se muestra la morfología floral básica de una especie derivada de Loasoideae. La modificación heterométrica progresiva de los estaminodios (marcados con trazos celestes) en las especies ancestrales de Loasoideae probablemente posibilitó la evolución de escamas nectaríferas (flecha blanca) en las especies derivadas. Las flores de las especies basales de Loasoideae (que representarían la condición ancestral) presentan variación en la cantidad de estaminodios (variación heterométrica). En el grupo derivado compuesto por *Nasa*, *Aosa*, *Loasa*, *Scyphanthus* y *Cajophora* se alcanza un número estabilizado de 15 estaminodios (tres por escama). Los cambios en la cantidad de estaminodios habrían ido acompañados por un sobrecrecimiento del tejido entre los estaminodios (variación heterométrica) (señalizado con flechas celeste), lo que dio lugar a escamas nectaríferas (Hufford, 2003). En contraposición con las diferencias notorias que se observan en la estructura floral si se comparan las especies basales con las derivadas (donde la principal diferencia consiste en la presencia-ausencia de la escama nectarífera), la variación floral entre especies cercanamente emparentadas (por ejemplo *Cajophora chuquitensis* y *Scyphanthus elegans*) ocurre sobre un tema común. Las flores de *Cajophora* polinizadas por colibríes retienen una morfología de corola afín a la de un pimpollo de las flores polinizadas por himenópteros (compárese la flor de *C. macrocarpa* (ornitófila, arriba) con el pimpollo de *S. elegans* (melitófila, abajo)) lo que sugiere heterocronía. Las corolas abiertas constituyen una adaptación para la polinización mediada por himenópteros; las cerradas para la polinización mediada por colibríes (Ackermann y Weigend, 2006).



Fisher (1930) sostiene que mientras pequeños cambios fenotípicos pueden promover un progresivo incremento en la adecuación, la probabilidad de mejora en la adecuación decrece marcadamente con cambios fenotípicos de gran magnitud, llegando a cero en alteraciones fenotípicas muy pronunciadas. Arthur (2011a) aplica este argumento a la adecuación de la secuencia ontogenética completa. Dicho argumento podría aplicarse a

los patrones evolutivos de la morfología floral discutidos en esta última sección: al requerir grandes re-arreglos de la ontogenia floral, las variantes heterotípicas tienen pocas chances de contribuir a la evolución floral; las variantes heterocrónicas y heterométricas, que no requieren una reorganización importante de la ontogenia y que son a su vez producidas dentro de las inflorescencias donde contribuyen a la adecuación de la planta, serían las que principalmente contribuyen a la evolución y a la diversificación floral. Dado que este tipo de variación es de fácil acceso en el desarrollo, la variación heterocrónica y heterométrica podría fomentar la diversificación a corto plazo, de estar los óptimos adaptativos próximos o contenidos dentro de la variación ontogenética que pueda ser generada mediante estos mecanismos.

Conclusión y perspectivas

Los estudios que abordan la evolución y diversificación de la morfología floral generalmente se han focalizado en la morfología de las flores funcionales, considerándola aisladamente de otros estadios ontogenéticos y de su función colectiva dentro de las inflorescencias. Sin embargo, la evolución y diversificación de los rasgos florales podrían ser comprendidas de una manera más integral si la flor se considerara como parte de una secuencia ontogenética sujeta a selección y si se la sitúa dentro del contexto de la inflorescencia donde contribuye de manera colectiva a la polinización. Tanto los programas de investigación que abordan la evolución floral a escala microevolutiva a través de experimentos de selección fenotípica y estudios de genética cuantitativa, así como los estudios que abordan la evolución floral a escala macroevolutiva, mediante aproximaciones comparativas, podrían beneficiarse al considerar a la flor desplegada como parte de un continuo espacio-temporal (Cuadro 2).

Cuadro 2. Preguntas a plantear en estudios micro y macroevolutivos que consideren a la flor funcional como parte de un continuo espacio-temporal.

MICROEVOLUCIÓN FLORAL

- ¿Hasta qué punto la respuesta a la selección de la flor funcional puede ser explicada por agentes selectivos que afectan al botón floral y al fruto?
- La morfología de las flores que se ubican dentro de inflorescencias laxas, ¿responde en mayor medida a la selección mediada por polinizadores que las flores que se encuentran estrechamente asociadas dentro de las inflorescencias?

MACROEVOLUCIÓN FLORAL

- ¿Hasta qué punto la morfología de las flores desplegadas evoluciona con independencia de otros estadios ontogenéticos?
- ¿Hasta qué punto la diversificación de la morfología floral se encuentra sesgada por la trayectoria de desarrollo ancestral?
- El grado de asociación funcional de las flores dentro de las inflorescencias, ¿determina el potencial de diversificación de distintos linajes de angiospermas?

CAPÍTULO II

EVOLUCIÓN DE LA MORFOLOGÍA FLORAL EN *CAIOPHORA* (LOASOIDEAE, LOASACEAE) EN EL CONTEXTO DE UNA RADIACIÓN ADAPTATIVA

Introducción

La evolución del fenotipo floral en respuesta a distintos polinizadores ha tomado a veces la forma de una radiación adaptativa (Whittall y Hodges, 2007; Givnish et al., 2014). A diferencia de la diversificación evolutiva gobernada por selección natural “de rutina”, las radiaciones adaptativas constituyen situaciones en las cuales un clado determinado presenta una diversificación adaptativa descomunal con respecto a sus grupos basales (Losos y Miles, 2002). De esta definición de radiación adaptativa se desprenden dos criterios que permiten determinar si un clado se originó o no en una radiación adaptativa. En primer lugar, en las especies del grupo en cuestión debieron haber evolucionado adaptaciones que les permitieran interactuar con el ambiente de diferentes maneras, ya sea utilizando distintos hábitats o recursos o utilizando un mismo hábitat o recurso de distintas maneras. En segundo lugar, la diversidad del clado originado en la radiación adaptativa tiene que ser inusualmente grande (Losos y Miles, 2002). En el caso puntual de la evolución floral mediada por polinizadores, estas condiciones se cumplen si el fenotipo floral del clado en cuestión evolucionó para depositar y recibir polen del cuerpo de diferentes tipos de polinizadores (o eventualmente de distintas partes del cuerpo de un mismo polinizador) y si el clado originado en la radiación adaptativa presenta un fenotipo floral más diverso que el que presentan sus grupos basales.

Las radiaciones adaptativas del fenotipo floral pueden verse facilitadas por dos factores, no necesariamente mutuamente excluyentes. El primero es la aparición de una novedad evolutiva en el fenotipo floral, por ejemplo la aparición de espolones nectaríferos (Hodges y Arnold, 1995). Como dichas novedades evolutivas intervienen en el ajuste flor-polinizador, la variación espacial en los ensambles de polinizadores puede promover la divergencia inter-poblacional en el fenotipo de dichas novedades evolutivas (en el caso de los espolones, divergencia en la longitud de éstos). Dado que la evolución del fenotipo floral que favorece la polinización mediada por un determinado grupo funcional de

polinizadores (por ejemplo colibríes) desfavorecería el ajuste con otros grupos de polinizadores (por ejemplo esfíngidos), los individuos de poblaciones adaptadas a distintos polinizadores tendrían, por razones mecánicas, menos posibilidades de entrecruzarse. Una vez establecida esta barrera reproductiva mecánica, puede tener lugar la evolución de barreras reproductivas post-cigóticas. Un ejemplo clásico de lo anterior es el género *Aquilegia*, donde la aparición de espolones nectaríferos habría permitido la diversificación marcada del fenotipo floral en respuesta a polinizadores con diferentes longitudes de probóscide (Hodges y Arnold, 1995; Whittall y Hodges, 2007). Por otra parte, la generación de nuevos nichos ecológicos puede favorecer la ocurrencia de radiaciones adaptativas (Johnson, 2006). Por ejemplo, la aparición de un nuevo tipo de polinizador en un ambiente donde no se encontraba previamente, en conjunto con cambios climáticos y orográficos que generen aislamiento reproductivo entre las poblaciones expuestas distintos ambientes de polinizadores, pueden promover una radiación adaptativa (trabajos citados en Johnson, 2006).

La transición entre estrategias de polinización más frecuentemente reportada es la que involucra la evolución desde la polinización mediada por himenópteros hacia la polinización mediada por colibríes (Van der Niet y Johnson, 2012; Rosas-Guerrero et al., 2014). Esta transición implica cambios en las características del néctar, el cual tiende a ser más energético en las flores polinizadas por colibríes; en la morfología floral, generalmente desde corolas más anchas y cortas hacia corolas más alargadas y angostas, y en la coloración de las flores, generalmente hacia flores de colores más rojizos (revisado en Thomson y Wilson, 2008). La transición desde la polinización mediada por himenópteros hacia la polinización mediada por colibríes frecuentemente habría tenido lugar en el contexto de radiaciones adaptativas (Classen et al., 2004; Kay et al., 2005; Whittall y Hodges, 2007; Givnish et al., 2014). Se ha propuesto que uno de los disparadores de la diversificación floral en la transición desde la polinización mediada por himenópteros hacia la polinización mediada por colibríes es el aumento de la abundancia de los colibríes en un ambiente determinado (Thomson y Wilson, 2008).

A pesar de que la evidencia presentada en la introducción general de esta tesis sugiere que el género *Caiophora* se habría originado en el contexto de una radiación adaptativa, aún no se ha puesto a prueba si el fenotipo floral de Loasoideae responde a la selección mediada por polinizadores y si *Caiophora* se encuentra más diversificado que sus

géneros basales. Estas son cuestiones que me propuse responder mediante el uso de variables morfogeométricas y del modelado evolutivo de dichas variables. Los detalles acerca del sistema de estudio utilizado en este capítulo pueden consultarse en la introducción general de esta tesis.

Materiales y métodos

El muestreo realizado, así como también el procesado de imágenes llevado a cabo para la obtención de variables morfogeométricas pueden consultarse en la metodología general de esta tesis.

Filogenia y reconstrucción de estrategias de polinización ancestrales

La estimación de una filogenia ultramétrica (donde las distancias entre la raíz y el extremo de cada una de las ramas son equivalentes) y la reconstrucción de las estrategias de polinización ancestrales son un prerequisite para aplicar los modelos utilizados en este estudio. Para ello compilamos las secuencias de cpDNA matK y trnL-trnF disponibles en la base de datos NCBI de GenBank de 25 especies de Loasoideae (incluyendo los dos morfotipos de *C. chuquitensis*). También amplificamos y enviamos a secuenciar estos marcadores de cinco especies adicionales. Los números de acceso de GenBank correspondientes a todas las secuencias utilizadas en este estudio pueden consultarse en el Apéndice 1. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando el protocolo de Hufford (2005). Las secuencias fueron alineadas con MAFFT (Kato et al., 2002) y luego verificadas a ojo utilizando PhyDE (Müller et al., 2010). Se realizó una estimación bayesiana de la filogenia utilizando BEAST v.1.7.5 (Drummond y Rambaut, 2007), aplicando un modelo de evolución molecular único a los dos marcadores plastídicos, para el cual se especificó un proceso evolutivo de Yule, un reloj estricto y un modelo de sustitución GTR+ Γ +I con cuatro categorías Gamma y *priors* no informativos para todos los parámetros. Se corrieron cuatro cadenas independientes de Markov Monte Carlo (MCMC), cada una de 50 millones de generaciones, realizándose un muestreo cada 1000 generaciones (reteniéndose 50 mil árboles por cadena). Los archivos Log de cada corrida fueron importados en TRACER v. 1.5, con el fin de examinar los tamaños de muestra efectivos y la estacionalidad. Los primeros 5000 árboles fueron descartados como *burnin* y los 45 árboles retenidos por cadena fueron ensamblados, usando LOG COMBINER

v.1.5.3, sumando a un total de 180 árboles. A partir de estos 180 árboles se obtuvo un árbol de máxima credibilidad y las probabilidades posteriores fueron calculadas para cada nodo. Finalmente se reconstruyeron las estrategias de polinización ancestrales mediante máxima parsimonia, usando el paquete de R 'ape' (Paradis et al., 2004). La filogenia original de 31 especies fue podada a 15 taxones terminales para el modelado evolutivo de la morfología floral.

Selección de rasgos y análisis morfogeométricos

Se obtuvieron variables morfogeométricas que describen la forma y el tamaño de la corola y del complejo escama-estaminodios. Ambas estructuras juegan un rol clave en el mecanismo de polinización de Loasoideae, lo cual ya ha sido desarrollado en la introducción general de esta tesis.

A partir de las coordenadas de los hitos colocados sobre las imágenes correspondientes a la corola y al complejo escama-estaminodios (ver metodología general) se realizaron dos análisis de deformaciones relativas (*relative warp analyses*) usando el programa tpsRelw (Rohlf, 2009); el primero para capturar la forma de la corola, el segundo para capturar la forma del complejo escama-estaminodios. El análisis de deformaciones relativas permite detectar las deformaciones globales con respecto a una forma consenso (promedio) de las configuraciones de LM y SLM de todos los especímenes analizados. Estas deformaciones son detectadas a lo largo de ejes ortogonales, llamados deformaciones relativas (*relative warps*, RWps). También se obtuvieron los tamaños de centroide de la corola y del complejo escama-estaminodios. De cada una de los 15 taxones terminales analizados se calcularon promedios a partir de los coeficientes correspondientes a cada uno de los individuos sobre las deformaciones relativas retenidas. También se calculó un valor promedio de tamaño centroide (tanto de la corola como del complejo escama-estaminodios) para cada taxón terminal.

Modelado evolutivo de los rasgos florales

Para determinar si la morfología floral de Loasoideae respondió a la selección mediada por polinizadores, se modeló la evolución de cada rasgo (deformación relativa) de acuerdo a tres escenarios alternativos. Primero, modelamos la evolución del rasgo de acuerdo a un proceso Browniano. De acuerdo a este escenario, el rasgo evoluciona solamente por deriva y la distancia filogenética entre taxones terminales es el único factor que explica la variabilidad inter-específica del rasgo. Cuando se lo aplica a un sólo rasgo por vez (como en este estudio) este modelo posee dos parámetros: σ^2 , que representa la tasa de evolución estocástica del rasgo, y θ_0 , que representa al estado del rasgo en el nodo basal de la filogenia. Luego modelamos la evolución del rasgo de acuerdo a dos modelos OU alternativos (Hansen, 1997). El paquete de R ‘ouch’ (Butler y King, 2004) se utilizó para modelar la evolución de los rasgos de acuerdo a procesos Brownianos (Martins et al., 2002) y de Ornstein-Uhlenbeck (OU) (Hansen, 1997). Los procesos OU consideran que tanto la deriva como la selección son factores que explican la variabilidad inter-específica del rasgo.

El segundo modelo consistió en la versión más simple de un modelo OU. Según este modelo, el rasgo evoluciona hacia un óptimo adaptativo único. El modelo incluye cuatro parámetros: σ^2 , que representa la tasa de evolución estocástica (por deriva) del rasgo; α , que representa la tasa de evolución del rasgo por selección; θ , que representa un valor de rasgo óptimo hacia el cual el rasgo evoluciona bajo un régimen de selección estabilizadora y θ_0 , que representa el estado del rasgo en el nodo basal de la filogenia.

En el tercer modelo, a la versión simple del modelo OU se le incorporan tres óptimos adaptativos diferentes, θ_h , θ_c , θ_r (para la polinización mediada por himenópteros, por colibríes y por roedores, respectivamente) hacia los cuales evoluciona el rasgo. Estos óptimos son especificados *a priori* mediante el “pintado” de las ramas de la filogenia, lo cual permite “dibujar” la hipótesis acerca de cómo estos regímenes selectivos afectaron la evolución del rasgo.

Para seleccionar el modelo más apropiado, se compararon los valores de AICc (índice de Akaike corregido por tamaño de muestra) de los tres modelos y se realizó el test

del cociente de verosimilitud (*likelihood ratio test*), comparando al modelo con el valor de AICc más bajo con el modelo inmediato más sencillo. Con el fin de establecer la significación y de construir intervalos de confianza para los parámetros estimados se realizó una estimación herramental o *bootstrap* para cada uno de los parámetros, considerando como extremos de los intervalos de confianza a los percentiles 2.5% y 97.5%. Consideramos significativos a los parámetros σ^2 y α si dicho intervalo no contenía al cero.

Para determinar si *Caiophora* presenta una mayor diversificación en la forma y el tamaño floral con respecto a sus géneros basales, se utilizó la metodología descrita en Revell et al., (2011), realizando la implementación de dicha metodología mediante el paquete R ‘phytools’ (Revell et al., 2011). Esta metodología permite determinar, sin una hipótesis *a priori*, la distribución de las tasas de diversificación de un rasgo sobre la filogenia (lo que también puede conceptualizarse como la distribución de la “cantidad de diversificación”). El modelo utilizado contiene cuatro parámetros: θ , un vector que contiene la identidad de la rama y la posición sobre ésta en la que ocurrió un cambio en la tasa de diversificación; σ_1^2 y σ_2^2 , que son las tasas de diversificación antes y después de dicho cambio en la tasa de diversificación y α , que representa al valor del rasgo en el nodo basal de la filogenia. Estos parámetros se estimaron mediante inferencia bayesiana con MCMC para cada rasgo por separado. El largo de cada cadena fue de 5 millones de iteraciones y el muestreo a partir de esta cadena fue realizado cada 5000 iteraciones (por ende, se retuvieron 1000 iteraciones). Las primeras 100 iteraciones fueron descartadas como *burnin*. Para cada rama se estimó la probabilidad posterior de una transición en la tasa de diversificación. Luego se estimó el valor medio de las tasas de diversificación antes y después del punto de inflexión (σ_1^2 y σ_2^2) para la rama con la mayor probabilidad posterior de un cambio en la tasa de diversificación. La significación de la diferencia entre las tasas de diversificación antes y después de la posición en el que ocurrió el cambio en la tasa de diversificación ($\sigma_1^2 - \sigma_2^2$, denominada de aquí en adelante $\Delta\sigma^2$) se determinó de acuerdo a si el intervalo entre los cuantiles 2.5% y 97.5% incluía al cero. Esto último representa la hipótesis nula de que no existen diferencias entre los valores de σ^2 antes y después de la posición en la que ocurrió el cambio en la tasa de diversificación.

Resultados

La filogenia de Loasoideae se presenta en la fig.1. De acuerdo a la reconstrucción de las estrategias de polinización ancestrales, *Caiophora* presenta dos transiciones desde la polinización mediada por himenópteros hacia la polinización mediada por colibríes y una transición desde la polinización mediada por colibríes hacia la polinización mediada por roedores.

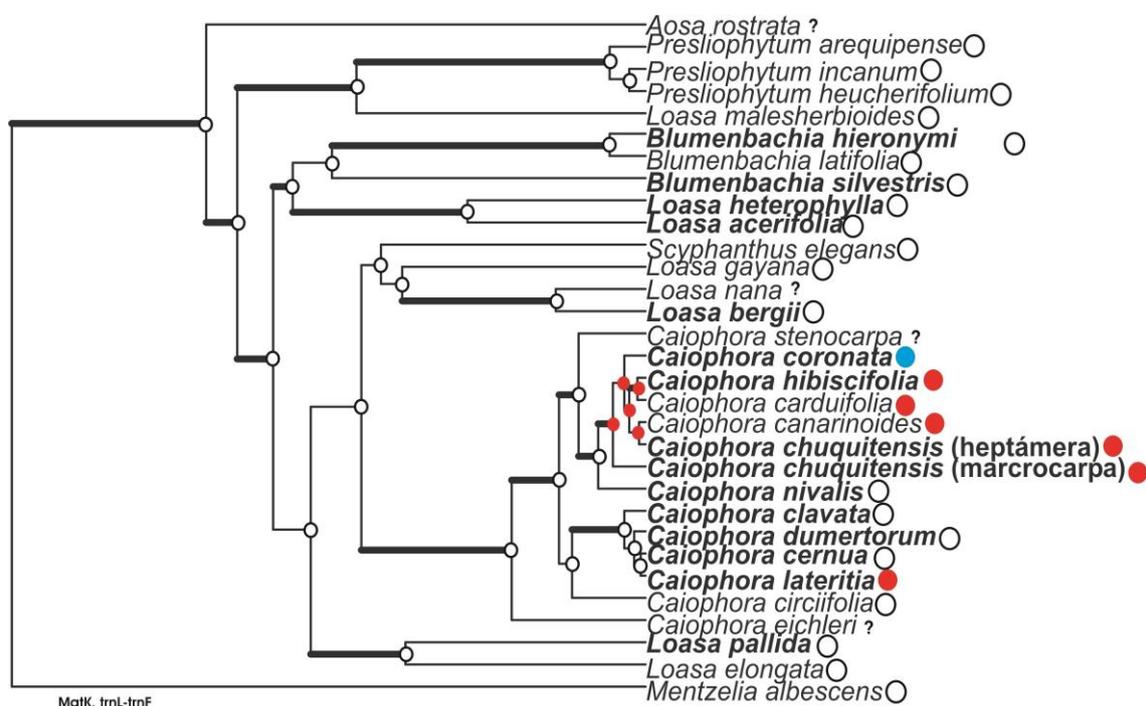


Fig. 1. Relaciones filogenéticas de Loasoideae (Loasaceae) en base a las regiones plásticas matK y trnL-trnF. La topología mostrada es la de un árbol de máxima credibilidad de un análisis bayesiano realizado con secuencias para matK y trnL-trnF de Hufford (2005) y secuencias propias. Las ramas con una probabilidad posterior superior al 95% están en negrita. Se resaltan en negrita las especies seleccionadas para este estudio y con círculos de diferentes colores las diferentes estrategias de polinización: blanco, polinización mediada por himenópteros; rojo, polinización mediada por aves; celeste, polinización mediada por roedores. Se señalan con "?" a las especies de las cuales se desconoce la estrategia de polinización. Para cada nodo se indica la reconstrucción de la estrategia de polinización ancestral.

En los análisis de Deformaciones relativas, el primer eje RWp obtenido capturó la variación morfológica esperada bajo distintos regímenes selectivos. El primer eje RWp obtenido a partir de la forma de la corola explicó el 83.06% de variación en la forma de dicha estructura y representó la variación en el grado de apertura de la corola (fig. 2A).

Este fue el único eje RWp retenido para modelar la evolución de la forma de la corola. Los tres primeros ejes de deformaciones relativa (RWps) obtenidos para el complejo escama-estaminodios explicaron el 82.4% de la variación en la forma de esta estructura y los tres fueron retenidos para el modelado evolutivo. El primer eje RWp obtenido a partir de esta estructura capturó el 56.23% de la variación total y representó principalmente la variación en el grado en que los estaminodios sobresalen por encima de la escama nectarífera (fig. 2B). El segundo eje RWp explicó el 16.95% de la variación en la forma de esta estructura y mostró principalmente la variación en el grado de concavidad de la escama nectarífera y en el grado en que el estaminodio se flexiona con respecto al eje vertical de la escama nectarífera (fig. 2B). El tercer eje RWp capturó el 9.22% de la variación de la forma del complejo escama-estaminodios y principalmente muestra la variación en la estrechez de la porción superior de la escama (fig. 2C). De aquí en adelante se referirá a los ejes RWps retenidos como “forma de la corola”, “forma de la escama-estaminodios 1”, “forma de la escama-estaminodios 2” y “forma de la escama-estaminodios 3”. Denominaremos al tamaño centroide obtenido para la corola y el complejo escama-estaminodios ‘tamaño de corola’ y ‘tamaño de escama-estaminodio’ respectivamente.

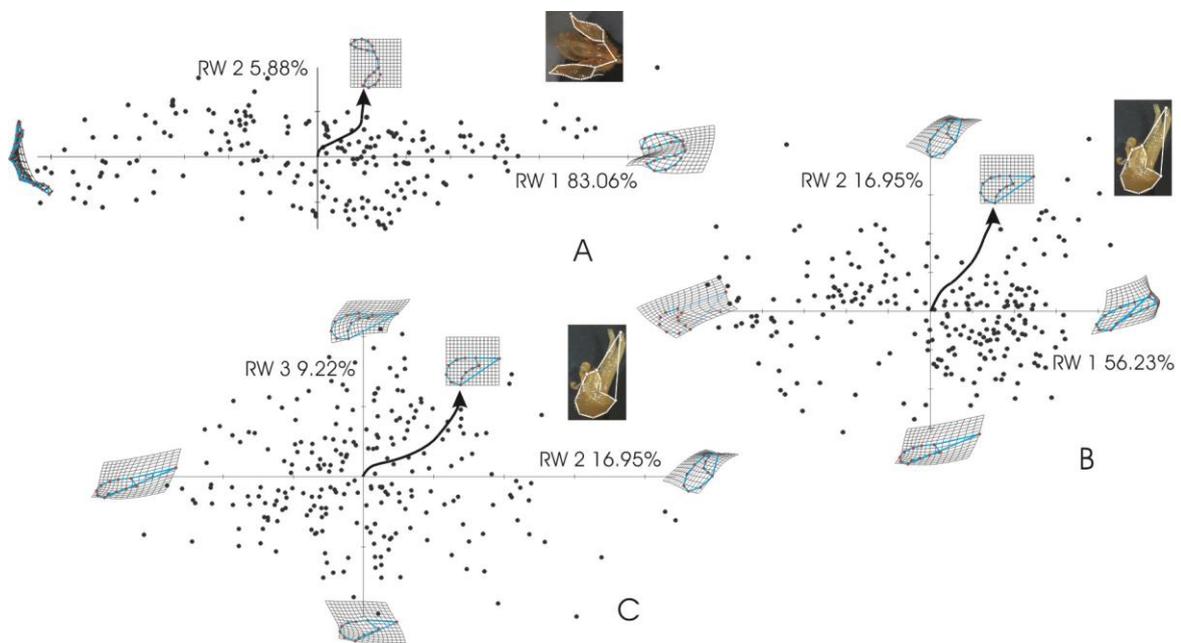


Fig.2. Las salidas de los análisis de deformaciones relativas correspondientes a la corola y al complejo escama-estaminodios se muestran en las figuras A, B y C. Se agregaron fotografías señalando la ubicación de LM (círculos blancos grandes) y SL (círculos blancos pequeños) A, sobre la corola y B, sobre el complejo escama-estaminodios. El porcentaje de la variación explicado por cada RWp se muestra junto a la variación de la forma a lo largo cada eje para cada estructura. Se presenta la forma consenso en el origen del sistema de coordenadas de cada gráfico.

La comparación de modelos mediante AICc y mediante cociente de verosimilitudes sugiere que las variables ‘forma de la corola’, ‘forma de la escama-estaminodios 1’, ‘tamaño de la corola’ y ‘tamaño de la escama-estaminodios’ responden a la selección mediada por polinizadores (fig. 3; Tabla 1). Los óptimos para la polinización mediada por himenópteros así como para la mediada por roedores presentan valores altos para la variable ‘forma de la corola’, los cuales se corresponden con una corola abierta. El óptimo para la polinización mediada por colibríes presenta un valor bajo para esta variable, el cual se corresponde con una corola completamente cerrada. En cuanto a los óptimos encontrados para la variable ‘forma de la escama-estaminodios 1’, el óptimo para la polinización mediada por roedores posee estaminodios que no sobresalen por encima de la escama; el óptimo para la polinización mediada por colibríes presenta estaminodios que sobresalen marcadamente por encima de la escama; el óptimo para la polinización mediada por himenópteros presenta estaminodios que sobresalen ligeramente por encima de ésta. El óptimo para la polinización mediada por colibríes presenta una corola y un complejo escama-estaminodios de gran tamaño. Ambas estructuras son pequeñas en el óptimo correspondiente a la polinización mediada por himenópteros. La configuración de rasgos óptima para la polinización mediada por colibríes presenta corolas de gran tamaño (incluso de tamaño mayor que el óptimo para la polinización mediada por colibríes) y estaminodios pequeños. La evolución de los rasgos ‘forma de la escama-estaminodios 2’ y ‘forma de la escama-estaminodios 3’ se ajusta mejor a un modelo de OU con un solo óptimo adaptativo (Tabla 1). Tanto la tasa de evolución por deriva σ^2 como la tasa de evolución por selección natural α son distintas de cero para los seis rasgos analizados, con valores de α marcadamente superiores a los de σ^2 . Los valores estimados para cada parámetro del modelo evolutivo y sus intervalos de confianza se muestran para cada rasgo en la Tabla 2.

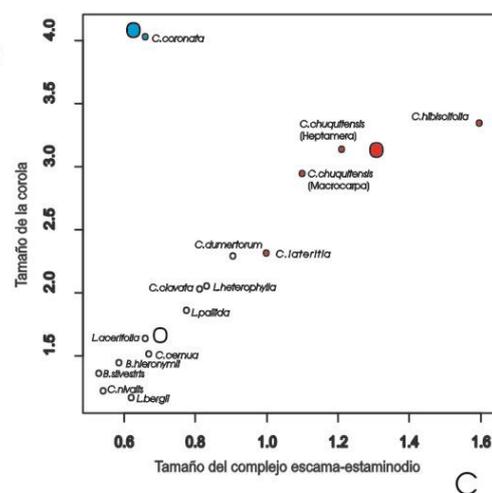
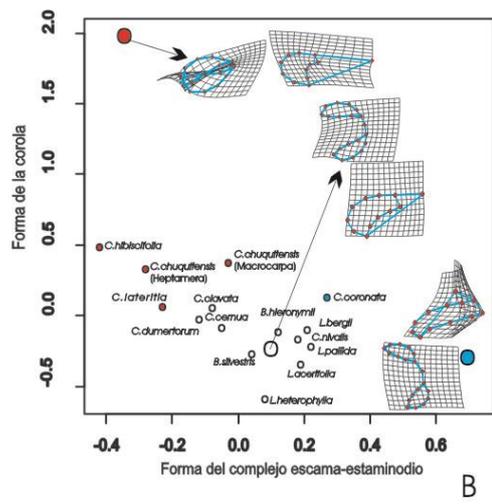
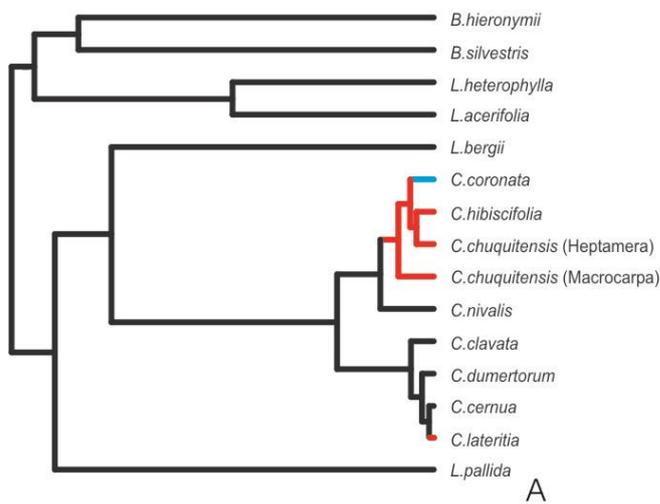


Fig. 3. Evolución de los rasgos florales ‘forma de la corola’ y ‘forma de la escama-estaminodios 1’ en respuesta al régimen de polinización. En A las ramas de la filogenia fueron pintadas según la reconstrucción de los regímenes de polinización. Las ramas negras corresponden a polinización mediada por himenópteros, las ramas rojas a la polinización mediada por colibríes y la rama celeste a la polinización mediada por roedores. Para los cuatro rasgos que respondieron a la selección mediada por polinizadores se muestran en B (forma) y en C (tamaño) la configuración óptima de rasgos para cada estrategia de polinización (círculos grandes) y los valores medios de los rasgos por especie (círculos pequeños): blanco, polinización mediada por himenópteros; rojo, polinización mediada por colibríes; celeste, polinización mediada por roedores. Las configuraciones de forma óptimas para cada rasgo se muestran según la salida gráfica de tpsRelw (Rohlf, 2009).

Modelo	AIC.c	Δ AIC.c	df	logLik	p logLik
Forma de la corola					
Proc. Browniano	5.793375		2	-0.39669	
OU 1 óptimo	3.394424		3	2.393697	
OU 3 óptimos	-4.507653	7.9021	5	10.58716	0.0058
Forma de la escama-estaminodios 1					
Proc. Browniano	15.3073		2	-5.15365	
OU 1 óptimo	1.053475		3	3.564172	
OU 3 óptimos	-4.622849	5.6763	5	10.64476	0.0146
Forma de la escama-estaminodios 2					
Proc. Browniano	-7.310046		2	6.155023	
OU 1 óptimo	-17.14024	9.8302	3	12.66103	0.0233
OU 3 óptimos	-14.01836		5	15.34252	
Forma de la escama-estaminodios 3					
Proc. Browniano	-15.69866		2	10.34933	
OU 1 óptimo	-30.48949	14.791	3	19.33566	0.003
OU 3 óptimos	-23.53552		5	20.1011	
Tamaño de la corola					
Proc. Browniano	49.83782		2	-22.4189	
OU 1 óptimo	41.10912	17.307	3	-16.4637	
OU 3 óptimos	23.8023		5	-3.56782	0.0001
Tamaño de la escama-estaminodio					
Proc. Browniano	27.22894		2	-11.1145	
OU 1 óptimo	12.53986	12.525	3	-2.17902	
OU 3 óptimos	0.015261		5	8.325703	0.0008

Tabla 1. Los valores AICc, el Δ AICc, los grados de libertad, el logaritmo de la verosimilitud y el p-valor del test del cociente de verosimilitud entre el modelo seleccionado y el modelo inmediato más sencillo se indican para cada comparación de modelos. El modelo seleccionado para cada rasgo está en negrita.

Forma de la corola	Forma esc-estam. 1	Forma esc-estam. 2	Forma esc-estam. 3	Tamaño corola	Tamaño escama-estaminodios
0.11 (0.02 - 0.40)	0.38 (0.04 - 3.11)	0.42 (0.06 - 20.38)	8.18 (3.85 - 15.44)	9.24 (0.7 - 32.83)	2.138675 (0.15 - 21.22)
2.22 (0.54 - 20.11)	11.99 (1.60 - 147.38)	18.53 (2.88 - 917.21)	920.34 (880.30 - 1233.42)	48.74 (4.96 - 192.83)	55.17481 (4.8 - 1146.18)
-0.23 (-0.35 - -0.11)	0.10 (0.02 - 0.18)	-0.01 (-0.07 - 0.05)	0.00 (-0.03 - 0.04)	1.65 (1.46 - 1.84)	0.69 (0.60 - 0.8)
1.99 (0.24 - 8.11)	-0.35 (-2.05 - -0.10)			3.14 (2.8 - 4.9)	1.3 (1.15 - 2.01)
0.11 (-2.96 - 1.73)	0.73 (0.15 - 4.62)			4.1 (3.47 - 8.35)	0.63 (0 - 0.91)

Tabla 2. Valores de los parámetros σ^2 , α y θ de los modelos 'ouch' seleccionados para cada rasgo e intervalos de confianza obtenidos mediante bootstrap para dichos parámetros. θ_h , θ_c y θ_r son los valores óptimos para la polinización mediada por himenópteros, colibríes y por roedores respectivamente.

La rama del árbol filogenético con una mayor probabilidad posterior de presentar un cambio en la tasa de diversificación es la que da origen a *Caiophora* (fig. 4A-D) en el caso de las variables de forma, y la que da origen a *Caiophora* y su especie más basal, *Loasa bergii* (fig. 4E-F) en el caso del tamaño. Las diferencias entre las tasas de diversificación antes y después del punto de inflexión no son significativas (Tabla 3).

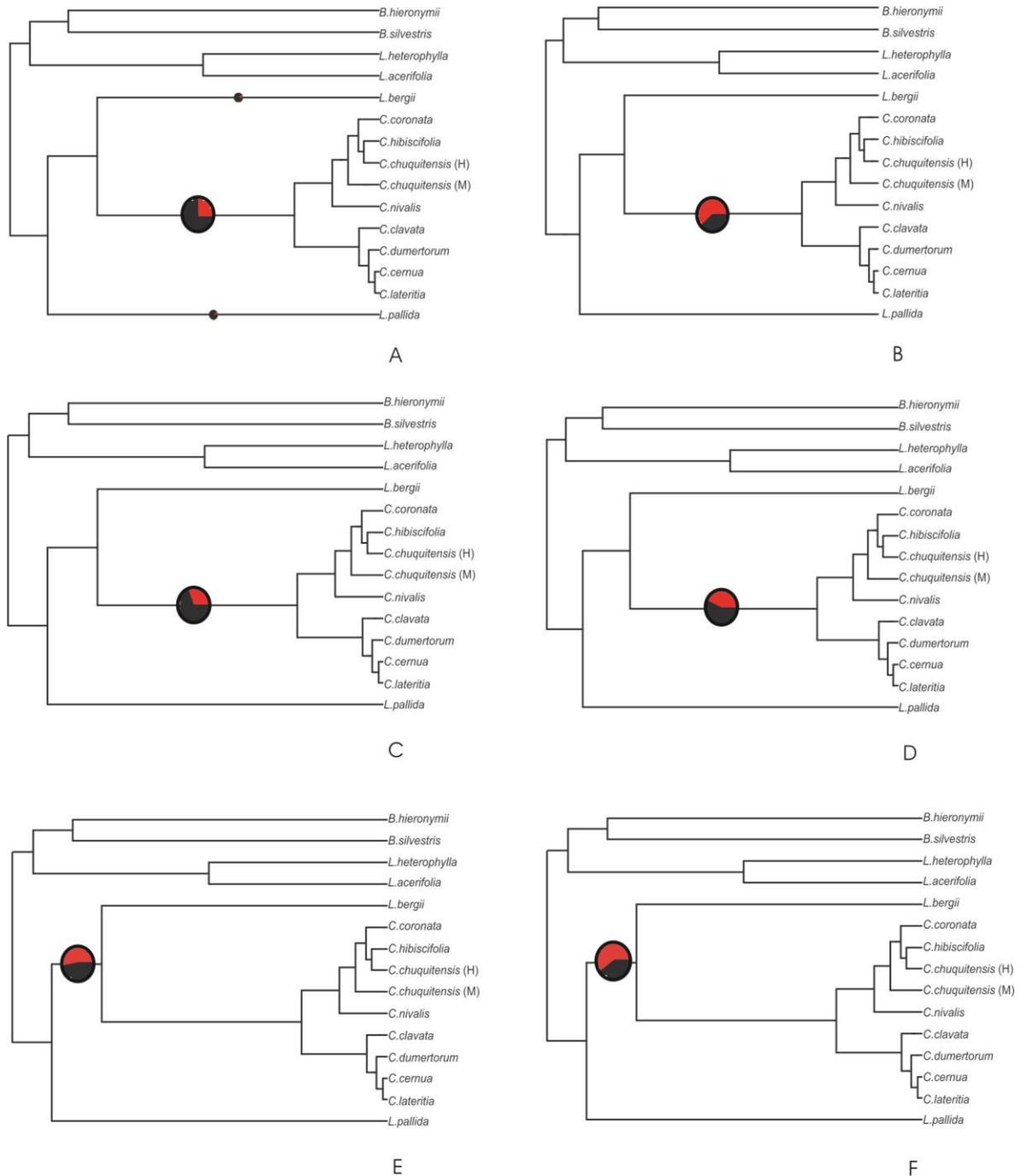


Fig. 4. La filogenia podada de Loasoideae se repite seis veces mostrando la salida de los análisis para detectar cambios en la tasa de diversificación en cada rasgo analizado: *A*, forma de la corola; *B*, forma de la escama-estaminodios 1; *C*, forma de la escama-estaminodios 2; *D*, forma de la escama-estaminodios 3; *E*, tamaño de la corola; *F*, tamaño del complejo escama-estaminodios. El gráfico de torta sobre las ramas indica con gris la probabilidad posterior de un cambio en la tasa de diversificación sobre esa rama. Este gráfico de torta solamente se dibujó para probabilidades posteriores superiores a 0.2.

Rasgo	σ^2_1	σ^2_2	$\Delta\sigma^2$ cuantiles
Forma de la corola	11.7425	12.1732	(-30.32 - 29.75)
Forma es-estam 1	16.1398	16.4931	(-46.24 - 44.11)
Forma es-estam 2	4.869	4.4239	(-11.22 - 15.59)
Forma es-estam 3	2.3395	2.3995	(-5.83 - 6.12)
Tamaño de la corola	207.2518	171.0313	(-314.9 - 667.14)
Tamaño es-estam	40.59979	46.15865	(-90.9 - 90.67)

Tabla 3 Valores medios de σ^2_1 y σ^2_2 estimados para cada RWp y para el tamaño centroide de las dos estructuras analizadas. Se muestran los intervalos de confianza de $\Delta\sigma^2$ que comprenden a los cuantiles 2.5% y 97.5%.

Discusión

El objetivo de este capítulo fue determinar si el género *Caiophora* (Loasoideae, Loasaceae) constituye una radiación adaptativa. Esto requirió verificar que la forma de las estructuras florales que participan en el mecanismo de polinización respondió a la selección mediada por polinizadores y que los rasgos florales se encuentran más diversificados en *Caiophora* que en sus géneros basales. Con este fin se definieron variables morfogeométricas que describieran la forma y el tamaño de estructuras florales que participan en el mecanismo de polinización en Loasoideae y se modeló la evolución de dichas variables usando dos tipos de modelo evolutivo. El primero permite determinar si el rasgo en cuestión responde a un conjunto hipotetizado de regímenes selectivos; el segundo permite localizar la posición sobre la filogenia en la que ocurrió el cambio en la tasa de diversificación de un rasgo y establecer si la tasa de diversificación difiere antes y después de dicha posición. Es importante destacar que este es uno de los primeros estudios donde se utiliza la morfometría geométrica para estudiar la diversificación floral en un contexto macroevolutivo.

La mayor parte de los resultados de este estudio dan sustento a la hipótesis según la cual *Caiophora* constituiría una radiación adaptativa. De acuerdo a las comparaciones realizadas entre los modelos, tanto el grado de apertura y el tamaño de la corola, como el tamaño del complejo escama estaminodios y el grado en que los estaminodios sobresalen por encima de la escama nectarífera ('forma de la escama-estaminodios 1') evolucionan hacia óptimos adaptativos diferentes en respuesta a la selección mediada por los polinizadores. Se espera que un régimen selectivo como éste (hacia diferentes óptimos adaptativos) aumente la varianza del rasgo en cuestión, y esto es justamente lo que se refleja en el elevado porcentaje de variación de la forma que las dos variables de forma

(‘forma de la corola’ y ‘forma del complejo escama-estaminodios 1’ presentan en los análisis de deformaciones relativas. Las formas y tamaños óptimos de la corola y del complejo escama-estaminodios hacia las cuales evolucionan las especies polinizadas por himenópteros, colibríes y la especie polinizada por roedores están de acuerdo con la función de dichas estructuras en distintos contextos de polinización (Cocucci y Sérsic, 1998; Ackermann y Weigend, 2006; Weigend, Ackermann y Henning, 2010; Ackermann y Weigend, comunicaciones personales). Es interesante destacar que a pesar de que la morfología óptima de corola para la polinización mediada por colibríes (una corola completamente cerrada) se encuentra por fuera del rango de variación de la morfología de la corola de las especies de *Caiophora* con esta estrategia de polinización (fig. 3B), algunas especies polinizadas por colibríes del género *Nasa* (Loasoideae, Loasaceae) presentan corolas marcadamente cerradas, por ejemplo *Nasa auca* y *Nasa loxensis*.

El segundo y el tercer RWp que describen la forma del complejo escama-estaminodios (‘forma de la escama-estaminodios 2’ y ‘forma de la escama-estaminodios 3’) evolucionan hacia un óptimo adaptativo único; dicho de otra manera, se encuentran bajo selección estabilizadora. De tal régimen selectivo se espera una disminución en la varianza del rasgo. El reducido porcentaje de variación de la forma del complejo escama-estaminodios representado por las variables ‘forma de la escama-estaminodios 2’ y ‘forma de la escama-estaminodios 3’ obtenido en el análisis de deformaciones relativas está en correspondencia con esta expectativa. La selección estabilizadora sobre ‘forma de la escama-estaminodios 2’ y ‘forma de la escama-estaminodios 3’ sugiere que la variación en estos rasgos sería de bajo valor adaptativo y que por ende debería ser eliminada. Los estaminodios y las escamas nectaríferas derivan de la modificación de cinco estambres (Hufford, 2002). Es posible que esta condición provoque que el desarrollo de estas estructuras esté hasta un cierto punto descoordinado, dando lugar a variantes morfológicas aberrantes que deben ser seleccionadas en contra para que el complejo escama-estaminodios funcione de manera adecuada. Dicho requerimiento de estabilidad regiría para todas las especies, independientemente del ambiente de polinizadores.

La mayor probabilidad posterior de cambio en la tasa de diversificación corresponde al nodo que da origen a *Caiophora*. La falta de diferencias significativas entre las tasas de diversificación de los rasgos antes y después del momento en que la tasa debería cambiar podrían deberse a la falta de poder estadístico, si se tiene en cuenta que en

este estudio se utilizaron solamente 15 taxones terminales y que la propuesta de Revell et al., (2011) funcionaría óptimamente con un número mayor de taxones. Sin embargo, restaría explicar por qué la tasa de diversificación disminuye en *Caiophora*, en vez de incrementar según lo esperado, en dos de los rasgos analizados una vez ocurrido el cambio de tasa.

Conclusión

Los resultados de este capítulo sugieren que la evolución de la morfología floral en Loasoideae ocurre en respuesta a la selección mediada por polinizadores e insinúan que la diversificación es mayor en *Caiophora* que en sus géneros basales. Ambos aspectos sustentan la hipótesis de que el género *Caiophora* sería el resultado de una radiación adaptativa. Más allá de las implicancias biológicas de este estudio, se mostró la utilidad de la morfometría geométrica para la obtención de variables que describan aspectos de la morfología floral, las cuales pueden a su vez estar sujetas a selección mediada por polinizadores. Se espera que este estudio estimule el uso de la morfometría geométrica en trabajos dedicados a modelar la evolución y diversificación de la morfología floral en contextos macroevolutivos.

CAPÍTULO III

CAMINOS HACIA LA FORMA ÓPTIMA DE LA FLOR DE *CAIOPHORA* (LOASOIDEAE, LOASACEAE)

Introducción

El principio del polinizador más eficiente propone que en las plantas con flores deben evolucionar especializaciones para ser polinizadas por los agentes más frecuentes y efectivos presentes en un ambiente determinado (Stebbins, 1970). Este proceso evolutivo predice que los rasgos florales presentarán configuraciones que aseguren la exportación y recepción adecuada del polen, constituyendo síndromes de polinización (Fenster et al., 2004, Rosas-Guerrero et al., 2014). El conjunto de rasgos de un síndrome de polinización representa el óptimo de una estrategia de polinización determinada, la cual en su forma más pura involucraría un tipo único de polinizador. Sin embargo, la mayoría de las plantas con flores son polinizadas por más de un agente (Waser et al., 1996) y estos agentes de polinización a veces difieren en su efectividad respecto al ajuste con las estructuras reproductivas de la flor requerido para la exportación y la recepción del polen (Armbruster et al., 2009).

Si la configuración de rasgos florales que beneficia la exportación y la recepción del polen mediante un determinado tipo de polinizador está en conflicto con los requerimientos para una transferencia efectiva del polen mediante otros tipos de polinizadores, se espera la ocurrencia de compensaciones (*trade-offs*) entre las configuraciones de rasgos florales que benefician el transporte de polen mediante cada tipo de polinizador. Una compensación (*trade-off*) de este tipo puede tener lugar cuando el fenotipo que maximiza la contribución a la adecuación de un tipo de polinizador (por ejemplo abejas de lengua larga) afecta de manera negativa a la contribución hecha por otro tipo de polinizador (por ejemplo abejas de lengua corta). Esto puede ocurrir cuando las estructuras fértiles (estambres y estilos) tienen que adaptar la posición que ocupan sobre la flor y su longitud a la recepción y a la deposición del polen sobre el cuerpo de polinizadores que varían en su tamaño y en su comportamiento (Armbruster et al., 2009). Estas compensaciones (*trade-offs*) también pueden afectar a rasgos que regulan el ángulo

en el cual el polinizador accede a la flor y se aproxima a las estructuras fértiles (Muchhala, 2007).

Se ha propuesto que los *trade-off* de adecuación constituyen uno de los mecanismos que pueden promover la optimización de los rasgos florales (Thomson y Wilson, 2008). También se ha propuesto que la evolución de flores generalistas (donde más de un polinizador contribuye a la adecuación de la planta) es prevenida en contextos compensatorios si los aspectos fenotípicos que aumentan la eficiencia de la polinización mediante un determinado agente disminuyen simultáneamente y de manera marcada la eficiencia de un segundo polinizador (Waser et al., 1996). Estos *trade-offs* intensos pueden tener lugar cuando los requerimientos para el transporte eficiente de polen involucran a grupos funcionales de polinizadores marcadamente distintos, por ejemplo a colibríes y murciélagos (Muchhala, 2007). Sin embargo este escenario de compensación dicotómico constituido por dos (o más) formas funcionales opuestas de polinizadores puede, al menos hipotéticamente y bajo condiciones particulares, promover la evolución de la generalización (Aigner, 2001). La dependencia de dos o más formas funcionales de polinizadores puede evolucionar siempre y cuando la adecuación global de la polinización sea maximizada de manera sinérgica por distintos grupos de polinizadores.

A pesar de la aparente relevancia de las compensaciones de adecuación de la polinización como mecanismo ligado a la optimización de los rasgos florales, ya sea hacia la especialización o hacia la generalización, se sabe muy poco acerca de si la optimización de los rasgos florales realmente se encuentra guiada por *trade-offs* en los sistemas planta-polinizador. Tampoco se conoce si la generalización funcional puede evolucionar en contextos compensatorios en tales sistemas. Dos excepciones de trabajos que abordan esta temática son las investigaciones de Aigner (2004) y de Muchhala (2007).

La transición desde la polinización mediada por himenópteros hacia la polinización mediada por colibríes es la más frecuentemente reportada (Rosas-Guerrero et al., 2014). Se espera que en dicho contexto las flores varíen en su función como resultado de la optimización para adaptar el transporte de polen a las diferencias entre el comportamiento y el tamaño de los himenópteros y de los colibríes (Thomson y Wilson, 2008). Un ejemplo de una transición desde la polinización mediada por himenópteros hacia la mediada por colibríes se encuentra en el género sub andino *Caiophora*, el cual presenta especies

polinizadas por himenópteros de lengua larga y de lengua corta, por colibríes y por roedores (Ackermann y Weigend, 2006). Brown y Kaul (1981) sugieren que la polinización cruzada es importante para la reproducción en *Caiophora*. Además, los distintos efectos de la selección ejercida por los himenópteros y por los colibríes hacen de este un sistema adecuado para explorar los caminos de optimización del fenotipo floral en este género.

En este capítulo se investigan los caminos hacia el fenotipo floral óptimo en tres especies del género *Caiophora*. Para ello se utilizó una herramienta de búsqueda de patrones, propuesta recientemente por Shoval et al., (2012a), la cual se basa en el concepto de eficiencia (u optimalidad) de Pareto. Este método provee una aproximación directa a la detección de patrones de *trade-off*. El objetivo de este capítulo es examinar si la especialización y la generalización funcional de la morfología floral de *Caiophora* evolucionaron en un contexto de *trade-off* entre la polinización mediada por himenópteros y la mediada por colibríes.

Sistema de estudio

El presente estudio se focaliza en tres especies sub andinas del género *Caiophora* (Loasoideae, Loasaceae). Estas son: *Caiophora nivalis* (fig. 1A), polinizada exclusivamente por avispas del género *Hypodynerus* (Eumenidae) (Anna Wertlen, no publicado; este estudio); *Caiophora hibiscifolia* (fig. 1B), polinizada por colibríes (Ackermann y Weigend, 2006; este estudio); y *Caiophora lateritia* (fig. 1C), polinizada por colibríes (Ackermann y Weigend, 2006; este estudio), abejas de lengua larga de los géneros *Xylocopa* y *Bombus* y abejas de lengua corta de la familia Halictidae (este estudio). Los himenópteros aparentan ser por lejos los visitantes más frecuentes en la población estudiada de *Caiophora lateritia*. De acuerdo a los datos recopilados en el campo, la frecuencia de visita por parte de himenópteros a las flores de *Caiophora lateritia* fue 22 veces superior a la frecuencia de visita por parte de colibríes. Una descripción más detallada acerca de las principales características de la subfamilia Loasoideae (Loasaceae) puede ser consultada en la introducción general de esta tesis.

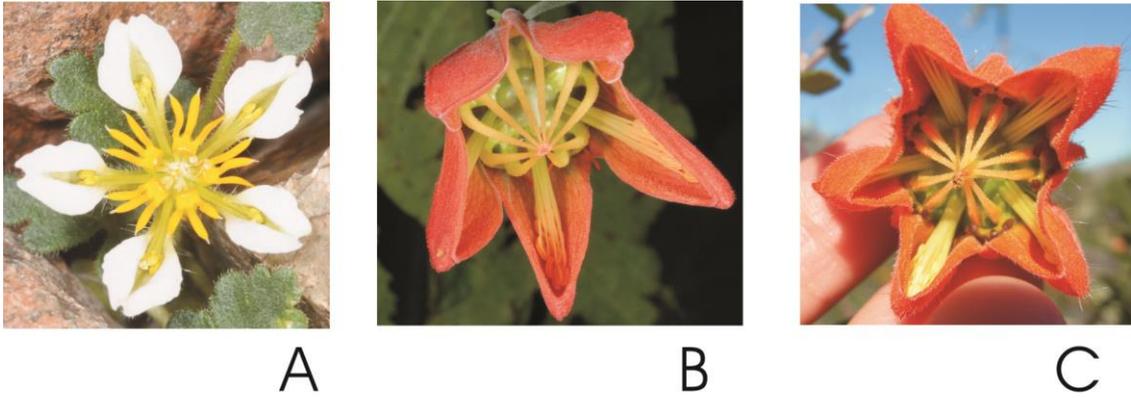


Fig 1. Flores de *Caiophora nivalis* (A), *Caiophora hibiscifolia* (B) y *Caiophora lateritia* (C).

Cuatro aspectos de la morfología floral en *Caiophora* podrían estar en conflicto dada la optimización para la polinización mediada por himenópteros y para la polinización mediada por colibríes. A continuación se detalla cómo la función de cada rasgo o conjunto de rasgos florales puede ser interpretada en el contexto de un *trade-off* entre la polinización mediada por himenópteros y la polinización mediada por colibríes.

Largo de los estambres: Mientras que los himenópteros se desplazan sobre la flor cuando la visitan, los colibríes revolotean en torno a ella pero nunca se asientan durante la visita (figs. 2A, 2B). Dada esta situación, los estambres con filamentos largos resultan más beneficiosos para depositar el polen sobre la cabeza del colibrí, donde se adhiere mejor que sobre el pico (Thomson y Wilson, 2008) (compare las figs. 2A y 2D); por otro lado, los filamentos cortos permiten depositar el polen sobre el abdomen de los himenópteros (compare las figs. 2B y 2C).

Forma de la corola: Las corolas abiertas proveen una plataforma de aterrizaje apropiada para los himenópteros (fig. 2B), los cuales necesitan posarse sobre las flores durante el forrajeo (Dafni, 1994). Por otro lado, las corolas angostas ayudan a posicionar la cabeza del colibrí con respecto a las estructuras fértiles de la flor durante el proceso de polinización (Thomson y Wilson, 2008) (compare las figs. 2A y 2D). Una corola angosta puede a la vez disuadir a los himenópteros de visitar a las flores, ya que dificultan a estos insectos posarse sobre las flores (compare las figs. 2B y 2C). Además de este *trade-off* que afecta al ajuste flor-polinizador, también puede considerarse la posibilidad de un *trade-off* modulado por las diferencias entre las capacidades cognitivas de los himenópteros y los colibríes. Se ha propuesto que los himenópteros y los colibríes utilizan diferentes rasgos

florales como señal: mientras que los rasgos frontales resultan más visibles para los himenópteros, los colibríes perciben en mayor medida los rasgos laterales de las flores (Dafni, 1994; Benitez-Vieyra et al., 2014). En Loasoideae, las especies con corolas estrechas tienen una mayor área del pétalo expuesta en vista lateral, mientras que los pétalos de las corolas abiertas son más visibles en vista frontal.

Forma del complejo escama nectarífera-estaminodios: En las especies polinizadas por colibríes, la estructura compuesta por la escama nectarífera y los estaminodios colabora con la corola a orientar la cabeza del colibrí con respecto a las estructuras fértiles de la flor (fig. 2A). El que los estaminodios sobresalgan en gran medida por encima de la escama es crítico para desempeñar esta función, ya que los estaminodios fuerzan al colibrí a introducir el pico a través de la pequeña apertura entre medio de éstos para acceder al néctar (compare las fig. 2A y 2D). Sin embargo, estos estaminodios largos bloquearían hasta un cierto punto el acceso al néctar a los himenópteros, (fig. 2C) razón por la cual la polinización mediada por himenópteros se beneficiaría de estaminodios reducidos (fig. 2B) (Markus Ackermann y Maximilian Weigend, comunicación personal).

Tamaño de la corola: Se ha observado que el largo del pétalo en *Caiophora* se correlaciona positivamente con la cantidad de azúcar en el néctar (Ackermann, 2012). Esta correlación también ha sido reportada entre características del néctar y rasgos florales de varias familias de angiospermas (Ornelas et al., 2007). Se ha propuesto que la preferencia de los colibríes por flores de mayor tamaño es una consecuencia indirecta de que estos animales seleccionan néctares más energéticos (Fenster et al., 2006; Ornelas et al., 2007). Por otro lado, se ha propuesto que la selección puede favorecer indirectamente la evolución de flores más pequeñas en especies polinizadas por himenópteros: las flores con néctares menos energéticos y por ende más pequeñas, “filtran” a los polinizadores de gran tamaño (entre ellos los colibríes) ya que no satisfacen sus demandas energéticas (Ollerton et al., 2007), promoviendo su especialización en polinizadores pequeños.

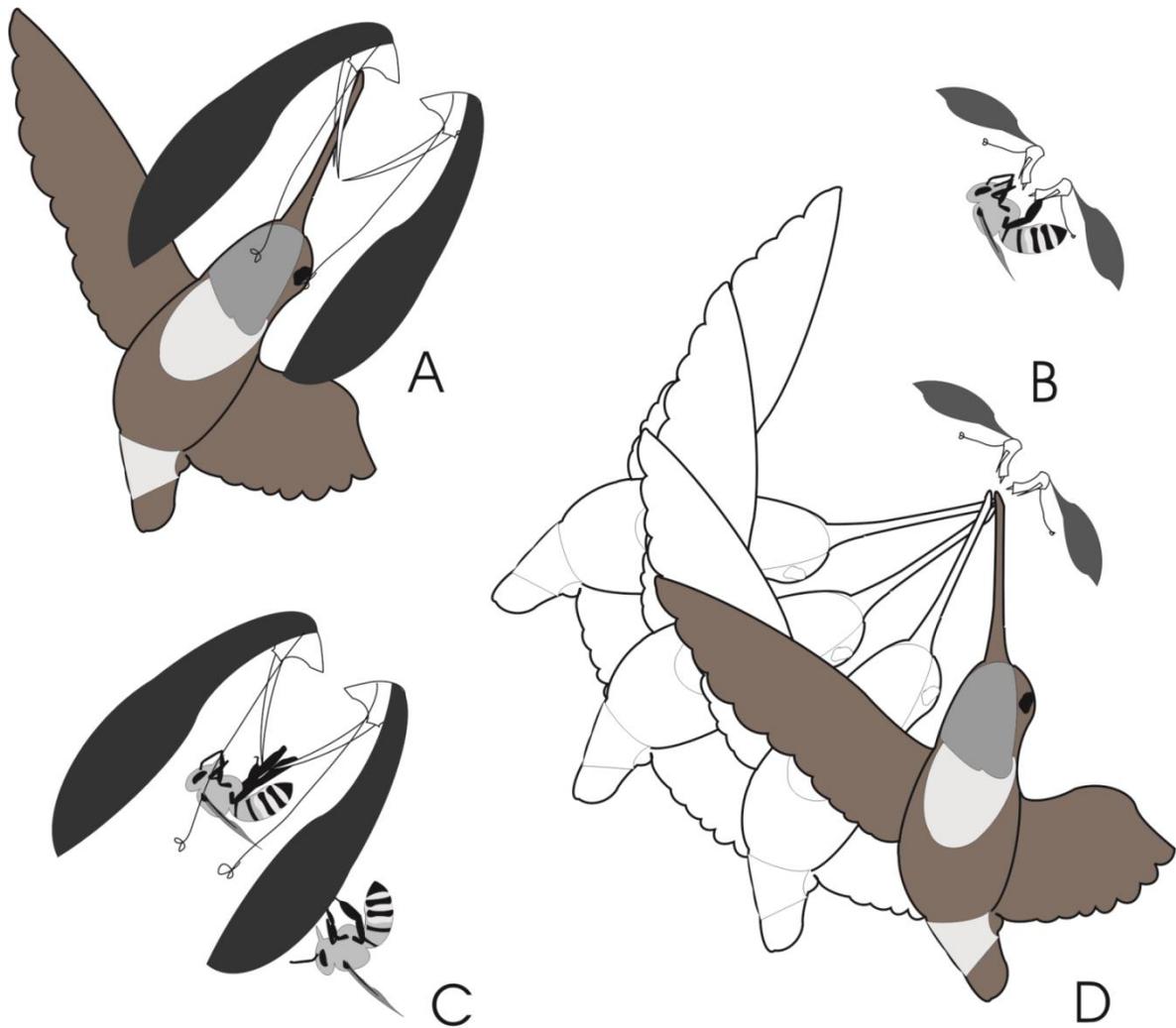


Fig.2. Las diferencias entre la polinización mediada por himenópteros y la polinización mediada por colibríes se representan esquemáticamente para las dos morfologías florales correspondientes a estas estrategias de polinización en *Caiophora*. *A, C*, morfología de una flor polinizada por colibríes. *B, D*, morfología de una flor polinizada por himenópteros.

Materiales y métodos

Obtención de variables morfométricas

Los detalles del muestreo de las especies utilizadas en este capítulo, así como también el procesado de imágenes llevado a cabo para la obtención de variables morfométricas pueden consultarse en la metodología general de esta tesis.

A partir de las coordenadas de los hitos colocados sobre las imágenes de las tres especies seleccionadas, correspondientes a la corola y al complejo escama-estaminodios

(ver metodología general) se realizaron dos análisis separados de deformaciones relativas (*relative warp analyses*) con tpsRelw (Rohlf, 2009). A partir del primero se obtuvieron las deformaciones relativas (*relative warps*, RWps) que describen la forma de la corola; a partir del segundo se obtuvieron las RWps que describen la forma del complejo escama-estaminodios. De cada uno de estos análisis se seleccionó el primer eje de deformación relativa (RWp). Por otra parte se obtuvo el tamaño centroide de la corola, el cual es una medida del tamaño independiente de la forma (Zelditch, 2012). Finalmente, la longitud del estambre fue medida con el programa ImageJ (Abramoff, Magalhaes y Ram, 2004). De aquí en adelante se referirá al primer RWp obtenido para la corola como FC y al primer RWp obtenido para el complejo escama-estaminodios como FEE. Al tamaño centroide obtenido para la corola se referirá como TC y a la longitud del estambre como LE.

El concepto de eficiencia de Pareto

El concepto de eficiencia de Pareto se utiliza en la ingeniería y en la economía para encontrar el conjunto de diseños que mejor compensan dos o más requerimientos diferentes. Este concepto también sugirió el uso de un método apropiado para explorar la incidencia de *trade-offs* en la optimización de rasgos en biología evolutiva. Shoal et al., (2012a) demostraron que las correlaciones lineales entre rasgos pueden ser consecuencia de *trade-offs* de adecuación. Esto fue sorprendente, ya que dichas correlaciones se consideraban tradicionalmente como el producto de procesos intrínsecos tales como las restricciones genéticas o del desarrollo (referencias en Shoal et al., 2012a). El concepto de eficiencia de Pareto tiene dos supuestos importantes. En primer lugar asume la existencia de fenotipos óptimos, denominados arquetipos por Shoal et al., (2012a), representados por combinaciones de rasgos que maximizan la adecuación para una tarea particular. En el caso del presente estudio, las tareas corresponderían a la polinización mediada por himenópteros y a la mediada por colibríes (fig. 3A). En segundo lugar, se asume que la adecuación para una determinada tarea, por ejemplo la adecuación para la polinización mediada por colibríes, disminuye a medida que aumenta la distancia respecto al fenotipo óptimo para esa tarea (en este caso, el fenotipo óptimo para la polinización mediada por colibríes). Los fenotipos con la adecuación global más baja son seleccionados en contra (fig. 3A), mientras que los fenotipos que prevalecen son aquellos que maximizan la contribución de ambas tareas (o estrategias adaptativas) a la adecuación global. Estos fenotipos constituyen la frontera de Pareto. Si esto mismo se considera en un espacio

morfológico y no en un espacio de adecuación (fig. 3B), se puede observar que los fenotipos sujetos a un *trade-off* se acomodan a lo largo de un segmento que conecta a las configuraciones de rasgos óptimas para las dos tareas en juego. La posición sobre tal segmento dependería a su vez de la importancia de cada una de las estrategias adaptativas en un ambiente determinado. Nótese que los fenotipos que no aparecen a lo largo de dicho segmento están a una distancia mayor de los dos óptimos adaptativos que aquellos fenotipos que sí se ubican sobre el segmento, teniendo por ende una adecuación global menor. De no estar sujetas a un *trade-off*, las configuraciones de rasgos podrían variar independientemente, conformando una nube no correlacionada en el morfoespacio (Shoval et al., 2012a).

Del concepto de eficiencia de Pareto se desprende una predicción acerca de cómo los fenotipos optimizados, tanto los especialistas como aquellos sujetos a la negociación de más de una tarea (generalistas), se acomodan en el morfoespacio en una situación de *trade-off*. Es por ello que este concepto ofrece un marco teórico para explorar si el acomodamiento de los rasgos florales de *Caiophora* en el morfoespacio evidencia un *trade-off* entre la polinización mediada por himenópteros y la mediada por colibríes.

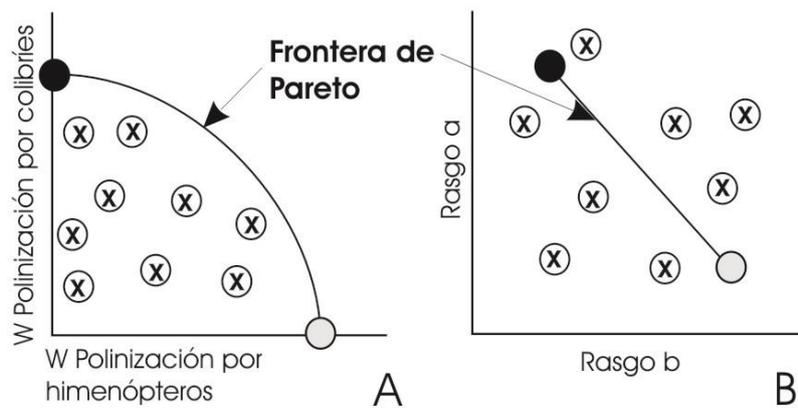


Fig.3. La frontera de Pareto se representa en un espacio de adecuación (A) y en un espacio fenotípico (B). W representa la contribución de los polinizadores al éxito reproductivo de la planta. Los círculos negros y grises representan fenotipos óptimos para una tarea única: polinización mediada por colibríes o polinización mediada por himenópteros. Los círculos tachados representan fenotipos que son seleccionados en contra debido a su baja adecuación. La frontera de Pareto puede ser concebida como la curva (A) o como la recta (B) que contiene a los especímenes que persisten después de la eliminación de los fenotipos con menor adecuación global. Estas imágenes se basan en la fig. 1 de Shoval et al., (2012a).

Detectar y validar la frontera de Pareto

Para determinar si los rasgos florales se acomodan a lo largo de un sólo eje del espacio morfológico, se siguió la metodología propuesta en Shoval et al., (2012b). En primer lugar se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el fin de comprobar si la varianza explicada por el primer componente principal (PC₁) es de gran magnitud (lo que se reflejaría en un primer valor propio notablemente mayor que los restantes). Esto sería indicativo de las variables analizadas se encuentran altamente correlacionadas. Para someter a prueba la significación de PC₁, se calculó el cociente entre el primer y el segundo valor propio del PCA, (λ_1/λ_2), y se comparó este cociente con un modelo nulo, donde dicho cociente se obtuvo a partir de un set de datos simulados no correlacionados. En total se generaron 1000 sets de datos aleatorizados. λ_1/λ_2 fue computado tras cada aleatorización con el fin generar la distribución nula de dicho parámetro. El valor de λ_1/λ_2 obtenido a partir del set de datos original fue comparado con esta distribución nula para obtener un valor-p. Un valor de λ_1/λ_2 con una probabilidad $p < 0.05$ de ser mayor que lo esperado según el modelo nulo fue considerado como significativo. Una vez determinada la significación de PC₁, se procedió a evaluar si los individuos de la especie polinizada por himenópteros y los individuos de la especie polinizada por colibríes se acomodan próximos a los extremos de la nube de datos a lo largo del PC₁. Los análisis fueron implementados en R (R Development Core Team, 2013).

Resultados

El primer RWp del análisis realizado a partir de la corola (FC) captura el 82.83% de la variación total en la forma de esta estructura. Los valores bajos de este RWp se corresponden con corolas angostas, mientras que los valores altos se corresponden con corolas completamente abiertas (fig. 4A). Para el complejo escama-estaminodios el primer RWp (FEE) captura el 71.33% de la variación total en la forma de esta estructura y representa principalmente variación en el grado en que el estaminodio sobresale por encima de la escama nectarífera (fig. 4B).

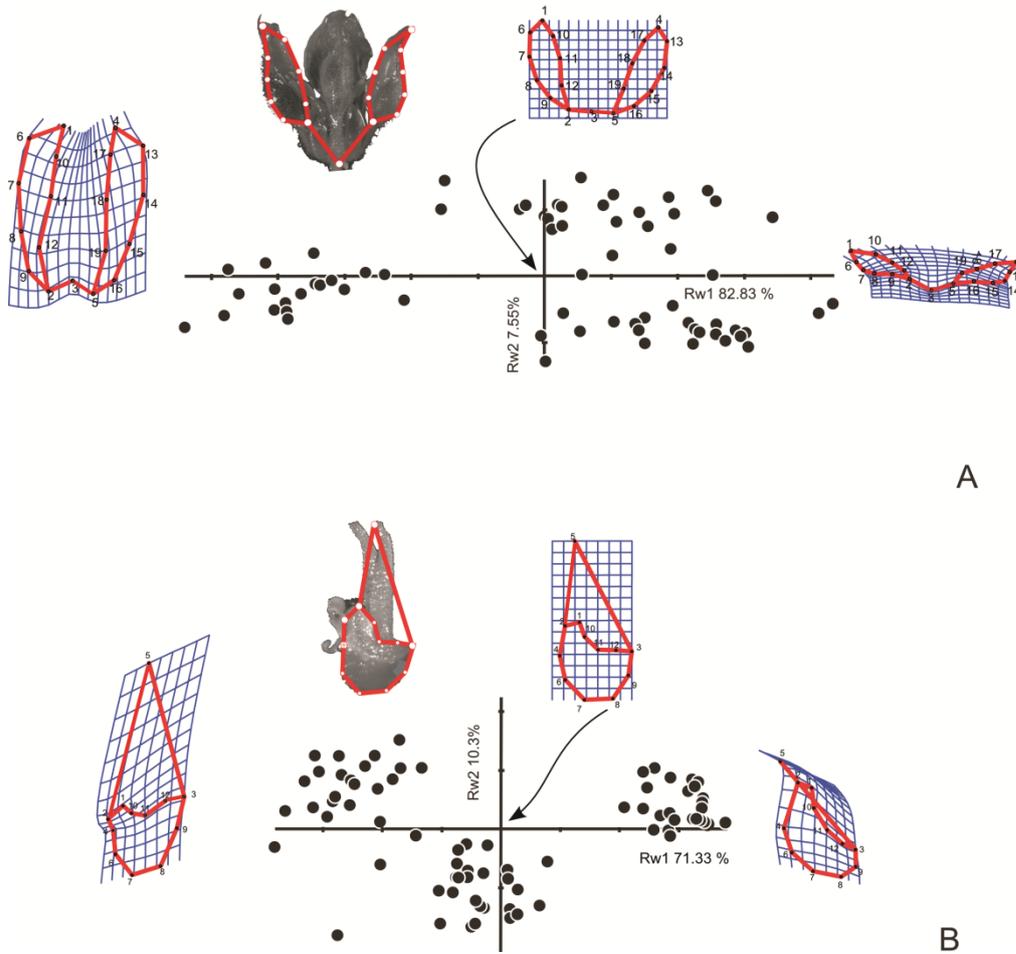


Fig. 4. Las salidas de los análisis de deformaciones relativas del Capítulo III correspondientes a la corola y a la estructura compuesta por la escama nectarífera y los estaminodios se muestran en las figuras A y B respectivamente. Se agregaron fotografías señalando la ubicación de *landmarks* matemáticos, (círculos blancos grandes), *landmarks* anatómicos (círculos grandes tachados), y *semi-landmarks* (círculos blancos pequeños) sobre la corola (A) y sobre la estructura compuesta por la escama nectarífera y los estaminodios (B). El porcentaje de la variación explicada por cada *relative warp* se muestra junto a la variación de la forma a lo largo cada eje para cada estructura. En el centro del sistema de coordenadas de cada gráfico se presenta la forma consenso.

Los rasgos florales de las tres especies analizadas reflejan el patrón predicho por el concepto de eficiencia de Pareto para una situación de *compensación* (fig. 5). El PC₁ explica el 76 % de la covariación de los rasgos florales analizados y es significativo ($P < 0.00001$). Los PC₂, PC₃ y PC₄ explican el 16%, el 5% y el 3% de la variación de los rasgos florales, respectivamente. La correlación de las variables originales con PC₁ es la siguiente: LE, $r = 0.95$; FEE, $r = -0.98$; FC, $r = -0.87$; TC, $r = 0.72$. De acuerdo a estos resultados los valores altos de PC₁ se corresponden con corolas angostas y grandes, con estaminodios que sobresalen marcadamente por encima de las escamas nectaríferas y con estambres largos. Los valores bajos de PC₁ se corresponden con corolas completamente

abiertas y pequeñas, con estaminodios que sobresalen poco de la escama nectarífera y con estambres cortos. Excepto para el TC, la correlación de las variables originales con el PC₂ fue baja: LE, $r=-0.12$; FEE, $r=0.03$; FC, $r=0.40$; TC, $r= 0.68$. Los individuos de la especie polinizada por himenópteros presentan los valores más bajos de PC₁, mientras que los individuos polinizados por colibríes presentan los valores más altos de PC₁. Los individuos de la especie con polinización mixta ocupan posiciones intermedias sobre el PC₁.

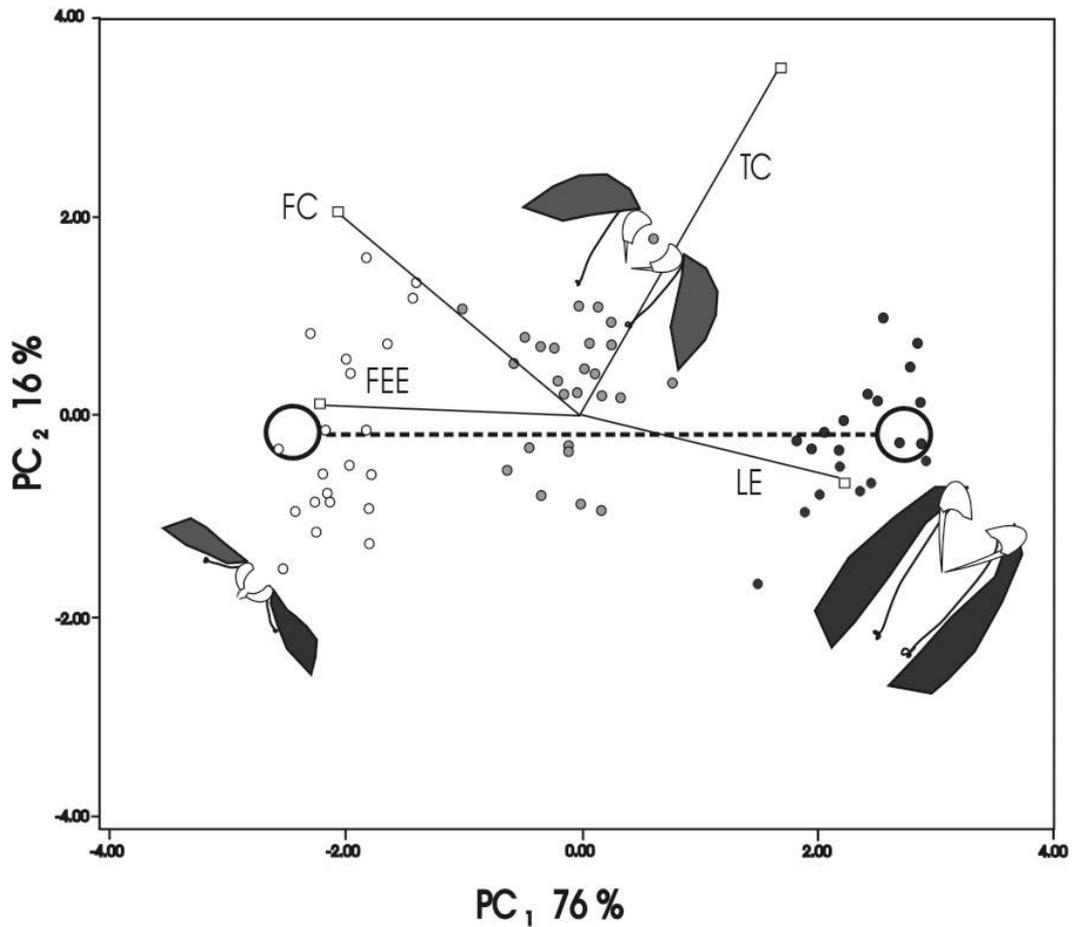


Fig. 5. Salida del PCA realizado para establecer la presencia de una frontera de Pareto en la morfología floral de *Caiophora*. Los individuos de *Caiophora nivalis* se representan con círculos blancos, los de *Caiophora hibiscifolia* con círculos negros y los de *Caiophora lateritia* con círculos grises. El segmento con guiones muestra la posición de la frontera de Pareto. Los círculos vacíos indican la posición de los fenotipos óptimos para la polinización mediada por himenópteros (izquierda) y por colibríes (derecha). Se agregó un esquema representando las configuraciones de rasgos óptimas de las flores especialistas y de la generalista. La orientación de las variables originales fue agregada al gráfico.

Discusión

La optimización de los rasgos florales se sitúa tradicionalmente en el contexto de la especialización funcional, de lo cual se desprende un escenario dicotómico (por ejemplo polinización mediada por abejas vs. polinización mediada por colibríes) en el cual los síndromes de polinización se corresponden con estrategias de polinización “puras”. De este estudio se desprende que la optimización de la morfología floral en *Caiophora* podría estar ocurriendo en un contexto de *compensación* entre la adaptación a la polinización mediada por himenópteros y la adaptación a la polinización mediada por colibríes y que la optimización de una morfología floral generalista podría ocurrir en un contexto de este tipo.

La posibilidad de que la morfología floral generalista haya evolucionado en *Caiophora lateritia* puede deberse a dos factores no necesariamente mutuamente excluyentes. El primer factor puede ser descrito a través de una “hipótesis de compensación”, según la cual una mayor frecuencia de visita por parte de himenópteros estaría compensando la menor efectividad de estos polinizadores si se los compara con los colibríes. Thomson y Wilson, (2008) proponen que la polinización mediada por colibríes es más efectiva que la polinización mediada por himenópteros porque el polen no representa un recurso para los colibríes, mientras que los himenópteros buscan el polen como recompensa, indistintamente de si la flor produce o no néctar como recompensa. Sin embargo, si los himenópteros visitan las flores con más frecuencia que los colibríes en un determinado ambiente, la evolución de rasgos florales que también aseguren el transporte de polen mediante himenópteros sería una ventaja (más allá de que una fracción del polen sea desperdiciado al depender de este tipo de polinizador). El segundo factor que podría estar vinculado a la evolución de una morfología floral generalista en *Caiophora lateritia* podría describirse a través de una “hipótesis del desarrollo”. Utilizando flores artificiales en un experimento controlado, Muchhala (2007) observó que la morfología de la corola de *Burmeistera* se encuentra afectada por fuerte *compensación* entre la polinización mediada por colibríes y la mediada por murciélagos. Solamente la polinización especializada (ya sea mediada por colibríes o por murciélagos) resulta posible en este sistema. Esto es así porque los fenotipos intermedios resultan inadecuados para el transporte de polen por cualquiera de estos dos agentes. La arquitectura floral básica de *Burmeistera* se caracteriza por una corola fusionada y por un número reducido de estambres fusionados que

sobresalen por una apertura relativamente angosta de la corola. Las flores que presentan este tipo de arquitectura poseen generalmente un ajuste flor-polinizador muy preciso (Armbruster, 2009), lo que excluye la polinización mediante agentes que no se ajustan a las configuraciones de rasgos de una especie. La evolución de la generalización en *Caiophora* podría estar siendo facilitada por el arreglo más bien suelto de las piezas florales que caracteriza a la arquitectura floral de Loasoideae. En esta familia las flores son radialmente simétricas y los pétalos no están fusionados. Por otro lado las flores de *Caiophora* exhiben sincrónicamente un gran número de estambres alrededor de su centro. Esta arquitectura floral permitiría la polinización por parte de agentes que varían en tamaño y comportamiento, más allá de que ocurra cierto desperdicio de polen durante el proceso, si se compara este aspecto con linajes cuyas flores son más restrictivas en su polinización (*sensu* Armbruster, 2009).

En conclusión, la optimización de la morfología floral para distintas estrategias de polinización en *Caiophora* pareciera estar ocurriendo en un contexto compensatorio de adecuación. La evolución de la generalización funcional de la morfología floral estaría teniendo lugar en este sistema, lo que podría atribuirse al hecho de que la arquitectura floral de Loasoideae no sería tan restrictiva a la generalización como en otros linajes de Angiospermas. Este abordaje también ofreció una visualización novedosa de las interacciones planta-polinizador donde éstas no se consideran meramente como situaciones donde los rasgos florales son optimizados para una estrategia de polinización determinada, sino como un sistema más amplio, representado por la frontera de Pareto, donde los fenotipos florales son optimizados en escenarios selectivos diferentes.

Antes de finalizar este capítulo, es importante destacar tres limitaciones importantes de este trabajo, las cuales quitan en parte sustento al resultado que sugiere la presencia de un *trade-off* entre la polinización mediada por himenópteros y la polinización mediada por colibríes en *Caiophora*. En primer lugar, se carece de información acerca de cuál es la contribución de los himenópteros y de los colibríes a la adecuación reproductiva de la planta en *C.lateritia*, *C.hibiscifolia* y *C.nivalis*, lo cual supone una limitación para interpretar al patrón morfológico arrojado por el análisis realizado en este capítulo como el resultado de un *trade-off* entre ambas estrategias de polinización. En segundo lugar, podría estarse cometiendo un error al considerar a las abejas y a las avispas como parte de un mismo grupo funcional de polinizadores, ya que las avispas, a diferencia de las abejas, no

colectan polen como recompensa (Rosas-Guerrero et al., 2014). Si la contribución de las avispa y de las abejas al éxito reproductivo de *Caiophora* difiriera, la contribución realizada por los “himenópteros” a la adecuación de la planta no podría ser homologada entre *C.lateritia* y *C.nivalis*. En tal caso, la elección del sistema utilizado en este trabajo sería incorrecta. Finalmente, el tamaño de muestra utilizado en este trabajo es reducido con respecto a la totalidad de especies presentes en el género *Caiophora*. Por ello, los resultados obtenidos en este capítulo no podrían extrapolarse con confianza a explicar cómo ocurre la optimización de los rasgos florales en respuesta a los colibríes y a los himenópteros en otras especies del género.

CAPÍTULO IV

DESARROLLO Y DIVERSIFICACIÓN FLORAL. PARTE I

Introducción

Los rasgos de los organismos muchas veces no responden a la selección natural en aislamiento de otros rasgos; más bien podría decirse que los rasgos se encuentran marcadamente asociados entre sí y que por ende se espera que la selección sobre un determinado rasgo acarree consigo la evolución de otros. Dichas asociaciones entre rasgos, que definen patrones de integración fenotípica y de modularidad (Olson y Miller, 1958) pueden tener una base funcional, cuando un rasgo cumple una determinada función en conjunto con otros rasgos, o una base genética o del desarrollo, cuando los genes o los procesos del desarrollo que subyacen a un rasgo determinado también determinan otros rasgos. A su vez, las asociaciones entre rasgos que son de base genética o del desarrollo también pueden ser funcionales (Pigliucci, 2003).

Si bien la definición de integración fenotípica aplica a la interdependencia entre los rasgos en un momento determinado del desarrollo, por ejemplo asociaciones entre la forma y el tamaño de los adultos reproductivos de una especie, dichas asociaciones también pueden darse entre los distintos estadios de la ontogenia de los organismos (o de la ontogenia de sus órganos) (Kingsolver et al., 2012; Donohue, 2013). Tal interdependencia entre estadios del desarrollo es esperable si se considera que una misma vía de señalización, integrada por hormonas y determinantes genéticos del desarrollo, puede afectar distintos aspectos de los organismos a lo largo de la ontogenia. Por ejemplo, existen evidencias de que los genes que regulan la transición hacia la floración en angiospermas también regulan la germinación de las semillas. Estos genes participan en vías encargadas de la percepción de factores ambientales, por ejemplo el fotoperíodo, que son claves para desatar ambos procesos (Donohue, 2013). Dada esta situación, la selección sobre las características fenotípicas de los organismos en un momento determinado del desarrollo puede tener un efecto indirecto sobre el fenotipo en otros estadios ontogenéticos (Kingsolver et al., 2012; Donohue, 2013).

En un contexto macroevolutivo, tal interdependencia entre estadios del desarrollo podría inferirse si la correspondencia entre un régimen selectivo determinado (por ejemplo definido por una dieta herbívora o una carnívora) y el fenotipo en un grupo de especies pertenecientes a un mismo clado se extendiese a otros estadios de la ontogenia, que no son blanco directo de la selección impuesta por dicho régimen selectivo. Si por el contrario el fenotipo de los organismos en el estadio que es el blanco directo de la selección pudiera responder a la selección con independencia de otras etapas del desarrollo, esto podría deducirse si las trayectorias ontogenéticas de distintas especies no se correspondieran con el régimen selectivo que afecta al estadio de desarrollo que es blanco directo de la selección. En una situación como esta, las trayectorias del desarrollo se corresponderían ya sea con la distancia filogenética que separa a las especies (lo cual sería indicio de que la trayectoria ontogenética habría evolucionado por deriva), o eventualmente con otros regímenes selectivos.

En general, la evolución fenotípica en respuesta a la selección natural se estudia desde una perspectiva que considera al fenotipo en un momento puntual del desarrollo del organismo (u órgano) y en aislamiento de su ontogenia. En animales, este momento puntual del desarrollo es generalmente el adulto reproductivo (Álvarez, Pérez y Verzi, 2011, Tseng, 2013) y, en el caso de las angiospermas, la flor en condiciones de exportar y de recibir polen (Whittall y Hodges, 2007; DeWitt Smith, Ané y Baum, 2008;) o el fruto maduro (Cannon y Manos, 2001; Lomáscolo et al., 2010). Sólo unos pocos trabajos han indagado acerca de la evolución de las trayectorias de desarrollo en respuesta a cambios en el ambiente selectivo (Bergmann y Berk, 2012; Kingsolver et al, 2012; Donohue, 2013) y ningún trabajo ha indagado hasta ahora acerca de la evolución de las trayectorias de desarrollo floral en respuesta a dichos cambios.

En cuanto a la ontogenia de la morfología floral, es interesante destacar que a lo largo de la misma se comparten determinantes genéticos y hormonales de crecimiento y proliferación celular (Dornelas et al., 2012). Dada esta situación, es razonable sugerir que la respuesta evolutiva de la morfología floral a un agente selectivo determinado (por ejemplo los polinizadores) conlleva la evolución de otros estadios ontogenéticos previos al despliegue. Esta hipótesis podría someterse a prueba a través de la predicción de que la trayectoria ontogenética que da lugar a la flor desplegada se corresponde con un determinado régimen selectivo (por ejemplo, la polinización mediada por aves vs.

polinización mediada por himenópteros). Dicha correspondencia no se esperaría si la morfología floral respondiera a la selección mediada por polinizadores con independencia de otros estadios ontogenéticos. En tal caso se espera que la trayectoria ontogenética que da lugar a la flor desplegada evolucione por deriva y esto último puede someterse a prueba mediante la predicción de que la trayectoria ontogenética que da lugar a la flor desplegada se corresponde solamente con la distancia filogenética que separa a las especies analizadas.

En el presente capítulo nos propusimos: 1) caracterizar las trayectorias de desarrollo de dos estructuras florales de Loasoideae (Loasaceae) involucradas en el mecanismo de polinización y 2) establecer si la ontogenia de estas dos estructuras florales responde el régimen de polinización, del mismo modo en que lo hace la forma de dichas estructuras en las flores desplegadas (Capítulo II) o si dicha trayectoria evoluciona por deriva.

Para llevar a cabo estos objetivos, en primer lugar generamos vectores ontogenéticos, los cuales representan el cambio en la forma de la estructura a lo largo de la ontogenia (forma inicial-forma final), a partir de los datos morfométricos del desarrollo de dos estructuras florales involucradas en la polinización: el pétalo y el complejo escama-estaminodios. Esto se hizo para 12 especies, las cuales presentan variación en sus estrategias de polinización. En el Capítulo II se estableció que en Loasoideae tanto la forma de la corola como la de la estructura compuesta por la escama nectarífera y los estaminodios responden a la selección mediada por polinizadores. Posteriormente se estableció por un lado la concordancia entre los vectores ontogenéticos obtenidos y las estrategias de polinización de Loasoideae y por otro la concordancia entre dichos vectores ontogenéticos y la distancia filogenética que separa a las especies analizadas. Una descripción más detallada acerca de las principales características de la subfamilia Loasoideae (Loasaceae) puede ser consultada en la introducción general de esta tesis. Las relaciones filogenéticas entre las especies de *Caiophora*, *Loasa*, *Blumenbachia* y *Schyphantus* puede consultarse en los resultados del Capítulo II.

Materiales y métodos

Los detalles del muestreo correspondientes a este capítulo pueden consultarse en la metodología general de la tesis, así como también la selección de estructuras florales y el procesamiento de imágenes llevado a cabo para la obtención de variables morfogeométricas.

Obtención de variables morfogeométricas

A las coordenadas de los hitos colocados sobre las imágenes del pétalo y del complejo escama-estaminodios en distintos estadios del desarrollo (incluyendo la flor funcional) (ver metodología general) se les realizó un ajuste de Procrustes utilizando el programa MorphoJ (Klingenberg, 2011). Además de las coordenadas de Procrustes se obtuvo el logaritmo del tamaño centroide (Zelditch, 2012).

Obtención de vectores ontogenéticos y cálculo de distancias

Los vectores ontogenéticos que describen el desarrollo del pétalo y del complejo escama-estaminodios se obtuvieron con el programa MorphoJ (Klingenberg, 2011) de la manera en que se describe a continuación. Utilizando el set de datos completo de cada especie (que incluye a la flor funcional pero también botones en distintos estadios del desarrollo) se realizaron regresiones entre cada una de las coordenadas de Procrustes y el logaritmo del tamaño centroide. El valor predicho de cada hito en estas regresiones define un vector ontogenético para ese hito, que representa el cambio en la posición del hito a lo largo del desarrollo. Una vez obtenidos los vectores ontogenéticos (uno por hito) del pétalo y del complejo escama-estaminodios que representan a cada especie, es posible obtener distancias inter-específicas en cuanto a la similitud-disimilitud de las ontogenias (representadas por los vectores ontogenéticos). Estas distancias se calculan, para cada par de especies, como la raíz cuadrada de la suma de las distancias euclídeas entre pares interespecíficos de vectores ontogenéticos.

Concordancia entre vectores ontogenéticos y filogenia y entre vectores ontogenéticos y estrategia de polinización

Para establecer si los vectores ontogenéticos de ambas estructuras analizadas concuerdan con la estrategia de polinización o con la filogenia se realizaron cuatro test de aleatorización sobre superposición de Procusto (PROTEST, Peres-Neto y Jackson, 2001). Dicho análisis minimiza la suma de cuadrados de las distancias (Δ_{12}^2) entre los resultados de la ordenación de dos sets de datos cuya concordancia se desea establecer. Dicha minimización se logra tras re-escalar y rotar una matriz contra otra, siguiendo el procedimiento de una superposición de Procusto.

Se establecieron concordancias entre: 1) los vectores ontogenéticos del pétalo y la estrategia de polinización, 2) los vectores ontogenéticos del pétalo y la filogenia, 3) los vectores ontogenéticos del complejo escama-estaminodios y la estrategia de polinización, 4) los vectores ontogenéticos del complejo escama-estaminodios y la filogenia. Para esto se elaboraron las correspondientes matrices de distancias inter-específicas. Para las matrices de distancia entre vectores ontogenéticos se utilizó la distancia euclídea, mientras que para la matriz de distancia filogenética se utilizó la distancia cofenética. Para elaborar una matriz de distancias entre estrategias de polinización se consideró que la distancia que separa a especies con la misma estrategia de polinización es cero (0). Dado que las transiciones en la estrategia de polinización sobre la filogenia de Loasoideae tienen el sentido polinización mediada por himenópteros > polinización mediada por colibríes > polinización mediada por roedores (Filogenia, Capítulo 1), se consideró que entre las especies polinizadas por himenópteros y la especie polinizada por roedores existe una distancia de dos pasos (2), mientras que tanto entre las especies polinizadas por himenópteros y las especies polinizadas por colibríes como entre las especies polinizadas por colibríes y la especie polinizada por roedores existe una distancia de un paso (1). Previo al análisis de superposición de Procusto se redujo la dimensionalidad de cada una de las matrices de distancia a dos ejes de variación, con el fin de proyectar la variación de las matrices en un espacio de ordenación común, lo cual se hizo mediante un escalamiento multidimensional no métrico (*non-metric multidimensional scaling*, NMDS). Para cada uno de estos NMDS se obtuvo el valor de estrés. El valor de estrés indica la medida en que las variables ordenadas en el NMDS son forzadas a ocupar un espacio de dos dimensiones.

Un valor de estrés > 0.05 provee una representación excelente de las variables en el espacio reducido, un valor >0.1 provee una representación muy buena; un valor >0.2 se considera marginalmente correcto y un valor >0.3 sugiere que la representación de las variables en dos dimensiones es pobre. Las matrices de distancias entre vectores ontogenéticos fueron rotadas y re-escaladas por un lado contra la matriz de distancias entre estrategias de polinización y por otro contra la matriz de distancias filogenéticas.

Para establecer la significación de la similitud entre matrices se realizaron 999 permutaciones de los valores correspondientes a cada especie sobre los ejes del NMDS hecho a partir de las distancias entre trayectorias ontogenéticas. Tras cada permutación se realizó una superposición de Procrustes entre los valores permutados y los observados en un caso para la estrategia de polinización y en otro para la filogenia. El valor minimizado de la suma de distancias elevadas al cuadrado (m_{12}^2) fue retenido tras cada una de estas permutaciones, con el fin de obtener una distribución nula de dicho parámetro. El valor observado de m_{12}^2 se comparó con la distribución del parámetro obtenida a partir de las 999 permutaciones, considerando la similitud entre matrices como significativa si se hallaba en el 5% inferior de esta distribución. Un valor m_{12}^2 significativo para la superposición de Procrustes que involucra a las trayectorias ontogenéticas y a la estrategia de polinización indica que las trayectorias ontogenéticas responden a la estrategia de polinización; un valor m_{12}^2 significativo para la superposición de Procrustes que involucra a las trayectorias ontogenéticas y a la filogenia indica que la distancia filogenética explicaría las diferencias entre trayectorias ontogenéticas.

Tanto la superposición de Procrustes como la prueba de significación de la concordancia entre conjuntos de datos fueron realizadas con el paquete de R 'vegan' (Oksanen et al., 2013). Por otra parte se utilizó el paquete de R 'phytools' (Revell, 2012) para graficar la salida del NMDS realizado para cada estructura considerando el contexto filogenético.

Resultados

Las trayectorias del desarrollo de la forma del pétalo y del complejo escama-estaminodios se muestran para todas las especies en la fig.1.

Pétalo

Los estadios tempranos del desarrollo de todas las especies analizadas presentan una morfología de pétalo compartida (fig.1). Las trayectorias parten de una forma de pétalo en la cual el unguículo (la parte inferior del pétalo) se encuentra retraído. Las diferencias inter-específicas en la forma del pétalo emergen a medida que avanza el desarrollo. La forma del pétalo cambia en gran medida a lo largo del desarrollo en las especies basales, lo que se refleja en una expansión marcada del unguículo (fig.1). La especie *L.bergii*, a diferencia del resto de las especies basales a *Caiophora*, también presenta un desdoblamiento marcado de la porción apical del pétalo (fig.1). Estos cambios son menos marcados a lo largo de la ontogenia de las especies de *Caiophora*, las cuales conservan un unguículo más retraído que sus especies basales (excepto en *C. nivalis*, donde estos cambios son marcados, y similares a los observados en *L.bergii*) (fig.1). Esto permite decir que la forma del pétalo en las flores desplegadas de *Caiophora* es comparativamente más juvenil (o pedomórfica *sensu* Alberch et al., 1979 y Klingenberg, 1998) que en las especies basales. Esta pedomorfosis (retención de características juveniles del ancestro) aparece exacerbada en algunas de las especies polinizadas por colibríes de este género (*C.hibiscifolia* y *C.chuquitensis*). Como se mencionó en la metodología general de la tesis, el grado de expansión del unguículo guarda correspondencia con el grado de apertura de las corolas en Loasoideae. Las corolas cuyos pétalos tienen el unguículo más expandido son más abiertas, mientras que lo contrario puede decirse para las corolas con unguículo más retraído.

Complejo escama-estaminodios

La trayectoria de desarrollo de esta estructura presenta una tendencia compartida entre especies a que los estaminodios sobresalgan cada vez menos por encima de la escama a medida que avanza el desarrollo (fig.1). Sin embargo, la condición inicial de la que parten estas trayectorias de desarrollo difiere entre *Caiophora* y sus especies basales (excepto para *C.nivalis*, donde las características del desarrollo del complejo escama-estaminodio son muy parecidas a las de *L.bergii*). En *Caiophora*, el estaminodio sobresale en mayor medida por encima de la escama nectarífera en los momentos iniciales del desarrollo que en los géneros basales (fig.1) (o sea, el complejo escama-estaminodios

presenta características más juveniles en estadios tempranos del desarrollo que las especies basales en esos mismos estadios). La adquisición de características comparativamente juveniles en momentos tempranos del desarrollo (las cuales son arrastradas luego a lo largo de toda la ontogenia) también constituye un mecanismo de pedomorfosis según Alberch et al.,1979 y Klingenberg, 1998. Nótese que esta pedomorfosis de estadios iniciales es aún más marcada en tres de las cuatro especies de *Caiophora* polinizadas por colibríes (*C.lateritia*, *C.chuquitensis* y *C.hibiscifolia*) (fig.1). A su vez es interesante destacar que la forma del complejo escama-estaminodios cambia menos a lo largo del desarrollo en estas tres especies que en el resto de las especies de *Caiophora* (fig.1). Este último aspecto contribuiría aún más a las características pedomórficas del complejo escama-estaminodios en especies polinizadas por colibríes. Esta condición pedomorfica del desarrollo de la escama se revierte marcadamente en *C.coronata*. Los estaminodios en esta especie son extremadamente cortos en relación a la escama en estadios tempranos del desarrollo si se los compara con los estaminodios en estadios tempranos del desarrollo de sus especies inmediatamente basales, *C.hibiscifolia* y *C. chuquitensis* (polinizadas por colibríes) (fig.1). La longitud de los estaminodios con respecto a la escama también disminuye marcadamente a lo largo de la ontogenia de *C.coronata*, cosa que no ocurre en sus especies basales polinizadas por colibríes (fig.1). Dicho sobre-desarrollo de los rasgos en el descendiente con respecto al ancestro (estaminodios muy cortos en relación a la escama en este caso), se conoce como peramorfosis (sobre-desarrollo, lo opuesto a pedomorfosis, *sensu* Alberch et al.,1979 y Klingenberg, 1998).

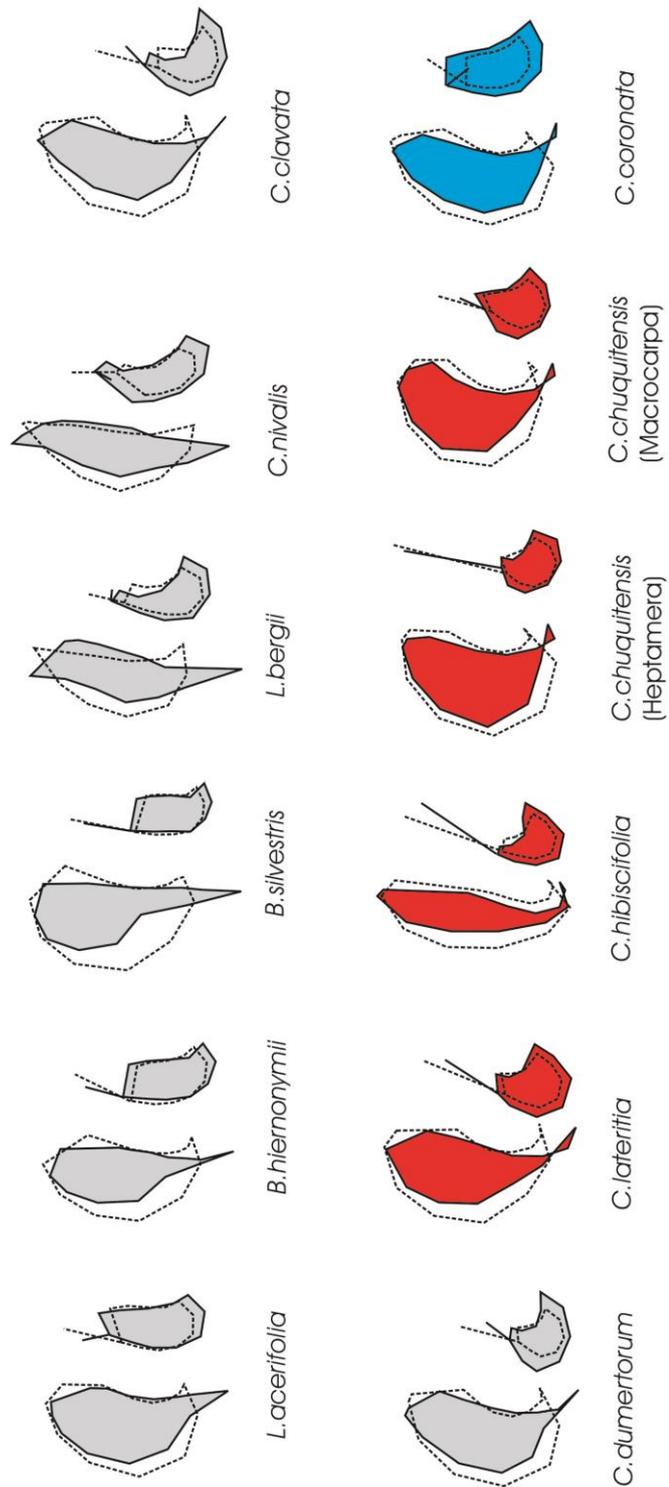


Fig. 1. Trayectorias de desarrollo del pétalo (izquierda) y del complejo escama-estaminodios (derecha) en las 11 especies de Loasoideae analizadas. El contorno punteado indica la forma de la estructura en momentos previos al despliegue floral mientras que el contorno continuo indica la forma de la estructura durante el despliegue. Los colores indican: gris, polinización mediada por himenópteros; rojo, polinización mediada por colibríes; celeste, polinización mediada por roedores.

En la fig. 2 se representan las relaciones filogenéticas y la disposición de los vectores ontogenéticos del pétalo (fig. 2A) y del complejo escama-estaminodios (fig. 2B), según las coordenadas que corresponden a cada uno de ellos en un NMDS. Los valores de m_{12}^2 y el valor-p de dicho parámetro se muestran en la Tabla 2. Las trayectorias ontogenéticas no se ajustan significativamente a la estrategia de polinización y se ajustan de manera marginalmente significativa a la filogenia.

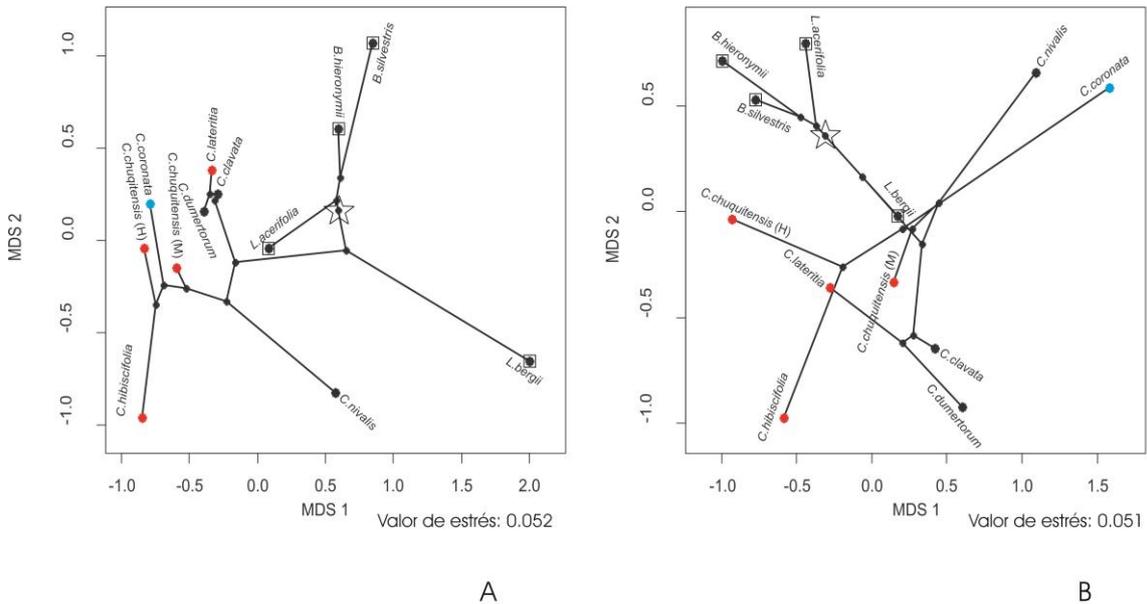


Fig. 2. Salida gráfica del análisis de escalamiento dimensional no métrico (NMDS) para la ontogenia del pétalo (A) y para la ontogenia del complejo escama-estaminodios (B). Se muestran los valores de estrés para cada uno de estos análisis. La raíz de los árboles filogenéticos se indica con una estrella, las especies basales al género *Caiophora* mediante un rectángulo. Los círculos negros corresponden a especies polinizadas por himenópteros, los rojos a las especies polinizadas por colibríes y los celestes a la especie polinizada por roedores.

	Salidas de análisis	Filogenia	Polinizador
Pétalo	m_{12}^2	0.7759	0.964
	p	0.099	0.7
Escama-estaminodio	m_{12}^2	0.7306	0.8599
	p	0.059	0.368

Tabla 2. Valores de m_{12}^2 y p-valores del parámetro.

Discusión

En el presente capítulo nos propusimos describir las trayectorias ontogenéticas de la morfología de dos estructuras florales involucradas en el mecanismo de polinización de Loasoideae así como también determinar si las trayectorias ontogenéticas de dichas estructuras se diferencian según la estrategia de polinización o si lo hacen de acuerdo a la distancia filogenética que separa a las 11 especies estudiadas. Esto último se realizó con el fin de establecer si la selección que los polinizadores ejercen sobre la morfología de la flor desplegada (Capítulo II) arrastra consigo variación en otros estadios del desarrollo o si la trayectoria de desarrollo floral evoluciona por deriva, independientemente de la selección ejercida por los polinizadores sobre la flor desplegada.

En resumen, la caracterización del desarrollo de las estructuras involucradas en el mecanismo de polinización de Loasoideae sugiere que las flores de *Caiophora* son en general pedomórficas (comparativamente más juveniles) si se las compara con las flores de las especies basales a este género. Dicha adquisición de características juveniles se habría visto exacerbada en algunas de las especies de *Caiophora* polinizadas por colibríes. La adquisición de características pedomórficas en las flores de especies polinizadas por colibríes en *Caiophora* es consistente con los resultados de un trabajo que demuestra el rol de la pedomorfosis en la evolución de flores polinizadas por colibríes en Ranunculaceae (Guerrant Jr., 1982). Una tendencia hacia la retención de unguículos retraídos en las flores funcionales de *Caiophora* (lo cual se corresponde con corolas más cerradas) podría haber generado la pre-condición para la evolución de las flores polinizadas por colibríes dentro de este género, al posibilitar la evolución de las corolas angostas que son más eficaces en esta estrategia de polinización (Introducción general). Por otra parte, la retención de características juveniles en el complejo escama-estaminodio en tres de las cuatro especies polinizadas por colibríes de *Caiophora*, (estaminodios que sobresalen marcadamente por encima de la escama nectarífera), podría beneficiar la polinización mediada por colibríes ya que, como se planteó en la introducción general de esta tesis, un complejo escama-estaminodios donde los estaminodios sobresalen marcadamente por encima de la escama coopera con la corola en aumentar el ajuste flor-polinizador. Finalmente, la peramorfosis de las escamas nectaríferas en la especie polinizada por roedores (la cual consiste en un estaminodio muy reducido en relación a la escama) también es coherente desde el punto de vista de la polinización. En las flores polinizadas por roedores los estaminodios no tienen

participación en el mecanismo de polinización y podrían incluso entorpecer el acceso al néctar a los polinizadores.

Los resultados de este estudio indican que las trayectorias ontogenéticas no concuerdan con la estrategia de polinización de las especies analizadas. Esto denota que en Loasoideae la selección mediada por polinizadores sobre las flores desplegadas no afecta a otros estadios ontogenéticos. También denota que en esta subfamilia fue posible la evolución de morfologías florales similares (aquellas que procuran maximizar la eficiencia de una estrategia de polinización determinada, Capítulo II) a través de trayectorias del desarrollo diferentes. Las diferencias entre las trayectorias de desarrollo de las especies polinizadas por himenópteros (fig. 2) podrían deberse a que éstas presentan variación en la magnitud del cambio morfológico que ocurre a lo largo de la ontogenia y, en el caso del complejo escama-estaminodios, a una fuente de variación adicional ocasionada por las diferencias en las condiciones iniciales del desarrollo (fig.1). Las trayectorias ontogenéticas de ambas estructuras en las especies polinizadas por colibríes sin embargo difieren menos entre ellas que las de las especies polinizadas por himenópteros entre sí (fig. 2). Esto podría deberse a las características pedomórficas de estas trayectorias (fig.1).

La asociación marginalmente significativa entre la trayectoria de desarrollo y la filogenia podría deberse a que la diversificación de *Caiophora* es reciente si se la compara con el tiempo de divergencia que separa a este género de las especies basales. Si bien las trayectorias de desarrollo de *Caiophora* podrían estar sujetas a selección mediada por polinizadores, la diversificación reciente del género quizá aún no posibilitó una divergencia entre trayectorias intra-genérica mayor que la que presenta *Caiophora* con respecto a las especies basales. Este efecto filogenético podría estar opacando el efecto de los polinizadores.

Conclusión

Las trayectorias de desarrollo del pétalo y del complejo escama-estaminodios no se corresponderían con la estrategia de polinización y sí lo hacen, de manera marginalmente significativa, con distancia filogenética que separa a las especies de Loasoideae analizadas. Lo primero sugiere que la selección mediada por polinizadores no afecta a otros estadios ontogenéticos de la flor y que por ende existen distintas vías del desarrollo para arribar a una morfología floral apta para una determinada estrategia de polinización. Sin embargo, puede destacarse que mientras existen diferentes vías del desarrollo para arribar a una morfología floral propicia para la polinización mediada por himenópteros, la vía propicia para arribar a una flor polinizada por colibríes es más conservadora, consistiendo ésta en la retención de características juveniles en las flores desplegadas. Finalmente, la leve señal filogenética en las trayectorias de desarrollo de Loasoideae podría deberse a la reciente diversificación de *Caiophora*, lo que podría explicar por qué no se observa un ajuste entre las trayectorias de desarrollo de todas las especies de Loasoideae analizadas y el síndrome de polinización.

CAPÍTULO V

DESARROLLO Y DIVERSIFICACIÓN FLORAL. PARTE II

Introducción

El rol de la ontogenia en la evolución y la diversificación se considera generalmente desde dos puntos de vista opuestos. Por un lado, la diversificación puede ocurrir sin un cambio en el patrón de desarrollo ancestral (fig 1, situaciones A y B) Gould, 2004); por otro lado, puede requerir que el patrón de desarrollo ancestral cambie (fig 1, situaciones C y D) (Wagner, Amemiya y Ruddle, 2003).

El primer punto de vista se basa en el siguiente argumento: no sólo es relevante para la evolución adaptativa la aptitud del fenotipo de un organismo en un estadio ontogenético determinado, por ejemplo durante la madurez reproductiva, sino que la secuencia de desarrollo completa de ese organismo debe estar bien adaptada al ambiente para poder arribar finalmente a tal estadio del desarrollo (Arthur, 2011a). De esto se desprende que los estadios ontogenéticos de un organismo ya se encuentran adaptados al ambiente y que por ende la evolución mediada por selección natural resultaría más “segura” si se nutriera de la variación fenotípica expresada a lo largo de la ontogenia del ancestro, en lugar de requerir la generación de variación novedosa, la cual podría ser inviable (Gould, 2004). El fenotipo de un organismo cambia a lo largo de su ontogenia. Si fuera beneficioso para el organismo, un simple cambio en el tamaño o en la edad a la cual se llega al estadio del desarrollo sujeto a selección sería suficiente para aumentar la adecuación del organismo al ambiente (Gould, 2004). La misma idea puede sostenerse para los órganos o para las distintas estructuras que conforman a los organismos (Box y Glover, 2010).

El segundo punto de vista se basa en el hecho de que los procesos de desarrollo necesarios para producir ciertas variantes fenotípicas, por ejemplo las redes regulatorias que producen un cierto fenotipo, pueden estar ausentes en un linaje (Arthur, 2011a). Por ende, algunas variantes fenotípicas son inaccesibles, a excepción de que un rearrreglo del

programa de desarrollo permita la exploración de nuevo espacio fenotípico (Wagner, Amemiya y Ruddle, 2003).

En las angiospermas, los cambios en el régimen de polinización contribuyen a explicar la copiosa diversidad de fenotipos florales (Classen et al., 2004; Kay et al., 2005; Whittall y Hodges, 2007; Givnish et al., 2014). Sin embargo, la relación que existe entre la diversificación floral mediada por polinizadores por un lado y los mecanismos de evolución del desarrollo que proveen la variación para que tal diversificación pueda ocurrir ha sido poco considerada (a excepción de revisiones como las de Box y Glover, 2010 y Becker et al., 2011). En particular, aun no se ha explorado hasta qué punto la diversificación floral depende o no de un cambio en el patrón de desarrollo ancestral. La subfamilia de angiospermas Loasoideae (Loasaceae) ofrece un sistema de estudio indicado para tal exploración.

En el presente capítulo se explora la relación entre la diversificación y la ontogenia floral en la subfamilia Loasoideae (Loasaceae). En particular, el objetivo de este capítulo es establecer si la diversificación marcada del género *Caiophora* (Capítulo II) requirió o no un cambio del patrón de desarrollo ancestral. Una descripción más detallada acerca de las principales características de la subfamilia Loasoideae (Loasaceae) puede ser consultada en la introducción general de esta tesis. Las relaciones filogenéticas entre las especies de *Caiophora*, *Loasa*, *Blumenbachia* y *Schyphantus* puede consultarse en los resultados del Capítulo II.

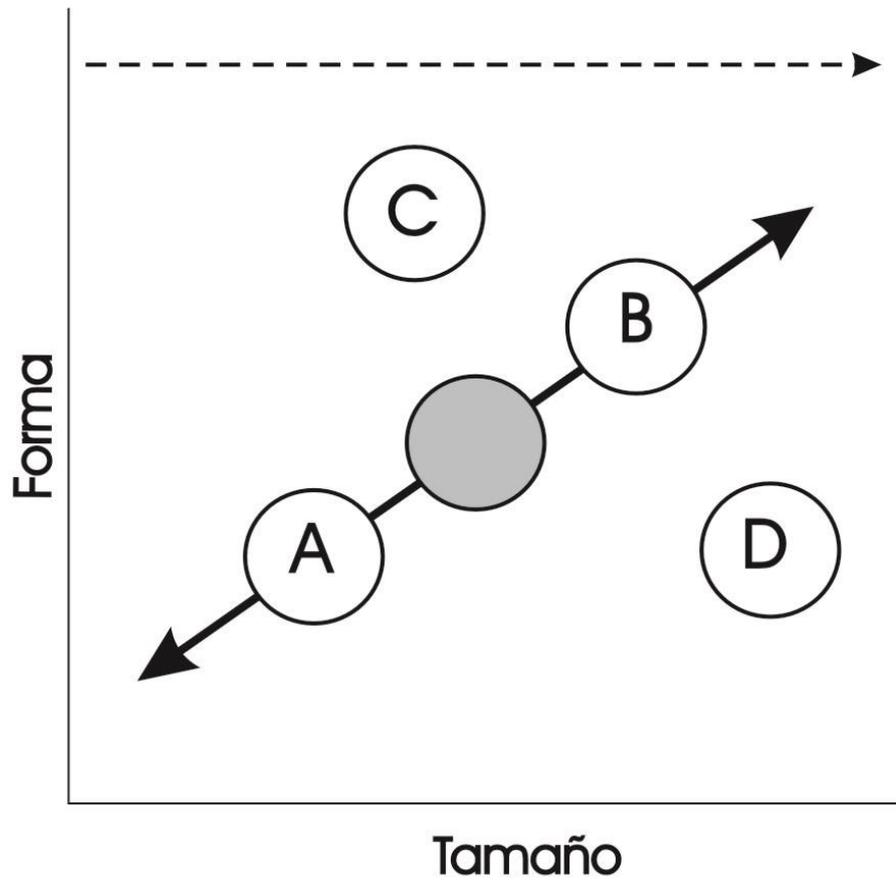


Fig 1. La dirección de la trayectoria de desarrollo de un rasgo de forma y otro de tamaño de un linaje ancestral está representada con una flecha de doble punta. El tiempo se representa de manera implícita con una flecha punteada. El círculo gris representa el fenotipo en un determinado estadio del desarrollo (por ejemplo el adulto) en el linaje ancestral. A, B, C y D son configuraciones de rasgos que corresponden a ese mismo estadio del desarrollo en especies descendientes. La evolución puede ocurrir sin alterar el patrón de desarrollo ancestral (A, B) o puede requerir un cambio (C, D).

Materiales y métodos

Los detalles del muestreo correspondientes a este capítulo pueden consultarse en la metodología general de esta tesis junto al procesado de imágenes para la obtención de variables morfogeométricas. Es importante destacar que se trabajó con el logaritmo del tamaño centroide en lugar de con este valor crudo.

Análisis morfométrico

En morfometría geométrica, las trayectorias de desarrollo pueden describirse mediante rectas obtenidas a partir de regresiones de variables de forma (por ejemplo Deformaciones relativas o coordenadas de Procrustes) sobre variables de tamaño (tamaño centroide o logaritmo del tamaño centroide). Así, las trayectorias de desarrollo pueden ser caracterizadas mediante una ordenada al origen (la cual describe la forma en estadios tempranos del desarrollo) y mediante una pendiente (la cual describe cuanto cambia la forma con respecto al tamaño) (ver por ejemplo Zelditch, 2012). Si bien esto no afectaría los parámetros de una regresión, el rango de la variable dependiente (el tamaño) también podría variar, representando variación en la extensión de la trayectoria de desarrollo. Existen tres mecanismos básicos mediante los cuales las trayectorias de desarrollo pueden evolucionar dando lugar a la diversificación morfológica. Estos son el escalamiento ontogenético (cambios en la extensión de la trayectoria de desarrollo, fig. 1, situaciones A y B), el cambio en la pendiente y/o la transposición lateral (cambios en la ordenada al origen) de las trayectorias de desarrollo (fig. 1, situaciones C y D); (Klingenberg, 1998). A diferencia del escalamiento ontogenético, estos dos mecanismos hacen disponibles configuraciones de forma y tamaño que están por fuera de los límites de la trayectoria de desarrollo ancestral (Klingenberg, 1998). Al implicar cambios sincronizados en el desarrollo del tamaño y de la forma total de un organismo u órgano, la evolución por escalamiento ontogenético se relaciona estrechamente con la evolución por heterocronía o heterometría (esto es, durante cuánto tiempo o en qué magnitud se expresa el programa de desarrollo) (Capítulo I). Ambos procesos también podrían estar implícitos en la transposición lateral y en el cambio de pendiente de la trayectoria de desarrollo, ya que estos casos se deberían a una aceleración o desaceleración/ sobreexpresión-disminución del desarrollo de la forma con respecto al desarrollo del tamaño. Sin embargo, al estar

representando una heterocronía-heterometría sincronizada de la forma y el tamaño, el escalamiento ontogenético representaría un nivel más integrado (menos modular) de la heterocronía o heterometría. Sin contar con datos acerca del tiempo real que dura el desarrollo, es imposible distinguir entre las contribuciones relativas de la heterometría y de la heterocronía al escalamiento ontogenético y a los otros mecanismos evolutivos mencionados (Klingenberg, 1998).

La contraposición entre la evolución por escalamiento ontogenético y la evolución por otros mecanismos que implican la ruptura de las relaciones entre forma y tamaño ancestrales representa a las dos hipótesis planteadas en este capítulo: 1) La diversificación de la morfología floral de *Caiophora* en respuesta a los polinizadores no implica un cambio en el patrón de desarrollo ancestral (por ejemplo, la forma y el tamaño del adulto en la especie derivada se correspondería con la forma y el tamaño de un estadio del desarrollo juvenil en la especie ancestral); 2) La diversificación de la morfología floral de *Caiophora* en respuesta a los polinizadores habría requerido de la ruptura de las asociaciones entre la forma y el tamaño presentes a lo largo de la ontogenia ancestral.

La morfometría geométrica permite estimar las relaciones entre la forma y el tamaño a través de regresiones de las coordenadas de Procrustes (que describen la forma de un organismo o estructura) en función del tamaño centroidal de dicho organismo o estructura (Klingenberg, 2011). Además permite la generación de predicciones acerca de si la evolución de un linaje ocurrió por escalamiento ontogenético o por otros mecanismos de evolución del desarrollo (cambio de pendiente y/o transposición lateral de la trayectoria de desarrollo ancestral). Si la evolución ocurrió por escalamiento ontogenético, se espera que las configuraciones de forma-tamaño de las especies descendientes en un estadio del desarrollo determinado se superpongan con la tendencia alométrica de la ontogenia ancestral (fig. 1, situaciones A y B); si la evolución ocurrió por un mecanismo distinto del escalamiento ontogenético, se espera que las configuraciones de forma-tamaño de las especies descendientes en tal estadio del desarrollo no se superpongan con la tendencia alométrica de la ontogenia ancestral (fig. 1, situaciones C y D).

El programa computacional MorphoJ (Klingenberg, 2011) contiene rutinas que permiten poner a prueba estas hipótesis. El procedimiento llevado a cabo para someter a prueba estas hipótesis, representando las predicciones correspondientes y descriptas en el

párrafo anterior, tiene tres pasos y fue realizado dos veces, una para cada estructura floral analizada. En primer lugar, combinando los sets de datos de las tres especies basales a *Caiophora*, *Loasa acerifolia*, *Blumenbachia hieronymii* y *Blumenbachia silvestris* (este incluye a la flor funcional pero también botones en distintos estadios del desarrollo) se realizaron regresiones entre las coordenadas de Procusto de cada hito morfogeométrico y el logaritmo del tamaño centroide de cada estructura. Estas rectas de regresión describen el patrón ontogenético ancestral. Dado que no se cuenta con información fósil, asumimos que estas tres especies basales representan la condición ontogenética ancestral.

El segundo paso del procedimiento consistió en una regresión combinada, en la cual las rectas de regresión obtenidas en el paso anterior se utilizan como rectas de regresión sobre la base de datos (coordenadas de Procusto y logaritmo del tamaño del centroide) correspondientes a las flores desplegadas de todas las especies de Loasoideae analizadas (de *Caiophora* y de sus géneros basales). Así se calculan residuos para cada hito morfogeométrico correspondiente al set de datos de las flores desplegadas. De haber ocurrido escalamiento ontogenético, se espera que los residuos correspondientes a las especies basales y los correspondientes a las especies de *Caiophora* se superpongan, ya que los mismos representarían desvíos de magnitud similar respecto a las rectas de regresión que describen el desarrollo ancestral. De haber ocurrido la diversificación por fuera del patrón de desarrollo ancestral, los residuos de las especies de *Caiophora* diferirían marcadamente de los residuos de las especies basales.

En tercer lugar, para reducir la dimensionalidad de los residuos, se realizó un análisis de variable canónica (*canonical variate analysis*, CVA) en el cual los individuos fueron clasificados *a priori* según la especie a la que pertenecen y se chequeó la superposición entre las elipses del 90% de confianza de los residuos de cada especie en la salida gráfica del CVA.

Resultados

Se confirma gráficamente la superposición entre los patrones de variación ontogenética de *L. acerifolia*, *B. silvestris* y *B. hieronymii* (figs. 2A, B). El porcentaje de la variación de la forma del pétalo y de la forma del complejo escama-estaminodios explicado por el logaritmo del tamaño del centroide de cada estructura se muestra en la Tabla 1 junto al p-valor de dichas regresiones.

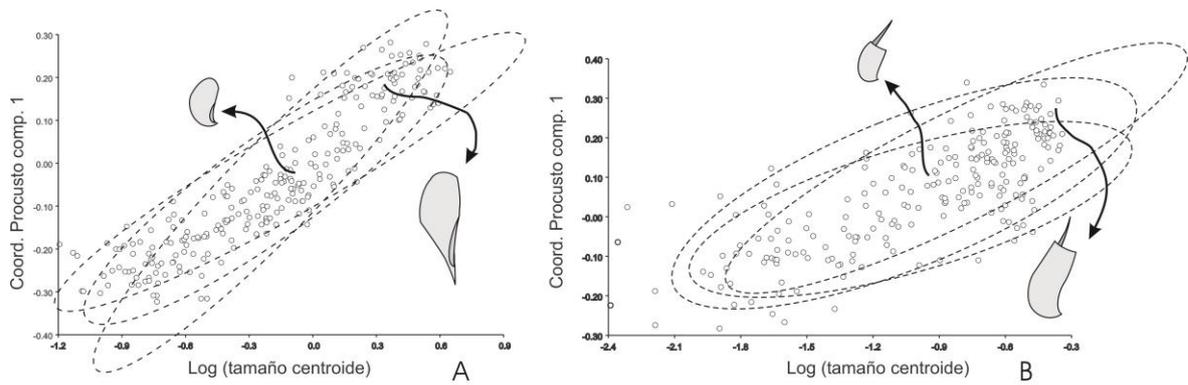


Fig. 2. Alometría ontogenética del pétalo (A) y del complejo escama-estaminodios (B). Se agregaron las elipses del 90% de confianza a las configuraciones de forma y tamaño a lo largo de la ontogenia de *Loasa acerifolia*, *Blumenbachia silvestris* y *Blumenbachia hieronymii*. Coordenadas de Procrusto componente 1 fue obtenido a partir de las regresiones individuales de cada coordenada de Procrusto sobre el logaritmo del tamaño centroide. Este eje resume la máxima covariación entre las coordenadas de Procrusto y el logaritmo del tamaño centroide (Monteiro, 1999).

Estructura	% forma dependiente de tamaño	p valor
Pétalo	45.58	< 0.0001
Escama nectarífera- estaminodios	27.59	< 0.0001

Tabla 1. Porcentaje de variación de forma explicada por tamaño y p-valor obtenido en las regresiones ontogenéticas.

Las configuraciones de forma y tamaño de ambas estructuras en las flores desplegadas de los 15 taxa analizados se muestran en la fig.3. Las salidas gráficas de los CVAs hechos con los residuos obtenidos a partir de las regresiones combinadas se muestran en la fig. 4. Las flores desplegadas de las especies basales a *Caiophora* presentan configuraciones de residuos similares entre sí, con excepción de *L.bergii*. Las configuraciones de residuos de las especies de *Caiophora* se apartan, en su mayoría, de las configuraciones de residuos de las especies basales.

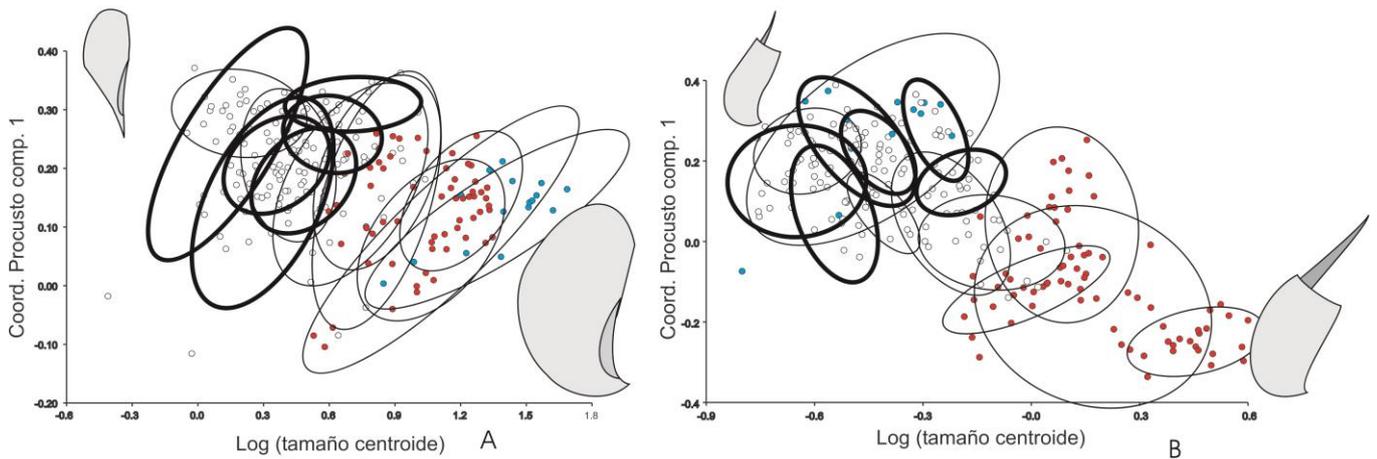


Fig. 3. Configuraciones de forma y tamaño obtenidas para las flores desplegadas de los 15 taxa de Loasoideae analizados. Estas configuraciones se muestran para el pétalo (A) y para el complejo escama-estaminodios (B). Se agregaron elipses del 90% de confianza a las configuraciones de forma y tamaño de cada especie. Las elipses gruesas corresponden a las especies basales a *Caiophora*. Cada círculo pequeño representa a un individuo y los colores indican: blanco, polinización mediada por himenópteros; rojo, polinización mediada por colibríes y celeste, polinización mediada por roedores. Se representa esquemáticamente la relación entre el tamaño y la forma de estas estructuras.

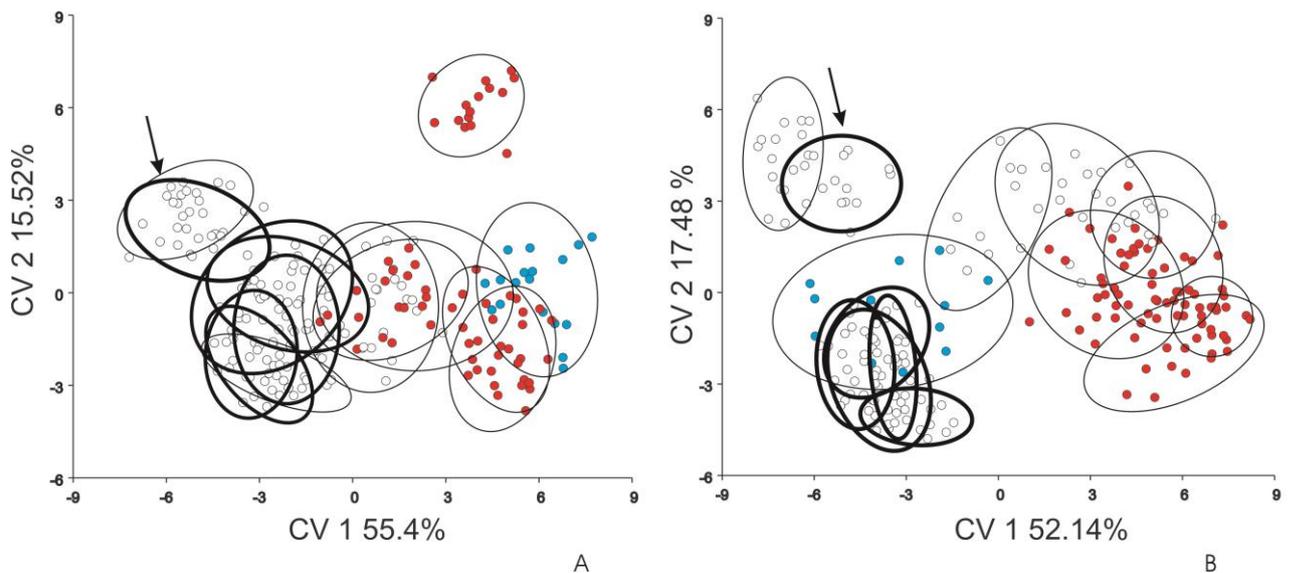


Fig. 4. Salida gráfica de los análisis CVA hechos a partir de los residuos de la forma del pétalo (A) y del complejo escama-estaminodios (B). Se agregaron elipses del 90% de confianza a las configuraciones de residuos de cada especie. Las elipses gruesas corresponden a las especies basales a *Caiophora*. Se señala con una flecha elipse que corresponde a la especie *Loasa bergii*. Cada círculo pequeño representa a un individuo y los colores indican: blanco, polinización mediada por himenópteros; rojo, polinización mediada por colibríes y celeste, polinización mediada por roedores.

Discusión

El objetivo de este capítulo consistió en establecer si la radiación adaptativa ocurrida en el género *Caiophora* utilizó como base las relaciones entre la forma y el tamaño presentes a lo largo de la trayectoria de desarrollo ancestral o si dicha radiación adaptativa requirió la generación de nuevas variantes. Los resultados sugieren que la radiación adaptativa de *Caiophora* requirió la generación de configuraciones de forma y tamaño que no están presentes a lo largo de la trayectoria de desarrollo ancestral.

La generación de configuraciones de forma y tamaño por fuera de los límites de la trayectoria de desarrollo ancestral parece haber ocurrido en un momento previo al origen de *Caiophora*: nótese que la variación de la forma de la flor desplegada en *L. bergii*, la especie basal más cercanamente emparentada a *Caiophora* (filogenia en Capítulo II) tiende a desprenderse de los patrones de variación ancestrales (fig.4). Esta “ruptura” de las relaciones alométricas ancestrales en un momento previo a la radiación adaptativa de *Caiophora* podría estar sugiriendo una desestabilización del desarrollo (Wagner, 2011) que, una vez ocurrida, habría ofrecido las condiciones necesarias para permitir la evolución de morfologías florales aptas para nuevas estrategias de polinización.

En cuanto a la evolución de las flores de *Caiophora* polinizadas por colibríes, nótese que la forma de los estadios juveniles del desarrollo de las especies basales al género (fig.2), se corresponde con los aspectos morfológicos óptimos para la polinización mediada por colibríes. Los pétalos se encuentran con el unguículo (la parte inferior) retraído (lo que se corresponde con corolas cerradas) y los estaminodios sobresalen marcadamente por encima de la escama (fig.2). Estas características se revierten hacia rasgos más propicios para la polinización mediada por himenópteros (unguículos expandidos, por ende corolas abiertas, y estaminodios que no sobresalen mucho por encima de la escama) a medida que las estructuras aumentan de tamaño (fig. 2). Sin embargo, la polinización mediada por colibríes se beneficia de las características juveniles antes mencionadas siempre y cuando las flores sean de gran tamaño (por ende pétalos, escamas y estaminodios): sólo las flores de gran tamaño se encuentran en condiciones de producir los néctares altamente energéticos requeridos por estos polinizadores (Fenster et al., 2006; Ornelas et al., 2007). Estas combinaciones de forma y tamaño asociadas a la

polinización mediada por colibríes se pueden observar en la fig.3. La inexistencia de la combinación de forma y tamaño óptima para la polinización mediada por colibríes a lo largo de la trayectoria ontogenética ancestral podría explicar el requerimiento de variantes por fuera de los límites la ontogenia ancestral durante la radiación adaptativa de *Caiophora*.

DISCUSIÓN GENERAL

Algunos de los resultados del Capítulo II de esta tesis sugieren que en el género subandino *Caiophora* (Loasoideae, Loasaceae) la morfología de dos estructuras florales involucradas en el mecanismo de polinización (la corola y la escama nectarífera) evolucionó en el contexto de una radiación adaptativa. Esta diversificación macada habría comenzado a finales del Oligoceno (Shenk y Hufford, 2010), momento que coincide con la llegada de un nuevo polinizador, el colibrí, a Sudamérica (McGuire, 2014). Luego se habría potenciado por el levantamiento andino abrupto ocurrido entre el Mioceno medio y el Plioceno y los cambios climáticos que éste trajo aparejados (Mulch et al., 2010). La orogenia andina durante dicho período es considerada uno de los eventos más importantes que explican la diversificación de los linajes de angiospermas que habitan actualmente a grandes alturas en los Andes sudamericanos (Luebert y Weigend, 2014).

Dado que la variación sobre la cual actúa la selección se origina y es posiblemente sesgada por el desarrollo (Capítulo I), resulta interesante hacerse preguntas acerca de la relación entre la ontogenia floral y los patrones de diversificación adaptativa en angiospermas. Dicha pregunta resulta particularmente interesante en el contexto de una radiación adaptativa, donde la generación de variación novedosa ocurre de manera rápida. La evolución de la morfología floral en respuesta a un determinado tipo de polinizador ¿tiene como base un mismo programa de desarrollo? ¿Las radiaciones adaptativas, se encuentran sesgadas por la variación provista a lo largo de la trayectoria de desarrollo ancestral?

Las relaciones de forma y tamaño a lo largo de la ontogenia ancestral no habrían sesgado la diversificación de *Caiophora* (Capítulo V). La diversificación de este género habría requerido la generación de variación morfológica por fuera del patrón de desarrollo ancestral. En el género *Caiophora*, cuya radiación adaptativa se asocia con la llegada del colibrí a Sudamérica, la polinización mediada por estos agentes habría requerido la evolución de combinaciones de forma y tamaño florales que no estaban presentes a lo largo de la ontogenia ancestral (flores con forma “juvenil” pero de gran tamaño). Cada vez más evidencia demuestra que la selección natural en ambientes selectivos estables (donde un sólo óptimo resulta favorecido) favorece la evolución de sistemas de desarrollo que sean

robustos a las fluctuaciones ambientales (e.g. temperatura) y a la mutación. (Jablonka y Lamb, 2006; Capítulo I). No obstante, si ocurre un cambio importante y repentino en el ambiente selectivo (una situación frecuente en el contexto de las radiaciones adaptativas) algunas de las variantes de desarrollo menos robustas a estas perturbaciones pueden proveer una fuente de variación para hacer frente a los nuevos desafíos (Pfennig et al., 2012). En tal situación, el desarrollo promedio del linaje se desviaría de su curso original, dando lugar a nuevas trayectorias de desarrollo, las cuales comienzan a estabilizarse en torno a un nuevo óptimo (Jablonka y Lamb, 2006). Una vez que esto ocurre, el patrón de desarrollo ancestral se pierde (Hansen, 2006). Según Barrett (2013) esta pérdida del programa de desarrollo ancestral podría explicar la escases de reversiones en rasgos fenotípicos que atañen al sistema reproductivo de las angiospermas (ya sea al síndrome, al sistema de entrecruzamiento o al grado de generalismo) una vez que ocurrió una transición en alguno de estos aspectos. Es interesante destacar que en *Caiophora* tampoco se observan reversiones hacia las estrategias de polinización ancestrales una vez que ocurrieron transiciones en el síndrome (Capítulo II).

Si bien según los resultados del Capítulo IV la trayectoria de desarrollo floral no responde a la selección mediada por polinizadores, la no significancia de estos resultados podría deberse a que la diversificación de *Caiophora* es muy reciente. Esta diversificación reciente opacaría el efecto de los polinizadores sobre la morfología de distintas especies de *Caiophora*, ya que las diferencias morfológicas entre *Caiophora* y sus especies basales serían mucho más marcadas, debido a la mayor distancia evolutiva que las separa. Los resultados de este capítulo arrojan indicios de que la heterocronía podría haber facilitado la evolución de la polinización mediada por colibríes en *Caiophora* (a través de la pedomorfosis, o retención de características juveniles), así como también la evolución de la polinización mediada por roedores (a través de la peramorfosis, o sobre-desarrollo de los rasgos). En ese sentido, el patrón de desarrollo ancestral encontrado en la forma (no en la relación entre la forma y el tamaño) del pétalo y del complejo escama-estaminodios, podría haber sesgado y facilitado la evolución de la ornitofilia y de la polinización mediada por roedores en *Caiophora*. Considerando lo discutido en el Capítulo I, hacer uso de la variación provista de antemano a lo largo de la trayectoria de desarrollo ancestral puede constituir una ventaja, ya que no implica una desestructuración de la secuencia del desarrollo y los riesgos que ésta podría traer aparejada para otros estadios ontogenéticos o niveles de organización biológica. Correr por esta vía “fácil” sería sin embargo posible

sólo si el desarrollo ancestral pone a disponibilidad de la selección morfologías que permitan hacer frente a los nuevos desafíos ambientales.

CONCLUSIONES PARTICULARES

- La morfología floral del género *Caiophora* (Loasoideae, Loasaceae) habría evolucionado en el contexto de una radiación adaptativa.
- Una compensación (*trade-off*) entre la polinización mediada por himenópteros y la mediada por colibríes estaría involucrada en la optimización de la morfología floral de *Caiophora*.
- La selección mediada por polinizadores no afectaría la forma de la trayectoria ontogenética.
- La radiación adaptativa de la morfología floral de *Caiophora* no habría estado sesgada por la trayectoria de desarrollo ancestral.

CONCLUSIÓN GENERAL

La diversificación de la morfología de las flores desplegadas de Loasoideae en respuesta a la selección mediada por polinizadores, posiblemente ocurrió en el contexto de una radiación adaptativa. La ontogenia de Loasoideae no respondió a la selección mediada por polinizadores (si bien este resultado podría deberse a la reciente diversificación de *Caiophora*). Sin embargo, podría decirse que la heterocronía de la forma floral habría facilitado la evolución hacia la polinización mediada por colibríes (pedomorfosis) y por roedores (peramorfosis) en *Caiophora*. Las relaciones de forma y tamaño presentes a lo largo de la trayectoria de desarrollo ancestral no sesgaron la diversificación adaptativa de la morfología floral en *Caiophora*.

APORTES DE LA TESIS

El primer aporte de esta tesis es una propuesta teórica acerca de cómo la ontogenia floral y el hecho de que las flores desempeñen una función colectiva dentro de las inflorescencias podrían estar sesgando la diversificación morfológica de las flores. Por otra parte esta tesis brinda propuestas metodológicas de fácil implementación que permiten indagar acerca de la relación que existe entre la diversificación morfológica de las flores y la ontogenia de éstas. Estas propuestas incluyen, entre otras herramientas, el uso de la morfometría geométrica. Esta herramienta permite la obtención de variables que describen la forma y el tamaño de diferentes estructuras florales a lo largo de su ontogenia y también posibilita la búsqueda de patrones y el análisis estadístico de dichas variables con la incorporación de información filogenética. Es importante destacar que esta tesis incluye uno de los primeros trabajos en que la macroevolución floral se modela utilizando morfometría geométrica (Capítulo II) y el primero en el que dicha herramienta se utiliza para describir y explorar la evolución de la ontogenia floral (Capítulos IV y V).

BIBLIOGRAFÍA

Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. 2004. Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **11**: 36-42

Ackermann M, Weigend M. 2006. Nectar, floral morphology and pollination syndrome in Loasaceae subfam. Loasoideae (Cornales). *Annals of Botany* **98**: 503–514

Ackermann M. 2012. Studies on systematics, morphology and taxonomy of *Caiophora* and reproductive biology of Loasaceae and *Mimulus* (Phrymaceae). Tesis de doctorado. Universidad Libre de Berlín, Alemania.

Aigner PA. 2001. Optimality Modelling and Fitness Trade-Offs: When should plants become pollinator specialists? *Oikos* **95**: 177-184

Aigner PA. 2004. Floral specialization without trade-offs: optimal corolla flare in contrasting pollination environments. *Ecology* **85**:2560–2569.

Álvarez A, Perez S, Verzi DH. 2011. Ecological and phylogenetic influence on mandible shape variation of South American caviomorph rodents (Rodentia: Hystricomorpha). *Biological journal of the Linnean Society* **102**: 828-837

Alberch P, Gould SJ, Oster GF, Wake DB. 1979. Size and shape in ontogeny and phylogeny. *Paleobiology* **5**: 296-371

Ambrose BA, Espinosa-Matías S, Vásquez-Santana S, Vergara-Silva F, Martínez E, Márquez-Guzmán J, Álvarez-Buylla ER. 2006. Comparative developmental series of the Mexican Triurids support a Euanthial interpretation for the unusual reproductive axes of *Lacandonia schismatica* (Triuridaceae). *American Journal of Botany* **93**: 15-35

Armbruster WS, Pélabon C, Pérez-Barrales R, Maad J. 2009. The adaptive accuracy of flowers: measurement and microevolutionary patterns. *Annals of Botany* **103**: 1529-1545

Armbruster WS. 2012. Floral paedomorphy leads to secondary specialization in pollination of Madagascar *Dalechampia* (Euphorbiaceae). *Evolution* **67**: 1196–1203

Arthur W. 2011a. Developmental bias and constraint. En: W. Arthur eds. *Evolution, a developmental approach*. Oxford, Reino Unido: Blackwell Publishing, 200-217

Arthur W. 2011b. Mutation and developmental repatterning. En: W. Arthur eds. *Evolution. A developmental approach*. Oxford, Reino Unido: Blackwell Publishing, 77-92

Barrett CHB. 2013. The evolution of plant reproductive systems. How often are transitions irreversible? *Proceedings of the Royal Society B*. **280**: 20130913

Becker A, Alix K, Damerval K. 2011. The evolution of flower development: current understanding and future challenges. *Annals of Botany* **107**: 1427-1431

Benitez-Vieyra SM, Fornoni J, Pérez-Alquicira J, Boege K, Domínguez CA. 2014. The evolution of signal-reward correlations in bee- and hummingbird-pollinated species of *Salvia*. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* **281**: 1471-2954

Bergmann PJ, Berk CP. 2012. The evolution of positive allometry of weaponry in horned lizards (*Phrynosoma*). *Evolutionary Biology* **39**: 311-323

Box MS, Glover BJ. 2010. A plant developmentalist's guide to paedomorphosis: reintroducing a classic concept to a new generation. *Trends in Plant Sciences* **15**: 242-246

Brown DK, Kaul RB. 1981. Flower structure and mechanism in Loasaceae. *American Journal of Botany* **68**: 361-372

Butler MA, King AA. 2004. Phylogenetic comparative analysis: a modelling approach for adaptive evolution. *The American Naturalist* **164**: 683-695

Cannon CH, Manos PS. 2001. Combining and comparing morphometric shape descriptors with a molecular phylogeny: the case of fruit type evolution in Bornean *Lithocarpus* (Fagaceae). *Systematic biology* **50**:860–880

Classen-Bockhoff R, Speck T, Tweraser E, Waser P, Thimm S, Reith M. 2004. The staminal lever mechanism in *Salvia* L. (Lamiaceae): a key innovation for adaptive radiation? *Organisms, Diversity and Evolution* **4**: 189-205

- Cocucci AA, Sérscic AN. 1998.** Evidence of rodent pollination in *Caiophora coronata* (Loasaceae). *Plant Systematics and Evolution* **211**: 113-128
- Dafni A. 1994.** Note on side advertisement in flowers. *Functional Ecology* **8**: 136-138
- DeWitt Smith S, Ané C, Baum DA. 2008.** The role of pollinators in the floral diversification of *Iochroma* (Solanaceae). *Evolution* **62**: 793-806
- Diggle PK. 1997.** Ontogenetic contingency and flower morphology. The effects of architecture and resource limitation. *International Journal of Plant Sciences* **158**: 99-107
- Donohue K. 2014.** Why ontogeny matters during adaptation: developmental niche construction and pleiotropy in the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Evolution* **68**: 32-47
- Dornelas MC, Maistro Patreze C, Angenent GC, Immink RGH. 2012.** MADS: the missing link between identity and growth? *Trends in Plant Sciences*. **16**: 90-97
- Drummond AJ, Rambaut A. 2007.** BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 214
- Endress PK. 1990.** Patterns of floral construction in ontogeny and phylogeny. *Biological Journal of the Linnean Society* **39**: 163-175
- Endress PK. 2006.** Angiosperm floral evolution: morphological developmental framework. *Advances in Botanical Research* **4**: 1-61
- Fenster CB, Armbruster WS, Wilson P, Dudash MR, Thomson JD. 2004.** Pollination syndrome and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **25**: 375-403
- Fenster CB, Cheely G, Dudash MR, Reynolds RJ. 2006.** Nectar reward and advertisement in hummingbird-pollinated *Silene virginica* (Caryophyllaceae). *American Journal of Botany* **93**: 1800-1807
- Fisher RA. 1930.** *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford

Givnish TJ, Barfuss MHJ, Van Ee B, Riina R, Schulte K, Horres R, Gonsiska PA, Jabaily RS, Crayn DM, Smith JAC, Winter K, Brown GK, Evans TM, Holst BK, Luther H, Till W, Zizka G, Berry PE, Sytsma KJ, 2014. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **71**: 55-78

Gómez JM, Perfectti F, Camacho PM. 2006. Natural selection on *Erysimum mediohispanicum* flower shape: insights into the evolution of zygomorphy. *The American Naturalist* **168**: 531-545

Gould SJ. 2004. La integración y la adaptación (la estructura y la función) en la ontogenia y la filogenia: constricciones históricas y la evolución del desarrollo. En: SJ. Gould eds. *La estructura de la teoría de la evolución*: 1054-1208

Green A, Kennaway JR, Hanna AI, Bangham JA, Coen E. 2010. Genetic control of organ shape and tissue polarity. *Plos Biology* **8**: 1- 16

Guerrant Jr. EO. 1982. Neotenic Evolution of *Delphinium nudicaule* (Ranunculaceae): A Hummingbird-Pollinated Larkspur. *Evolution* **36**: 699-712

Hallgrímsson B, Jamniczky H, Young NM, Rolian C, Parsons TE, Boughner JC, Marcucio RS. 2009. Deciphering the palimpsest: studying the relationship between morphological integration and phenotypic covariation. *Evolutionary Biology* **36**:355–376

Hansen T.F. 1997. Stabilizing selection and the comparative analysis of adaptation. *Evolution* **51**:1341–1351.

Hansen T.F. 2006. The Evolution of Genetic Architecture. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. **37**:123–57

Harder LD, Barret SCH, Cole WW. 2000. The mating consequences of sexual segregation within inflorescences of flowering plants. *Proceedings of the royal society* **267**: 315-320

Harder LD, Prusinkiewicz P. 2012. The interplay between inflorescence development and function as the crucible of architectural diversity. *Annals of Botany* **112**: 1477-1493

Hodges SA, Arnold ML. 1995. Spurring plant diversification: are floral nectar spurs a key innovation? *Proceedings of the royal society* **262**: 343-348

Hufford L. 2003. Homology and developmental Transformation: models for the origins of the staminodes of Loasaceae Subfamily Loasoideae. *International Journal of Plant Sciences* **164**: 409–439

Hufford L. 2005. A phylogenetic analysis of Loasaceae, subfamily Loasoideae based on plastid DNA sequences. *International Journal of Plant Sciences* **166**: 289-300

Jablonka E, Lamb MJ. 2006. *Evolution in Four Dimensions: Genetic, Epigenetic, Behavioral, and Symbolic Variation in the History of Life*. EEUU. Massachusetts Institute of Technology..

Johnson SD. 2006. Pollinator-driven speciation in plants. En: LD. Harder, SCH Barret eds. *Ecology and evolution of flowers*. Oxford, Reino Unido: Oxford University Press, 295-311

Kay KM, Reeves PA, Olmstead RG, Schemske DW. 2005. Rapid speciation and the evolution of hummingbird pollination in Neotropical *Costus* subgenus *Costus* (Costaceae): evidence from nrDNA ITS and ETS sequences. *American Journal of Botany* **92**: 1899-1910

Katoh K, Misava K, Kuma K, Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acid research* **30**: 3059-3066

Kingsolver JG, Diamond SE, Seiter SA, Higging JK. 2012. Direct and indirect phenotypic selection on developmental trajectories in *Manduca sexta*. *Functional Ecology* **26**: 598–607

- Klingenberg PK. 1998.** Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biological Reviews* **73**: 79-123
- Klingenberg PK. 2010.** Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nature reviews* **11**: 623- 633
- Klingenberg PK. 2011.** Morpho J: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* **11**: 353-357
- Laux T, Mayer KF, Jürgens G. 1996.** The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* **122**: 87-96
- Lomáscolo SB, Levey DJ, Kimball RT, Bolker BM, Alborn HT. 2010.** Dispersers shape fruit diversity in *Ficus* (Moraceae). *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*. **107**: 14668–14672
- Losos JB, Miles DB. 2002.** Testing the hypothesis that a clade has adaptively radiated: iguanid lizard clades as a case study. *The American naturalist* **160**: 147-157
- Losos, JB. 2011.** Convergence, adaptation, and constraint. *Evolution* **65**: 1827-1840
- Lloyd DG, Webb CJ. 1986.** The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms I. Dichogamy. *New Zeland Journal of Botany* **24**: 135-162
- Luebert FE, Weigend M. 2014.** Phylogenetic insight into Andean plant diversification. *Frontiers in Ecology and Evolution*. **2**. doi:10.3389/fevo.2014.00027
- Martins EP, Diniz JAF, Housworth EA. 2002.** Adaptive constraints and the phylogenetic comparative method: a computer simulation test. *Evolution* **56**:1-13.
- McGuire JA, Witt CC, Remsen Jr. JV, Corl A, Rabosky DL, Altshuler DL, Dudley L. 2014.** Molecular phylogenetics and the diversification of hummingbirds. *Current Biology* **24**: 910-916

- Monteiro L. 1999.** Multivariate regression models and geometric morphometrics: the search of causal factors in the analysis of shape. *Systems Biology* **48**: 192-199
- Muchhala N. 2007.** Adaptive trade-offs in flower morphology mediates specialization for flowers pollinated by bats and hummingbirds. *The American Naturalist*. **169**: 494-504
- Mulch A, Uba CE, Strecker MR, Schoenberg R, Chamberline CP. 2010.** Late Miocene climate variability and surface elevation in the central Andes. *Earth and Planetary Science Letters* **290**: 173-182
- Müller J, Quandt D, Neinhuis C. 2005.** PhyDe – Phylogenetic Data Editor. Programa distribuido por el autor.
- Oksanen, JF, Blanchet G, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MH, Wagner H. 2013.** vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-10. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Ollerton J, Killick A, Lamborn E, Watts S, Whiston M. 2007.** Multiple meanings and modes: on the many ways to be a generalist flower. *Taxon* **56**: 717-728
- Olson EC y Miller RL. 1958.** *Morphological Integration*. University of Chicago Press, Chicago.
- Ornelas JF, Ordano M, De-Nova AJ, Quintero ME, Garland Jr T. 2007.** Phylogenetic analysis of interspecific variation in nectar of hummingbird-visited plants. *Journal of Evolutionary Biology* **20**: 1904-1917
- Paradis E, Claude J, Strimmer K. 2004.** APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* **20**: 289-290
- Peres-Neto PR, Jackson DA. 2001.** How well do multivariate data sets match? The advantages of a Procrustean superimposition approach over the Mantel test. *Oecologia* **129**:169–178

Pfennig DW, Wund MA, Snell-Rood EC, Cruickshank T, Schlichting CD, Moczek AP. 2012. Phenotypic plasticity's impact on diversification and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* **25**: 459-467

Pigliucci M. 2003. Phenotypic integration. Studying the ecology and evolution of complex phenotypes. *Ecology letters* **6**: 265–272

Puzey JR, Gerbode SJ, Hodges SA, Kramer EM, Mahadevan L. 2012. Evolution of spur-length diversity in *Aquilegia* petals is achieved solely through cell-shape anisotropy. *Proceedings of the Royal Society* **279**: 1640-1645

R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

Revell LJ, Mahler DL, Peres-Neto PR, Redelings BD. 2011. A new phylogenetic method for indentifying exceptional phenotypic diversification. *Evolution* **66**: 135-146

Revell LJ. 2012. phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution* **3**: 217-233

Rogers 2006. Programmed cell death in floral organs: How and why do flowers die? *Annals of Botany* **97**: 309-315

Rohlf FJ. 2009. TPS series software. Disponible en: <http://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html>

Rosas-Guerrero V, Aguilar R, Martén-Rodríguez S, Ashworth L, Lopezaraiza-Mikel M, Bastida JM, Quesada M. 2014. A quantitative review of pollination syndromes: do floral traits predict effective pollinators? *Ecology Letters* **17**: 388–400

Rudall PJ, Bateman RM. 2003. Evolutionary change in flowers and inflorescences: evidence from naturally occurring terata. *Trends in Plant Sciences* **8**: 76–82

Schenk JJ, Hufford L. 2010. Effects of substitution models on divergence time estimates: Simulations and an empirical study of model uncertainty using Cornales. *Systematic Botany* **35**: 578-592

Shoval O, Shefter H, Shinar G, Hart Y, Ramote O, Mayo A, Dekel E, Kavanagh H, Alon U. 2012a. Evolutionary trade-offs, Pareto optimality, and the geometry of phenotype space. *Science* **336**: 1157-1160

Shoval O, Shefter H, Shinar G, Hart Y, Ramote O, Mayo A, Dekel E, Kavanagh H, Alon U. 2012b. Supplementary materials for evolutionary trade-offs, Pareto optimality, and the geometry of phenotype space. *Science* **336**: 1157-1160

Stayton CT. 2008. Is convergence surprising? An examination of the frequency of convergence in simulated data sets. *Journal of theoretical biology* **252**: 1-14

Stebbins GL. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1**: 307-326.

Thomson JD, Wilson P. 2008. Explaining evolutionary shifts between bee and hummingbird pollination: convergence, divergence and directionality. *International Journal of Plant Sciences* **169**: 23-38

Tseng ZJ. 2013. Testing Adaptive Hypotheses of Convergence with Functional Landscapes: A Case Study of Bone-Cracking Hypercarnivores. *Plos one* DOI: 10.1371/journal.pone.0065305

van der Niet T, Johnson SD. 2012. Phylogenetic evidence for pollinator driven diversification of angiosperms. *Trends in Ecology and Evolution* **27**: 353-361

Walsh B, Blow MW. 2009. Abundant genetic variation + strong selection = multivariate genetic constraints. A geometric view of adaptation. *Annual review of ecology, evolution and systematic* **40**: 41-59

Wagner GP. 2001. Characters, units and natural kinds: an introduction. En: GP. Wagner Eds. *The Character Concept in Evolutionary Biology*. San Diego, California. EEUU: Academic Press, 1-10

Wagner GP, Amemiya C, Ruddle F. 2003. Hox cluster duplications and the opportunity for evolutionary novelties. *Proceeding of the national academy of sciences of the United States of America.* **100:** 14603-14606

Wagner A. 2011. Genotype networks shed light on evolutionary constraints. *Trends in ecology and evolution* **26:** 577-584

Waser NM, Chittka L, Price MV, Williams NM, Ollerton J. 1996. Generalization in pollination systems and why it matters. *Ecology* **77:** 1043-1060

Weigend M, Ackermann M, Henning T. 2010. Reloading the revolver- male fitness as a simple explanation for complex reward partitioning in *Nasa macrothyrsa* (Loasaceae, Cornales). *Botanical Journal of the Linnean Society* **100:** 124-131

Whittall JB, Hodges SA 2007. Pollinator shifts drive increasingly long nectar spurs in columbine flowers. *Nature* **447:** 706-709

Zelditch ML. 2012. *Geometric Morphometrics for Biologists. A Primer.* San Diego, California, EEUU: Elsevier Academic Press.

APÉNDICE

Apéndice 1. Números de acceso en Genbank de las secuencias plásticas matK y trnL-trnF de las especies de Loasaceae utilizadas para confeccionar la filogenia del Capítulo II.

Especie	No. Acceso GenBank	
	matK	trnL-trnF
<i>Aosa rostrata</i>	AY781437	AY781512
<i>Blumenbachia hieronymii</i>	AY250186	AY254226
<i>Blumenbachia latifolia</i>	AF503324	AY254227
<i>Blumenbachia silvestris</i>	KM349823	AY285684
<i>Caiophora canarinoides</i>	AF503325	AY254231
<i>Caiophora carduifolia</i>	AF503328	AY254232
<i>Caiophora cernua</i>	KM349821	KM349825
<i>Caiophora chuquitensis</i>	AF503329	AY254233
<i>Caiophora circiifolia</i>	AF503327	AY254235
<i>Caiophora clavata</i>	AY254060	AY254236
<i>Caiophora coronata</i>	AY781442	AY781516
<i>Caiophora dumertorum</i>	KM349822	
<i>Caiophora eichlerii</i>	AY781443	AY781517
<i>Caiophora hibiscifolia</i>	AY781444	AY781518
<i>Caiophora lateritia</i>	JF308701	
<i>Caiophora macrocarpa</i>	AY781445	AY781519
<i>Caiophora nivalis</i>	KM349824	AY388480
<i>Caiophora stenocarpa</i>	AY781446	AY781520
<i>Loasa acerifolia</i>	KM349820	AY285697
<i>Loasa bergii</i>	AY781449	AY781523
<i>Loasa elongata</i>	AY781450	AY781524
<i>Loasa gayana</i>	AY781452	AY781526
<i>Loasa heterophylla</i>	AY254066	AY285702
<i>Loasa malesherbioides</i>	AF503318	AY254251
<i>Loasa nana</i>	AY781454	AY781528
<i>Loasa pallida</i>	AF503322	AY254252
<i>Mentzelia albescens</i>	AY254068	AY254254
<i>Presliophytum arequipense</i>	AY254091	AY254293
<i>Presliophytum heucherifolium</i>	AY254092	AY254294
<i>Presliophytum incanum</i>	AY254093	AY254295
<i>Scyphanthus elegans</i>	AF503334	AY254298