

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas:

“AISLAMIENTO REPRODUCTIVO EN
SISYRINCHIUM (IRIDACEAE):
ANÁLISIS DE LA POSIBILIDAD
DE ESPECIACIÓN SIMPÁTRICA Y DE
DESPLAZAMIENTO DE CARACTERES”

Tesista: Biol. Evangelina Glinos
Director: Dr. Andrea A. Cocucci

Lab. Ecología evolutiva y Biología Floral
Instituto Multidisciplinario
de Biología Vegetal
IMBIV - CONICET

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Universidad Nacional de Córdoba



TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“AISLAMIENTO REPRODUCTIVO EN *SISYRINCHIUM*
(IRIDACEAE): ANÁLISIS DE LA POSIBILIDAD DE
ESPECIACIÓN SIMPÁTRICA Y DE DESPLAZAMIENTO DE
CARACTERES”**

por

Biol. Evangelina Glinos

Director/a: Andrea A. Cocucci

Lugar de Trabajo

**Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral
IMBIV-CONICET**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

Córdoba, Argentina

2013

COMISIÓN ASESORA

- Dr. Andrea A. Cocucci (Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba).
- Dra. Beatríz Ofelia Saidman (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires).
- Dra. Liliana Katinas (Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata).

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

TRIBUNAL

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

Firma:

Aclaración:

AGRADECIMIENTOS

A las cientos de plantitas que observé en el campo... por su belleza.

A mi director Andrea Cocucci por su confianza, su generosidad, sus sugerencias, su ayuda, su paciencia.

A Alicia Sérsic por las charlas y momentos compartidos en estos años y por permitirme ser parte de los proyectos del laboratorio.

A los miembros de mi comisión asesora Dra. Beatriz. O. Saidman y Dra. Liliana Katinas por sus aportes y sugerencias a lo largo de esta tesis.

A las autoridades del IMBIV por permitirme realizar la tesis en el instituto y hacer uso de las instalaciones.

A CONICET por la beca doctoral.

A mis “co-directores” Andre y Santi por la ayuda incondicional y desinteresada, especialmente en los aspectos moleculares y estadísticos.

A Laura Las Peñas por ayudarme y alentarme con las técnicas cromosómicas.

A los chicos del lab por la paciencia, las charlas, las sugerencias, la compañía, los mates, los consejos, las risas...

A la Andreuchi por horas y horas de charla.

A Martín y Santi por ser mis amiguitos y quererme a pesar de ser una “esperanza honoraria”.

A mi familia por su amor y por apoyarme siempre.

A Lu, Rous e Irens por su amistad.

Al grupo de “apoyo terapéutico y festivo” de Agua de Oro: Danii, Sil, Clau, Flor, Blas, Flaco, Joel, Anita y Anita.

A Danii por compartir y acompañarme en este proceso. Gracias por tan hermosos años!

A los ayudantes de campo: Danii, Andre, Santi, Caro Diller, Vale, Indio, Marina...

ÍNDICE

RESÚMEN	1
SUMMARY	2
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
Hipótesis.....	6
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos.....	6
Especies de <i>Sisyrinchium</i> estudiadas.....	7
Bibliografía.....	10
CAPÍTULO 1: PATRONES DE AISLAMIENTO REPRODUCTIVO PRE-ZIGÓTICO EN POBLACIONES SIMPÁTRICAS DE <i>SISYRINCHIUM</i>. EVALUACIÓN DE LA IMPORTANCIA DE BARRERAS TEMPORALES Y FLORALES.	
Introducción.....	12
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
Materiales.....	16
Sitios de estudio.....	16
Métodos.....	18
Resultados.....	24
Discusión.....	34
Bibliografía.....	65
CAPÍTULO 2: SELECCIÓN FENOTÍPICA SOBRE UN RASGO VINCULADO AL AISLAMIENTO MECÁNICO EN POBLACIONES SIMPÁTRICAS DE <i>SISYRINCHIUM</i>	
Introducción.....	69
Objetivos generales.....	70
Materiales y Métodos.....	70
Resultados.....	72

Discusión.....	73
Bibliografía.....	81

CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DE LA POSIBILIDAD DE QUE *SISYRINCHIUM CHILENSE* Y *SISYRINCHIUM IRIDIFOLIUM* SSP. *VALDIVIANUM* SE HAYAN ORIGINADO EN EL CONTEXTO DE LA SIMPATRÍA.

Introducción.....	83
Objetivo general.....	84
Objetivos específicos.....	85
Materiales y Métodos.....	85
Resultados.....	87
Discusión.....	88
Bibliografía.....	95

CAPÍTULO 4: ANÁLISIS DE LA POSIBILIDAD DE DESPLAZAMIENTO DE CARACTERES EN *SISYRINCHIUM CHILENSE* Y *SISYRINCHIUM IRIDIFOLIUM* SSP. *VALDIVIANUM*

Introducción.....	98
Objetivo general.....	99
Objetivos específicos.....	99
Sitios de estudio.....	100
Métodos.....	100
Resultados.....	107
Discusión.....	112
Bibliografía.....	137

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....	139
--	------------

RESÚMEN

El aislamiento reproductivo es uno de los principales factores determinantes de la especiación y del mantenimiento de especies coexistentes. La aparición de mecanismos de aislamiento temporal y mecánico puede estar vinculada a diversos procesos, tales como especiación simpátrica, poliploidía y desplazamiento de caracteres. *Sisyrinchium* es el mayor género de Iridáceas polinizado por abejas colectoras de aceites. En varias localidades dentro su área de distribución conviven dos o más especies oleíferas que comparten como polinizadores a especies del género *Lanthanomelissa*. Evidencia preliminar sugiere que *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* se mantienen aisladas por dos mecanismos: separación horaria en la floración y separación topográfica en el depósito de polen sobre el cuerpo de abejas de la especie *L. discrepans*. El objetivo general de esta tesis fue determinar si estas especies podrían haberse originado mediante especiación en simpatría y evaluar la posible existencia de desplazamiento de caracteres. En poblaciones donde coexisten dos o más especies y mediante ensayos de sistema reproductivo, observaciones de polinizadores y patrones de floración diaria, se estimó el nivel de aislamiento reproductivo total y las contribuciones de barreras florales y temporales. El aislamiento temporal y el mecánico resultaron ser de las barreras más importantes en dos combinaciones de especies: *S. chilense* - *S. iridifolium ssp. valdivianum* y *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum* - *S. platense*. Por otro lado, se evaluaron las distribuciones geográficas de *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* y su nivel de ploidía. Además, se mapeó un rasgo vinculado al aislamiento mecánico (arquitectura floral) en una filogenia ya existente. Si bien no se hallaron indicios de especiación simpátrica, estudios más profundos son necesarios. *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* resultaron poliploides pero se desconoce si la aparición de barreras temporales y mecánicas estaría asociada a cambios en el nivel de ploidía. El carácter arquitectura floral parece haber sido ancestralmente rotáceo y habría evolucionado independientemente en varias oportunidades hacia el fenotipo hipocrateriforme, que está asociado significativamente con la polinización por abejas colectoras de aceites. Finalmente se compararon variables fenotípicas claves en poblaciones simpátricas y alopátricas de ambas especies y se realizaron análisis de selección fenotípica, no detectándose patrones consistentes con procesos de desplazamiento de caracteres vinculados al depósito diferencial de polen. Se encontraron indicios de que la separación temporal podría explicarse por este tipo de mecanismo en al menos una de las poblaciones mixtas.

SUMMARY

Reproductive isolation plays a key role in the formation and maintenance of species in nature. The origin of temporal and mechanical isolating mechanisms can be related with different processes such as sympatric speciation, polyploidy and character displacement. *Sisyrinchium* is the largest genus of Iridaceae pollinated by oil collecting bees. In several places within its range of distribution two or more oil-bearing species pollinated by bees of the genus *Lanthonomelissa* coexist. It has been suggested that *S. chilense* and *S. iridifolium ssp. valdivianum* would remain isolated by two mechanisms: different timings of flowering during the day and different places of pollen deposition on the bees' bodies. The purpose of the present study was to determine if the two species mentioned could have originated by sympatric speciation and to evaluate the possibility of character displacement. In sympatric populations, breeding system experiments and observations of pollinators and flowering patterns were carried out. The level of total isolation and the contribution of temporal and floral barriers were estimated. In two combinations of species (*S. chilense* - *S. iridifolium ssp. valdivianum* and *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum* - *S. platense*) temporal and mechanical barriers were the main isolating mechanisms. Also, geographical distributions and ploidy level of *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* were evaluated. In addition, a trait associated with mechanical isolation (floral morphology) was mapped in an already existing phylogeny. Evidence of sympatric speciation was not detected, nevertheless more studies are needed to fully confirm this result. Both species were polyploids but it is not clear if the origin of temporal and mechanical barriers are associated with changes in ploidy level. The ancestral state of floral morphological type would be flat perianth which would have evolved to cupped perianth several times independently. Species with cupped perianth were significantly correlated with oil collecting bees. Finally, flower traits associated with isolation mechanisms were compared between sympatric and allopatric populations of both species and phenotypic selection analysis were carried out. No evidence of character displacement associated with pollen deposition in different parts of pollinators' bodies was found. Temporal isolation can be explained by this mechanism in at least one of the populations studied.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La coexistencia de especies de plantas filogenéticamente próximas permite evaluar hipótesis relevantes acerca de los mecanismos evolutivos implicados en dicha convivencia.

El aislamiento reproductivo es uno de los principales factores determinantes de la especiación y del mantenimiento de especies coexistentes ya que impide los cruzamientos interespecíficos y mantiene los bancos genéticos aislados (Futuyma 2005). En este contexto interesan las barreras pre-zigóticas pregaméticas, tales como: el aislamiento de hábitat, temporal, de sistema reproductivo, etológico y mecánico (Coyne y Orr 2004, Futuyma 2005). En el aislamiento etológico el flujo génico interespecífico se ve restringido porque las flores de las distintas especies son visitadas por diferentes polinizadores que las distinguen por su color, olor, recompensa o morfología. Por su parte, el aislamiento mecánico implica la imposibilidad física de los polinizadores para visitar las flores de determinadas especies de plantas o, en el caso de poder visitarlas, el polen queda depositado en diferentes partes del cuerpo de los mismos polinizadores. El aislamiento de especies simpátricas debido a estos dos mecanismos (mecánico y etológico) es conocido conjuntamente como aislamiento floral (ejemplos de este tipo de aislamiento se encuentran resumidos en Grant 1994). Por otro lado, el aislamiento temporal se presenta cuando la floración y la polinización se producen en diferentes momentos durante el año o durante el día (Coyne y Orr 2004), tal como ocurre, por ejemplo, en *Zaluzianskya* (Scrophulariaceae), género en el que especies con floración diurna son polinizadas por nemestrínidos, mientras que las especies que florecen por la noche son visitadas por esfíngidos (Archibald et al. 2004, Johnson et al. 2002).

Sin embargo, que las especies de plantas se encuentren aisladas en la actualidad por barreras florales o temporales no necesariamente implica que se hayan originado por su causa. La aparición de mecanismos de aislamiento temporal y mecánico puede estar vinculada a los siguientes procesos: **especiación simpátrica, poliploidía, desplazamiento de caracteres** o “**reinforcement**” (efecto Wallace).

Si bien existe controversia en cuanto a la existencia de **especiación simpátrica**, la misma es teóricamente posible. El modelo más convincente para explicarla es la selección disruptiva (Coyne y Orr 2004). La especiación simpátrica debida a separación topográfica en la aplicación de polen sobre distintas partes del cuerpo del polinizador sería posible, como lo sugiere la existencia de especies próximas que comparten la misma especie de polinizador pero que poseen distintos mecanismos de entrega de polen (Cocucci y Vogel

2001, Paulus y Gack 1997, Grant 1994, Kwak 1978, Dressler 1968). Sin embargo, no se ha probado ningún caso en que barreras florales mecánicas y con el mismo polinizador hayan conducido a la especiación simpátrica. En cuanto al aislamiento temporal, si bien cambios en los tiempos de floración de las especies pueden, por si mismos ocasionar especiación simpátrica, no existe evidencia que indique que este mecanismo operaría con frecuencia en la naturaleza (Coyne y Orr 2004).

Por su parte, se ha comprobado que los cambios en el nivel de ploidía pueden provocar cambios en caracteres tales como la morfología de las flores y los tiempos de floración de las plantas (Segraves y Thompson 1999) y se tiene conocimiento de que la poliploidización es un mecanismo de especiación en simpatría común en las Angiospermas (Albert y Schluter 2005).

Alternativamente, las especies que conviven, aunque filogenéticamente próximas, pueden haber resultado de procesos de especiación alopátrica antes de llegar a ocupar un mismo sitio. En este caso, el aislamiento floral o temporal entre dichas especies coexistentes puede ser el resultado de desplazamiento de caracteres. El **desplazamiento de caracteres** se define como una mayor diferencia entre dos especies en caracteres fenotípicos claves en poblaciones simpátricas que en poblaciones alopátricas (Futuyma 2005, Grant 1994, Hansen et al. 2000). En el caso de las plantas con flores éste puede ser el resultado de la competencia interespecífica por el mismo polinizador. La competencia puede producirse porque una de las especies de plantas es más eficaz en atraer a los polinizadores ó, aunque los polinizadores visiten indistintamente a ambas especies, porque el polen heteroespecífico cubre y satura los estigmas impidiendo la llegada o germinación de granos de polen conespecíficos. Estos efectos pueden ejercer presiones selectivas que lleven a una reducción de la competencia por el polinizador entre plantas que los comparten. Ante estas presiones las plantas pueden evolucionar hacia flores con distinto color o recompensas para atraer a otros tipos de polinizadores, o adquirir distinta morfología que permita, por ejemplo, la deposición diferencial de polen sobre los polinizadores (Miyake y Inoue 2003).

Varios estudios han documentado desplazamiento en caracteres relacionados a la polinización tales cómo, la longitud de las piezas fértiles, el lugar de depósito del polen sobre los mismos polinizadores, el tiempo de floración, el largo de la corola, etc (Miyake y Inoue 2003, Armbruster y Herzig 1984, Brown y Brown 1979) pero sólo en uno de ellos se evaluó el efecto de la selección fenotípica mediada por polinizadores (Caruso 2000). Si la divergencia en caracteres florales claves es consecuencia de la competencia por el

polinizador, entonces se espera que el modo e intensidad en que la selección natural está operando se vea influenciada por la presencia o ausencia de la especie competidora (Caruso 1999, 2000).

Finalmente, el “**reinforcement**” se da cuando especies que se originaron en alopatría entran en contacto geográfico, existiendo aún entre ellas cierto grado de hibridación. Como los híbridos no son aptos, los individuos que se cruzan con su propio taxón disfrutan de una ventaja en el éxito reproductivo, favoreciéndose así la evolución de barreras prezigóticas ya existentes. A diferencia de lo que ocurre en el desplazamiento de caracteres, donde las especies no pueden formar híbridos, en los casos de “reinforcement” el aislamiento postzigótico no es total por lo que se produce la hibridación (Coyne y Orr 2004).

Especies de *Sisyrinchium* proporcionan un modelo interesante para poner a prueba hipótesis de aislamiento reproductivo, especiación simpátrica y desplazamiento de caracteres.

Sisyrinchium se distribuye principalmente en el Nuevo Mundo e incluye, según los autores, desde cerca de 100 (Goldblatt et al. 1990) hasta 200 especies (Rudall et al. 1986). Es el mayor género de Iridáceas polinizado por abejas colectoras de aceites. En varias localidades dentro del área de distribución de *Sisyrinchium* conviven dos o más especies oleíferas, que suponemos comparten como polinizadores a especies colectoras de aceites del género *Lanthonomelissa*. Según la información disponible (Cocucci y Vogel 2001), estos insectos dependen exclusivamente de *Sisyrinchium* como fuente de aceites para alimentar a sus larvas e impermeabilizar sus nidos (e.g. Rozen et al. 2006, Buchman 1987, Cane et al. 1983). Se ha presentado evidencia preliminar que sugiere que *Sisyrinchium chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum*, ambas polinizadas por abejas de la especie *Lanthonomelissa discrepans*, se mantienen aisladas por dos mecanismos: separación horaria en la floración y separación topográfica en el depósito de polen sobre el cuerpo de las abejas ocasionado, principalmente, por las diferencias morfológicas en las flores de ambas especies (Cocucci y Vogel 2001).

No son muchos los modelos de interacciones planta-polinizador en los que, como en el caso de *Sisyrinchium*, las plantas dependan de una sola especie de polinizador. En este sistema de especies coexistentes es interesante responder si las mismas se encuentran efectivamente aisladas por barreras florales y temporales y si su existencia puede ser el resultado de especiación simpátrica. Además interesa saber si la competencia por el polinizador ha tenido como resultado selectivo el desplazamiento de caracteres. Es decir,

debería evaluarse si la competencia por un único vector de polen, tiene efectos en la fuerza o dirección de la selección de los distintos rasgos florales.

El estudio se centrará en dos hipótesis independientes sobre la existencia de especiación simpátrica y desplazamiento de caracteres.

HIPÓTESIS

Si las dos especies en cuestión se hubieran originado por **especiación simpátrica**, se espera que: 1) las especies tengan una distribución en gran parte simpátrica, 2) ambas estén aisladas reproductivamente por alguno de los mecanismos mencionados; 3) que sean filogenéticamente hermanas.

Si la diferenciación morfológica actual entre las especies fuera consecuencia de **desplazamiento de caracteres** debido a la competencia por el polinizador, se espera que el mismo conduzca a mayores diferencias fenotípicas (por ejemplo en la longitud de la columna estaminal) entre especies en poblaciones mixtas que en poblaciones monoespecíficas. Además, por la misma causa, se esperaría: selección divergente en poblaciones mixtas

OBJETIVO GENERAL

Determinar si dos especies coexistentes de *Sisyrinchium* (*S. iridifolium* ssp. *valdivianum* y *S. chilense*) podrían haberse originado mediante especiación en simpatría y evaluar la posible existencia de desplazamiento de caracteres.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar cuál es la importancia de las barreras reproductivas pre-zigóticas que mantienen aisladas a especies de *Sisyrinchium* que crecen en simpatría (**Capítulo 1**).

- Determinar si la longitud de la columna estaminal (variable vinculada al aislamiento mecánico) de especies coexistentes de *Sisyrinchium* está sujeta a selección, qué tipo de selección está actuando (direccional, estabilizadora o disruptiva) y con qué intensidad (**Capítulo 2**).

- Analizar los resultados de los análisis de selección teniendo en cuenta el sistema reproductivo, los principales polinizadores y la fuerza de las distintas barreras reproductivas para cada especie y en cada sitio (**Capítulo 2**).

- Determinar si especies coexistentes y separadas por barreras temporales y mecánicas se originaron por especiación en simpatria (**Capítulo 3**).

- Determinar si los patrones actuales observados podrían haberse originado por desplazamiento de caracteres debido a competencia por el mismo polinizador (**Capítulo 4**).

ESPECIES DE *SISYRINCHIUM* ESTUDIADAS

Las flores de las especies oleíferas de *Sisyrrinchium* estudiadas en esta tesis presentan elaióforos distribuidos principalmente en la base de la columna estaminal. Dichas glándulas florales están compuestas de tricomas unicelulares capitados. La cutícula de la cabeza de los tricomas debe ser abierta por setas especiales que se encuentran presentes en las patas delanteras de abejas del género *Lanthanomelissa* para la extracción de los aceites contenidos en el espacio subcuticular (Cocucci y Vogel 2001). A diferencia de los que ocurre en otros géneros como en *Calceolaria* donde la antesis de las flores dura varios días y los aceites son secretados continuamente, en *Sisyrrinchium* los aceites florales no se reponen (Cocucci y Vogel 2001).

Dada la confusa taxonomía del género, la existencia de múltiples sinonimias y a la variabilidad encontrada en las distintas poblaciones, en esta tesis se adoptó como criterio para la identificación de las especies el establecido por Ravenna (1969 a y b y 2001). A continuación se detallan las principales características de las especies estudiadas según dicho autor:

S. pachyrhizum ssp pachyrhizum: Plantas de 9 a 25 cm de alto. Rizoma muy poco evidenciado con raíces carnosas-fibrosas. Hojas basales muchas, linear-ensiformes, de 6-12 cm de largo y 0.7-2mm de ancho. Flores rotáceas amarillas con manchas pardas hacia el centro. Tépalos apiculados. Columna estaminal alargada aproximadamente de 2,5 mm, densamente cubierta de glándulas amarillas hacia la base. Anteras contiguas. Ovario

obovoide. Ramas del estilo muy pequeñas. Cápsulas irregulares obovoides o casi globosas. Semillas negras muy pequeñas (Fig. 1A).

S. chilense: Plantas de entre 8-36 cm de altura. Rizoma breve, vertical u oblicuo con raíces fasciculadas, fibroso-carnosas. Hojas basales de 6,5-22 cm por 1,3 mm, ensiformes. Flores infundibuliformes de color azul-violáceo, hacia el centro amarillas. Tépalos apiculados. Columna estaminal alargada de 2 a 2,5 mm, glandulosa hacia la base. Anteras erguidas. Ovario obovado. Ramas del estilo muy pequeñas. Cápsulas obovadas con semillas muy pequeñas, negras y angulosas (Fig. 1B).

S. platense: Plantas de 10-50 cm de altura. Raíces carnosas-fibrosas, con frecuencia rojizas. Hojas basales muchas de color verde-grisáceo, de 10-25 cm de largo y 2-4 mm de ancho. Flores violáceas. Tépalos apiculados, conniventes en una copa y amarillentos hacia la base. Columna estaminal de 1.9 mm de largo aproximadamente engrosada y densamente glandulosa hacia la base. Anteras contiguas, derechas. Ovario obovoide. Ramas del estilo muy pequeñas. Cápsulas obovoides o casi globosas, irregulares. Semillas muy pequeñas, negras (Fig. 1C).

S. iridifolium ssp. valdivianum: Plantas que varían entre 7 y 40 cm de altura. Rizoma muy breve que origina raíces tenues. Hojas basales de 3-15 cm de largo por 1-6mm de ancho, ensiformes, con frecuencia extendidas. El color de las flores varía de azul-violáceo a blanco con tintes purpúreos hacia la base de la lámina. Tépalos conniventes hacia la base a modo de copa. Columna de 1-1,2 mm, engrosada y densamente glandulosa hacia la base. Anteras algo incurvas con la dehiscencia. Ovario casi globoso. Ramas del estilo extendidas. Cápsulas globosas sobre pedicelos horizontales o reflexas. Semillas pequeñas, negras y angulosas (Fig. 1D).

Cabe aclarar que Rodríguez (1986) considera a esta especie y a *S. chilense* como una única especie.

S. unguiculatum: Plantas perennes de 20 a 33 cm de altura. Rizoma compacto que origina varias raíces fibrosas fasciculadas. Perigonio amarillo brillante con forma de estrella, con diminutas manchas marrones en el centro. Columna estaminal filiforme, amarilla y glabra. Anteras conniventes en el ápice. Ovario obovoide. Estilo filiforme extremadamente delgado, blanco de 5,8 a 6,5 mm de largo.

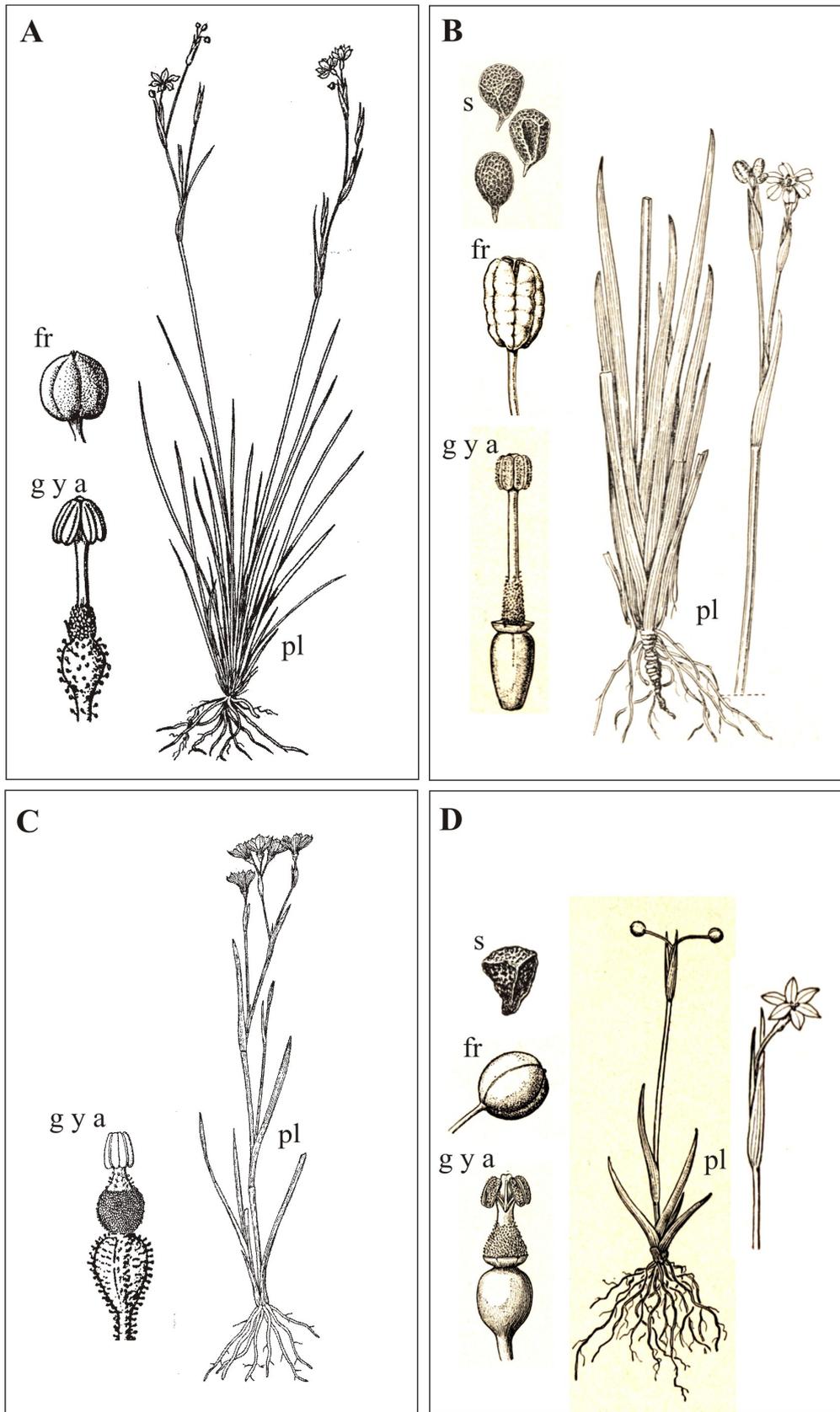


Figura 1: Especies de *Sisyrrinchium* estudiadas. Esquemas extraídos de Ravenna (1969 a y b y 2001). **A:** *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum*. **B:** *S. chilense*. **C:** *S. platense*. **D:** *S. iridifolium ssp. valdivianum*. **pl:** planta entera; **g y a:** gineceo y androceo; **fr:** fruto; **s:** semilla.

BIBLIOGRAFÍA

- ALBERT AYK, AND SCHLUTER D. 2005. Selection and the origin of species. *Current biology* 15: p.283–288.
- ARCHIBALD JK, WOLFE AD, AND JOHNSON SD. 2004. Hybridization and gene flow between a day and night-flowering species of *Zaluzianskya* (Scrophulariaceae S. S., Tribe Manuleeae). *American Journal of Botany*.1333–1344.
- ARMBRUSTER WS, AND HERZIG AL. 1984. Partitioning and sharing of pollinators by four sympatric species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Panama. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 71: p.1–16.
- BROWN JH, AND BROWN AK. 1979. Convergence, competition, and mimicry in a temperate community of hummingbird pollinated flowers. *Ecology* 60: p.1022–1035.
- BUCHMAN SL. 1987. The ecology of oil flowers and their bees. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: p.343–369.
- CANE JH, EICKWORT GC, WESLEY FR, AND SPIELHOLZ J. 1983. Foraging, grooming, and mating behaviours of *Macropsis nuda* (Hymenoptera: Melittidae) and use of *Lysimachia ciliata* (Primulaceae) oils in larval provisions. *American Naturalist* 110: p.257–264.
- CARUSO MC. 2000. Competition for pollination influences selection on floral traits of *Ipomopsis aggregata*. *Evolution* 54: p.1546–1557.
- CARUSO MC. 1999. Pollination of *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae): effects of intra vs. interspecific competition. *American Journal of Botany* 86: p.663–668.
- COCUCCI AA, AND VOGEL S. 2001. Oil producing species of *Sisyrinchium* (Iridaceae) and their pollination by oil-collecting bees in subtropical South America. *Flora* 196: p.26–46.
- COYNE JA, AND ORR HA. 2004. Speciation. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- DRESSLER RL. 1968. Pollination by Euglossine bees. *Evolution* 22: p.202–210.
- FUTUYMA DJ. 2005. Evolutionary biology. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- GOLDBLATT P, RUDALL P, AND HENRICH JE. 1990. The genera of the *Sisyrinchium* Alliance (Iridaceae: Iridoideae): Phylogeny and relationships. *Systematic Botany* 15: p.497–510.
- GRANT V. 1994. Modes and origins of mechanical and ethological isolation in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: p.3–10.
- HANSEN TF, ARMBRUSTER WS, AND ANTONSEN L. 2000. Comparative Analysis of Character Displacement and Spatial Adaptations as Illustrated by the Evolution of

Dalechampia Blossoms. *The american naturalist* 156: p.S17–S34.

- JOHNSON SD, EDWARDS TJ, CARBUTT C, AND POTGIETER C. 2002. Specialization for hawkmoth and long-proboscid fly pollination in *Zaluzianskya* section Nycterinia (Scrophulariaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 138: p.17–27.
- KWAK MM. 1978. Pollination, hybridization and ethological isolation of *Rhinanthus minor* and *R. Serotinus* (Rhinanthoideae: Scrophulariaceae) by bumblebees (*Bombus* Latr.). *Taxon* 27: p.145–158.
- MIYAKE T, AND INOUE K. 2003. Character displacement in style length between pollinator-sharing *Clerodendrum trichotomum* and *C. izuinsulare* (Verbenaceae). *Plant Systematics and Evolution* 243: p.31–38.
- PAULUS HF, AND GACK C. 1997. Pollinators as prepollinating isolation factors: evolution and speciation in *Ophrys* (Orchidaceae). *Israel Journal of Botany* 39: p.43–79.
- ROZEN JG, MELO GAR, AGUIAR AJC, AND ALVES-DOS-SANTOS I. 2006. Nesting biologies and immature stages of the Tapinotaspidine bee genera *Monoeca* and *Lanthanomelissa* and of their osirine cleptoparasites *Protosiris* and *Parepeolus* (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *American museum novitates* 3501: p.1–60.
- RUDALL P, KENTON AY, AND LAWRENCE TJ. 1986. An anatomical and chromosomal investigation of *Sisyrinchium* and allied genera. *Botanical Gazette* 147: p.466–477.
- SEGRAVES KA, AND THOMPSON JN. 1999. Plant polyploidy and pollination: floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia*. *Evolution* 53: p.1114–1127.

CAPÍTULO 1

PATRONES DE AISLAMIENTO REPRODUCTIVO PRE-ZIGÓTICO EN POBLACIONES SIMPÁTRICAS DE *SISYRINCHIUM*. EVALUACIÓN DE LA IMPORTANCIA DE BARRERAS TEMPORALES Y FLORALES.

INTRODUCCIÓN

Si bien existe un largamente sostenido debate entre evolucionistas en relación al modo de definir y delimitar a las especies (ver De Queiroz 2007, Coyne 1994 y bibliografía allí citada), hay consenso en cuanto a la importancia del aislamiento reproductivo en la formación y el mantenimiento de las mismas en la naturaleza (Coyne y Orr 2004, Futuyma 1997). El aislamiento reproductivo es una propiedad común a dos especies (Coyne y Orr 2004) y sus mecanismos pueden clasificarse según actúen impidiendo el flujo génico antes o después de la fertilización denominándose pre- o post-zigóticos respectivamente (Dobzhansky 1950) (ver tabla1; pág. 45). Las barreras pre-zigóticas han atraído la atención de muchos autores y han sido consideradas más importantes, críticas o efectivas que las post-zigóticas (Kirkpatrick y Ravigné 2002, Jiggins et al. 2001). Esto se debe a que, al actuar secuencialmente en la vida de los organismos, aquellas barreras que aparecen más temprano representarían impedimentos más fuertes para el intercambio génico (Coyne y Orr 2004). Diversos estudios han puesto a prueba esta idea y han evidenciado que, tanto en animales como en plantas, las barreras pre-zigóticas tienen un rol preponderante (Martin y Willis 2007, Whiteman y Semlitsch 2005, Hurt et al. 2005, Husband y Sabara 2004, Ramsey et al. 2003). Dentro de las barreras pre-zigóticas pre-gámicas (es decir, que impiden el intercambio génico antes de la transferencia de polen) podemos citar a aquellas basadas en diferencias ecológicas entre las especies (**aislamiento de hábitat, etológico, mecánico y temporal**) y a aquellas relacionadas al sistema reproductivo de las mismas (**aislamiento por sistema reproductivo**) (Coyne y Orr 2004) (ver Tabla 1; pág. 45).

El **aislamiento de hábitat** se da cuando el flujo génico se ve afectado debido a que las especies ocupan diferentes hábitats en las zonas geográficas donde coexisten y son incapaces de usar el hábitat de la otra especie (Coyne y Orr 2004). Sin embargo, una separación en este tipo de preferencias puede no necesariamente impedir el flujo génico si,

por ejemplo, estos micro-ambientes se encuentran lo suficientemente próximos como para permitir que las distintas especies de plantas sean polinizadas por los mismos polinizadores.

En el **aislamiento temporal**, el flujo de polen se evita porque las especies presentan distintos periodos reproductivos. Esto incluye diferencias en los períodos de entrega de polen, receptividad de los óvulos o floración (Coyne y Orr 2004). En este último caso se conocen múltiples evidencias de especies cuyas floraciones se dan en distintas semanas o meses (Martin y Willis 2007, Martin et al. 2007, Lobo et al. 2003, McIntosh 2002). Pocos son los sistemas en los que está implicada una separación en la hora de floración durante el día. Un ejemplo de esto se da en el género *Zaluzianskya* (Scrophulariaceae) en el que algunas especies con floración nocturna y otras con floración diurna son polinizadas por esfíngidos y nemestrínidos respectivamente (Archibald et al. 2004, Johnson et al. 2002). Menos frecuentes aún son los casos en los que dos especies de plantas son polinizadas por la misma especie de polinizador y se encuentran separadas en el horario diario de floración, tal como ocurre en *Dalechampia* (Armbruster y Herzig 1984).

El fenómeno por el cual la estructura de las flores reduce o evita la transferencia inter-específica de polen se conoce como **aislamiento mecánico**; mientras que, aquel por el cual los polinizadores visitan preferentemente a una especie que se distingue por sus atractivos secundarios (forma, color, olor, etc.) se denomina **aislamiento etológico** (Grant 1994 y 1949). El aislamiento de especies simpátricas debido a estos dos mecanismos (mecánico y etológico) es conocido conjuntamente como **aislamiento floral** y se ha propuesto que habría cumplido un rol clave en la evolución de las Angiospermas (Dodd et al. 1999, Grant 1949). Existen numerosos casos descritos en los que especies de plantas coexistentes son visitadas por distintos ensambles de polinizadores (Kephart & Theiss 2003, Johnson et al. 2002, Ando et al. 2001, Dressler 1968, Grant 1949, 1994). También hay evidencia de especies próximas que comparten la misma especie de polinizador pero poseen distintos mecanismos de entrega de polen (Cocucci y Vogel 2001, Paulus y Gack 1990, Grant 1994, Kwak 1978, Dressler 1968, Grant 1949).

El **aislamiento por sistema reproductivo** se define como aquel que provoca una reducción en el flujo génico entre dos especies debido a un cambio en el sistema reproductivo (Coyne y Orr 2004). Las barreras más comúnmente citadas incluyen pases de xenogamia a apomixis o autopolinización. Si bien varios autores consideran a estos cambios como mecanismos de aislamiento por haber sido adoptados como un medio para preservar la integridad genética de pools génicos divergentes (Martin y Willis 2007, Fishman and Stratton 2004, Levin 1971) otros autores consideran que la autogamia y la

apomixis no serían barreras reproductivas ya que, no solo impiden el flujo génico inter-específico sino que también lo impiden entre individuos de la misma especie (Coyne y Orr 2004). Desde este punto de vista, los cambios en el sistema reproductivo no serían componentes del aislamiento reproductivo, aunque si podrían promover la especiación (Coyne y Orr 2004). Por ejemplo, un único individuo puede colonizar un nuevo hábitat, reproducirse formando una nueva población y llevar así al aislamiento reproductivo como producto de la adaptación (Coyne y Orr 2004).

Tradicionalmente se ha abordado el estudio del aislamiento reproductivo mediante la evaluación de cada barrera por separado, sin embargo, actualmente se sabe que la mayoría de los taxa se encuentran aislados por una combinación de barreras de distinto tipo (Nosil 2006, Coyne y Orr 2004, Ramsey 2003, Price and Bouvier 2002, Morrison et al. 1994), situación que es esperable si consideramos que la especiación es un proceso largo (Coyne y Orr 2004). Es por esto, que estudios recientes han tratado de identificar y medir las diversas barreras reproductivas que separan a especies relacionadas evaluando la contribución de cada una de ellas en cada etapa de la vida de los organismos (Martin y Willis 2007, Whiteman y Semlitsch 2005, Nosil et al. 2005, Ramsey et al 2003). Hay diferentes maneras en que las barreras pueden ser consideradas importantes: en un sentido absoluto (es decir, cuando son un impedimento fuerte al flujo génico al actuar solas), relativo (teniendo en cuenta todas las posibles barreras y la secuencia en la que intervienen) o porque provocaron la especiación (lo cual implica reconstruir el orden en el que las barreras evolucionaron y conocer la importancia relativa de las mismas en el momento en el que efectivamente el flujo génico cesó) (Coyne y Orr 2004). Si bien las contribuciones actuales no nos hablan de los procesos históricos, una barrera no puede haber tenido un rol en la especiación a menos que actualmente tenga un efecto absoluto grande (Coyne y Orr 2004), por lo que, un conocimiento detallado de la importancia actual de las diversas barreras es un primer paso necesario para identificar las fuerzas primarias responsables que promovieron la especiación (Martin y Willis 2007). Por otro lado, estudios comparativos en los que se incluyen varias combinaciones de especies relacionadas son importantes porque permiten examinar la efectividad y distribución taxonómica de los diferentes mecanismos de aislamiento reproductivo (Morrison et al. 1994).

Otro aspecto a tener en cuenta al evaluar el aislamiento reproductivo y que hasta el momento ha sido poco explorado es el vinculado a las variaciones geográficas en los niveles de aislamiento entre especies simpátricas. Se tiene amplio conocimiento de que los mecanismos que van modulando las interacciones entre las especies pueden variar

especialmente (Thompson 1994). Las especies pueden estar sujetas a diferencias entre localidades en el ensamble de polinizadores (ej. Nattero y Cocucci 2007, Medel et al. 2007, Herrera 1988), en las características climáticas (ej. Chalcoff et al. 2008), en la fenología de floración (Martin et al. 2007, Martin y Willis 2007, Lobo et al. 2003, Primack 1980), en la interacción con otras especies de plantas, etc., por lo que, consecuentemente, tanto el nivel de aislamiento como la contribución y el tipo de barreras reproductivas que separan a especies simpátricas también puede variar geográficamente.

El género *Sisyrrinchium* brinda un interesante sistema para evaluar estos aspectos ya que existen numerosas poblaciones en donde conviven distintas combinaciones de especies, y es en el contexto de la simpatría donde las barreras reproductivas se estudian mejor por ser allí donde efectivamente previenen el flujo génico. Estudios previos sugieren que entre algunas especies oleíferas de este género (*S. chilense* y *S. iridifolium* ssp. *valdivianum*) que comparten como principal polinizador a abejas colectoras de aceites (*Lanthanomelissa discrepans*) existe una separación en el horario de floración durante el día y un depósito diferencial de polen sobre el cuerpo de dichas abejas (Cocucci y Vogel 2001).

Es por esto que nos proponemos:

OBJETIVO GENERAL

Determinar cuál es la importancia de las barreras reproductivas pre-zigóticas que mantienen aisladas a especies de *Sisyrrinchium* que crecen en simpatría.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar cuales son los mecanismos pre-zigóticos (temporales y florales) que mantienen aisladas a especies de *Sisyrrinchium* que crecen en simpatría.
- Determinar la importancia y las contribuciones absolutas y relativas de los distintos tipos de barreras al aislamiento total
- Comparar la importancia de los distintos tipos de barreras en poblaciones donde coexisten los mismos pares de especies.

En este capítulo sólo describiremos patrones, las posibles causas o el contexto (simpatría, alopatría) en el que estas barreras podrían haber aparecido se tratará en los próximos capítulos de esta tesis.

MATERIALES

Las especies estudiadas fueron: *S. chilense*, *S. iridifolium ssp. valdivianum*, *S. unguiculatum*, *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum* y *S. platense*. De acuerdo a la morfología de sus flores, podemos dividir a las especies mencionadas en 2 grupos:

- El primer grupo, dentro del que se encuentra: *S. chilense*, *S. unguiculatum* y *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum*, presenta flores rotáceas con columna estaminal alargada que queda totalmente expuesta fuera del perigonio (Fig. 1A; pág. 45).
- El segundo grupo, dentro del que se encuentran *S. iridifolium ssp. valdivianum* y *S. platense* presenta flores hipocraterimorfas quedando la columna estaminal contenida dentro de la copa formada por la base de los tépalos (Fig. 1B; pág. 45).

De todas las especies estudiadas sólo *S. unguiculatum* no ofrece como recompensa a sus polinizadores aceites florales. Los polinizadores visitarían sus flores en busca de polen. El resto de las especies poseen elaióforos ubicados en la base de la columna estaminal (Fig. 1; pág. 45).

SITIOS DE ESTUDIO

Se trabajó en 6 poblaciones (Fig. 2; pág. 46) en las que coexisten dos o más especies de *Sisyrinchium*:

1) **Cuesta Blanca** (Córdoba), 31° 29'0,95"S; 64°34'45,95"O. Especies estudiadas: *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum*.

2) **Tandil** (Buenos Aires), 37°18'58,49"S; 59°8'58.03"O. Este sitio fue uno de los más diversos en cuanto a la cantidad de variedades de *Sisyrinchium* presentes. Aquí coexisten individuos de *S. chilense* (cuyas flores varían entre los colores lila pálido a blanco o blanco-amarillento) y de *S. iridifolium ssp. valdivianum* (con flores lilas, rosas y blancas). Se hallaron además individuos que según la clave (Ravenna 1969 a y b) serían de esta misma especie pero que presentaban flores con corolas más grandes, tépalos más anchos y ramas estigmáticas más distanciadas de las anteras (Fig. 3A; pág. 47). Esta

variedad (que presenta flores lilas, rosas y blancas) fue evaluada por separado y se la denominará de ahora en adelante como *S. iridifolium ssp. valdivianum* variedad 2.

3) **Rodeo Grande** (Tafí del Valle, Tucumán), 26 °51'22" S; 65°44'03" O. Especies estudiadas: *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum*. Los individuos de *S. chilense* presentes en este sitio presentaron algunas diferencias en relación a los de otras poblaciones por lo que denominaremos a esta especie *S. chilense* variedad 2. Las particularidades observadas fueron: hojas notablemente más anchas, (semejantes a las presentes en *S. iridifolium ssp. valdivianum*) y elaióforos más pequeños y con menor densidad de tricomas en relación a lo observado en otras poblaciones de esta especie (Fig. 3B; pág. 47).

4) **Pampa de Achala** (Córdoba), 31°36'34,46"S; 64°48'34,06"O. Especies estudiadas: *S. chilense* y *S. unguiculatum*.

5) **Carapunco** (Tafí del Valle, Tucumán), 26°46'33,53"S; 65°43'45,09"O. Especies estudiadas: *S. chilense* variedad 2 y *S. unguiculatum*.

6) **Chapicuy** (Paysandú, Uruguay), 31°37'0,18"S; 57°52'43,34"O. Especies estudiadas: *S. platense* y *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum*.

En la Fig. 4 (pág. 48) se observan fotos de las especies presentes en cada sitio. Se puede observar la variabilidad existente en las flores de las distintas poblaciones de una misma especie. A partir de ahora y a lo largo de la tesis cada especie será representada con la imagen que se observa en la Fig. 2 (pág. 46), dejando de lado las diferencias de color y tamaño entre los sitios.

Hábitats

Si bien no se realizó un estudio de los micro-hábitats en los que estas especies se encuentran, cabe destacar que en las poblaciones de Cuesta Blanca y Tandil se observó una clara diferenciación en los sitios en donde crecen las distintas especies. Mientras que *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* variedad 2 están presentes en suelos compactos, pedregosos y secos, *S. iridifolium ssp. valdivianum* crece preferentemente en suelos

arenosos y húmedos, cercanos a ríos o a cursos de agua. Ambos tipos de micro-ambientes se encuentran muy próximos entre sí por lo que las especies pueden compartir polinizadores. En el resto de las poblaciones no se observó una diferencia en el tipo de sustrato en el que crecen las especies, encontrándose las plantas de las distintas especies entremezcladas.

MÉTODOS

*Distribución geográfica de las especies de *Sisyrinchium* estudiadas.*

Para determinar el rango de distribución de *S. chilense* y *S. iridifolium* ssp. *valdivianum* se utilizaron los datos obtenidos de 208 ejemplares de ambas especies pertenecientes a cinco herbarios de Argentina (CORD, SI, LIL, CTES y LP). Numerosos ejemplares presentaban más de un nombre específico, muchos estaban sin identificar y otros no coincidían en sus características con la descripción de especie en la que nos basamos. Es por esto que se utilizaron sólo aquellos ejemplares cuyas características coincidían con las descripciones de especie detalladas en Ravenna 1969 a, b. y 2001.

Para establecer la distribución de *S. unguiculatum*, *S. platense* y *S. pachyrhizum* ssp. *pachyrhizum* se utilizó la información obtenida de 72 ejemplares del herbario CORD.

Para todas las especies se incorporó además información presente en la base de datos IRIS-Documenta Florae Australis del Instituto de Botánica Darwinion en donde se encuentra cargada información de *Sisyrinchium* de los siguientes herbarios: FCQ, BAB, GH, K, US, F, NY, BA, MBM y Herb. Ravenna.

Las coordenadas de aquellos lugares cuyos ejemplares no las tenían se obtuvieron de los siguientes sitios de internet: <http://www.calles.com> y <http://maps.google.com.ar>. En aquellos casos en los que fue necesario transformar a escala decimal se utilizó el programa Geocalc 3.0.

Con toda esta información se realizaron mapas utilizando el programa Arcview 3.1.

Cabe aclarar que si bien existen descripciones generales en la bibliografía sobre las distribuciones de estas especies, se utilizó como base de datos la información de los ejemplares de herbarios para poder detectar lugares puntuales en los que las especies coexisten.

Fenología floral (épocas y patrones diarios de floración)

Para determinar la época de floración de las especies se trabajó con los ejemplares de herbario ya mencionados en la página 18. Para cada especie, se cuantificó la cantidad de ejemplares con flor en cada mes y se calcularon porcentajes en función del total de ejemplares observados. Dichos datos se graficaron en diagramas de barras.

Para conocer los patrones diarios de floración, en cada población se delimitaron parches en los que se encontraran una proporción similar de plantas de cada una de las especies de *Sisyrinchium* coexistentes. El número de flores abiertas de cada especie se cuantificó cada 15 minutos. A los fines de estandarizar, estas mediciones se realizaron siempre en días soleados ya que los patrones de floración, en especial de una de las especies, se vieron claramente influenciados por este factor (ejemplo: las flores de *S. iridifolium ssp valdivianum* no abren en días nublados). Luego, se realizaron curvas con los porcentajes de flores abiertas (número de flores abiertas de una determinada especie*100/número máximo de flores abiertas de esa especie) en función del tiempo.

Considerando que existen observaciones previas que indican a *S. chilense* como una especie protándrica (Cocucci y Vogel 2001), en la población de Cuesta Blanca se tuvo en cuenta además, al momento de cuantificar las flores abiertas, si se encontraban en estadio masculino o femenino.

Dependencia de los polinizadores para la producción de frutos y semillas.

Se realizaron 2 tratamientos de sistema reproductivo: Autopolinización Espontánea (flores vírgenes fueron aisladas de los polinizadores) y Polinización Libre (las flores se dejaron expuestas a las visitas de los polinizadores). En algunos sitios (Carapunco, Chapicuy y Pampa de Achala) entre 10 y 25 plantas por tratamiento se embolsaron a campo. A cada planta se le retiraron las flores abiertas y que por lo tanto no se sabía si habían sido polinizadas o no. Los frutos que ya estaban en formación (es decir, que habían estado expuestos a los polinizadores) se marcaron en los pedicelos con hilos de un determinado color que indicaba el tratamiento de Polinización Libre. Los pimpollos se embolsaron por un mes aproximadamente hasta la formación de los frutos. En otros sitios (Cuesta Blanca, Tandil y Rodeo Grande) entre 10 y 15 plantas fueron transplantadas a invernadero. Los frutos que ya se habían formado en el campo se consideraron bajo el tratamiento de Polinización Libre, mientras que la Autopolinización Espontánea se evaluó

con las flores que iban abriendo a diario. Nuevamente, los distintos tratamientos se señalaron con hilos de distintos colores que fueron atados en los pedicelos florales.

La proporción de frutos formados (frutos formados/flores tratadas) y la cantidad de semillas se comparó entre los tratamientos con un test estadístico no paramétrico de Wilcoxon ya que los residuos no se distribuyeron normalmente, utilizando el programa estadístico Infostat v.1.1 (Di Rienzo et al. 2000). Esta última variable (número de semillas) no pudo ser evaluada en todos los sitios debido a que muchas de las plantas murieron antes de la maduración de los frutos o porque los frutos fueron comidos por coleópteros y/u hormigas. Cabe destacar que la cuantificación de la proporción de fructificación resulta sencilla en *Sisyrinchium* debido a que los pedicelos florales persisten en la plantas aún cuando no se forman frutos. También cabe señalar que se observó una notable variación en la cantidad de flores producidas por planta en las distintas especies y entre los sitios por lo que la cantidad de flores evaluadas por planta para cada tratamiento varió entre 8 y 393.

Elenco de polinizadores, tasas de visita, comportamiento y lugar de depósito de polen.

Se dedicaron 149 horas a la observación de polinizadores en todas las poblaciones. Se realizaron censos de 20 minutos en los que se observaron diferentes grupos de individuos elegidos al azar. En cada censo se registró el número de flores observadas, número de visitas realizadas por cada insecto y la identidad del polinizador. A partir de estos datos se calculó para cada censo la tasa de visitas por flor por unidad de tiempo (número de visitas/número flores observadas/horas de observación). Se estimó además el porcentaje de visitas (%) de cada polinizador en relación al total de visitas observadas (número de visitas de un polinizador dado*100/ el total de visitas de todos los insectos registrados). Las especies de insectos colectadas fueron identificadas mediante la comparación de los ejemplares capturados con colecciones de referencia depositadas en el Laboratorio de Biología Floral, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (colectados por el Dr. Andrea Cocucci) o fueron enviados al Dr. Roig-Alsina (Museo Argentino de Ciencias Naturales) y al Dr. Claudio Sosa (Cátedras de Entomología e Introducción a la Biología, FCEfyN, UNC) para su identificación. Por otro lado, los insectos capturados fueron analizados bajo lupa estereoscópica. Se evaluó la presencia o no de polen de *Sisyrinchium* en el cuerpo de los mismos a los fines de definir si trataba de polinizadores eficientes o ladrones de polen. Esta información fue complementada con el registro del comportamiento de los insectos al visitar las flores. Cabe destacar que, el

pequeño tamaño de algunos de los insectos observados impidió detectar, a campo, las sutiles diferencias existentes entre las especies. Es por esto que las visitas realizadas por halíctidos se analizaron conjuntamente sin discriminar por especie, al igual que las realizadas por colétidos.

En las poblaciones de Carapunco y Rodeo Grande (en las que sólo se destinó un día a la observación de polinizadores) se registró la presencia de marcas en las flores que dieran indicios de visitas por parte de abejas colectoras de aceites. Estas abejas dejan pequeñas marcas fácilmente visibles en los tépalos al contactarlos con sus patas mientras visitan las flores. Para esto se observaron entre 92 y 100 flores de cada una de las especies en cada sitio.

En aquellas poblaciones en que las especies simpátricas comparten como polinizadores a abejas del género *Lanthanomelissa* (Tandil, Cuesta Blanca y Chapicuy) y a los fines de determinar con precisión el lugar de depósito de polen, se colocaron polvos fluorescentes de distintos colores sobre las anteras de las flores de las especies coexistentes de *Sisyrinchium* y se capturaron las abejas visitantes. Luego se observaron y fotografiaron bajo luz UV.

Color de las flores y su relación con el tipo de recompensa

Para conocer si el color de las flores es un indicativo para los polinizadores del tipo de recompensa ofrecida (aceites en todos los casos a excepción de *S. unguiculatum* que ofrece polen) se midieron los espectros de reflexión de los tépalos de entre 10 y 27 flores frescas de cada especie por población con un espectrofotómetro USB 4000 (Ocean Optics, Florida, USA).

Las medidas de reflexión a diferentes longitudes de onda (cada 0,22nm entre los 300 y 700nm) se redujeron a 8 variables mediante la siguiente fórmula: $\sum 0,22S_i$, donde S_i es el porcentaje de reflexión de la superficie de la flor cada 0,22 nm. Luego se calcularon los promedios de los valores obtenidos en 8 franjas de 50 nm. Con estas 8 variables por individuo se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) para analizar cómo se agrupan las especies en un espacio multivariado según las coloraciones de sus corolas. Se realizaron también Análisis de la Varianza Multivariados (MANOVA) y Univariados (ANOVAs) con los 2 primeros ejes arrojados por el PCA para conocer si existen diferencias significativas en los colores de la corola entre las especies. A los fines de determinar si existen diferencias entre las especies que ofrecen como recompensa aceites o

polen se realizaron también los análisis antes mencionados pero utilizando como criterio de clasificación el tipo de recompensa. Los tests a posteriori que se utilizaron fueron Test de Tukey y de Hotelling para ANOVAs y MANOVAs respectivamente. Para todos los análisis estadísticos realizados se utilizó el programa Infostat v.1.1 (Di Rienzo et al. 2000).

Por otro lado, basándonos en las fórmulas propuestas por Chittka y Kevan 2005, se analizaron los espectros teniendo en cuenta la visión de una abeja solitaria modelo. Para esto, los loci de color se ubicaron en el espacio perceptual tridimensional según nuestro conocimiento de la sensibilidad de los ojos de *Anthophora acervorum* (Fig. 15A; pág. 59). Entre las abejas cuya sensibilidad de fotorreceptores ha sido estudiada (Briscoe y Chittka 2001) esta especie es la filogenéticamente más próxima a *Lanthanomelissa*. La proporción de cuantos capturados por cada uno de los tres fotorreceptores (UV, azul y verde) se calcularon como la intersección de las áreas de las siguientes tres curvas: sensibilidad de los fotorreceptores, luz incidente y espectro de reflexión de los tépalos. Para cada espectro de reflexión se obtuvieron 3 valores (proporción de cuantos capturados por el ojo) correspondientes a cada fotorreceptor: Q_{uv} , Q_b , Q_g . Dichos valores fueron transformados para que representaran fracciones de 1 del siguiente modo: $Q_i/(Q_{uv}+Q_b+Q_g)$. Finalmente se utilizaron para representar a los colores de cada muestra en un diagrama ternario o triángulo de Maxwell en donde las distancias entre los loci representan diferencias en el color. Por lo que mientras más distanciados se encuentren los locis entre sí mayor es la probabilidad de que sean distinguidos por el polinizador.

Cabe aclarar que las flores de las especies estudiadas presentan, en general, algún diseño hacia el centro donde se encuentran las piezas fértiles. En todas las especies la base de los tépalos se torna amarilla y en algunos casos, como en *S. unguiculatum* y *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum* se observan diseños llamativos en colores marrones (Fig. 4; pág. 48). Hubiera sido interesante evaluar el color de estos dibujos pero el espectrofotómetro utilizado no tenía una sonda lo suficientemente delgada como para que permitiera captar el color de porciones tan pequeñas de la flor.

Relación de las tasas de visita de los principales polinizadores con los patrones de floración.

En aquellas poblaciones en las que se observó que las especies de *Sisyrrinchium* compartían polinizadores, se relacionaron las tasas de visita del principal polinizador con los patrones de floración. Para esto, los valores obtenidos de tasas de visita se agruparon en

categorías definidas en base a los patrones de floración. Se delimitaron los rangos horarios en los que cada especie florecía sola y en los que los patrones de las especies se solapaban. Es decir que las categorías fueron, por ejemplo para dos especies de floración superpuesta A y B, las siguientes tres: cuando solo las flores de la especie A estaban abiertas, cuando las flores de las 2 especies estaban abiertas y cuando sólo estaban abiertas las flores de la especie B. Luego, las tasas de visita se compararon entre rangos horarios y entre especies con tests no paramétricos (Kruskall Wallis o Wilcoxon) mediante el programa Infostat v.1.1 (Di Rienzo et al 2000). Es decir, se evaluó: por un lado, si las frecuencias de visita del principal polinizador sobre una determinada especie de *Sisyrinchium* variaban entre rangos horarios y por otro lado, se determinó si los polinizadores visitaban diferencialmente a las especies de *Sisyrinchium* en los rangos horarios en que las floraciones se solapaban.

Aislamiento reproductivo

Para evaluar el aislamiento reproductivo y la contribución de las distintas barreras al aislamiento total se tuvo en cuenta el orden de aparición de las mismas en la historia de vida de los organismos estudiados. Esto quiere decir que, si sólo consideramos las barreras pre-gámicas, en las especies que crecen juntas, la primera barrera que podría impedir el flujo de polen sería la temporal. En este caso en particular, como las especies estudiadas estaban en flor en la misma época, sólo se consideraron los patrones de floración diarios, dejando de lado el aislamiento estacional. Una segunda barrera que comenzaría a actuar en caso de no ser total el aislamiento fenológico, sería la de los polinizadores (aislamiento etológico). La probabilidad de que haya más o menos flujo de polen entre las especies estaría dada, en este caso, por la cantidad de polinizadores en común que las mismas presenten. Finalmente, si ambas especies comparten el ensamble de polinizadores, la restricción en el flujo génico podría estar dada por el lugar de depósito de polen sobre el cuerpo de los insectos polinizadores. Entonces, para cada especie, se calculó la fuerza del aislamiento reproductivo (RI_i) de cada barrera (temporal, etológica y mecánica) en relación a una segunda especie con la que convive, por ej. $RI_{S. chilense}$ y $RI_{S. iridifolium. ssp. valdivianum}$. Por otro lado, con los valores de RI obtenidos, se calculó la contribución absoluta al aislamiento (**AC**), el aislamiento total (**T**) y contribución relativa al aislamiento (**RC**). En el Apéndice 1 (pág. 38) se describen en detalle los procedimientos y fórmulas utilizados para estimar cada índice.

Los valores de todos los índices mencionados varían entre 0 a 1, representando 1 el máximo aislamiento.

Todo esto se realizó en base al trabajo de Ramsey et al. 2003.

RESULTADOS

Distribución geográfica de las especies de Sisyrrinchium estudiadas.

El mapa de las especies estudiadas (Fig. 5; pág.49) muestra que las mismas presentan una distribución restringida a America del Sur, más puntualmente a Argentina, Bolivia, Perú, Brasil, Uruguay, Paraguay y Chile. Sin embargo, este resultado podría estar sesgado por el hecho de que los Herbarios consultados se encuentran en Argentina y podrían contener más ejemplares colectados en las cercanías de esta zona.

S. chilense se encuentra distribuido principalmente hacia el oeste de Sudamérica abarcando desde Tierra del Fuego hasta Perú. Los registros (obtenidos en base a la información de los Herbarios consultados) de *S. iridifolium ssp. valdivianum* son más frecuentes hacia el centro y este de Argentina, mientras que se hallan algunos ejemplares en Uruguay, Sur de Brasil y Paraguay. Aunque las especies no son simpátricas, las mismas coexisten en algunos sitios de las provincias de Tucumán y Córdoba. *S. unguiculatum* se distribuye principalmente en el centro de Argentina (casi exclusivamente en Córdoba) y en algunos sitios de Paraguay y Brasil. Tanto *S. platense* como *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum* presentan una distribución oriental, observándose varios sitios en los que coexisten.

Fenología floral (épocas y patrones diarios de floración)

Al evaluar el porcentaje de ejemplares de herbario con flor colectados en cada mes, se encontró que las especies que encontramos creciendo en simpatría florecen simultáneamente durante prácticamente todo el periodo de floración (Fig. 6; pág. 50).

En cuanto a los patrones de floración diurno, las poblaciones de Cuesta Blanca, Rodeo Grande, Tandil y Chapicuy mostraron una separación en el horario pico de floración de las especies coexistentes. El pico de floración de *S. iridifolium ssp. valdivianum*, *S. iridifolium ssp. valdivianum var 2* y *S. platense*, se dio entre 3 y 6 horas más temprano que los picos de *S. chilense*, *S. chilense var. 2* y *S. pachyrhizum*. A excepción de la población

de Cuesta Blanca en la que la separación horaria de la floración entre las especies fue casi total, en el resto de las poblaciones, los patrones de floración de las especies coexistentes se solapan en mayor o menor grado (Fig. 7A, C, E y G; pág. 51). En el caso de Tandil la curva de *S. iridifolium ssp. valdivianum* se encuentra contenida dentro de la de *S. iridifolium ssp. valdivianum* var. 2 coincidiendo la hora pico de floración en ambas especies (Fig. 7E; pág. 51).

En las poblaciones de Pampa de Achala y Carapunco el solapamiento en la floración del *S. chilense* y de *S. unguiculatum* fue importante y los picos de floración de ambas especies coincidieron en los dos sitios (Fig. 7D y F; pág. 51)

Al analizar el patrón de floración diario de *S. chilense* de Cuesta Blanca considerando los distintos estadios reproductivos, se observó que las primeras flores en abrir fueron aquellas que estaban en estadio femenino, es decir cuyas anteras ya prácticamente no tenían polen y cuyos estigmas se encontraban receptivos. Luego abrieron las flores en estadio masculino (Fig 7B). Si bien esto no se evaluó en detalle en el resto de las poblaciones de esta especie, si se observó que tanto en Tandil como en Pampa de Achala las flores en estadio femenino también abren primero.

Dependencia de los polinizadores para la producción de frutos y semillas.

Los resultados de los tratamientos de sistema reproductivo se muestran en la Fig. 8 (pág. 52).

Se determinó que las plantas tratadas de *S. chilense* de las poblaciones de Pampa de Achala, Tandil y Cuesta Blanca, *S. iridifolium ssp. valdivianum* variedad 2 de Tandil, *S. unguiculatum* de Pampa de Achala, *S. platense* y *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum* no formaron frutos bajo el tratamiento de autopolinización espontánea (Fig. 8) por lo que necesitan de los polinizadores para su reproducción. En el caso de *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Cuesta Blanca ($W=91$; $p=0,2823$), en *S. chilense* variedad 2 de Carapunco ($W=103,5$; $p=0,2477$), *S. chilense* variedad 2 de Rodeo Grande ($W=31$; $p=>0,99$) no se hallaron diferencias significativas en la proporción de fructificación entre los 2 tratamientos (AE y PL) por lo que estas especies en estos sitios no dependerían de los polinizadores para la producción de frutos y semillas. En la población de Carapunco de *S. unguiculatum* la totalidad de la plantas tuvieron una fructificación del 100% para ambos tratamientos (AE y PL) por lo que tampoco dependerían de los polinizadores para reproducirse. En el caso de *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Rodeo Grande si bien se

hallaron diferencias significativas entre los tratamientos ($W=111$; $p=0,0151$) siendo mayor la proporción de fructificación bajo el tratamiento de PL, la especie no depende totalmente de los polinizadores ya que puede formar frutos en ausencia de los mismos (el valor medio de proporción de fructificación para el tratamiento de AE fue de 0,42, alcanzando algunos de los individuos tratados valores de 1). En las poblaciones de *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Cuesta Blanca y Rodeo Grande (únicos sitios en los que se pudo evaluar este aspecto) el número de semillas por fruto no difirió significativamente entre los tratamientos de autopolinización espontánea y polinización libre (Cuesta Blanca: $W=1631,5$; $p=0,2166$ y Rodeo Grande: $W=225$; $p=0,5911$).

En *S. chilense*, *S. platense* y *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum* la autopolinización espontánea es impedida por ser las flores protándricas (Cocucci y Vogel 2001), mientras que en *S. iridifolium ssp. valdivianum* var. 2 el depósito de polen sobre estigmas de la misma flor es posible que no se produzca debido a la distancia existente entre las anteras y las ramas estigmáticas (impedimento mecánico) (Fig. 3A; pág. 47). El mecanismo que evita la autopolinización espontánea en *S. unguiculatum* en Pampa de Achala no fue determinado.

Elenco de polinizadores, tasas de visita, comportamiento y lugar de depósito de polen.

Las figuras 10 y 11 (pág. 54 y 55) muestran los resultados correspondientes a porcentajes y tasas de visitas respectivamente. En la Fig. 9 (pág. 53) se muestran fotos de algunos de los visitantes observados en las distintas poblaciones.

Cuesta Blanca: en ambas especies de *Sisyrinchium* el principal polinizador fue *Lanthanomelissa discrepans* (Anthophoridae) (Fig. 9B). En el caso de *S. chilense* el 93,4% de las visitas correspondieron a esta abejas colectoras de aceites las cuales se observó portaban abundante cantidad de polen sobre sus cuerpos. El resto de las visitas fueron realizadas por avispas del género *Trimeria* (Masaridae) (5,65%) (Fig. 9A) y por halíctidos del género *Dialictus sp.* (0,95%) (Fig. 9H). Tanto las avispas como los halíctidos visitarían las flores en busca de polen, no habiéndose observado polen sobre el cuerpo de los ejemplares capturados.

En el caso de *S. iridifolium ssp. valdivianum* las visitas de *L. discrepans* correspondieron al 50,75%. Las abejas capturadas presentaron abundante cantidad de polen en sus cuerpos. Se observaron además halíctidos (*Dialictus sp.*), colétidos (*Colletes sp.*, *Hyaleus sp.*, *Leioproctus sp.*) y sírfidos (*Toxomerus sp.*) visitando las flores en busca de

polen (Fig 9H, G y D). Tanto los colétidos como la mayoría de los halíctidos hicieron contacto con las piezas fértiles al visitar las flores, sin embargo en los ejemplares capturados no se observó polen en sus cuerpos, presumiblemente por comportamiento de acicalamiento observado luego de visitar las flores. Esto nos permite inferir dichos insectos no cumplirían un rol de importancia en la transferencia de polen entre flores de distintas plantas (polinización cruzada). Los sírfidos observados no hicieron contacto con los estigmas al visitar las flores por lo que no estarían implicados en el proceso de polinización de esta especie de planta.

Tandil: Las 3 especies de *Sisyrinchium* estudiadas en este sitio fueron polinizadas principalmente por abejas de la especie *L. discrepans* (Fig. 9B). Del total de visitas observadas, el 51,9%, 37,03% y 50% correspondieron a dichas abejas colectoras de aceites en *S chilense*, *S. iridifolium ssp. valdivianum* var. 2 y *S. iridifolium ssp. valdivianum* respectivamente. Se observaron además sírfidos del género *Toxomerus* que (al igual en Cuesta Blanca) no polinizarían las flores. Tanto *S. chilense* como *S. iridifolium ssp. valdivianum* var. 2 recibieron 43,5% y 13,6% de visitas por partes de halíctidos que, si bien no fueron identificados, se determinó se trataba de una especie en *S. chilense* y de dos especies (distintas a la presente en *S. chilense*) en *S. iridifolium ssp. valdivianum* var. 2. Las especies de halíctidos observadas no serían las mismas que las presentes en la población de Cuesta Blanca. Se evidenció abundante cantidad polen en los cuerpos de dichos halíctidos, en particular en aquellos observados en *S. chilense*. Estos últimos se sostenían de la columna estaminal y giraban alrededor de las piezas fértiles al visitar las flores en busca de polen (Fig. 9C). En *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* se observaron además colétidos (que no fueron identificados) visitando las flores en frecuencias muy bajas (0,003 y 0,006 v/h/f respectivamente). Si bien el mayor porcentaje de visitas correspondió a *Lanthanomelissa discrepans* en *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* var. 2, en esta población los halíctidos observados cumplirían también un rol como polinizadores, visitando las flores en frecuencias similares a las de las abejas colectoras de aceites (0,5797 y 0,5279 v/h/f para *L. discrepans* y halíctidos respectivamente en *S. chilense*; 0,085 y 0,1185 v/h/f para *L. discrepans* y halíctidos respectivamente en *S. iridifolium ssp. valdivianum* var. 2).

Rodeo Grande: *S. chilense* var. 2 fue visitado en igual proporción por halíctidos (de 2 especies no identificadas) y sírfidos (46,15%) pero sólo se observó polen sobre el cuerpo de los halíctidos los cuales visitaron las flores en frecuencias muy bajas (0,0105 v/f/h). El comportamiento de estas abejas al visitar las flores fue similar al observado en Tandil, las

mismas giraban alrededor de las piezas fértiles para colectar el polen (Fig. 9F). El resto de las visitas (7,7%) fueron realizadas por colétidos no identificados.

En el caso de *S. iridifolium ssp. valdivianum* el 66,7% de las visitas fueron realizadas por sírfidos del género *Toxomerus* que no cumplirían un rol en la polinización. El resto de las visitas fueron realizadas por halíctidos de una especie no identificada distinta a la observada en *S. chilense*, por colétidos (de una especie no identificada) por sírfidos del género *Carposcalis* y por *L. discrepans*. Las visitas de ésta última representaron sólo el 8,3% del total de las visitas y la frecuencia de visitas fue de 0,006 v/h/f.

En esta población se reforzó la observación de flores con la observación de marcas de abejas en las flores, no detectándose para ninguna de las especies de *Sisyrrinchium* indicios de visitas por parte de *Lanthanomelissa sp.* en las 92 y 100 flores de *S. chilense* var. 2 y *S. iridifolium ssp. valdivianum* respectivamente.

Carapunco: En *S. chilense* el mayor porcentaje de visitas fue realizado por sírfidos de dos géneros: *Carposcalis* (32%) (Fig. 9E) y *Toxomerus* (37,3). Ninguno de estos sírfidos hizo contacto con el estigma de las flores y tampoco se observó polen sobre el cuerpo de los mismos, por lo que no serían polinizadores eficientes. El resto de las visitas fueron realizadas por halíctidos de una especie no identificada y por colétidos de una especie que tampoco pudo ser identificada. Los halíctidos observados rodeaban las piezas fértiles en igual comportamiento al descrito para Rodeo Grande y fueron los únicos que cargaban polen en la parte ventral de su cuerpo. La frecuencia de visita de los mismos fue muy baja (0,022 v/h/f). En las 97 flores observadas no se registraron marcas de visitas por parte de abejas colectoras de aceites.

En el caso de *S. unguiculatum* sólo se observaron sírfidos del género *Toxomerus* (85,7%) y halíctidos no identificados (14,3%) visitando las flores a frecuencias muy bajas (0,31 v/h/f en todos los casos). No observamos a ninguno de los visitantes transportando polen en sus cuerpos.

Pampa de Achala: en *S. chilense* el 78,5% de las visitas fueron realizadas por *Lanthanomelissa discrepans*. También se observaron sírfidos de los géneros *Carposcalis* y *Toxomerus* y colétidos no identificados en muy bajos porcentajes (15,18%; 1,26% y 5,06% respectivamente) y visitando las flores en frecuencias muy bajas (0,0312 v/h/f; $2,4510 \times 10^{-3}$ v/h/f y 0,0115 v/h/f respectivamente). No se observó polen sobre el cuerpo de estos sírfidos y colétidos.

S. unguiculatum fue visitado casi exclusivamente por sírfidos del género *Carposcalis* (Fig. 9I). El 96,94% de las visitas observadas fueron realizadas por estos sírfidos que

visitaron las flores con una frecuencia de 0,1078 v/h/f. No se detectó polen en el cuerpo de los ejemplares capturados ni se observó, a campo, que los mismos hicieran contacto con los estigmas al buscar polen en las flores. El resto de visitas (0,06%) fueron realizadas por sírfidos del género *Toxomerus*.

Chapicuy: El 72,35% de las visitas a *S. platense* fueron realizadas por *Lanthanomelissa magaliae* (Fig. 9L), el 24,88 % por halíctidos (Fig. 9K) y el 2,76 % por colétidos (Fig. 9J).

En el caso de *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum* casi la totalidad de las visitas (95,73%) fueron realizadas por *Lanthanomelissa magaliae*. Se observaron además, sírfidos del género *Toxomerus* y halíctidos no identificados. No se observó polen sobre los sírfidos colectados.

No se pudo determinar con precisión si los halíctidos observados transportaban polen ya que no pudieron ser capturados. Sin embargo se observó a campo que los mismos hacían contacto con las piezas fértiles y no se evidenció comportamiento de acicalamiento entre visita y visita, por lo que podríamos asumir que serían polinizadores de ambas especies de *Sisyrinchium*. Los halictidos observados en las 2 especies de *Sisyrinchium* eran de especies distintas.

De las seis poblaciones estudiadas sólo tres (Cuesta Blanca, Tandil y Chapicuy) comparten al principal polinizador: abejas colectoras de aceite del género *Lanthanomelissa*. Estas abejas visitaron las flores con frecuencias menores a 0,95 v/h/f en todas las poblaciones (Fig. 11; pág. 55), lo que quiere decir que hay que mirar 1 flor durante al menos una hora para poder ver una visita.

Con respecto al comportamiento de dichas abejas colectoras de aceite, se observó que las mismas se asientan sobre la columna de las flores del *S. chilense* y *S. pachyrhizum* (cuya arquitectura floral es rotácea) sin hacer contacto con el perianto mientras que las patas delanteras raspan con la parte ventral el elaióforo. Antes de llegar a esta posición en la que permanecen colectando los aceites, dichos insectos contactan las piezas fértiles de las flores con el tórax por un instante. En *S. iridifolium ssp. valdivianum*, *S. iridifolium ssp. valdivianum* var. 2 y en *S. platense* (arquitectura hipocrateriforme) las abejas se apoyan sobre el limbo e introducen las patas delanteras y parte de la cabeza en la flor en busca de aceites. Este comportamiento diferencial de las abejas provoca que el polen sea depositado en el abdomen y tórax de las abejas en el primer caso y en tórax y cabeza en el segundo caso (Fig. 12; pág. 56). Se observó además, que estas abejas muestran una notable

preferencia por las flores nuevas. Esto podría deberse a que en *Sisyrinchium* los aceites no se regeneran por lo que aquellas flores muy visitadas ya no tendrían aceites disponibles.

Color de las flores y su relación con el tipo de polinizador

Los espectros de reflexión de las corolas florales se muestran en la Fig. 13 (pág. 57).

S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum, *S. unguiculatum* y *S. chilense* de Tandil muestran 2 picos de mayor reflexión: uno en la franja correspondiente al UV (a los 330 nm aproximadamente) y otro en la correspondiente al amarillo (a los 570 nm aproximadamente). Por otro lado, *S. chilense* en todas las poblaciones (a excepción de Tandil), *S. chilense* var. 2, *S. iridifolium ssp. valdivianum*, *S. iridifolium ssp. valdivianum* var. 2 y *S. platense* presentan un pico de mayor reflexión en el violeta entre los 400 y 450 nm aproximadamente.

Los dos primeros ejes del análisis de componentes principales (Fig. 14; pág. 58) explicaron el 95% de la variación observada. En la Tabla 2 (pág. 42) se muestran las correlaciones de las variables de color con los dos primeros ejes del PCA.

Al hacer el MANOVA se evidenciaron diferencias significativas entre todas las especies (F de Pillai= 17,73; $p < 0,0001$). Al evaluar cada eje por separado (ANOVAs), el PC1 no evidenció una tendencia clara de agrupamiento, formando las especies un continuo en el que sólo *S. platense* y *S. chilense* var 2 se diferenciaron del resto ($F_{6,190}=2,97$; $p=0,0086$). El PC2 separó a *S. unguiculatum*, a *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum* y agrupó al resto de las especies (ANOVA, $F_{6,190}=94,19$; $p < 0,0001$) (Fig. 14; pág. 58).

Al usar como criterio de clasificación el tipo de recompensa (polen o aceites) se encontraron diferencias significativas al considerar los 2 ejes juntos (MANOVA; F de Pillai=163,15; $p < 0,0001$). Al evaluar cada uno de los ejes del PCA por separado se observó que el PC1 no evidencio diferencias ($F_{1,190}= 2,86$; $p= 0,0926$), mientras que el PC2 separó a *S. unguiculatum* (única especie que ofrece polen como recompensa) de las demás especies oleíferas (ANOVA) (pc2 $F_{1,190}=307,66$; $p < 0,0001$). Esta separación estaría asociada a mayores valores de las variables de color 550-600 y 600-650 (Fig. 14; pág. 58).

Al evaluar el color de las flores teniendo en cuenta la visión de la abeja solitaria modelo se observó que *S. unguiculatum*, única especie que no presenta aceites, es la que más se separa del resto de las especies cuyos locis se encuentran superpuestos en el diagrama ternario (Fig 15B).

Relación de las tasas de visita de los principales polinizadores con los patrones de floración.

Para cada una de las tres poblaciones que comparten al principal polinizador (Cuesta Blanca, Tandil y Chapicuy) y basándose en los patrones de floración obtenidos, se establecieron rangos horarios para evaluar si las especies coexistentes de *Sisyrinchium* diferían en las tasas de visita de *Lanthanomelissa sp.* cuando se encontraban simultáneamente florecidas. Por otro lado, se compararon (en cada especie de *Sisyrinchium*), las frecuencias con que las abejas visitan a las flores en los distintos rangos horarios para determinar cómo afecta la presencia o ausencia de flores de la especie coexistente en el comportamiento de forrajeo de las abejas.

Cuesta Blanca (Fig 16A, pág. 60): los rangos horarios establecidos fueron 3:

- de 10 a 14 hs: sólo *S. iridifolium ssp. valdivianum* en flor;
- de 14 a 16 hs: ambas especies en flor;
- de 16 a 20 hs: sólo *S. chilense* en flor.

Se determinó qué, al abrir *S. chilense* las flores de *S. iridifolium ssp. valdivianum* que quedaban aun abiertas (aproximadamente un 60%) dejaron de ser visitadas. Por otro lado, *S. chilense* recibió más visitas en la categoría horaria en que ambas especie estaban abiertas que entre las 16 a 20 hs que es cuando sólo las flores de *S. chilense* se encontraban abiertas ($W=372,5$; $p= 0,0167$).

Chapicuy (Fig 16B, pág. 60): Los rangos horarios fueron:

- de 10.15 a 14.15 hs: sólo *S. platense* en flor;
- de 14.15 a 19.15 hs: ambas especies (*S. platense* y *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum*) en flor.

Si bien las diferencias en las frecuencias de visitas a *S. platense* entre categorías horarias no fueron significativas ($W=263$; $p=0,7186$), si se observó una disminución en las visitas cuando empezaron a abrir las flores de *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum*. Cuando ambas especies estaban en flor *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum* fue significativamente mas visitado que *S. platense* ($W=224,5$ $p=0,0431$).

Tandil (Fig 16C, pág. 60): Se establecieron los siguientes rangos horarios:

- de 10.15 a 16.15hs: las 3 especies en flor.
- de 16.15 a 18.00hs: sólo *S. chilense* y *S. iridifolium ssp valdivianum* var. 2 en flor.

Entre las 10.15 y las 16.15 hs. *Lanthanomelissa discrepans* visitó con más frecuencia a *S. chilense*. Sin embargo esta diferencia no fue significativa, es decir que las abejas visitaron en frecuencias similares a las 3 especies de *Sisyrinchium* en el horario mencionado (en el que sus floraciones se solapaban) ($H=1,61$; $p=0,2128$). Las comparaciones entre *S. iridifolium ssp. valdivianum* var. 2 y *S. chilense* en el rango horario comprendido entre las 16.15 y 18 hs. no se realizaron debido a que el n de intervalos de observación para *S. iridifolium ssp. valdivianum* var. 2. fue muy bajo (ver Tabla 3, en página 42, donde se detalla el número de intervalos de observación para cada especie). Por otro lado, al comparar las frecuencias de visitas a *S. chilense* entre las 2 categorías horarias tampoco se detectaron diferencias significativas ($W=414$; $p=0,133$).

Aislamiento reproductivo.

Los valores medios y desvíos estándares de las frecuencias de visita de los polinizadores para cada especie y en cada sitio que fueron utilizados para estimar el aislamiento etológico se muestran en la Tabla 4 (pág. 43). Cabe destacar que se tuvieron en cuenta al evaluar el aislamiento por polinizadores, exclusivamente, a aquellos visitantes que se observaron transportando polen. Sólo en el caso de *S. unguiculatum* de Pampa de Achala se consideraron como polinizadores a sírfidos del género *Carposcalis*, que si bien no fueron observados cargando polen o contactando los estigmas, sus visitas representaron más del 90% del total observado. Siendo *S. unguiculatum* (en esta población) una especie que no se autopoliniza, la alta fructificación observada indicaría que algún vector de polen estaría interviniendo en su reproducción, y *Carposcalis sp.* sería el único candidato posible según nuestras observaciones. En la Fig. 17 (pág. 61) se muestran las curvas de distribución de las longitudes de los estambres que fueron utilizados para calcular el aislamiento mecánico. Los valores de RI, AC, T y RC de cada barrera y para cada combinación de especies en las distintas poblaciones se muestran en la Tabla 5 (pág. 44).

Al evaluar la fuerza de las distintas barreras por si mismas (sin tener en cuenta la resto de las barreras que actúan) (RI), podemos observar que la barrera temporal sólo tuvo una gran importancia en las dos especies coexistentes en Cuesta Blanca. El aislamiento mecánico alcanzó valores máximos cercanos a 1 en todas las especies y poblaciones a excepción de la combinación de *S. iridifolium ssp. valdivianum* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* var. 2 de Tandil. Estas dos especies presentaron valores de aislamiento mecánico muy bajos cercanos a 0. Sin considerar a esta última combinación de especies

mencionadas, las especies coexistentes de Pampa de Achala y Carapunco presentaron los valores más bajos de RI para el aislamiento mecánico. A pesar de ser los más bajos estarían sobreestimados ya que no es sólo la longitud de los estambres lo que determina el lugar de depósito de polen sino también el comportamiento de los polinizadores. Considerando que las flores de estas dos especies presentan arquitectura rotácea, de ser polinizadas por los mismos insectos esperaríamos que el polen se depositara en igual lugar, por lo que la importancia de esta barrera sería casi nula. Los valores más altos de aislamiento etológico fueron detectados en las especies de las poblaciones de Carapunco, Pampa de Achala y Rodeo Grande (Fig. 18; pág. 62).

Al considerar la contribución absoluta (Fig. 19; pág. 63) de cada barrera podemos observar que, la que más contribuye al aislamiento en las dos especies coexistentes de Pampa de Achala y de Rodeo grande, en *S. chilense* var. 2 de Carapunco y en ambas variedades de *S. iridifolium ssp valdivianum* de Tandil, es la barrera etológica. Si bien las especies comparten al principal polinizador en la población de Tandil, también son visitadas por especies de halíctidos no compartidas (Tabla 4; pág. 43) lo que explica el valor alto de esta barrera. En Cuesta Blanca, en Chapicuy y en *S. chilense* de Tandil la barrera que más contribuiría al aislamiento es la temporal. Al comparar las mismas combinaciones de especies entre poblaciones podemos ver que la importancia de cada barrera varía entre sitios (Fig. 19, pág. 63).

Si bien hay barreras que por si mismas contribuyen fuertemente al aislamiento total como es el caso de la barrera temporal en Cuesta Blanca (Fig. 19; pág. 63), en la mayoría de los casos las especies se encuentran aisladas debido a una combinación de barreras de distinto tipo (Fig 19). En el caso de todas las poblaciones menos Chapicuy, Tandil (en la interacción de *S. chilense* con las dos variedades de *S. iridifolium ssp. valdivianum*) y Cuesta Blanca, el aislamiento total se consigue con la contribución de barreras temporales y etológicas. Mientras que en las 3 poblaciones mencionadas, cuyas especies son polinizadas por *Lanthanomelissa sp.*, una vez superadas estas barreras (temporales y etológicas) el aislamiento mecánico contribuye a aislar por completo a las especies coexistentes.

Las únicas especies que presentaron bajos valores de aislamiento total recíproco fueron *S. iridifolium ssp. valdivianum* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* var. 2 de Tandil. Dichas especies tienen patrones de floración solapados en gran parte, comparten al principal polinizador y presentan un muy bajo nivel de aislamiento mecánico. El resto de

las combinaciones de especies analizadas presentaron valores de T cercanos a 1 en todos los sitios.

DISCUSIÓN

Todos los pares de especies estudiados mostraron valores de aislamiento pre-gámico muy altos, próximos a 1, a excepción de la combinación *S. iridifolium ssp. valdivianum* - *S. iridifolium ssp. valdivianum* var. 2 de Tandil. De todas las combinaciones analizadas, ésta última sería la que más probabilidad de flujo de polen inter-específico podría tener. En todos los casos el aislamiento se alcanzó por la actuación conjunta de barreras de distinto tipo.

Se observaron dos situaciones o patrones generales de aislamiento (Fig. 20; pág. 64). El primer patrón se da en especies coexistentes que se mantienen aisladas principalmente por barreras de tipo temporales y etológicas como fue el caso de la combinación de *S. chilense* (*S. chilense* var. 2 en Carapunco) y *S. unguiculatum* de las poblaciones de Pampa de Achala y Carapunco (Fig. 20A; pág. 64). En estos casos, el aislamiento temporal mostró valores bastante altos (en *S. unguiculatum*) tanto al ser considerado sólo (RI) como al ponderarse en relación a los otros tipos de barreras (AC, RC). Sin embargo, los picos de floración diario de las especies coexistentes coincidieron exactamente por lo que esta barrera estaría sobreestimada. En cuanto al aislamiento etológico, se observó en esta tesis que *S. unguiculatum* (única especie que ofrece polen como única recompensa) fue la que presentó los locis de color más separados del resto de las especies oleíferas estudiadas. Si bien no se ha establecido una distancia mínima que indique en qué medida las abejas distinguen a las especies, mayores distancias entre los locis en el triángulo de Maxwell indican mayores probabilidades de que las flores analizadas sean percibidas como distintas por el polinizador evaluado (Chittka y Kevan 2005). Entonces, los resultados obtenidos serían un indicio de que el color podría ser uno de los atractivos que determine el tipo de visitante que va a las flores de las distintas especies de *Sisyrinchium*, es decir, podría ser un indicativo del tipo de recompensa ofrecida.

Los valores de RI de la barrera mecánica para esta combinación de especies fueron los más bajos observados y su contribución relativa al aislamiento total fue nula. Al comparar las longitudes de las piezas fértiles se evidenció un claro solapamiento entre las especies coexistentes. Si consideramos además, que el lugar de depósito de polen sobre las abejas no solo depende de la longitud de los estambres sino también de la arquitectura de la

flor y, que tanto *S. chilense* como *S. unguiculatum* poseen flores rotáceas, podemos deducir que el valor de aislamiento mecánico estaría sobreestimado. Es probable que, si las dos especies fueran visitadas por los mismos polinizadores, el polen de las flores de ambas quedaría depositado sobre el abdomen de los mismos.

El segundo patrón detectado fue aquel según el cual el aislamiento se da por una combinación de barreras temporales, etológicas y mecánicas, como se observó en las siguientes combinaciones de especies: *S. platense*- *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum*, *S. chilense*- *S. iridifolium ssp. valdivianum* y *S. chilense*- *S. iridifolium ssp. valdivianum* var 2 de las poblaciones de Tandil, Cuesta Blanca y Chapiçuy (Fig. 20B; pág. 64). En estos casos, si bien se observó cierto grado de solapamiento en los patrones, los picos de floración de las especies coexistentes no coincidieron. De hecho, fue la barrera temporal la que más contribuyó al aislamiento para todas las especies (excepto *S. iridifolium ssp. valdivianum* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* var. 2 de Tandil). En Cuesta Blanca, en particular, ésta barrera por si misma impediría más del 95% del flujo génico inter-específico. En *S. chilense* (cuyas flores son protándricas), se observó que las flores en estadio femenino abrieron antes que las flores en estadio masculino por lo que en el momento en que las floraciones de *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* se solapan no habría polen de *S. chilense* disponible por lo que el valor de aislamiento de la especie que abre por la mañana (*S. iridifolium ssp. valdivianum*) sería aún mayor. Si bien existen evidencias de sistemas en los que la barrera fenológica cumple un rol importante (Martin et al. 2007, Waser 1978), este tipo de aislamiento es el que menos ha sido estudiado (Coyne y Orr 2004) y no existen trabajos previos en los que se haya evaluado la contribución actual de barreras fenológicas diarias tal como se realizó en esta tesis.

En relación al aislamiento floral, las especies coexistentes presentaron distinto elenco de polinizadores pero los vectores de polen más abundantes y eficientes fueron, en todos los casos, abejas colectoras de aceites del género *Lanathanomelissa* evidenciándose un depósito diferencial de polen sobre el cuerpo de las mismas tal como había sido descrito por Cocucci y Vogel (2001). En estas poblaciones las especies simpátricas presentaron dos tipos de arquitecturas florales (hipocrateriforme y rotácea) lo cuál determinó un comportamiento diferencial de las abejas y consecuentemente la deposición de polen sobre tórax y abdomen en *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum* y *S. chilense* y sobre cabeza y tórax en *S. platense*, *S. iridifolium ssp. valdivianum* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* var 2. Otro comportamiento de las abejas del género *Lanathanomelissa* que ya había sido descrito (Cocucci y Vogel 2001) y que también fue observado en esta tesis, es el de preferencia por

flores nuevas. Esto es explicado probablemente debido a que los aceites de los tricomas de éste género de plantas no se regeneran por lo que las flores más visitadas tienen menor cantidad disponible. En las poblaciones de Cuesta Blanca, y Chapicuy se observó una tendencia a la disminución en la frecuencia de visitas de la especie que abre más temprano al comenzar a florecer la segunda especie. Esto haría aún menos probable el flujo de polen entre las especies coexistentes. El sistema conformado por las plantas secretoras de aceites florales y las abejas colectoras de aceites ha sido considerado uno de los sistemas más especializados dentro de los mutualismos planta-polinizador (e.g. Johnson y Steiner 2000, Steiner y Whitehead 1990 y 1991). En particular, las abejas del género *Lanthanomelissa* dependen exclusivamente de *Sisyrinchium* como fuente de aceites no volátiles y polen (Rozen et al. 2006, Cocucci & Vogel 2001, Neff y Simpson 1981) que utilizan para alimentar a sus larvas e impermeabilizar los nidos (e.g. Rozen et al. 2006, Buchmann 1987, Cane et al. 1983). Dichas abejas poseen setas especiales en los basitarsos de las patas delanteras con los que abren los elaióforos y absorben su contenido (Cocucci & Vogel 2001, Cocucci et al. 2000). Cualquier otro insecto que visite estas flores oleíferas lo puede hacer porque *Lanthanomelissa* rompió previamente los elaióforos o porque buscan polen (Cocucci y Vogel 2001) como sería el caso de los halictidos, colétidos, avispa y sírfidos observados en esta tesis. Desde el punto de vista de las plantas, las especies productoras de aceites en general requieren de estas abejas para reproducirse sexualmente (Machado, 2004). En este estudio pudimos observar que al menos 4 de las especies oleíferas de *Sisyrinchium* estudiadas (*S. chilense*, *S. platense* y *S. pachyrhizum* ssp. *pachyrhizum*, *S. iridifolium* ssp. *valdivianum* var 2.) dependen de las visitas de *Lanthanomelissa* para su reproducción. El resto de las especies (*S. chilense* var. 2, *S. iridifolium* ssp. *valdivianum*) pueden autopolinizarse, por lo que pueden prescindir de las abejas colectoras de aceites para su reproducción. Cabe aclarar que si bien en esta tesis sólo se observó a abejas del género *Lanthanomelissa* visitando las flores de *S. platense*, existen registros previos que indican como polinizador de esta especie a *Chalepogenus roitmani* en poblaciones de la provincia de Buenos Aires (Devoto y Medan 2008).

Dos de las combinaciones de especies estudiadas quedarían fuera de estos dos patrones descritos. Se trata de las dos variedades de *S. iridifolium* ssp. *valdivianum* coexistentes en Tandil y de *S. chilense* var. 2 y *S. iridifolium* ssp. *valdivianum* de Rodeo Grande. En el primer caso, las variedades presentaron los valores más bajos de aislamiento, floreciendo simultáneamente, compartiendo a los mismos polinizadores y depositando el polen sobre el mismo lugar en el cuerpo de los mismos. En el segundo caso, si bien los

picos de floración no coincidieron, la importancia de esta barrera fue muy baja. Por otro lado, la barrera mecánica presentó valores de importancia cercanos a 1 pero este mecanismo no actuaría en la actualidad debido a que las especies no comparten polinizadores. De hecho, aunque los halítidos vistos en *S. chilense* var. 2 llevaban polen, las tasas de visita fueron tan bajas que no explicarían el 100% de fructificación observada bajo polinización libre, lo que nos permite suponer que dependería de la autopolinización espontánea casi como único método de reproducción. *S. chilense* var. 2 fue la única de las especies oleíferas en las que no observamos visitas de abejas colectoras de aceites y fue la única que presentó una considerable reducción en el elaióforo.

Cabe destacar que las flores de las especies que se determinó se autopolinizaban (*S. iridifolium* ssp. *valdivianum*, *S. chilense* var 2 y *S. unguiculatum* de Carapunco) presentan el polen expuesto en las anteras ya en estado de pimpollo por lo que, en general, las flores al abrirse ya tienen los estigmas saturados con polen propio (Fig. 3A; pág. 47). Esto disminuiría la probabilidad de que los granos de polen de la especie coexistente (en los casos en que los polinizadores son compartidos) germinen en los estigmas. Tal como propone Levin (1971) el método reproductivo por sí mismo podría ser una barrera. Sin embargo, no hay que olvidar que la llegada de polen de otras flores de la misma especie se vería igualmente afectada.

En relación a las contribuciones relativas de las barreras a nivel geográfico, si bien sólo evaluamos 2 sitios en los que coexisten *S. chilense* y *S. iridifolium* ssp. *valdivianum* (Cuesta Blanca y Tandil) y dos en los que coexisten *S. chilense* y *S. unguiculatum* estos son representativos de las zonas donde sus distribuciones geográficas se superponen. Como ya dijimos, en todas las poblaciones las barreras que intervinieron en el aislamiento fueron las mismas (temporales, etológicas y mecánicas) para la primera combinación de especies y casi exclusivamente etológicas para la segunda combinación de especies. Sin embargo, la importancia absoluta y la contribución de cada una de ellas varió entre los sitios. Sólo existe un estudio hasta el momento que evalúa el aislamiento en más de una población de especies simpátricas y también se observó una variación en los patrones de floración (Martin y Willis 2007). Esta tesis brinda una evidencia más de la importancia de abordar estudios a escala geográfica.

Si bien no evaluamos todas las barreras posibles, los resultados obtenidos en relación a la importancia actual de las barreras pre-gámicas en *Sisyrinchium* son un primer paso para luego explorar cual fue la importancia histórica de las mismas.

Apéndice 1: Índices de aislamiento reproductivo basados en las fórmulas propuestas por Ramsey et al. 2003.

Índice de aislamiento temporal: Se calculó, el área de superposición entre las dos curvas de floración diaria (AI) y luego la relación entre el área de intersección y el área de la curva de cada especie (A_i).

Es decir que, el aislamiento temporal se calculó, entonces, como:

$$RI_i = 1 - AI / A_i$$

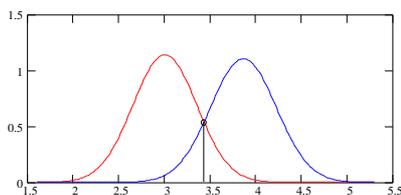
Índice de aislamiento etológico: Para cada especie se sumaron las frecuencias de visitas de los insectos polinizadores compartidos por las dos especies de *Sisyrinchium* coexistentes y se dividió por la frecuencia de visita de todos los insectos polinizadores comunes y no comunes. Así por ej,

$$RI_i = 1 - ((f1 + f2) / (f1 + f2 + f3 + f4))$$

donde $f1$ y $f2$ son frecuencias de insectos en común y $f1$ a $f4$ son las frecuencias de todos los insectos polinizadores de ambas especies.

Índice de aislamiento mecánico: Como la longitud de los estambres determina en gran parte el lugar de depósito de polen sobre el cuerpo de los polinizadores, esta variable se utilizó como una aproximación para estimar el aislamiento mecánico. Para esto, se midieron los estambres de entre 40 y 108 flores de cada especie por población. Las mismas fueron colectadas y conservadas en alcohol 70% y luego fotografiadas bajo una lupa Leica M420 equipada con una cámara digital Leica DFC 420. Las fotos obtenidas se midieron luego con el programa SigmaScan.

Se estimaron los parámetros μ y σ , es decir la media y la raíz cuadrada de la varianza para cada curva de distribución normal de las longitudes de los estambres.



Cada una de estas curvas representa la distribución de la longitud de los estambres. El área de intersección, AI, se calculó como la superposición entre las dos curvas (roja y azul) correspondientes a los pares de especies comparados. Cada curva tiene un área=1. Así,

$$RI_i=1-AI.$$

Este valor es igual para las dos especies ya que las áreas de las campanas son iguales.

En detalle los cálculos realizados con el programa Mathcad 14 fueron los siguientes: los parámetros μ y σ se introdujeron a la función normal para cada especie:

$$w(x, \mu, \sigma) := \frac{1}{\sigma \cdot \sqrt{2 \cdot \pi}} \cdot e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2 \cdot \sigma^2}}$$

Luego se obtuvo el valor de x donde ambas campanas se cruzan (indicado con una línea negra y un circulito en el gráfico). Matemáticamente se obtiene de despejar x de la siguiente igualdad, donde $\mu_1, \sigma_1, \mu_2, \sigma_2$ son los parámetros de las especies roja (subíndice 1) y azul (subíndice 2).

$$\frac{1}{\sigma_1 \cdot \sqrt{2 \cdot \pi}} \cdot e^{-\frac{(x-\mu_1)^2}{2 \cdot \sigma_1^2}} = \frac{1}{\sigma_2 \cdot \sqrt{2 \cdot \pi}} \cdot e^{-\frac{(x-\mu_2)^2}{2 \cdot \sigma_2^2}}$$

El área de intersección (AI) entre las dos curvas se calculó como:

$$\text{Intersec} := \left(\int_{-\infty}^{\text{cruce1}(\mu_1, \mu_2, \sigma_1, \sigma_2)} w_2(x) dx \right) + \left(\int_{\text{cruce1}(\mu_1, \mu_2, \sigma_1, \sigma_2)}^{\infty} w_1(x) dx \right)$$

Por otro lado, con los valores de RI obtenidos, se calculó la contribución absoluta al aislamiento (AC), el aislamiento total (T) y contribución relativa al aislamiento (RC):

La contribución absoluta (AC) de un componente de aislamiento reproductivo (RI) en la etapa n en la historia de vida se calculó como:

$$AC_n = RI_n \left(1 - \sum_{i=1}^{n-1} AC_i \right)$$

Para m componentes de aislamiento reproductivo, el aislamiento total (T) se calculó como:

$$T = \sum_{i=1}^m AC_i$$

La contribución relativa (RC) de cada barrera reproductiva al aislamiento total en la etapa n de la historia de vida se calculó como:

$$RC_n = AC_n / T$$

Tabla 1: Clasificación de barreras reproductivas (basada en Coyne y Orr 2004)

I) Barreras reproductivas prezigóticas, pregámicas: impiden el flujo génico a miembros de otras especies antes de la transferencia de polen.

A) Aislamiento ecológico: basado principalmente en diferencias en la ecología de las especies, por ejemplo: barreras que son productos directos de la adaptación al ambiente local.

1. Aislamiento de hábitat: las especies son propensas genética o biológicamente a ocupar diferentes hábitats cuando crecen en una misma área general, previniendo o limitando el intercambio génico a través de una separación espacial durante la temporada reproductiva. Este aislamiento puede darse por: adaptación diferencial, competencia o una combinación de estos factores.

2. Aislamiento temporal: el flujo génico entre taxa simpátricos es impedido porque los mismos se reproducen en distintos momentos.

3. Aislamiento floral (por polinizadores): El flujo génico es reducido porque las especies de plantas interaccionan diferencialmente con los polinizadores. Esto se puede dar de 2 maneras:

3a. Aislamiento etológico: las especies son polinizadas por distintos polinizadores los cuales distinguen las flores por diferencias en color, olor, néctar o morfología.

3b. Aislamiento mecánico: el depósito de polen de las especies de plantas se da diferencialmente sobre el cuerpo de los mismos polinizadores o se da una restricción mecánica por la cual un tipo de polinizador no puede acceder a las flores de una determinada especie de planta.

B) Aislamiento por sistema reproductivo: La evolución de autogamia parcial o total o de apomixis puede resultar en la creación de un nuevo taxón o un set de linajes. Esta no es una barrera reproductiva en el mismo sentido que las otras barreras mencionadas.

II) Barreras reproductivas prezigóticas, postgámicas: actúa después de la transferencia de polen pero antes de la fertilización.

A) Aislamiento gamético: las gametas transferidas no pueden fertilizar.

1. Aislamiento gamético no competitivo: problemas intrínsecos con la transferencia, almacenamiento o fertilización de gametas heteroespecíficas.

2. Aislamiento gamético competitivo: preferencia de polen conoespecífico. Las gametas heteroespecíficas no son adecuadamente transferidas, almacenadas o usadas en la fertilización sólo cuando compiten con gametas conoespecíficas.

III) Aislamiento postzigótico: esterilidad o inviabilidad de los híbridos.

A) Extrínseco: el aislamiento postzigótico depende del ambiente tanto biótico como abiótico.

1. Inviabilidad ecológica: los híbridos se desarrollan normalmente pero tienen viabilidad reducida porque no disponen de un nicho adecuado.

2. Esterilidad comportamental: los híbridos tienen gametogénesis normal pero son menos fértiles que las especies parentales porque no pueden conseguir parejas. Generalmente, los híbridos tienen un fenotipo intermedio que los hacen poco atractivos.

B) Intrínseco: el aislamiento postzigótico es el reflejo de un problema de desarrollo de los híbridos que es independiente del ambiente.

1. Inviabilidad de los híbridos: los híbridos sufren de dificultades en el desarrollo causando parcial o total mortalidad.

2. Esterilidad de los híbridos: los híbridos sufren lesiones fisiológicas que los hacen incapaces de reproducirse.

Tabla 2: Correlaciones de las 8 variables de color con los dos primeros ejes del análisis de componentes principales (PCA)

Variables	PC1	PC2
300-350	-0,37	0,09
350-400	-0,37	-0,20
400-450	-0,30	-0,58
450-500	-0,32	-0,51
500-550	-0,38	0,05
550-600	-0,35	0,40
600-650	-0,36	0,37
650-700	-0,36	0,24

Tabla 3: Cantidad de intervalos de observación de *Lanthanomelissa sp.* para cada rango horario establecido en las poblaciones de Cuesta Blanca, Chapicuy y Tandil.

Población	Especie	Rango horario	n (intervalos de observación de 15 a 20 min.)
Cuesta Blanca	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	10 a 14	44
Cuesta Blanca	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	14 a 16	14
Cuesta Blanca	<i>S. chilense</i>	14 a 16	22
Cuesta Blanca	<i>S. chilense</i>	16 a 20	21
Chapicuy	<i>S. platense</i>	10,15 a 14,15	17
Chapicuy	<i>S. platense</i>	14,15 a 19,15	16
Chapicuy	<i>S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum</i>	14,15 a 19,15	18
Tandil	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	10,15 a 16,15	23
Tandil	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum var. 2</i>	10,15 a 16,15	27
Tandil	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum var. 2</i>	16,15 a 18	4
Tandil	<i>S. chilense</i>	10,15 a 16,15	28
Tandil	<i>S. chilense</i>	16,15 a 18	16

Tabla 4: Valores medios y desvíos estándares (D.E) de las tasas de visita de los polinizadores observados en las especies de *Sisyrinchium* coexistentes en las poblaciones estudiadas. n: cantidad de censos (de 20 minutos cada uno).

Población	Especie	Polinizador	n	Media	D.E
Cuesta Blanca	<i>S. chilense</i>	<i>Lanthonomelissa discrepans</i>	43	0,43	0,86
Cuesta Blanca	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	<i>Lanthonomelissa discrepans</i>	58	0,14	0,35
Carapunco	<i>S. chilense</i> var. 2	Halictidae	51	0,02	0,1
Carapunco	<i>S. unguiculatum</i>	Halictidae	32	0,03	0,18
Chapicuy	<i>S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum</i>	<i>Lanthonomelissa magaliae</i>	18	0,93	1,24
Chapicuy	<i>S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum</i>	Halictidae	18	0,04	0,11
Chapicuy	<i>S. platense</i>	<i>Lanthonomelissa magaliae</i>	33	0,31	0,61
Chapicuy	<i>S. platense</i>	Halictidae	33	0,25	0,63
P. de Achala	<i>S. chilense</i>	<i>Lanthonomelissa discrepans</i>	51	0,08	0,24
P. de Achala	<i>S. unguiculatum</i>	<i>Carposcalis sp.</i>	75	0,11	0,2
Rodeo Grande	<i>S. chilense</i> var. 2	Halictidae	20	0,01	0,05
Rodeo Grande	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	<i>Lanthonomelissa discrepans</i>	47	0,01	0,03
Tandil	<i>S. chilense</i>	<i>Lanthonomelissa discrepans</i>	49	0,58	1,03
Tandil	<i>S. chilense</i>	Halictidae	49	0,53	1,15
Tandil	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	<i>Lanthonomelissa discrepans</i>	23	0,1	0,37
Tandil	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i> var. 2	<i>Lanthonomelissa discrepans</i>	31	0,08	0,23
Tandil	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i> var. 2	Halictidae	31	0,12	0,41

Tabla 5: Importancia (RI), contribuciones absolutas (AC) y relativas (RC) al aislamiento total (T) de las barreras reproductivas pre-gámicas temporales, etológicas y mecánicas para cada combinación de especies de *Sisyrinchium* coexistente evaluada en las seis poblaciones estudiadas.

Población	Especie	RI			AC			T	RC		
		temporal	etológico	mecánico	temporal	etológico	mecánico		temporal	etológico	mecánico
Rodeo Grande	<i>S. chilense</i> var. 2	0,357	1,000	1,000	0,357	0,643	0,000	1,000	0,357	0,643	0,000
Rodeo Grande	<i>S. iridifolium</i> ssp. valdivianum	0,330	1,000	1,000	0,330	0,670	0,000	1,000	0,330	0,670	0,000
P. de Achala	<i>S. chilense</i>	0,000	1,000	0,886	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000
P. de Achala	<i>S. unguiculatum</i>	0,463	1,000	0,886	0,463	0,537	0,000	1,000	0,463	0,537	0,000
Carapunco	<i>S. chilense</i> var. 2	0,115	1,000	0,706	0,115	0,885	0,000	1,000	0,115	0,885	0,000
Carapunco	<i>S. unguiculatum</i>	0,638	1,000	0,706	0,638	0,362	0,000	1,000	0,638	0,362	0,000
Cuesta Blanca	<i>S. chilense</i>	0,963	0,246	1,000	0,963	0,009	0,028	1,000	0,963	0,009	0,028
Cuesta Blanca	<i>S. iridifolium</i> ssp. valdivianum	0,959	0,754	1,000	0,959	0,031	0,010	1,000	0,959	0,031	0,010
Chapicuy	<i>S. pachyrhizum</i> ssp. pachyrhizum	0,486	0,392	0,997	0,486	0,201	0,311	0,999	0,487	0,202	0,311
Chapicuy	<i>S. platense</i>	0,534	0,797	0,997	0,534	0,371	0,094	1,000	0,534	0,372	0,094
Tandil	<i>S. chilense</i>	0,635	0,557	0,997	0,635	0,203	0,161	0,999	0,635	0,204	0,161
Tandil	<i>S. iridifolium</i> ssp. valdivianum var. 2	0,183	0,939	0,997	0,183	0,767	0,050	1,000	0,183	0,767	0,050
Tandil	<i>S. chilense</i>	0,746	0,521	0,991	0,746	0,132	0,121	0,999	0,747	0,132	0,121
Tandil	<i>S. iridifolium</i> ssp. valdivianum	0,126	0,917	0,991	0,126	0,802	0,072	0,999	0,126	0,802	0,072
Tandil	<i>S. iridifolium</i> ssp. valdivianum	0,044	0,667	0,131	0,044	0,637	0,042	0,723	0,061	0,881	0,058
Tandil	<i>S. iridifolium</i> ssp. valdivianum var. 2	0,381	0,733	0,131	0,381	0,454	0,022	0,857	0,445	0,530	0,025

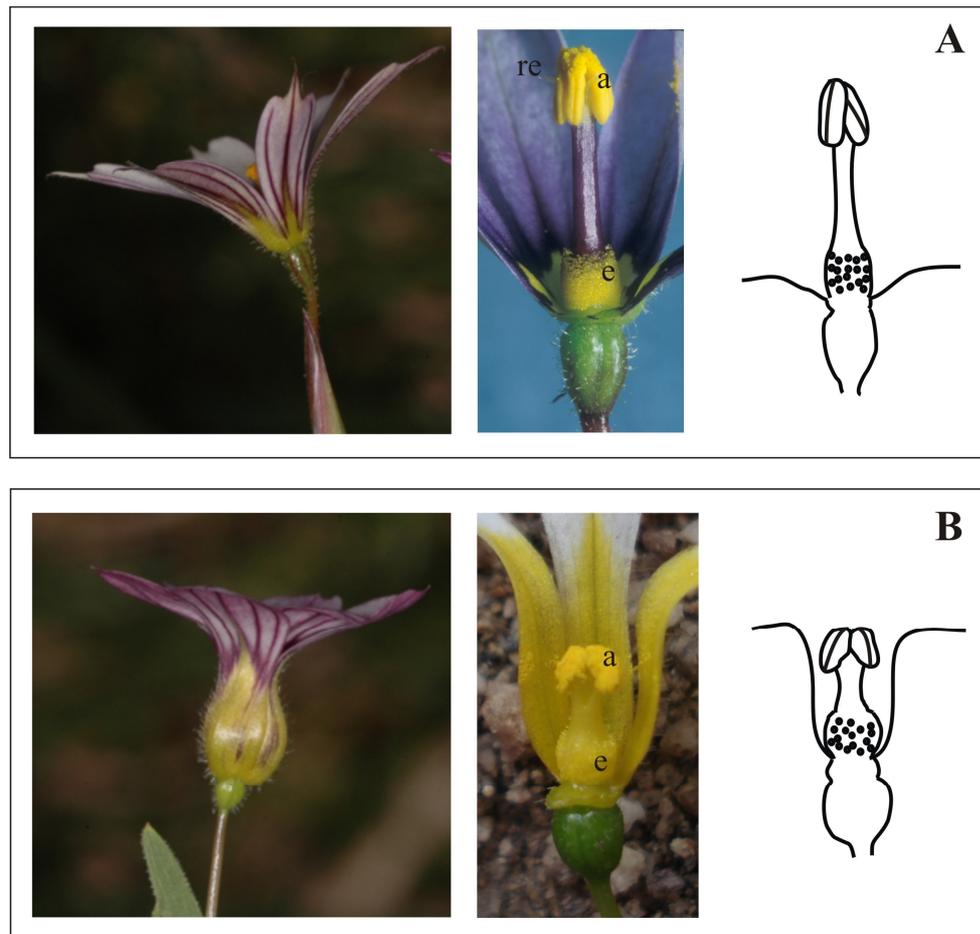


Figura 1: Morfología de las flores de *Sisyrinchium* estudiadas. En A y B se observa: hacia la izquierda, las vistas laterales de las flores completas. En el centro se observan las piezas fértiles en flores a las que se les removieron 3 tépalos. A la derecha se encuentran dibujos esquemáticos de ambos morfo-tipos. **A.** flores rotáceas. Nótese que las piezas fértiles quedan expuestas. **B.** flores infundibuliformes en las que las piezas fértiles quedan contenidas dentro del tubo que forman la base de los tépalos. **a:** anteras; **e:** elaióforo; **re:** rama estigmática

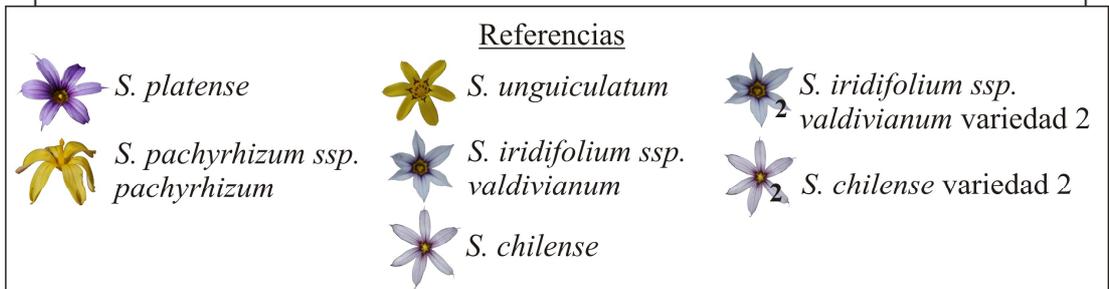
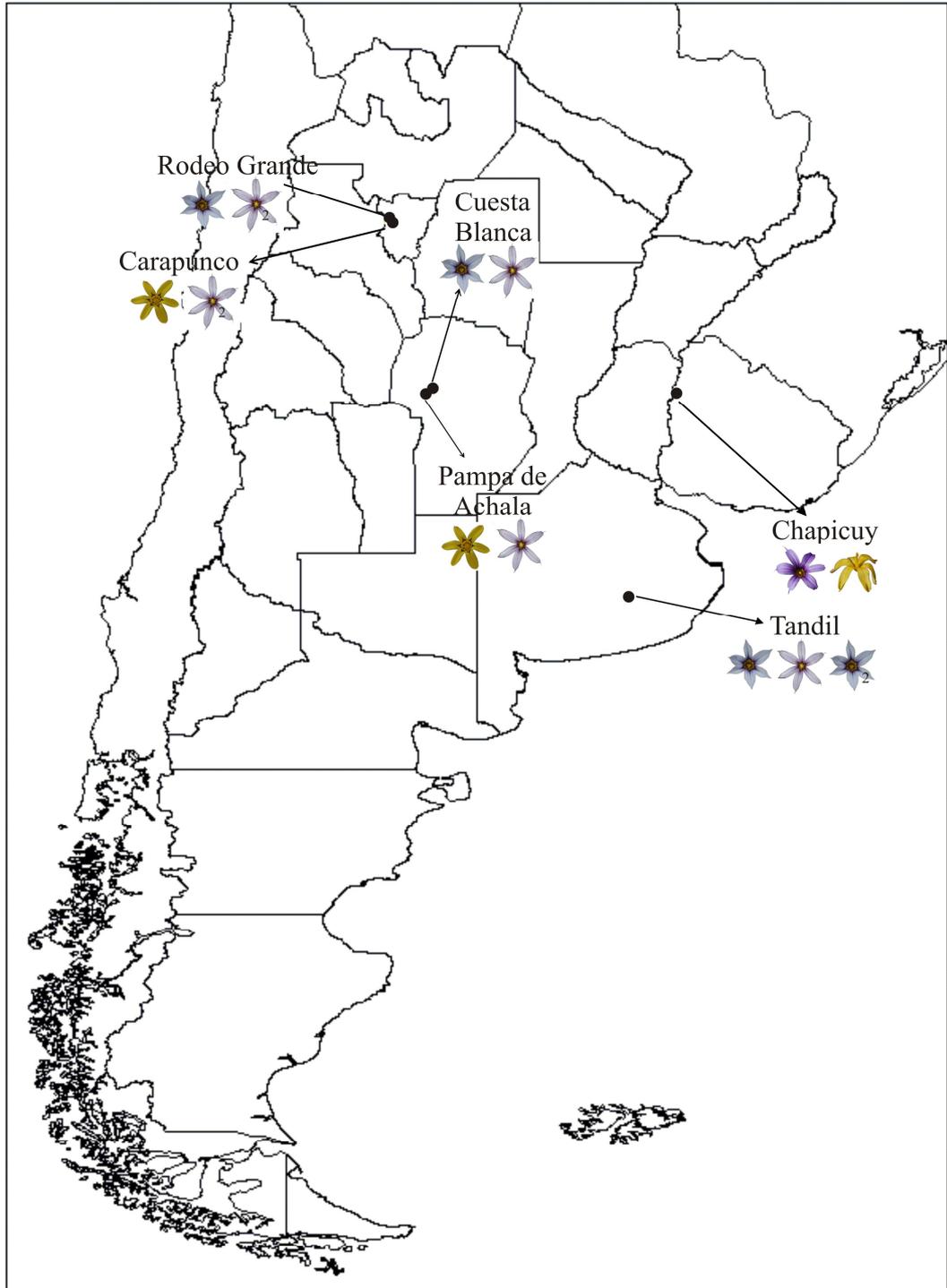


Figura 2. Sitios de estudio y especies presentes en cada sitio.

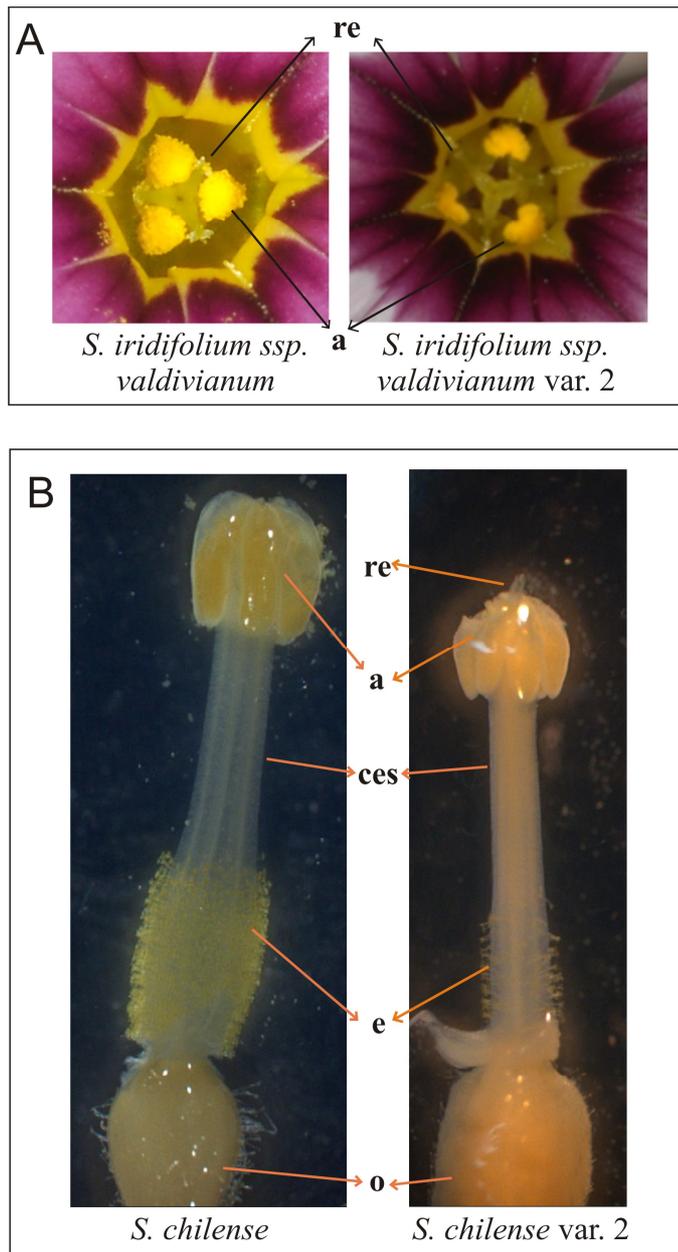


Figura 3: Diferencias entre variedades de *Sisyrinchium* **A:** Detalle de las piezas fértiles de *S. iridifolium ssp. valdivianum* (a la izquierda) y *S. iridifolium ssp. valdivianum var. 2* (a la derecha). Esta última variedad presenta ramas estigmáticas más largas y anteras más separadas entre sí que *S. iridifolium ssp. valdivianum*., por lo que el polen no puede depositarse espontáneamente en los estigmas de la misma flor. **B:** Vista lateral de flores de *S. chilense* (a la derecha) y de *S. chilense var. 2* (a la izquierda) a las que se les removieron los tépalos. Se observa que *S. chilense* presenta, en la base de la columna estaminal, elaióforos densos. *S. chilense var. 2*, en cambio, posee unos pocos tricomas aislados. **a:** anteras; **re:** ramas estigmáticas; **ces:** columna estaminal; **e:** elaióforo; **o:** ovario.

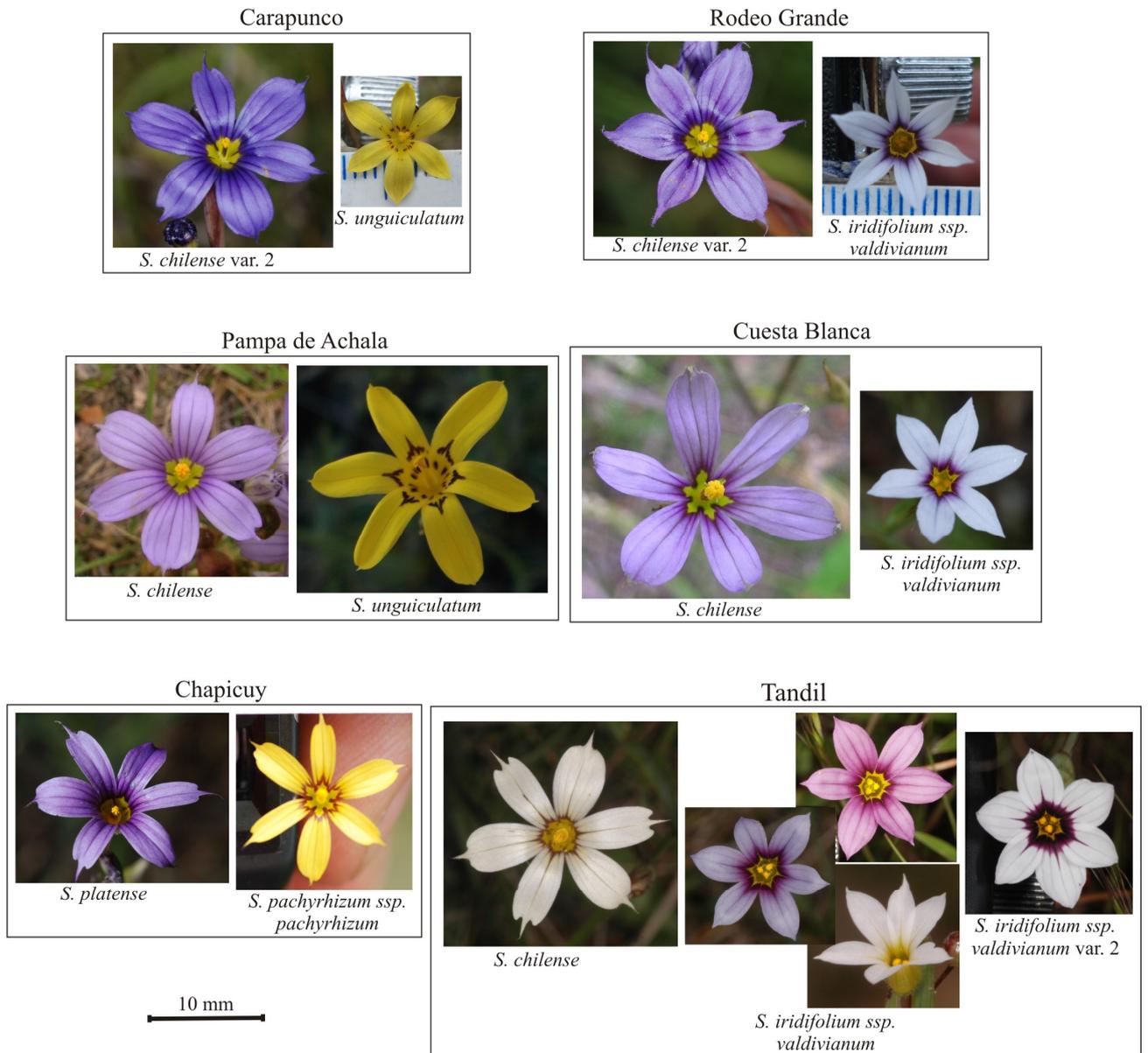
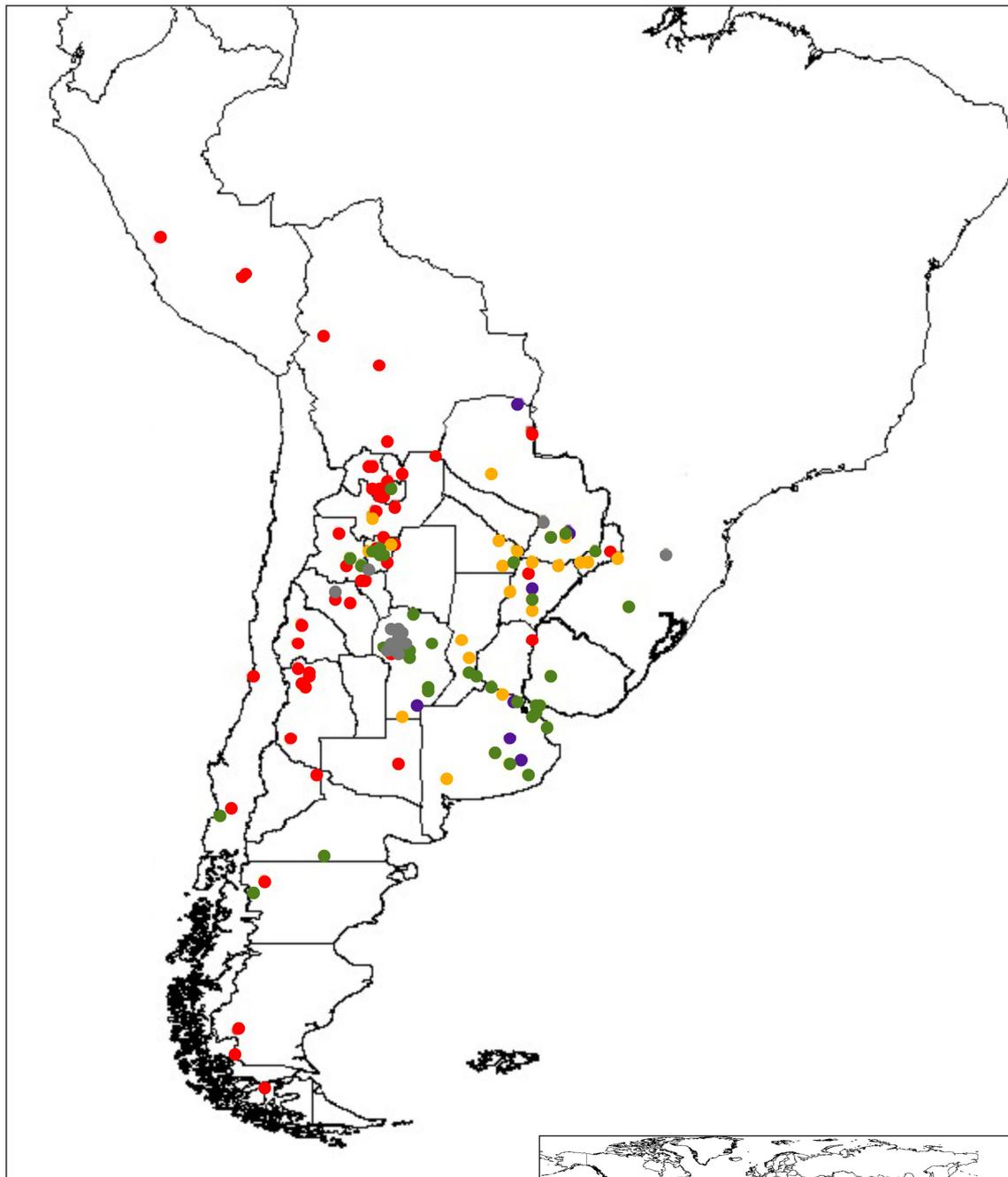


Figura 4: Especies de *Sisyrinchium* estudiadas en cada sitio de muestreo. Nótese la variabilidad existente en colores y tamaños entre las mismas especies de distintos sitios.



- *S. unguiculatum*
- *S. iridifolium ssp. valdivianum*
- *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum*
- *S. platense*
- *S. chilense*

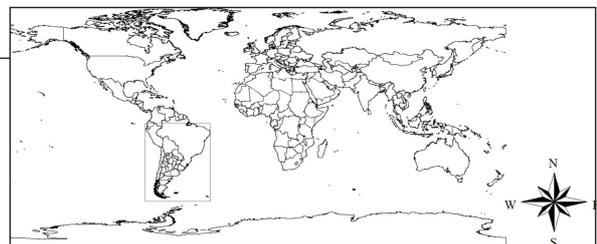


Figura 5: Mapa de distribución de las especies de *Sisyrinchium* estudiadas.

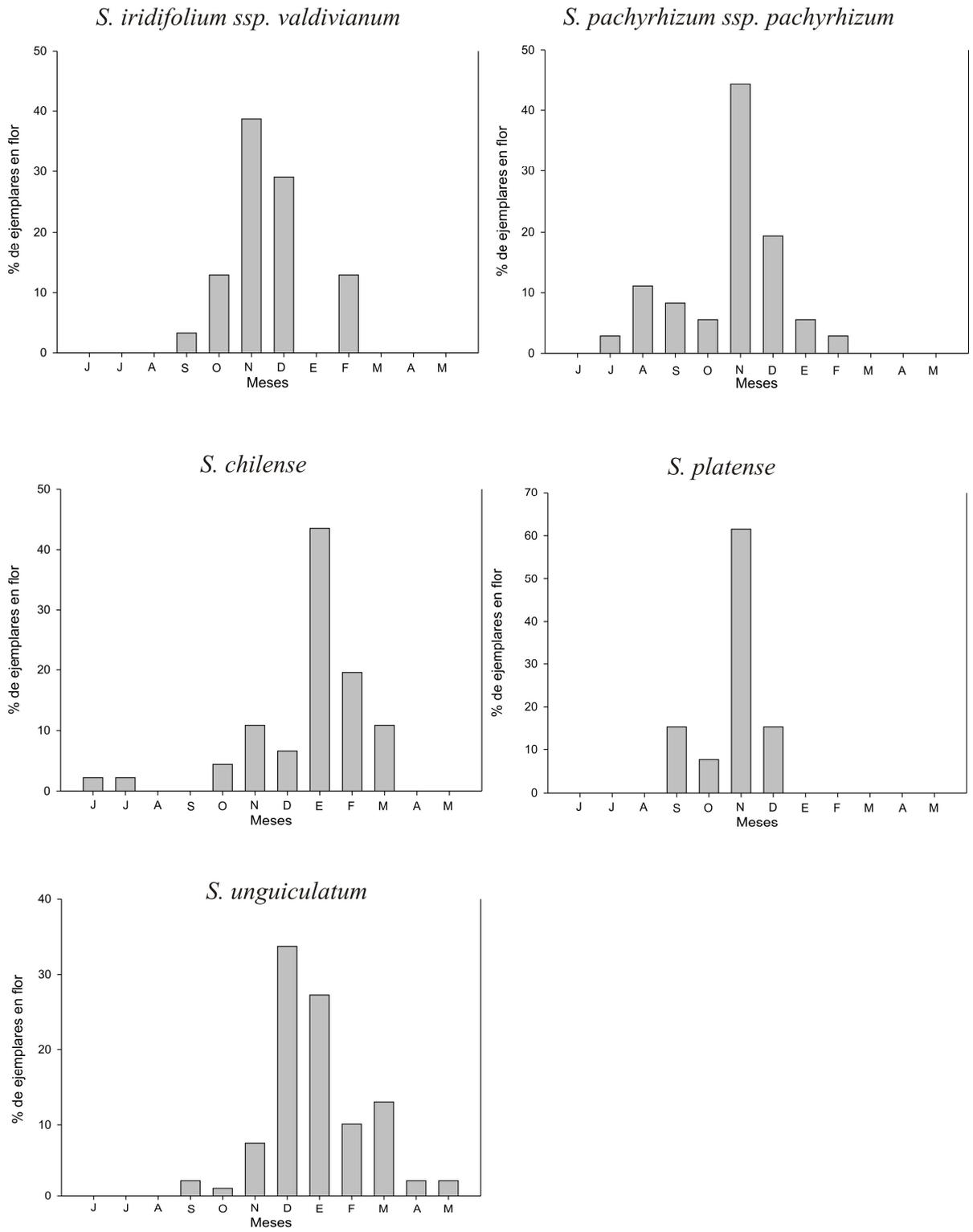


Figura 6: Fenología floral de las especies de *Sisyinchium* estudiadas.

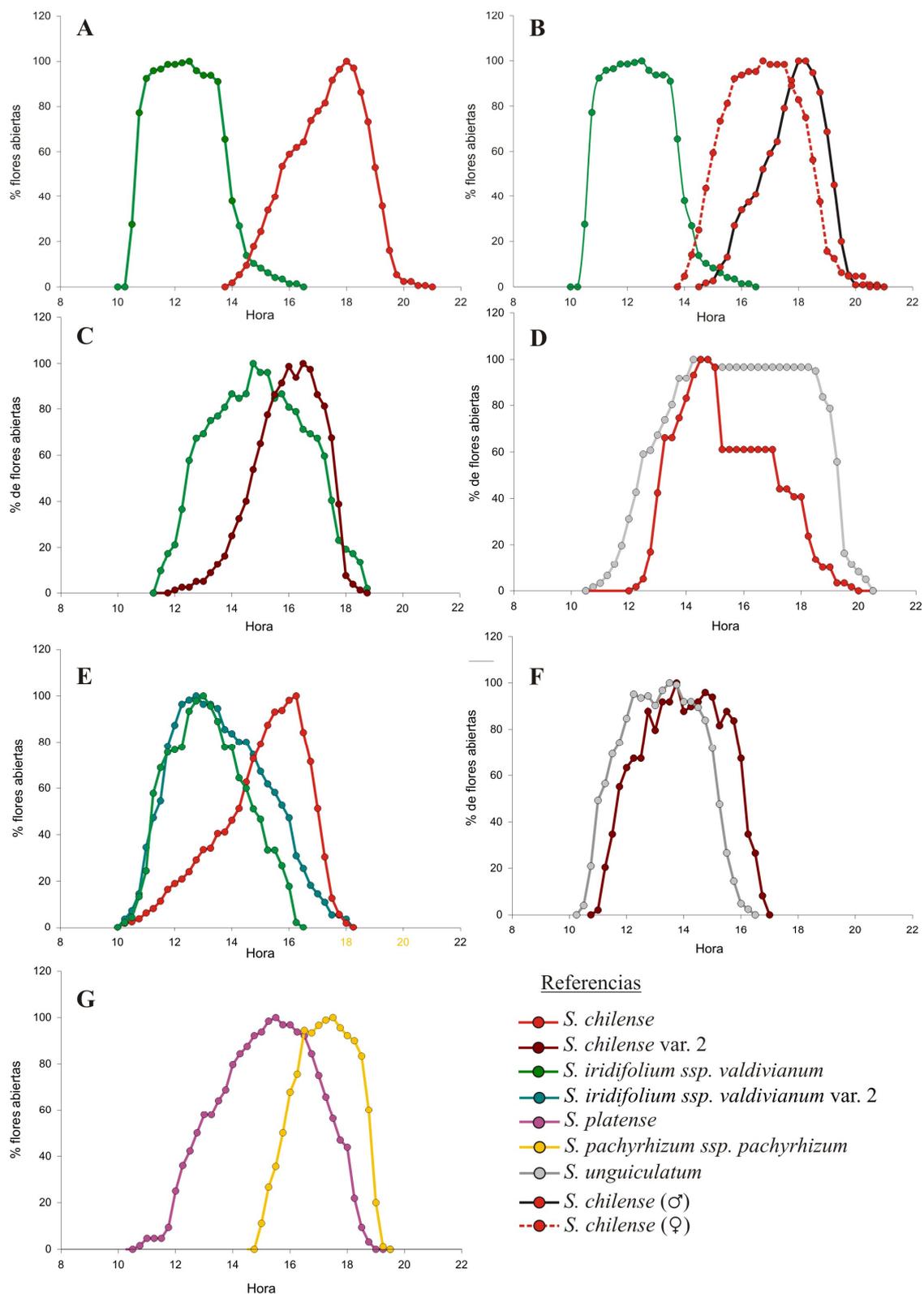


Figura 7: Patrones de floración diario de las especies coexistentes de *Sisyrrinchium* en los seis sitios estudiados. **A:** Cuesta Blanca. **B:** Cuesta Blanca. En el caso de *S. chilense* (especie protándrica) se tuvo en cuenta el estadio (masculino o femenino) de las flores que iban abriendo. **C:** Rodeo Grande. **D:** Pampa de Achala. **E:** Tandil. **F:** Carapunco. **G:** Chapicuy.

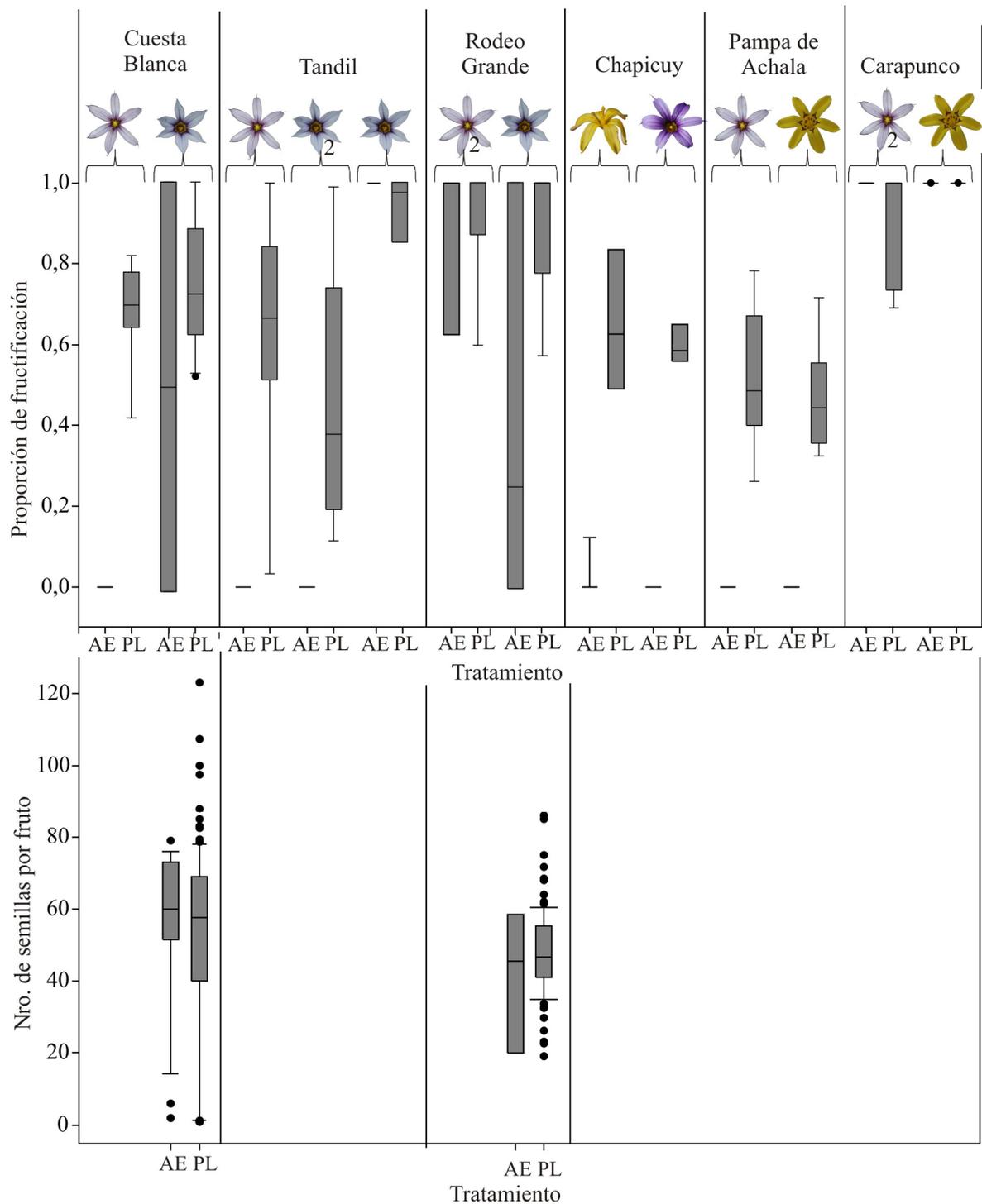


Figura 8: Sistema reproductivo de las especies de *Sisyrichium* estudiadas en cada sitio. Proporción de fructificación (arriba) y número de semillas promedio (abajo) para los tratamientos de Autopolinización Espontánea (AE) y Polinización Libre (PL).

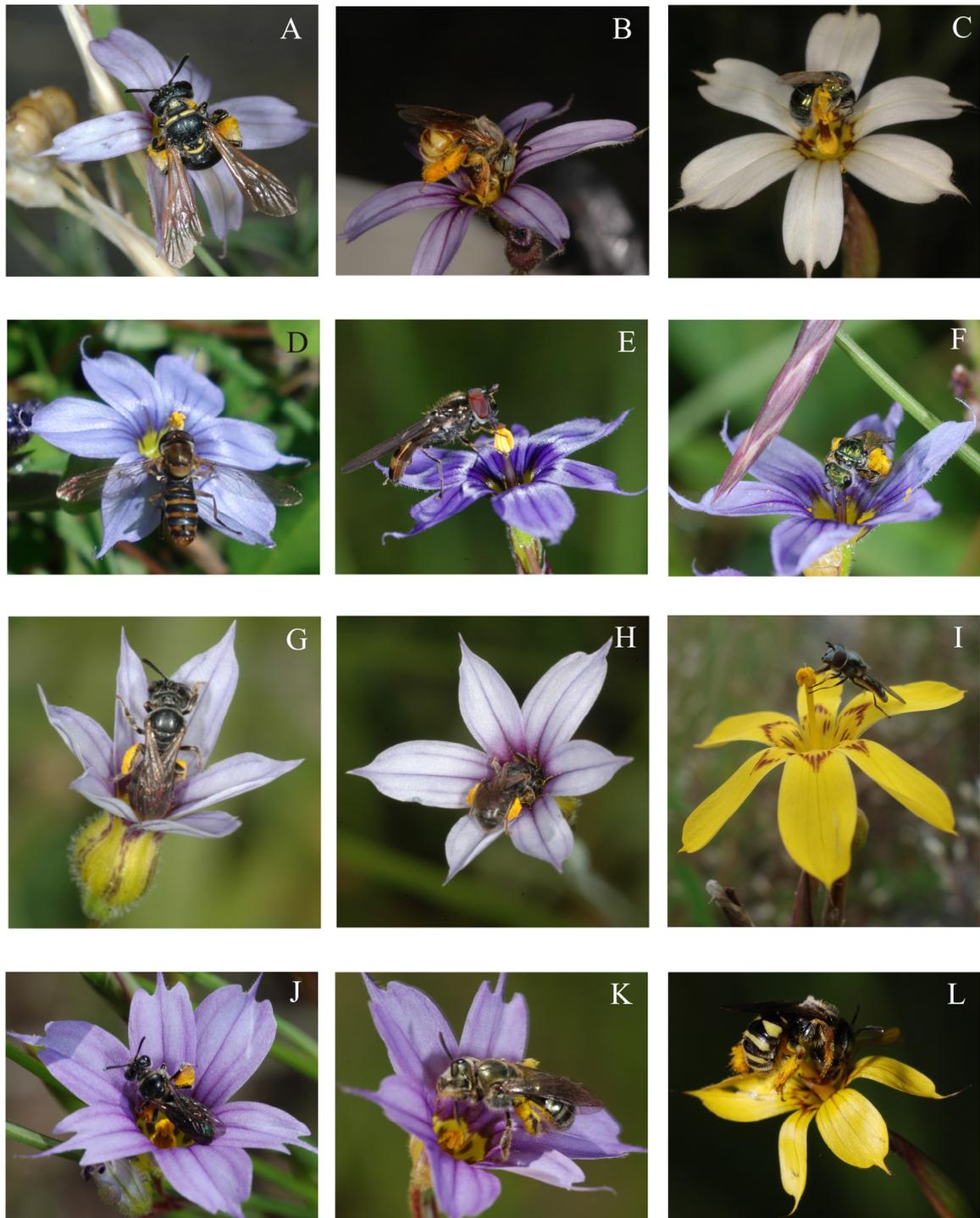


Figura 9: Algunos de los visitantes observados en las distintas especies de *Sisyrinchium*. **A:** Avispa del género *Trimeria* (Masaridae) en *S. chilense*. **B:** *Lathanomelissa discrepans* en *S. chilense*. **C:** Halíctido en *S. chilense* (Tandil). **D:** Sírfido del género *Toxomerus* visitando una flor de *S. chilense*. **E:** Sírfido del género *Carposcalis* sobre *S. chilense*. **F:** Halíctido en *S. chilense* var. 2. **G:** *Leioproctus* sp. en *S. iridifolium* ssp. *valdivianum*. **H:** *Dialictus* sp. en *S. iridifolium* ssp. *valdivianum*. **I:** Sírfido (*Carposcalis* sp.) en *S. unguiculatum*. **J:** Colétido en *S. platense*. **K:** Halíctido en *S. platense*. **L:** *Lathanomelissa magaliae* en *S. pachyrhizum* ssp. *pachyrhizum*.

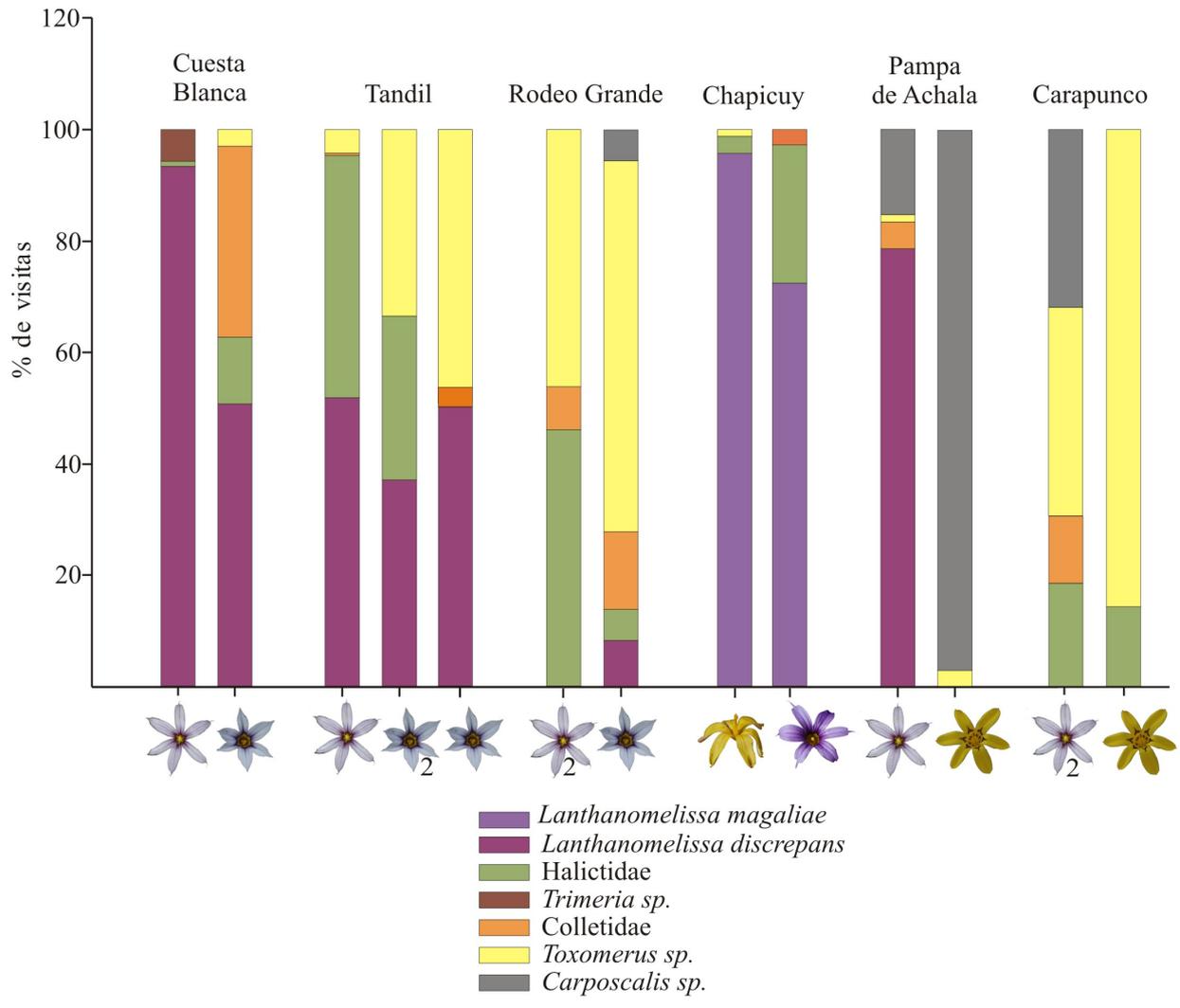


Figura 10: Porcentajes de visitas de los visitantes observados sobre las especies de *Sisyrrinchium* estudiadas en las distintas poblaciones (Cuesta Blanca, Tandil, Rodeo Grande, Chapicuy, Pampa de Achala y Carapunco)

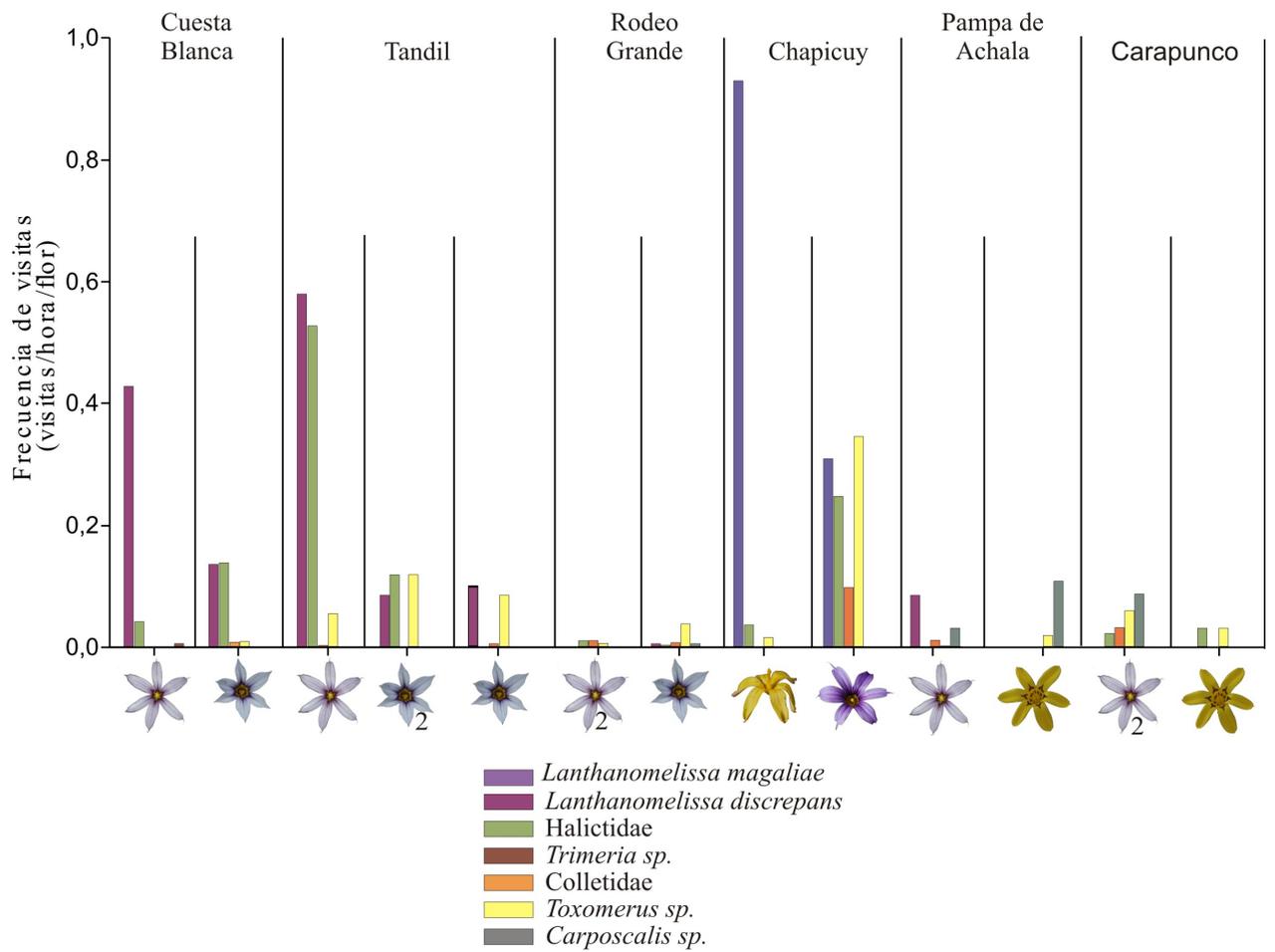


Figura 11: Tasas de visitas (visitas/hora/flor) de los visitantes observados sobre las especies de *Sisyrinchium* estudiadas en las distintas poblaciones (Cuesta Blanca, Tandil, Rodeo Grande, Chapicuy, Pampa de Achala y Carapunco)

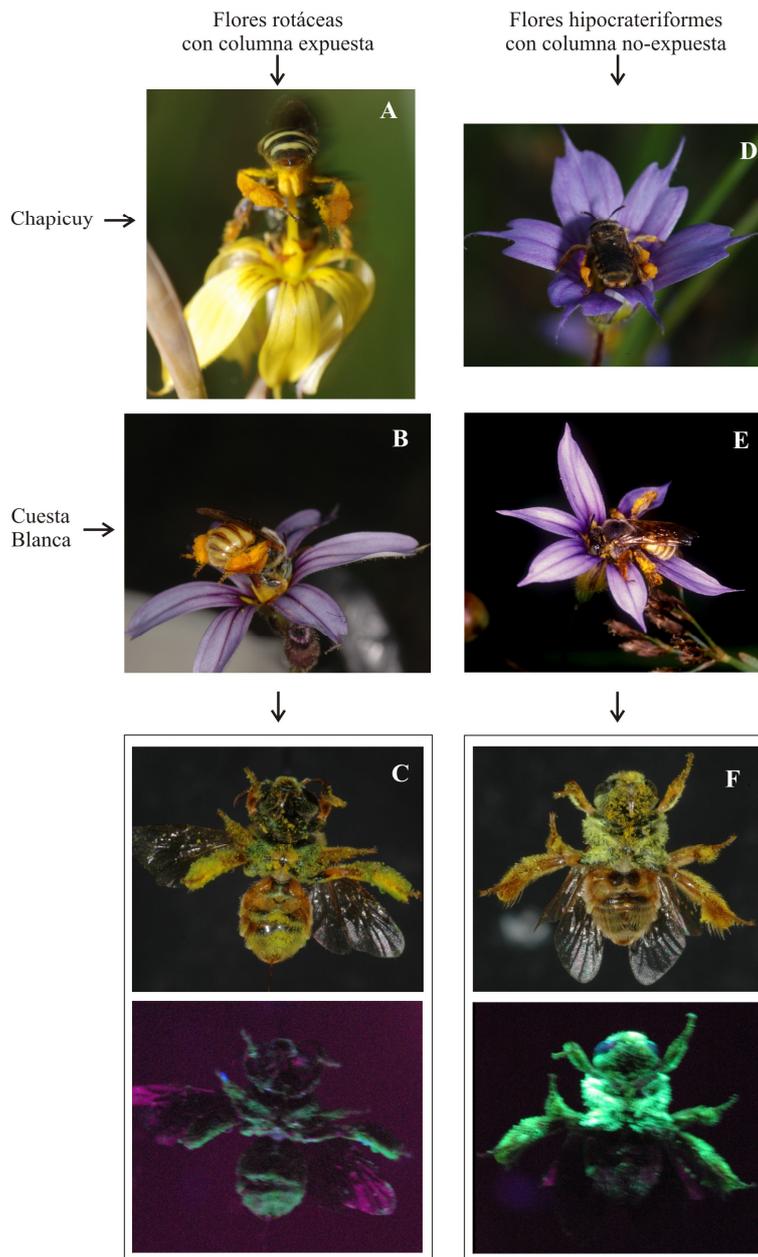


Figura 12: Comportamiento de abejas del género *Lanthanomelissa* y lugar de depósito de polen sobre el cuerpo de las mismas. Observe como, al visitar flores con arquitectura rotácea como las de *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum* (A) y *S. chilense* (B) las abejas se sostienen de la columna estaminal para coleccionar los aceites y el polen queda depositado en parte del tórax y el abdomen (C). Al visitar flores con arquitectura hipocrateriforme como las de *S. platense* (D) y *S. iridifolium ssp. valdivianum* (E), las abejas se posan sobre el limbo de la flor quedando el polen depositado sobre cabeza y tórax (F). A y D: *L. magaliae* visitando las flores de *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum* y *S. platense* respectivamente en la población de Chapicuy. B y E: *L. discrepans* visitando las flores de *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* respectivamente en Cuesta Blanca. C y F: lugar de depósito de polen sobre *L. discrepans* evidenciado con polvos fluorescentes. En las fotos inferiores se observan las mismas abejas pero fotografiadas bajo luz UV.

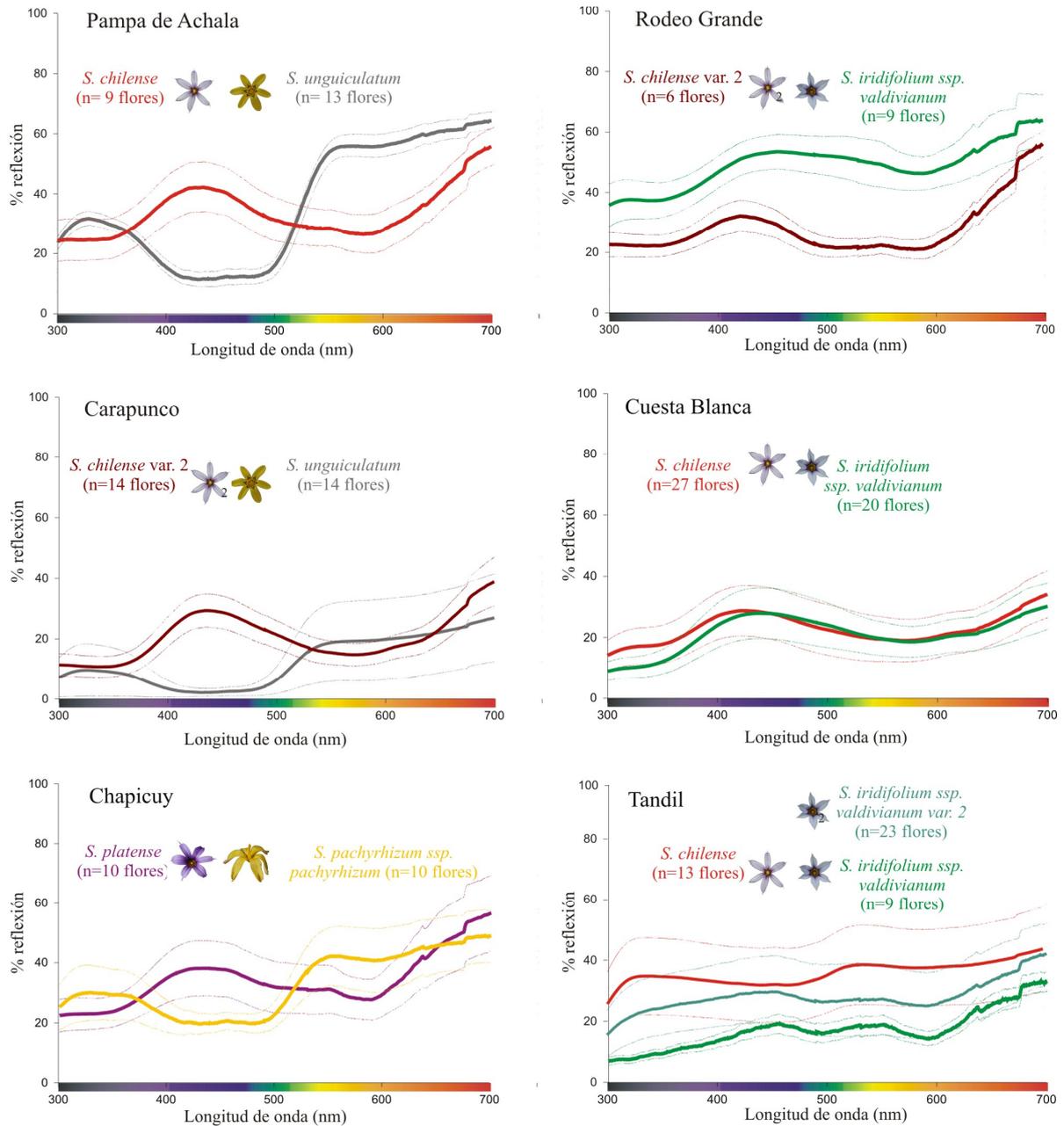


Figura 13: Espectros de reflexión de los tépalos de las especies simpátricas de *Sisyrinchium* evaluadas en cada población. La línea continua muestra el promedio por especie de los valores de reflexión para cada longitud de onda y las líneas de puntos indican el desvío estándar.

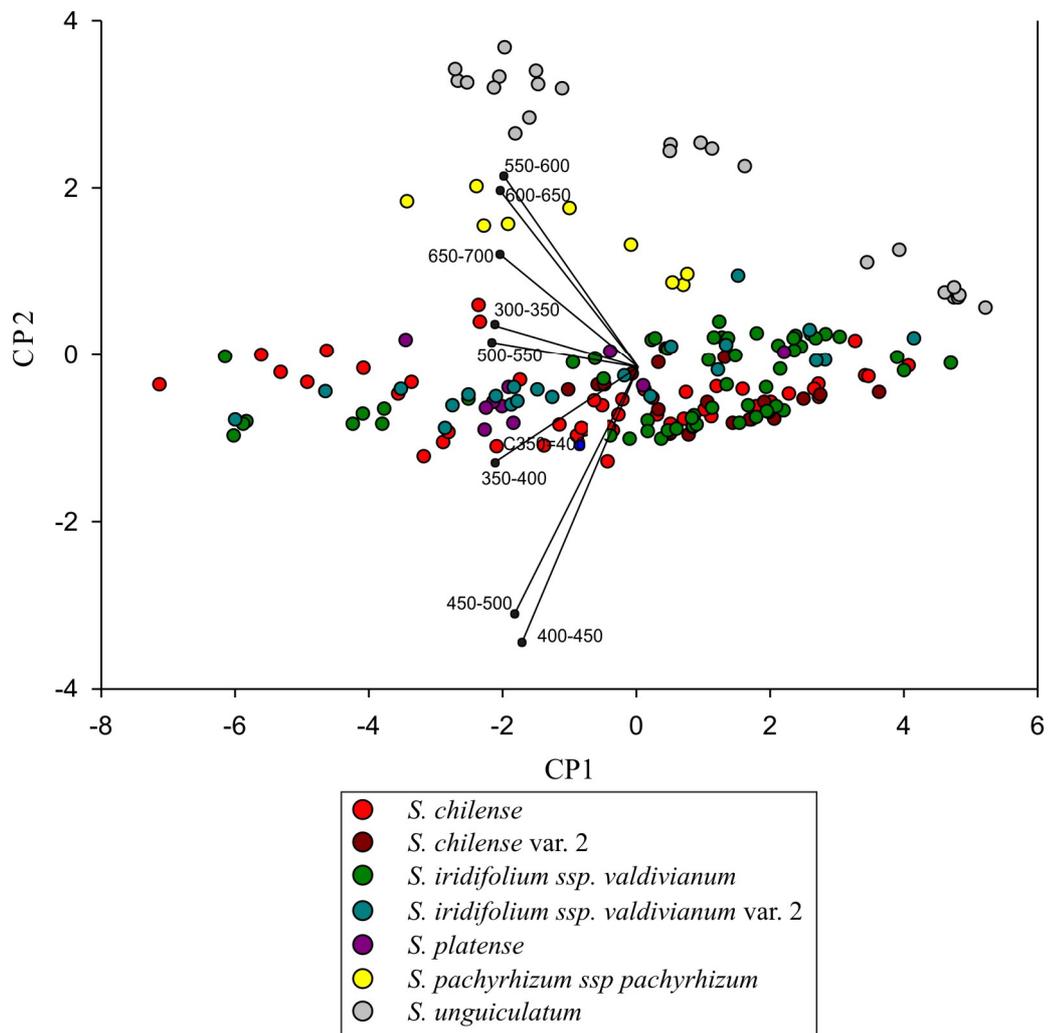


Figura 14: Gráfico biplot donde se muestra el ordenamiento de los individuos de las especies de *Sisyinchium* estudiadas en función de los dos primeros ejes del análisis de componentes principales (PCA) realizado con 8 variables de color. Cada círculo representa una flor. Con distintos colores están representadas las distintas especies estudiadas. La longitud y dirección de las flechas indican la contribución de cada variable de color a los dos componentes principales.

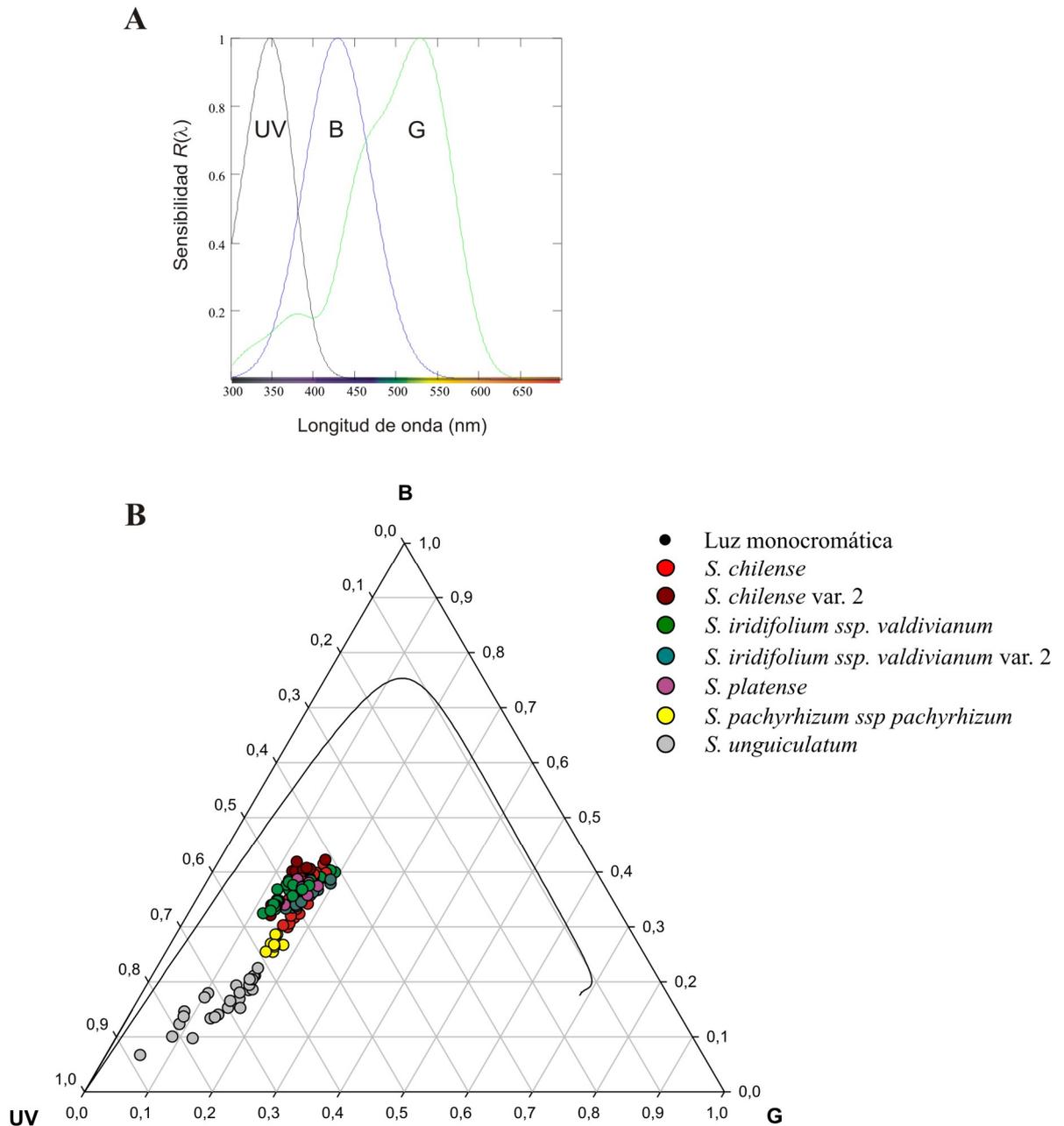


Figura 15: Visión de *Anthophora acervorum*. **A:** Curvas de sensibilidad espectral de los tres tipos de fotorreceptores (UV=ultravioleta, B=azul, G=verde). Los picos representan la sensibilidad máxima (UV= 348, B= 428, G= 528; Peitsch et al. 1992). **B:** Triángulo de Maxwell. Los tres ejes del triángulo representan la proporción de excitación de cada uno de los tres fotorreceptores provocada por los tépalos de las especies de *Sisyrrinchium* estudiadas. Cada loci dentro del triángulo representa a una flor. La línea negra representa la línea monocromática.

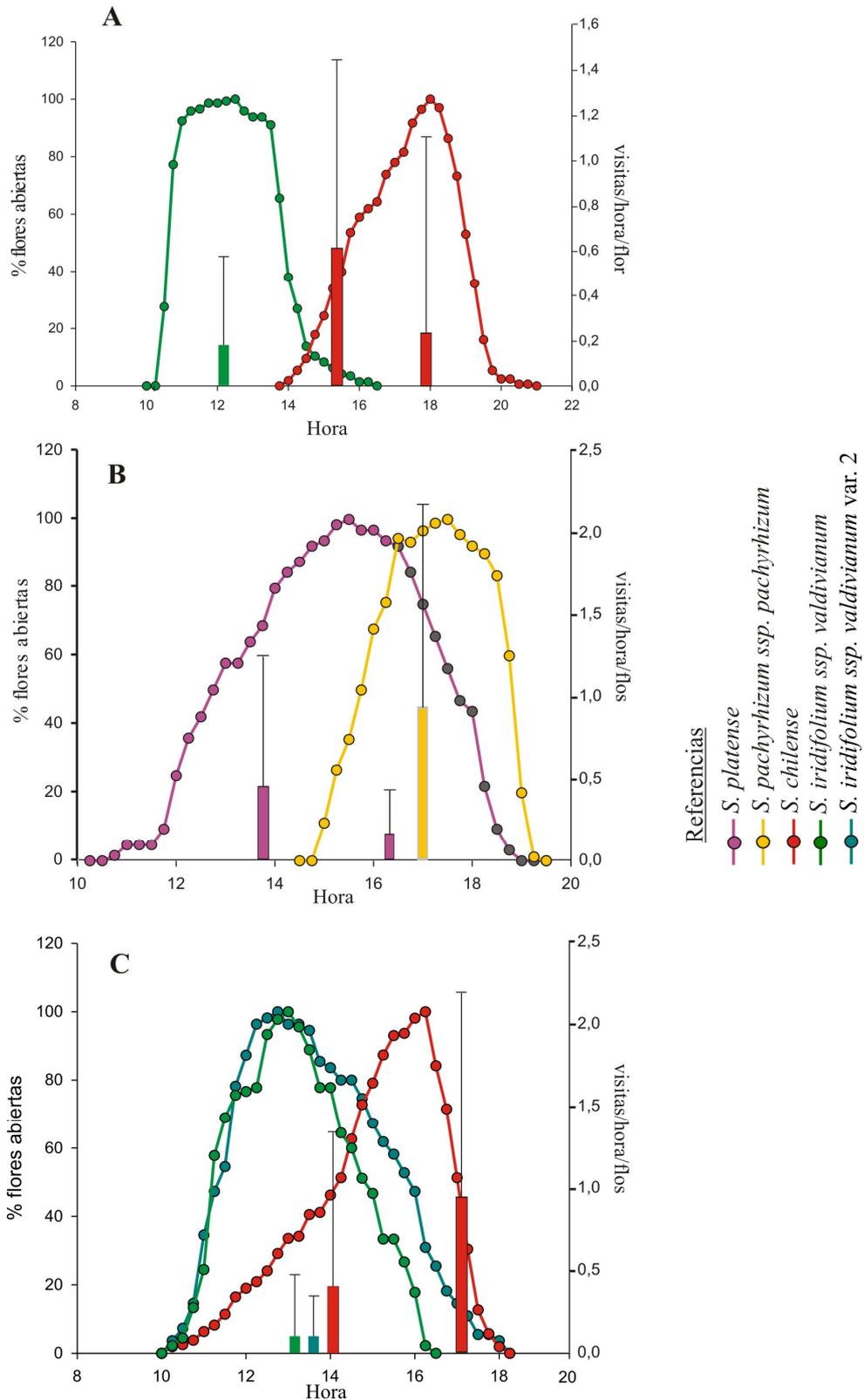


Figura 16: Patrones de floración y tasas de visitas de *Lanthanmelissa* en las 3 poblaciones en las que dicha abeja es el principal polinizador. **A:** Cuesta Blanca. **B:** Chapicuy. **C:** Tandil. Las curvas representan los patrones de floración y las barras representan la media de las tasas de visita mas su desvío estándar en cada categoría horaria.

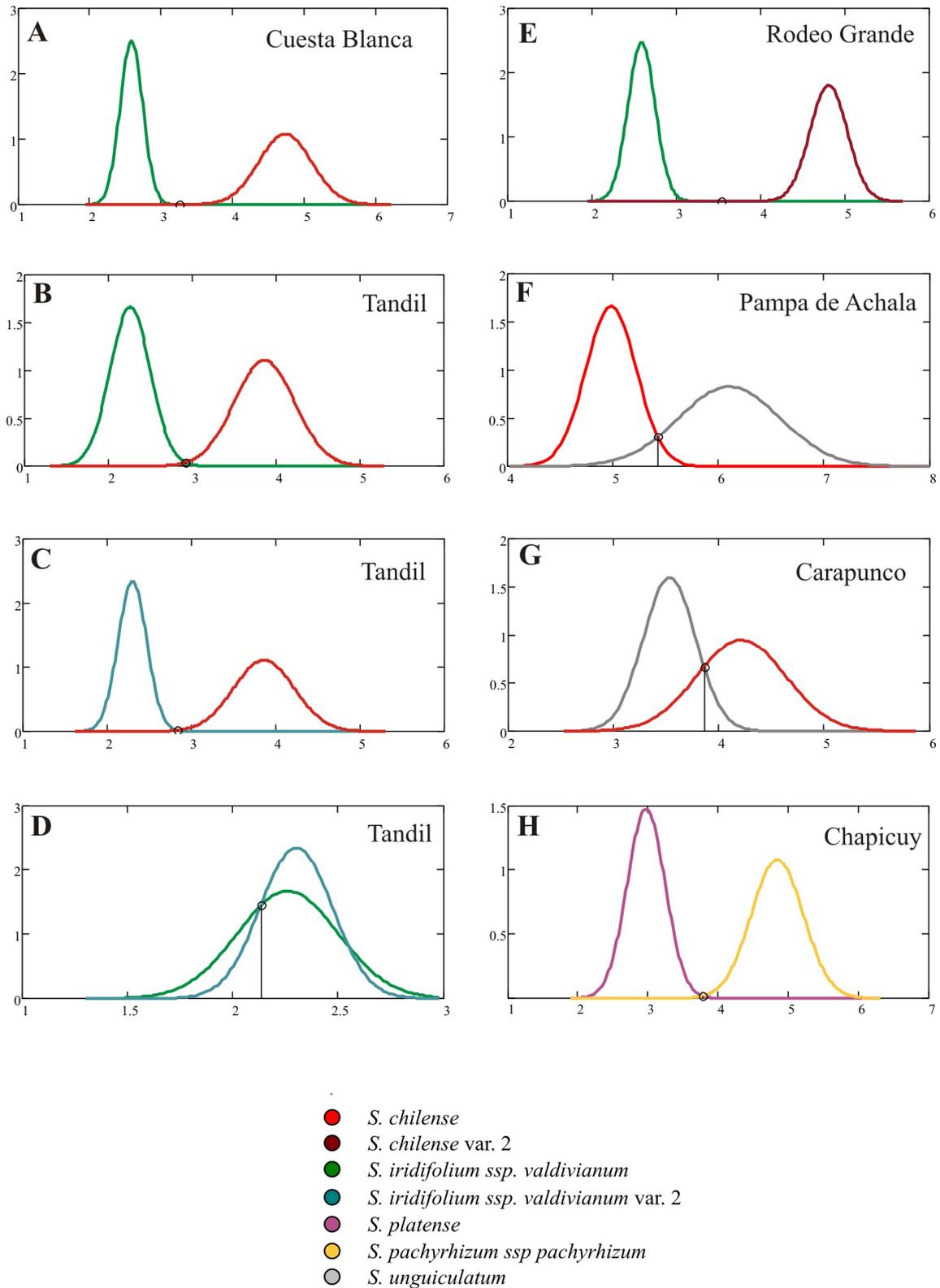


Figura 17: Curvas de distribución normal de las longitudes de los estambres de los pares de especies de *Sisyrinchium* coexistentes en las poblaciones estudiadas. La línea negra con el circulito indica el valor de x donde ambas campanas se cruzan.

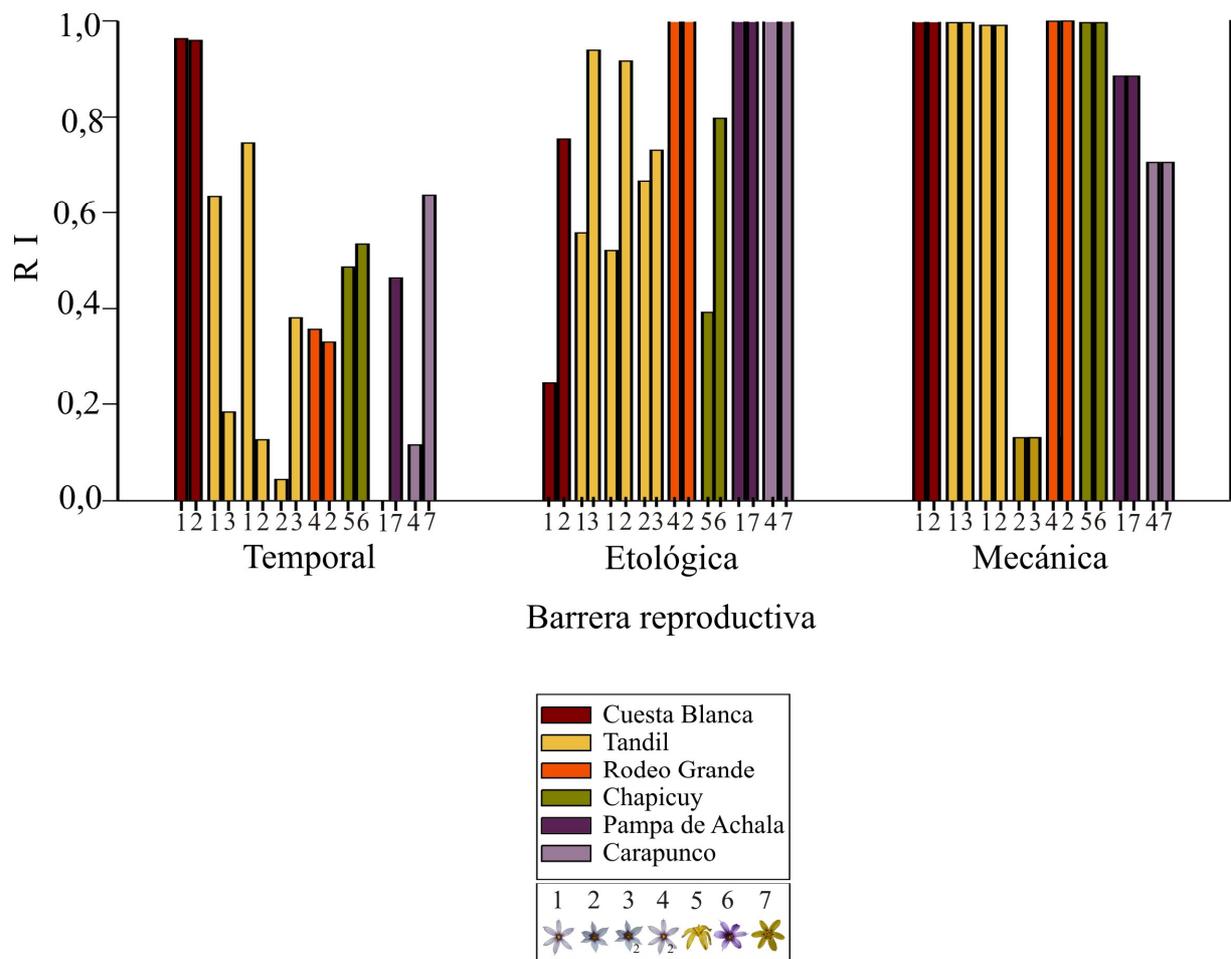


Figura 18: Fuerza o importancia (RI) de las barreras reproductivas temporales, etológicas y mecánicas para cada una de las especies y en todas las poblaciones evaluadas.

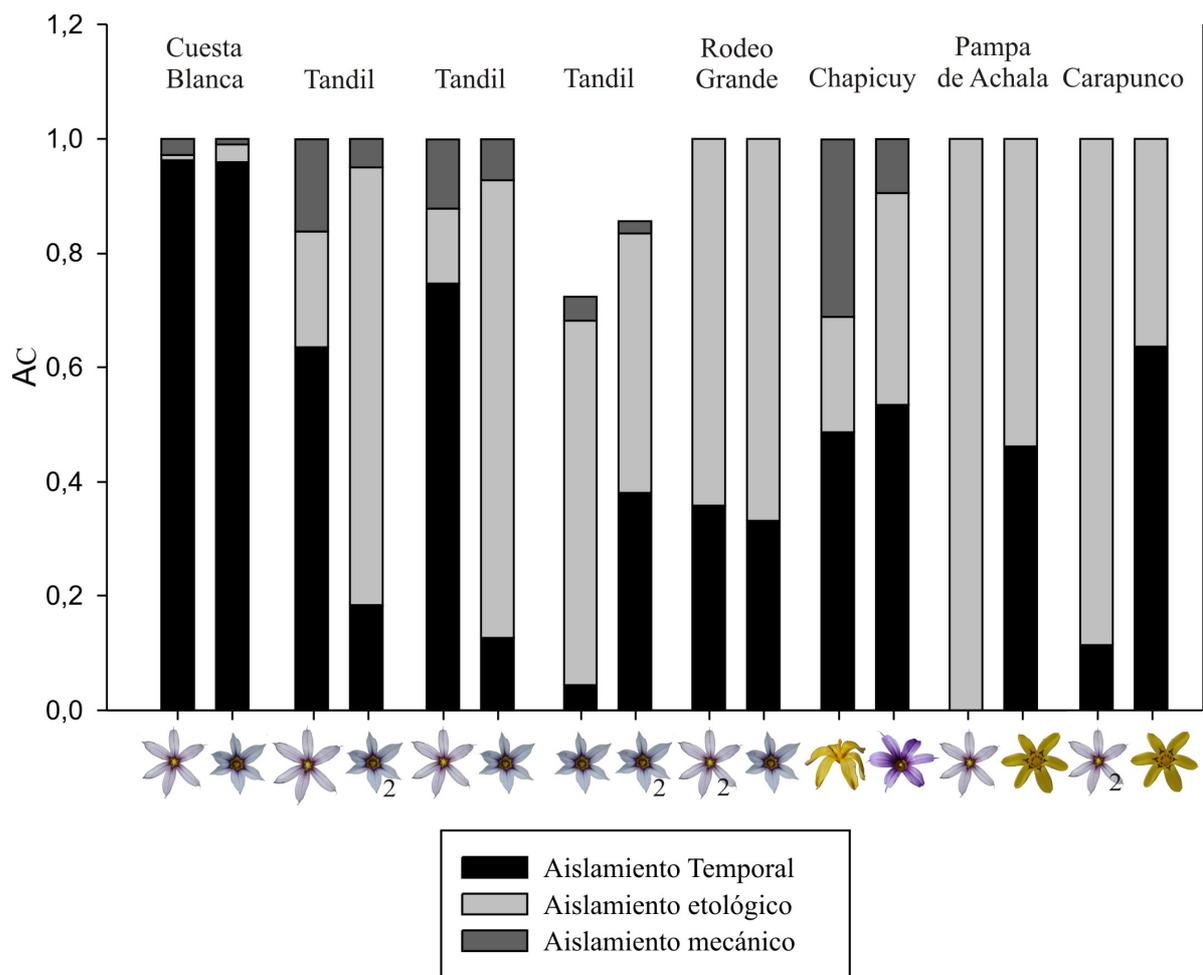


Figura 19: Contribuciones absolutas (AC) de las distintas barreras (temporales, etológicas y mecánicas) al aislamiento total de las especies de *Sisyrrinchium* estudiadas en cada población.

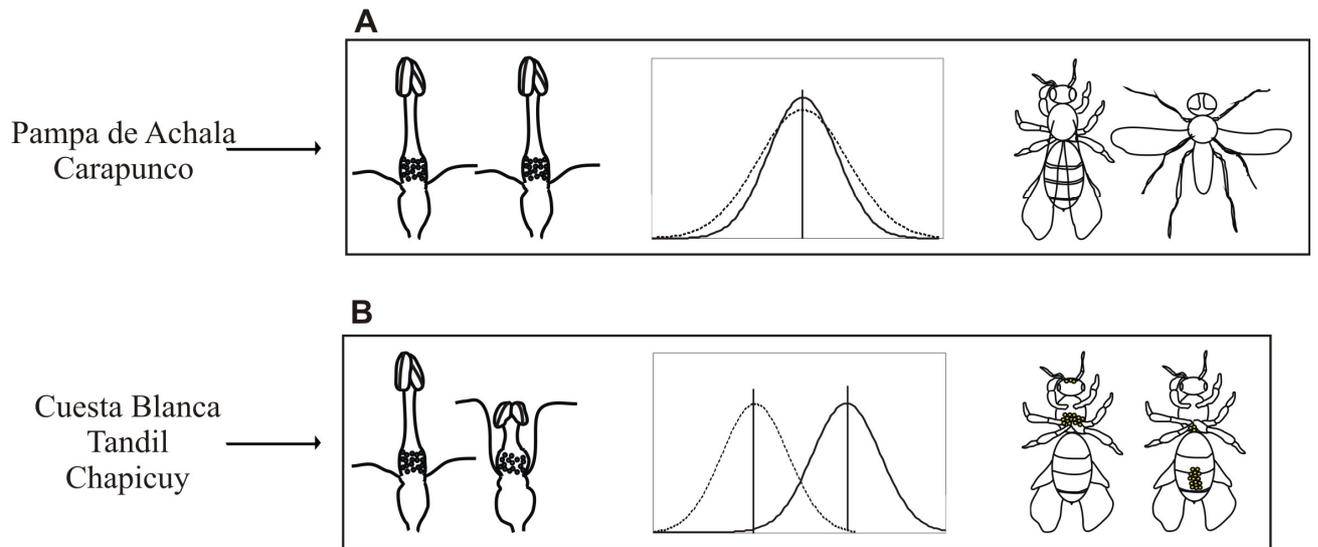


Figura 20: Patrones generales de aislamiento observados. **A:** las especies coexistentes tienen el mismo tipo de arquitectura floral (rotácea), sus picos de floración coinciden y presentan distinto ensamble de polinizadores. **B:** las especies coexistentes presentan distintas arquitecturas florales (rotácea e hipocrateriforme), sus picos de floración no se solapan y comparten al principal polinizador depositando el polen diferencialmente sobre el cuerpo de las abejas.

BIBLIOGRAFÍA

- ANDO T ET AL. 2001. Reproductive isolation in a native population of *Petunia* sensu Jussieu (Solanaceae). *Annals of Botany* 88: p.403-413.
- ARCHIBALD JK, WOLFE AD, Y JOHNSON SD. 2004. Hybridization and gene flow between a day and night-flowering species of *Zaluzianskya* (Scrophulariaceae S. S., Tribe Manuleeae). *American Journal of Botany* 91: p.1333-1344.
- ARMBRUSTER S, Y HERZIG AL. 1984. Partitioning and sharing of pollinators by four sympatric species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Panama. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 1: p.1-16.
- BRISCOE AD, Y CHITKKA L. 2001. The evolution of colour vision in insects. *Annual Review of Entomology* 46: p.471-510.
- BUCHMAN SL. 1987. The ecology of oil flowers and their bees. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: p.343-369.
- CANE JH, EICKWORT GC, WESLEY FR, Y SPIELHOLZ J. 1983. Foraging, grooming, and mating behaviours of *Macropsis nuda* (Hymenoptera: Melittidae) and use of *Lysimachia ciliata* (Primulaceae) oils in larval provisions. *American Naturalist* 110: p.257-264.
- CHALCOFF VR, EZCURRA C, Y AIZEN MA. 2008. Uncoupled geographical variation between leaves and flowers in a south andean Proteaceae. *Annals of Botany* 102: p.79-91.
- CHITKKA L, Y KEVAN PG. 2005. Flower colour as advertisement. In *Practical pollination biology*, 157-196. Enviroquest Ltd., Cambridge.
- COCUCCI AA, Y VOGEL S. 2001. Oil-producing lowers of *Sisyrinchium* species (Iridaceae) and their pollinators in southern South America. *Flora* 196: p.26-46.
- COCUCCI AA, SÉRSIC AN, Y ROIG ALSINA A. 2000. Oil-collecting structures in Tapinotaspidini (Hymenoptera: Apidae): their diversity, function and probable origin. *Mitt. Munch. Ent. Ges.* 90: p.51-74.
- COYNE JA. 1994. Ernst Mayr and the origin of species. *Evolution* 48: p.19-30.
- COYNE JA, Y ORR HA. 2004. *Speciation*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts USA.
- DEVOTO M Y MEDAN D. 2008. Expected mating system, floral diversity and flower visitors of five species of Iridiaceae of the Argentine pampas. *Acta Botánica Venezolana* 31: p.425-434.
- DOBZHANSKY T. 1950. Mendelian populations and their evolution. *The American Naturalist* 84: p.401-418.

- DODD ME, SILVERTOWN J, Y CHASE MW. 1999. Phylogenetic analysis of trait evolution and species diversity variation among Angiosperm families. *Evolution* 53: p.732-744.
- DRESSLER RL. 1968. Pollination by Euglossine bees. *Evolution* 22: p.202-210.
- FISHMAN L, Y STRATTON DA. 2004. The genetics of floral divergence and postzygotic barriers between outcrossing and selfing populations of *Arenaria uniflora* (Caryophyllaceae). *Evolution* 58: p.296-307.
- FUTUYMA, D. Evolutionary Biology. Sinauer Associates.
- GRANT V. 1994. Modes and origins of mechanical and ethological isolation in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: p.3-10.
- GRANT V. 1949. Pollination systems as isolating mechanisms in Angiosperms. *Evolution* 3: p.82-97.
- GUSTAFSSON S, Y LONN M. 2003. Genetic differentiation and habitat preference of flowering-time variants within *Gymnadenia conopsea*. *Heredity* 91: p.284-292.
- HERRERA CM. 1988. Variation in mutualisms: the spatiotemporal mosaic of a pollinator assemblage. *Biological Journal of the Linnean Society* 35: p.95-125.
- HURT CR, FARZIN M, Y HEDRICK PW. 2005. Premating, not postmating, barriers drive genetic dynamics in experimental hybrid populations of the endangered Sonoran Topminnow. *Genetics* 171: p.655-662.
- HUSBAND BC, Y SABARA HA. 2003. Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *New Phytologist* 161: p.703-713.
- JIGGINS CD, NAISBIT RE, COE RL, Y MALLETT J. 2001. Reproductive isolation caused by colour pattern mimicry. *Nature* 411: p.302-305.
- JOHNSON SD. 1994. The coevolutionary process. University of Chicago Press, Chicago.
- JOHNSON SD, Y STEINER KE. 2000. Generalization vs specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology and Evolution* 15: p.140-143.
- JOHNSON SD, EDWARDS TJ, CARBUTT C, Y POTGIETER C. 2002. Specialization for hawkmoth and long-proboscid fly pollination in *Zaluzianskya* section *Nycterinia* (Scrophulariaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 138: p.17-27.
- KEPHART S, Y THEISS K. 2003. Pollinator-mediated isolation in sympatric milkweeds (*Asclepias*): do floral morphology and insect behavior influence species boundaries? *New Phytologist* 161: p.265-277.
- KIRKPATRICK M, Y RAVIGNÉ V. Speciation by natural and sexual selection: models and experiments. *The American Naturalist* 159: p.S22-S35.
- KWAK MM. 1978. Pollination, hybridization and ethological isolation of *Rhinanthus minor*

- and *R. Serotinus* (Rhinanthoideae: Scrophulariaceae) by bumblebees (*Bombus* Latr.). *Taxon* 27: p.145-158.
- LEVIN DA. 1971. The origin of reproductive isolating mechanisms in flowering plants. *Taxon* 20: p.91-113.
- LOBO J ET AL. 2003. Factors affecting phenological patterns of bombacaceous trees in seasonal forests in Costa Rica and Mexico. *American Journal of Botany* 90: p.1054-1063.
- MACHADO IC. 2004. Oil-collecting bees and related plants: a review of the studies in the last twenty years and case histories of plants occurring in NE Brazil. In Solitary bees, conservation, rearing and management for pollination: a contribution to th international workshop on solitary bees and their role in pollination, 252-282. Imprensa Universitaria, Fortaleza.
- MARTIN NH, Y WILLIS JH. 2007. Ecological divergence associated with mating system causes nearly complete reproductive isolation between sympatric *Mimulus* species. *Evolution* 61: p.68-82.
- MARTIN NH, SAPIR Y, Y ARNOLD ML. 2007. The genetic architecture of reproductive isolation in Louisiana irises: pollination syndromes and pollinator preferences. *Evolution* 62: p.740-752.
- MCINTOSH ME. 2002. Flowering phenology and reproductive output in two sister species of *Ferocactus* (Cactaceae). *Plant ecology* 159: p.1-13.
- MEDEL R ET AL. 2007. The influence of insects and hummingbirds on the geographical variation in the flower phenotype in *Mimulus luteus*. *Ecography* 30: .
- MORRISON DA, McDONALD M, BANKOFF P, Y QUIRICO P. 1994. Reproductive isolation mechanisms among four closely-related species of *Conospermum* (Proteaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 116: p.13-31.
- NATTERO J, Y COCUCCHI AA. 2007. Geographical variation in floral traits of the tree tobacco in relation to its hummingbird pollinator fauna. *Biological Journal of the Linnean Society* 40: p.657-667.
- NEFF JL, Y SIMPSON BB. 1981. Oil collecting structures in the Antophoridae (Hymenoptera): morphology, function and use un systematics. *Journal of Kansas Entomological Society* 54: p.95-125.
- NOSIL P, VINES TH, Y FUNK DJ. 2005. Perspective: reproductive isolation caused by natural selection against immigrants from divergent habitats. *Evolution* 59: p.705-719.
- PASCARELLA JB. 2007. Mechanisms of prezygotic reproductive isolation between two sympatric species, *Gelsemium rankinii* and *G. sempervirens* (Gelsemiaceae), in the southeastern United States. *American Journal of Botany* 94: p.468-476.
- PAULUS HF, Y GACK C. 1990. Pollinators as prepollinating isolation factors: evolution and speciation in *Ophrys* (Orchidaceae). *Israel Journal of Botany* 39: p.43-79.

- PRICE TD, Y BOUVIER MM. The evolution of F1 postzygotic incompatibilities in birds. *Evolution* 56: p.2083-2089.
- PRIMACK RB. 1980. Variation in the phenology of natural populations of montane shrubs in New Zeland. *Journal of Ecology* 68: p.849-862.
- DE QUEIROZ K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56: p.879-886.
- RAMSEY J, BRADSHAW HD, Y SCHEMSKE DW. 2003. Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution* 57: p.1520-1534.
- RATHCKE B, Y LACEY EP. Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecological Systematics* 16: p.179-214.
- RAVENNA PF. 1969a. Iridaceae. In Flora Patagónica, 167-186. Colección científica del INTA.
- RAVENNA PF. 2001. Iridaceae of the Cuyo Region, Argentina. *Onira* 6: p.7-8.
- RAVENNA PF. 1969b. In Flora de la Provincia de Buenos Aires., Iridaceae, 539-565. Colección científica del INTA, Buenos Aires.
- DI RIENZO J, ROBLEDO W, CASANOVES F, Y BALZARINI M. 2000. Software estadístico Infostat v1.1. *Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba.*
- ROZEN JG, MELO GAR, AGUIAR AJC, Y ALVES-DOS-SANTOS I. 2006. Nesting biologies and immature stages of the Tapinotaspidine bee genera *Monoeca* and *Lanthanomelissa* and of their osirine cleptoparasites *Protosiris* and *Parepeolus* (Hymenoptera: Apidae: Apinae). *American museum novitates* 3501: 1-60.
- STEINER KE, Y WHITEHEAD VB. 1991. Oil flowers and oil bees: further evidence for pollinator adaptation. *Evolution* 45: p.1493-1501.
- STEINER KE, Y WHITEHEAD VB. 1990. Pollinator adaptation to oil secreting flowers. *Rediviva and Diascia. Evolution* 44: p.1701-1707.
- THOMPSON JN. 2005. The geographic mosaic of coevolution. The University of Chicago Press, Chicago and London.
- WASER NM. 1978. Competition for hummingbird pollination and sequential flowering in two Colorado wildflowers. *Ecology* 59: p.934-944.
- WHITEMAN HH, Y SEMLITSCH RD. 2005. Asymmetric reproductive isolation among polymorphic salamanders. *Biological Journal of the Linnean Society* 86: p.265–281.

CAPÍTULO 2

SELECCIÓN FENOTÍPICA SOBRE UN RASGO VINCULADO AL AISLAMIENTO MECÁNICO EN POBLACIONES SIMPÁTRICAS DE *SISYRINCHIUM*

INTRODUCCIÓN

La selección fenotípica es ampliamente aceptada en la actualidad como causa primaria de evolución adaptativa en poblaciones naturales (Kingsolver y Pfennig 2007). El mecanismo de la selección afecta la distribución fenotípica a nivel poblacional y esto es posible cuando individuos con diferentes características (fenotipos) difieren en su éxito reproductivo (Brodie et al. 1995). Cuando los valores medios de los caracteres fenotípicos de una población se ven afectados estamos frente a un caso de **selección direccional**. Por otro lado, tanto la **selección estabilizadora** como la **disruptiva** actúan generando cambios en la varianza poblacional (Fig. 1; pág. 77). En la primera, la variación se reduce alrededor de un valor óptimo mientras que en la segunda la varianza aumenta favoreciendo a los individuos que caen en las colas de la distribución (Lande y Arnold 1983, Brodie et al. 1995).

En las plantas en particular, son muchos los estudios que han demostrado que los caracteres florales están sujetos a selección (ver Kingsolver 2001, Kingsolver y Pfennig 2007). Existe evidencia de que los polinizadores ejercen presiones que modelan caracteres atractivos, tales como el tamaño de la corola (ej. Campbell 1989, Medel et al. 2003,), el color de la corola (Campbell et al. 1997), la forma de las flores (Nattero et al. 2010, Benitez Vieyra et al. 2009), el olor (Ackerman et al. 1997, Miyake y Yafuso 2003, Majetic et al. 2009, Schiestl et al. 2011). También se ha detectado selección mediada por polinizadores en la longitud de espolones y tubos florales (Johnson y Steiner 1997, Boberg y Agren 2009, Maad y Alexandersson 2004) y en la profundidad del nectario (Benitez Vieyra et al. 2006), rasgos directamente vinculados a procesos de transferencia de polen más eficientes. Además, se ha evidenciado que la disponibilidad de polinizadores sería uno de los agentes selectivos capaces de promover la evolución del sistema reproductivo hacia morfologías florales que propicien la autopolinización (Fenster y Ritland 1994). Sin embargo, no sólo la interacción con los polinizadores sino otros factores bióticos como la presencia de otras

especies de plantas competidoras (Caruso 2000) y factores abióticos como por ejemplo el clima (Siepielski 2009, Gómez 2008) son componentes modeladores de la selección.

En el Capítulo 1 observamos que, el aislamiento mecánico sería uno de los mecanismos que impide el flujo génico entre especies de *Sisyrinchium* coexistentes en la actualidad. En poblaciones que comparten como polinizadores a abejas colectoras de aceites, el depósito de polen en distintos lugares del cuerpo de los insectos se da por un comportamiento diferencial de los mismos al visitar flores con distintas arquitecturas (Fig. 12 del Capítulo 1; pág. 56). Las flores de arquitectura rotácea presentan columna estaminal larga y expuesta, mientras que las flores con arquitectura hipocrateriforme tienen columna estaminal corta contenida dentro de un pequeño tubo floral (Fig. 1 del Capítulo 1; pág. 45). La longitud de la columna estaminal es, entonces, una variable directamente vinculada al aislamiento mecánico de algunas especies de este género. Teniendo en cuenta que la mayoría de las barreras reproductivas tienden a completarse, es decir a alcanzar valores de aislamiento máximos (Coyne y Orr 2004) resulta interesante conocer cómo está evolucionando dicha variable (vinculada al depósito diferencial de polen) en especies de *Sisyrinchium* con distintos grado de aislamiento mecánico, distintos sistemas reproductivos y polinizadores.

OBJETIVOS GENERALES:

- Determinar si la longitud de la columna estaminal (variable vinculada al aislamiento mecánico) de especies coexistentes de *Sisyrinchium* está sujeta a selección, qué tipo de selección está actuando (direccional, estabilizadora o disruptiva) y con qué intensidad.
- Analizar los resultados de los análisis de selección teniendo en cuenta el sistema reproductivo, los principales polinizadores y la fuerza de las distintas barreras reproductivas para cada especie y en cada sitio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios de selección fenotípica se llevaron a cabo en las seis poblaciones simpátricas en las que se había evaluado el grado de aislamiento en el Capítulo 1: Cuesta Blanca (*S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum*), Rodeo Grande (*S. chilense* var. 2 y *S. iridifolium ssp. valdivianum*), Tandil (*S. chilense*, *S. iridifolium ssp. valdivianum* y *S.*

iridifolium ssp. valdivianum var. 2), Chapicuy (*S. platense* y *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum*), Pampa de Achala (*S. chilense* y *S. unguiculatum*) y Carapunco (*S. chivense* var. 2 y *S. unguiculatum*).

Se trabajó con 42 a 97 individuos por especie en cada población (ver Tabla 1, pág. 76). A cada individuo se le retiró una flor que fue conservada en etanol 70%. Posteriormente, a cada flor se le quitaron los tépalos y la columna estaminal y una escala fueron fotografiadas con una cámara digital Leica DFC 420 bajo una lupa Leica M420 (Fig. 2; pág.78). La longitud de la columna estaminal se midió con el programa Sigma Scan en las fotografías calibradas con escala. Por otro lado, se colectaron 5 frutos por individuo. El número de semillas por fruto fue cuantificado y se calculó un valor promedio por individuo que fue utilizado como medida de éxito reproductivo. Otra medida de éxito reproductivo que se midió pero no pudo ser utilizada fue la proporción de fructificación. Para esto se cuantificó el número de frutos formados en relación al total de pedicelos florales presentes en 5 infructescencias por individuo. La imposibilidad de utilizar esta medida en los análisis de selección se debió a que en las poblaciones de Chapicuy y Pampa de Achala se observó una importante cantidad de flores siendo trasladadas por hormigas y muchos frutos comidos por coleópteros. Esto hizo imposible discriminar entre aquellos pedicelos que no tenían frutos porque habían sido removidos por dichos insectos y aquellos que no habían fructificado. Por otro lado, en las poblaciones de Carapunco y Rodeo Grande la proporción de fructificación fue del 100% en la mayoría de los individuos. Ésta falta de variabilidad impide que dicha medida de éxito reproductivo sea utilizada en este tipo de estudios.

Para los análisis de selección fenotípica la variable (longitud de la columna estaminal) fue estandarizada a media cero y varianza 1, mientras que la medida de éxito reproductivo (número de semillas promedio) de cada individuo fue relativizada por la media poblacional.

Se estimaron los siguientes parámetros: oportunidades (I) y diferenciales de selección lineales (S) y cuadráticos (C).

El potencial total para la selección de una población es la oportunidad de selección (I). Este parámetro da una idea de la fuerza de la selección y se calcula como la varianza en el éxito reproductivo relativo (Crow 1958). Cuando no hay varianza en el éxito reproductivo no hay posibilidad de selección, por el contrario cuando la varianza es grande mayor es la probabilidad de que opere la selección (Brodie et al 1995).

Para estimar los diferenciales de selección se siguió el método propuesto por Lande y Arnold (1983). Los cambios en la distribución del fenotipo en una generación pueden darse porque la selección actúa directamente sobre un rasgo o porque la selección actúa

indirectamente a través de la correlación con otros rasgos. Los diferenciales de selección miden el cambio total que resulta de la selección, sin distinguir entre efectos directos e indirectos. Los diferenciales lineales, es decir que reflejan cambios en la media poblacional (selección direccional) se estimaron como la covarianza entre el rasgo y el éxito reproductivo relativo. Los diferenciales cuadráticos, es decir que reflejan cambios en la varianza (selección estabilizadora/disruptiva) se calcularon como la covarianza entre los desvíos cuadrados del rasgo y el éxito reproductivo relativo.

Para calcular los parámetros mencionados se utilizó el paquete estadístico Rcmdr del programa R 2.14.1 (disponible online en <http://www.r-project.org>).

En aquellos casos en que se obtuvieron resultados significativos se realizaron regresiones no paramétricas Cubic Spline (Schluter 1988a). Este método permite establecer funciones de fitness que dependen de una variable sin hacer supuestos sobre su forma y permite estimar el error estándar a través de replicaciones bootstrap de la función de fitness.

RESULTADOS

En la Tabla 1 (pág. 76) se observa la estadística descriptiva de la variable medida en las distintas especies y poblaciones. La oportunidad de selección (I) fue mayor en aquellas especies cuyo principal polinizador es *Lanthanomelissa sp.*, es decir: en *S. chilense*, *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Cuesta Blanca y Tandil, *S. iridifolium ssp. valdivianum* var. 2, *S. platense* y *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum* (ver Tabla 2; pág. 76). Por otro lado, las especies que pueden autopolinizarse (*S. unguiculatum* de Carapunco, *S. chilense* var. 2, *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Rodeo Grande), mostraron los valores de I más bajos. *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Cuesta Blanca y Tandil presentaron valores de I mayores a los del resto de las especies que se autopolinizan (Tabla 2; pág. 76). Cabe recordar que si bien *S. iridifolium ssp. valdivianum* puede autopolinizarse, en los sitios mencionados recibe visitas de *Lanthanomelissa discrepans* en frecuencias similares a las de las otras especies de *Sisyrrinchium* que se demostró dependen de estas abejas para reproducirse (ver Fig. 11 del Capítulo 1; pág. 55).

Se detectaron diferenciales de selección significativos sólo en: *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Cuesta Blanca y en *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Tandil (Fig. 3; pág. 79). En la primera población, *S. chilense* mostró selección direccional negativa (Fig. 4B; pág. 80), es decir que aquellos individuos con columnas estaminales más cortas se vieron favorecidos, mientras que *S. iridifolium ssp. valdivianum* mostró la tendencia

opuesta, siendo aquellos individuos con columnas estaminales más largas los que mayor éxito reproductivo mostraron. En esta especie también se observó selección estabilizadora (Fig. 4A; pág. 80). En el caso de Tandil, al igual que en Cuesta Blanca, se detectó selección direccional positiva sobre la longitud de la columna estaminal de *S. iridifolium ssp. valdivianum* (Fig. 4C; pág. 80) y si bien el diferencial cuadrático fue significativo, el Cubic Spline no mostró un punto de fitness mínimo dentro del rango del fenotipo por lo que ese resultado es engañoso (ver Mitchell-olds y Shaw 1987).

DISCUSIÓN

En el Capítulo 1 se determinó que en las especies de *Sisyrinchium* coexistentes que comparten como polinizadores a abejas colectoras de aceites, el aislamiento mecánico cumple un rol importante al ser considerado por si mismo (RI) (Fig. 18 del Capítulo 1; pág. 62). Por otro lado, aquellas especies cuyo principal mecanismo de aislamiento es el etológico mostraron valores totales de aislamiento mecánico más bajos, siendo las contribuciones relativas y absolutas (RC y AC) iguales a cero (Fig 18 y Fig. 19 del Capítulo 1; pág. 62 y 63). Al analizar los patrones de selección, en estas últimas (es decir, en especies donde la barrera mecánica no actúa) no se detectaron diferenciales de selección significativos sobre la columna estaminal y fueron, de todas las especies evaluadas, las que menor oportunidad para la selección mostraron.

En el caso de las especies polinizadas por abejas del género *Lanthanomelissa* sólo se evidenció selección significativa en las dos especies presentes en la población de Cuesta Blanca y en *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Tandil. En Cuesta Blanca, se detectó selección direccional negativa en la especie con la columna estaminal más larga (*S. chilense*) y selección direccional positiva y estabilizadora en la especie con la columna estaminal más corta (*S. iridifolium ssp. valdivianum*). Desde el punto de vista del aislamiento se hubiera esperado que la selección promueva un aumento en las diferencias entre las longitudes de las piezas fértiles de las especies coexistentes o que mantenga las diferencias existentes, sin embargo la tendencia observada fue opuesta. Cabe destacar que en este sitio se observaron las mayores diferencias entre los valores mínimos y máximos de la variable evaluada (columna estaminal), siendo la mayor longitud observada en *S. iridifolium ssp. valdivianum* de 2,91 mm y la menor longitud en *S. chilense* de 3,69 mm (Tabla 1; pág. 76). Esto daría un indicio de que las especies tienen margen para aproximarse y aun así permanecer aisladas. Por otro lado, el tamaño de las abejas polinizadoras impone

un límite máximo en la longitud de las piezas fértiles. Si consideramos que el polen queda depositado, en el caso de *S. chilense*, en el extremo más distal del abdómen de *Lanthanomelissa discrepans* (ver Fig. 12 del Capítulo 1; pág. 56), podemos suponer que, si los estambres siguieran creciendo el ajuste con el polinizador se perdería. Al contemplar la importancia de los otros mecanismos de aislamiento evaluados, observamos que, en este sitio, la barrera que mostró la contribución absoluta más elevada (AC) fue la temporal, siendo la contribución de la barrera mecánica mínima (Fig. 19 del Capítulo 1; pág. 63). La alta eficiencia de este mecanismo de aislamiento podría permitir que la barrera mecánica se revirtiera. De hecho se ha planteado que es fácil que las barreras pre-gámicas se reviertan, una vez que han alcanzado valores máximos. Según Coyne y Orr 2004, la reversión de una barrera basada en divergencia fenotípica (pre-zigótica) puede involucrar genes diferentes a los que la generaron originalmente. Esto es diferente a lo que ocurre con barreras post-zigóticas basadas en incompatibilidades alélicas. Para que esta reversión tenga lugar la selección debería actuar sobre exactamente los mismos genes que divergieron originalmente, restaurando los alelos originales.

Se ha sugerido que las especies especialistas son más propensas a presentar gradientes de selección significativos (Jonhson y Steiner 2000). El presente estudio evidenció selección significativa sólo en los tres casos mencionados anteriormente, no detectándose patrones significativos en *S. platense* y *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum* de Chapicuy, *S. iridifolium ssp. valdivianum* var. 2 y *S. chilense* de Tandil. En estos casos, a diferencia de lo que ocurre en las especies de Cuesta Blanca, los halíctidos observados podrían jugar algún rol en la polinización. Si consideramos el comportamiento de los mismos, que consiste en girar en torno a las piezas fértiles, resulta evidente que la longitud de las mismas no influiría en el proceso de polinización. Una posible explicación al hecho de no haber encontrado selección significativa podría ser, entonces, que las presiones ejercidas por estos polinizadores podría anular las ejercidas por las abejas colectoras de aceites tal como proponen Nattero et al. (2010) para el caso de otra especie de planta oleífera (*Nierembergia linaerifolia*). En este mismo trabajo se propone que, aquellos caracteres vinculados al ajuste mecánico con el polinizador, en general, presentan bajos coeficientes de variación por lo que resulta difícil detectar la selección. Por otro lado, si bien en estas poblaciones, la barrera mecánica juega un rol más importante que en Cuesta Blanca, su importancia absoluta (AC) es también baja y es quizás por eso que no se detecta selección sobre esta variable en la actualidad.

En el caso de las especies que se auto-polinizan, la oportunidad para la selección fue menor que en las especies que dependen de los polinizadores para reproducirse, a excepción de en *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Cuesta Blanca y Tandil, únicos casos en los que se detectó selección. En estos sitios las frecuencias con que las abejas colectoras de aceites visitaron las flores fueron similares a aquellas detectadas en las especies de *Sisyrinchium* que no tienen la capacidad de auto-polinizarse (Fig. 10 del Capítulo 1; pág. 54). En el caso de Cuesta Blanca (en Tandil no pudo evaluarse) si bien no se detectaron diferencias significativas en los tratamientos de sistema reproductivo (Fig. 8 del Capítulo 1; pág. 52), la polinización libre mostró mayor variabilidad que la autopolinización espontánea, hallándose valores máximos bajo el tratamiento de polinización libre (120 semillas bajo PL vs. 80 bajo AE). Esto indicaría que quizás dichas abejas influyen de manera positiva en el éxito reproductivo, aumentando el número de semillas y ejerciendo presiones selectivas que se manifiestan en diferenciales significativos.

Tabla 1: Estadística descriptiva de la variable “columna estaminal” para cada especie de *Sisyrinchium* en las seis poblaciones evaluadas. **n:** cantidad de flores evaluadas; **D.E.:** desvío estándar; **CV:** coeficiente de variación; **Mín:** valor mínimo; **Máx:** valor máximo.

Especie	Población	n	Media	D.E.	CV	Mín	Máx
<i>S. chilense</i>	Cuesta Blanca	79	4,73	0,34	7,26	3,69	5,42
<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Cuesta Blanca	93	2,59	0,16	6,10	2,07	2,91
<i>S. chilense</i> var. 2	Rodeo Grande	46	4,81	0,22	4,59	4,23	5,43
<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Rodeo Grande	42	2,59	0,10	3,93	2,36	2,79
<i>S. chilense</i>	Tandil	89	3,87	0,37	9,60	3,06	4,82
<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Tandil	96	2,27	0,25	11,07	1,93	2,89
<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i> var. 2	Tandil	89	2,29	0,17	7,49	1,91	2,78
<i>S. platense</i>	Chapicuy	74	2,96	0,20	6,59	2,42	3,69
<i>S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum</i>	Chapicuy	53	4,87	0,36	7,42	4,09	5,69
<i>S. chilense</i>	P. de Achala	91	4,98	0,24	4,90	4,45	5,48
<i>S. unguiculatum</i>	P. de Achala	97	6,09	0,48	7,86	4,77	7,69
<i>S. chilense</i> var. 2	Carapunco	92	4,19	0,41	9,79	3,28	5,14
<i>S. unguiculatum</i>	Carapunco	95	3,54	0,25	7,03	2,75	4,04

Tabla 2: Oportunidad de selección (*I*) para cada especie en las seis poblaciones estudiadas. Con negrita se señalan especies cuyos principales polinizadores son abejas colectoras de aceites del género *Lanthanomelissa*. En rojo se señalan especies que no son capaces de autopolinizarse, es decir que dependen de los polinizadores para su reproducción.

Especie	Población	<i>I</i>
<i>S. unguiculatum</i>	Carapunco	0,05
<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Rodeo Grande	0,07
<i>S. chilense</i> var. 2	Rodeo Grande	0,08
<i>S. chilense</i> var. 2	Carapunco	0,10
<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Tandil	0,14
<i>S. unguiculatum</i>	P. de Achala	0,16
<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i> var. 2	Tandil	0,17
<i>S. chilense</i>	P. de Achala	0,17
<i>S. platense</i>	Chapicuy	0,23
<i>S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum</i>	Chapicuy	0,23
<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Cuesta Blanca	0,24
<i>S. chilense</i>	Tandil	0,26
<i>S. chilense</i>	Cuesta Blanca	0,28

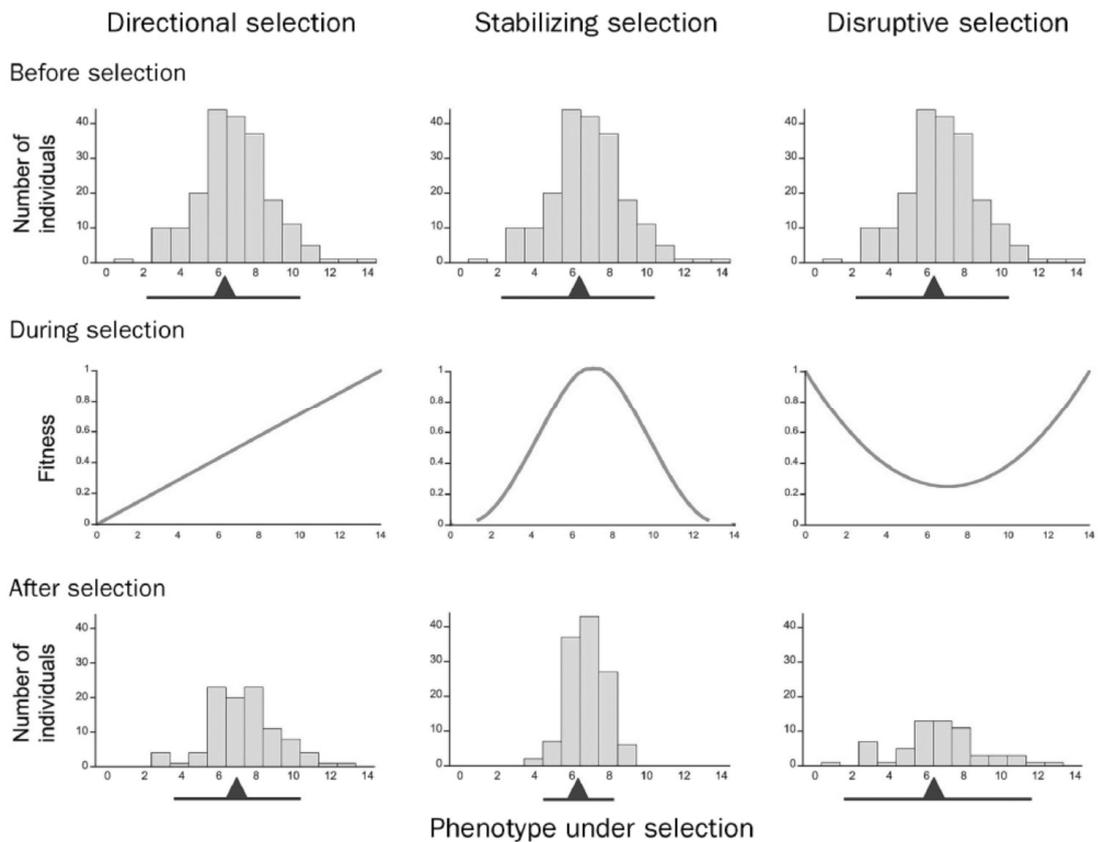


Figura 1: Tipos de selección (direccional, estabilizadora y disruptiva). Arriba se observa la distribución de un determinado carácter en una población hipotética antes de la selección. En el centro se muestra la función de fitness y abajo la distribución del carácter después de la selección. El triángulo debajo de cada histograma indica la media poblacional y la barra muestra la varianza poblacional (± 2 desvíos estándares). Extraído de Kingsolver y Pfennig 2007.

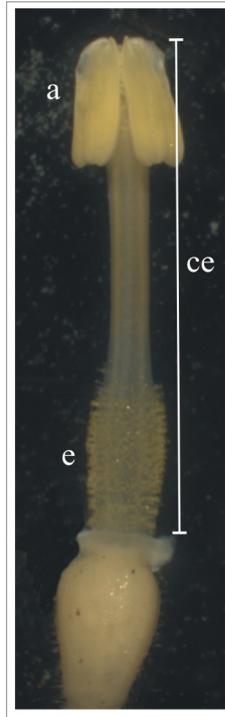


Figura 2: Flor de *Sisyrrinchium pachyrrhizum ssp. pachyrrhizum* a la que se le retiraron los tépalos y se fotografió bajo lupa. La línea blanca señala la longitud de la columna estaminal (**ce**) (variable medida para los análisis de selección fenotípica). **a:** anteras. **e:** elaióforo.

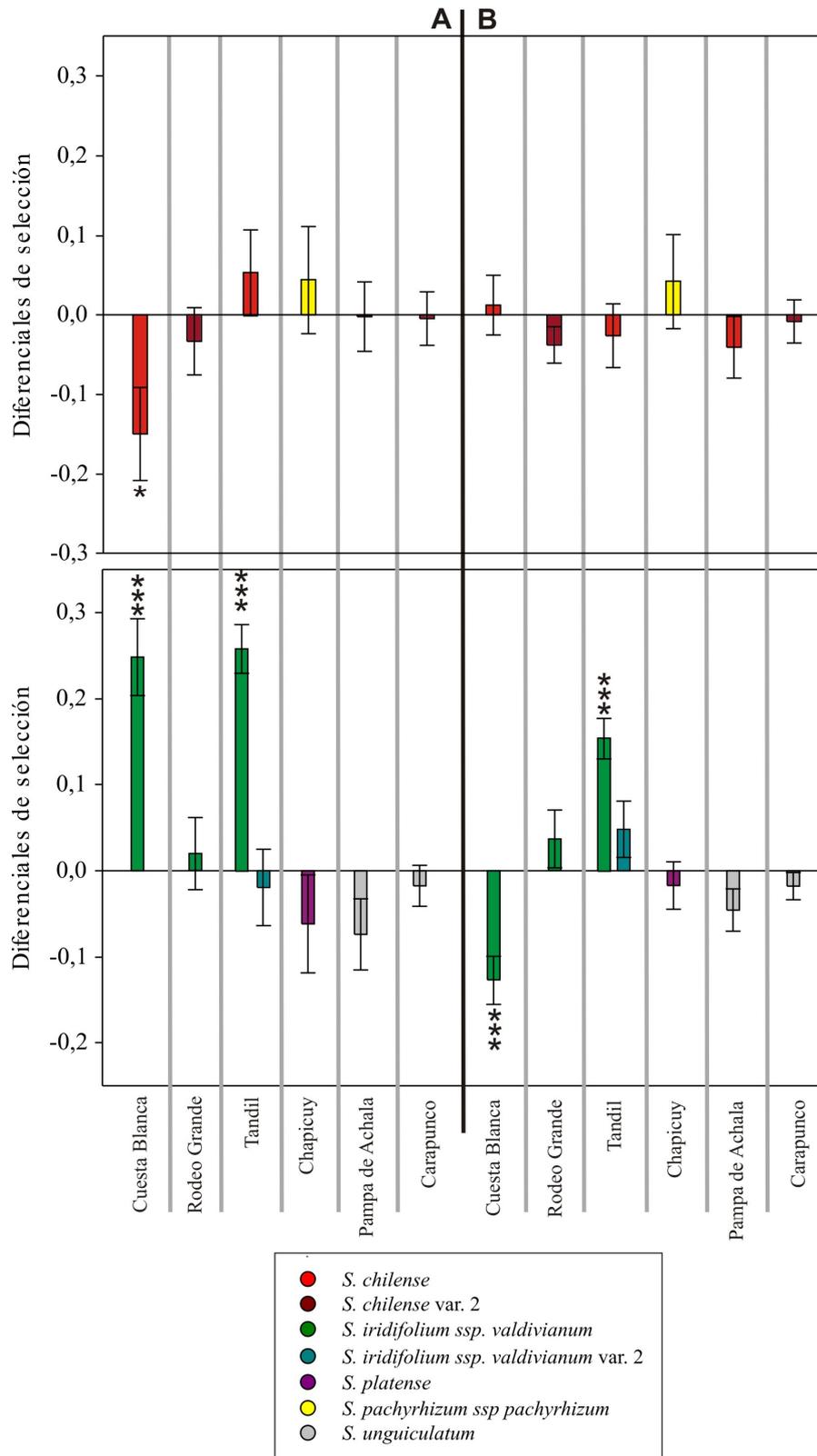


Figura 3: Diferenciales de selección de las especies estudiadas en cada población. La barras de error indican \pm DE. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. **A:** Diferenciales de selección lineales (selección direccional). **B:** Diferenciales de selección cuadráticos (selección estabilizadora o disruptiva). En la parte superior se muestran las especies con arquitectura rotácea (*S. chilense*, *S. chilense* var. 2 y *S. pachyrhizum* ssp. *pachyrhizum*). En el gráfico inferior se muestra las especies con arquitectura hipocrateriforme (*S. iridifolium* ssp. *valdivianum*, *S. iridifolium* ssp. *valdivianum* var. 2 y *S. platense*) a excepción de *S. unguiculatum* que posee flores rotáceas.

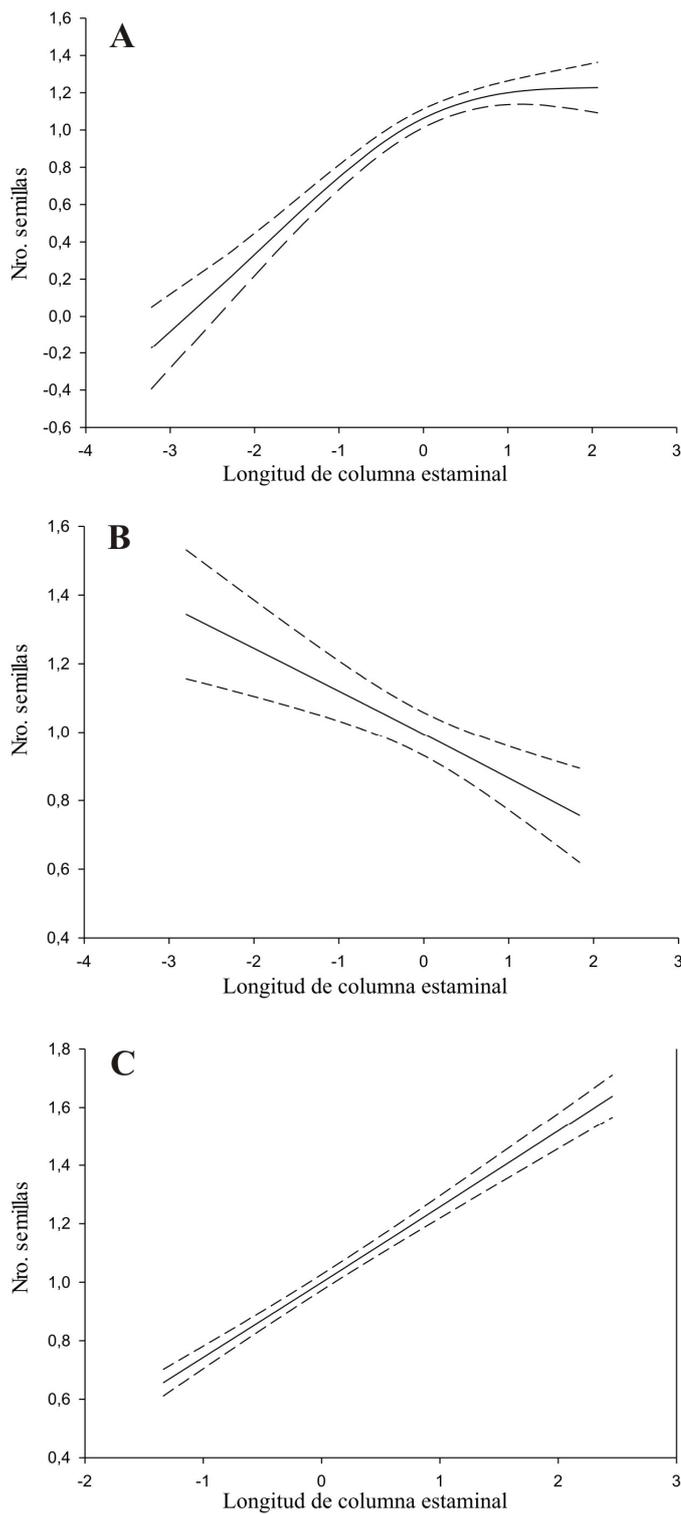


Figura 4: Regresiones Cubic Spline mostrando la relación entre la longitud de la columna estaminal y el número de semillas. **A:** *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Cuesta Blanca. **B:** *S. chilense* de Cuesta Blanca. **C:** *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Tandil. Las líneas de puntos representan el error estándar.

BIBLIOGRAFÍA

- ACKERMAN JD, MELE´NDEZ-ACKERMAN AJ, Y SALGUERO-FARIA J. 1997. Variation in pollinator abundance and selection on fragrance phenotypes in an epiphytic orchid. *American Journal of Botany* 84: p.1383-1390.
- BENITEZ-VIEYRA S, MEDINA AM, Y COCUCCI AA. 2009. Variable selection patterns on the labellum shape of *Geoblasta pennicillata*, a sexually deceptive orchid. *Journal of Evolutionary Biology* 22: p.2354-2362.
- BENITEZ-VIEYRA S, MEDINA AM, GLINOS E, Y COCUCCI AA. 2006. Pollinator-mediated selection on floral traits and size of floral display in *Cyclopogon elatus*, a sweat bee-pollinated orchid. *Functional Ecology* 20: p.948-957.
- BRODIE ED, MOORE AJ, Y JANZEN FJ. 1995. Visualizing and quantifying natural selection. *Trens in Ecology and Evolution* 10: p.313-318.
- CAMPBELL DR. 1989. Measurements of selection in a hermaphroditic plant: variation in male and female pollination success. *Evolution* 43: p.318-334.
- CARUSO CM. 2000. Competition for pollination influences selection on floral traits of *Ipomopsis aggregata*. *Evolution* 54: p.1546-1557.
- COYNE, Y ORR HA. 2004. Speciation. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts USA.
- CROW JF. 1958. Some possibilities for measuring selection intensities in man. *Human Biology* 30: p.1-13.
- DARWIN C. 1877. The various contrivances by which British and foreign Orchids are fertilised by insects. D. Appleton, New York.
- FENSTER CB, Y RITLAND K. 1994. Evidence of natural selection on mating system in *Mimulus* (Scrophulariaceae). *International Journal of Plant Science* 155: p.588-596.
- GÓMEZ JM. 2008. Sequential conflicting selection due to multispecific interactions 8 triggers evolutionary trade-offs in a monocarpic herb. *Evolution* 62: p.668-679.
- HERRERA CM. 1996. Floral traits and planta adaptation to insect pollinators: a devil's advocate approach. In *Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants*, 65-87. Chapman & Hall, New York.
- JOHNSON SD, Y STEINER KE. 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trens in Ecology and Evolution* 15: p.140-143.
- JOHNSON SD, Y STEINER KE. 1997. Long-tongued fly pollination and evolution of floral spur length in the *Disa draconis* complex (Orchidaceae). *Evolution* 51: p.45-53.
- KINGSOLVER JG ET AL. 2001. The strength of phenotypic selection in natural populations. *The American Naturalist* 157: p.245-261.
- KINGSOLVER JG, Y PFENNIG DW. 2007. Patterns and power of phenotypic selection in

- nature. *Bioscience* 27: p.561-572.
- LANDE R, Y ARNOLD SJ. 1983. The Measurement of selection on correlated characters. *Evolution* 37: p.1210-1226.
- MAAD J, Y ALEXANDERSSON R. 2004. Variable selection in *Platanthera bifolia* (Orchidaceae): phenotypic selection differed between sex functions in a drought year. *Journal of Evolutionary Biology* 17: p.642-650.
- MAJETIC CJ, RAGUSO RA, Y ASHMAN T. 2009. The sweet smell of success: floral scent affects pollinator attraction and seed fitness in *Hesperis matronalis*. *Functional Ecology* 23: p.480-487.
- MEDEL R, BOTTO-MAHAN C, Y KALIN-ARROYO M. 2003. Pollinator-mediated selection on the nectar guide phenotype in the Andean monkey flower, *Mimulus luteus*. *Ecology* 84: p.1721- 1732.
- MITCHELL-OLDS T, Y SHAW R. 1987. Regression analysis of natural selection: statistical inference and biological interpretations. *Evolution* 41: p.1149-1161.
- MIYAKE T, Y YAFUZO M. 2003. Floral scents affect reproductive success in fly-pollinated *Alocasia odora* (Araceae). *American Journal of Botany* 90: p.370-376.
- NATTERO J, COCUCCI AA, Y MEDEL R. 2010. Pollinator-mediated selection in a specialized pollination system: matches and mismatches across populations. *Journal of Evolutionary Biology* 19: p.1957-1968.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2010. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- SCHIESTL FP, HUBER FK, Y GOMEZ JM. 2011. Phenotypic selection on floral scent: trade off between attraction and deterrence? *Evolutionary Ecology* 25: p.237-248.
- SCHLUTER D. 1988. Estimating the form of natural selection on a quantitative trait. *Evolution* 42: p.849-861.
- SIEPIELSK AM, DiBATTISTA JD, Y CARLSON SM. 2009. It's about time: the temporal dynamics of phenotypic selection in the wild. *Ecology letters* 12: p.1261-1276.

CAPÍTULO 3

ANÁLISIS DE LA POSIBILIDAD DE QUE *SISYRINCHIUM CHILENSE* Y *SISYRINCHIUM IRIDIFOLIUM* SSP. *VALDIVIANUM* SE HAYAN ORIGINADO EN EL CONTEXTO DE SIMPATRÍA.

INTRODUCCIÓN

En las últimas dos décadas ha resurgido el interés por evidenciar la existencia del tipo de especiación más controvertido: la especiación simpátrica. Este tipo de especiación implica el surgimiento de mecanismos de aislamiento entre miembros de una población que se entrecruzan. La restricción inicial del flujo génico se da, no por accidentes geográficos o por distancia, sino por rasgos biológicos de los organismos, por lo que deben evolucionar simultáneamente el aislamiento reproductivo y la habilidad para coexistir (Coyne y Orr 2004). Entonces, la dificultad que cualquier modelo debe sortear es cómo reducir la frecuencia de los genotipos intermedios que actuarían como conducto del intercambio genético entre las especies incipientes (Futuyma 2005). Los mecanismos propuestos según los cuales este tipo de especiación podría operar son: selección sexual disruptiva y selección natural disruptiva que involucre competencia por los recursos (Coyne y Orr 2004). Si bien este tipo de especiación es teóricamente posible, resulta difícil comprobar su existencia ya que hay que demostrar que las especies que conviven actualmente se originaron en simpatría y no en alopatría y que la coexistencia se dió con posterioridad. Es decir, la principal dificultad es rechazar las alternativas (Coyne y Orr 2004). Coyne y Orr (2004) enumeran cuatro aspectos fundamentales para evaluar si dos especies se originaron en simpatría: las mismas deben ser en gran parte o totalmente simpátricas; deben estar reproductivamente aisladas y este aislamiento debe estar preferentemente basado en diferencias genéticas; las especies deben ser filogenéticamente hermanas y, por último, la historia biogeográfica y evolutiva de los grupos debe hacer la existencia de una fase alopátrica poco probable. Algunos de los ejemplos más convincentes de especiación sin aislamiento geográfico se han evidenciado en peces (Barluenga y Meyer 2004, Taylor y McPhail 1999 y 2000, Gislason et al. 1999, Schliewen et al. 1994, ver también revisión de Coyne y Orr 2004), mientras que, en plantas hay poca evidencia en relación a este tipo de especiación. Análisis moleculares realizados en palmeras son

consistentes con modelos que involucran selección disruptiva (Savolainen et al, 2006). La especiación simpátrica debida a separación topográfica en la aplicación de polen sobre distintas partes del cuerpo del polinizador sería también posible, como lo sugiere la existencia de especies próximas que comparten la misma especie de polinizador pero que poseen distintos mecanismos de entrega de polen (Cocucci y Vogel 2001, Paulus y Gack 1997, Grant 1994, Kwak 1978, Dressler 1968). Sin embargo, no se ha probado ningún caso en que barreras florales mecánicas y con el mismo polinizador hayan conducido a este tipo de especiación. Por otro lado, un proceso que, por si mismo, puede provocar especiación simpátrica pero que no parece ser frecuente en la naturaleza es el aislamiento temporal (Coyne y Orr 2004).

Un modo de especiación en simpatría que no está en duda es la poliploidización. Se ha estimado que del 2-4 % de los eventos de especiación en las plantas con flores son debidos a poliploidización (Albert y Schluter 2005). Uno de los factores que aumentan las probabilidades de supervivencia de un nuevo poliploide es la aparición de mecanismos de aislamiento prezigótico. Una barrera común en la naturaleza es la asincronía en la floración entre los poliploides y sus progenitores diploides. De hecho se ha sugerido que esta sería una consecuencia fisiológica del aumento en el nivel de ploidía (Coyne y Orr 2004). Otro de los mecanismos de los que hay registro en poliploides es el cambio en el tamaño, forma o color de sus flores, lo que puede llevar a cambios en el elenco de polinizadores o en la especificidad con que los mismos visitan las flores (Segraves y Thompson 1999).

S. chilense y *S. iridifolium ssp. valdivianum*, que según Rodríguez (1986) deben considerarse como una única especie, proporcionan un modelo interesante para poner a prueba hipótesis de especiación simpátrica. Como ya se describió en el Capítulo 1 de esta tesis, estas especies se encuentran aisladas por barreras mecánicas y temporales.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si dos especies coexistentes de *Sisyrinchium* (*S. iridifolium ssp. valdivianum* y *S. chilense*) podrían haberse originado mediante especiación en simpatría.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar si las especies se distribuyen en gran parte o completamente en simpatría.
- Determinar si las especies estudiadas son poliploides.
- Determinar, utilizando como base la filogenia realizada por Chauveau et al. (2011) si las especies son filogenéticamente hermanas.
- Realizar un mapeo filogenético de la arquitectura floral (carácter involucrado en el aislamiento mecánico de las especies), para determinar cuál es el estado ancestral (rotáceo o hipocrateriforme), cuántas veces evolucionó dicho carácter y si existe algún tipo de asociación con la presencia de abejas colectoras de aceites.

MATERIALES Y MÉTODOS

Distribución de las especies

Tal como se describió en el Capítulo 1, para determinar el rango de distribución de *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* se utilizaron los datos obtenidos de 208 ejemplares de ambas especies pertenecientes a cinco herbarios de Argentina (CORD, SI, LIL, CTES y LP). Se utilizaron sólo aquellos ejemplares cuyas características coincidían con las descripciones de especie detalladas en Ravenna 1969 a, b. y 2001.

Análisis cromosómicos

Se colectaron semillas de ambas especies de distintos sitios: *S. chilense* de las poblaciones de Santa María de Punilla, Tandil, Pampa de Achala, Cuesta Blanca y *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Tandil y Cuesta Blanca. Las mismas se colocaron durante una semana en heladera (a 5°C) y luego, en cápsulas de petri sobre papel de filtro húmedo en cámara de cultivo (a 20°C durante el día y de 10 a 16°C durante la noche; fotoperíodo: de 8 a 20hs) hasta la aparición de las raicillas. Los ápices de las raíces se pre-trataron en una solución 0,002M de 8-Hidroxiquinoleína dejándolas durante 4 hs a 4 °C y luego se fijaron en una mezcla 3:1 de etanol 100: ácido acético glacial. Se realizaron recuentos con técnicas citológicas clásicas de cromosomas en metafases mitóticas utilizando la coloración de Feulgen (Jong 1997). Lo preparados obtenidos se fotografiaron bajo un microscopio Leica DM LB.

Análisis filogenéticos y mapeo de caracteres

Uno de los objetivos planteados inicialmente en el marco de esta tesis, consistía en realizar una filogenia molecular del género. A tales fines se colectó material vegetal de varias especies de *Sisyrinchium* y de *Olsynium junceum* (como extragrupo) y se obtuvieron secuencias del gen cloroplástico *matK*. Considerando que recientemente ha salido publicada una filogenia más completa del género (Chauveau et al. 2011), en donde se incluyen las especies de nuestro interés y una mayor cantidad de marcadores moleculares, el mapeo de caracteres se realizó en base a las secuencias publicadas en el GenBank por Chauveau et al. 2011. Se trabajó entonces con las secuencias de 8 genes (tres regiones codificantes de ADN cloroplástico: *rpoC1*, *rpoB* y *matK*, dos espaciadores intergénicos de ADN cloroplástico: *trnH-psbA* y *trnQ-rps16*, dos intrones de ADN mitocondrial: *nad1-2/3* y *nad4-1/2* y el espaciador interno de ADN ribosómico: región ITS, incluyendo ITS1, ITS2 y el gen 5.8S) correspondientes a 85 especies de *Sisyrinchium*, 5 especies de *Olsynium*, una de *Orthrosanthus* y dos de *Solenomelus* (éstos últimos géneros se utilizaron como extragrupos por estar cercanamente emparentados a *Sisyrinchium*).

Para reconstruir las relaciones filogenéticas entre las especies se utilizaron dos algoritmos diferentes, Parsimonia (P) y Máxima verosimilitud (MV). El análisis de parsimonia se realizó en TNT v 1.1 (Goloboff et al. 2008) por medio de búsquedas heurísticas. El soporte de clados se estimó mediante técnicas de remuestreo como Bootstrapping (Felsenstein 1985) con 1000 réplicas y búsquedas también heurísticas.

Para realizar la reconstrucción por MV en una primera instancia se evaluó qué modelo de evolución molecular se ajustaba mejor a los datos, utilizando el programa JModelTest v.3.06. (Posada y Crandall 1998) y el criterio de Akaike (Akaike 1974). El modelo seleccionado fue GTR+G. El análisis de MV fue realizado con el programa PhyML 3.0 (Guindon y Gascuel 2003, Guindon et al. 2005). Los valores de soporte de los nodos se obtuvieron mediante 1000 réplicas de bootstrap no paramétricos (Felsenstein 1985).

El mapeo de caracteres se realizó sobre el árbol de mayoría obtenido mediante MV, con el programa Mesquite v.2.74 (Maddison y Maddison 2007), utilizando dos métodos alternativos de reconstrucción de los estados ancestrales el de Máxima Verosimilitud y Parsimonia. El rasgo que fue evaluado fue la arquitectura floral (hipocrateriforme y rotácea). Para determinar el tipo de arquitectura de las flores se realizó una búsqueda de bibliografía en la que aparecieran descripciones de las especies. Aquellos datos que no

podieron ser encontrados por esta vía fueron provistos por el Dr. Chauveau (Université Paris-Sud, Laboratoire Ecologie Systématique et Evolution). Luego, se evaluó la correlación existente entre este rasgo (arquitectura floral) y el tipo de polinizadores (abejas colectoras de aceites u otros polinizadores) utilizando el análisis de PAGEL94 del programa Mesquite v.2.74 (Maddison y Maddison 2007). Si bien existe poca información de cuáles son los polinizadores de las distintas especies de *Sisyrinchium*, a modo de aproximación, se utilizó la información disponible en Cocucci y Vogel (2001) y en Chauveau et al. (2011), la cual fue complementada con las observaciones a campo realizadas en el marco de esta tesis. En el caso de aquellas especies de las que no se dispone de registros de visitantes se consideró que eran polinizadas por abejas colectoras de aceites si presentaban elaióforos y se distribuían dentro del área de distribución de dichos insectos. Se incluyó dentro de la categoría “abejas colectoras de aceites” tanto a *Chalepogenus sp.* como a *Lanthanomelissa sp.*

RESULTADOS

Distribución de las especies

Si bien las distribuciones de las especies no son completamente simpátricas, las especies coexisten en, por ejemplo, algunos sitios de Córdoba, Buenos Aires y Tucumán (Fig. 1; pág. 91). Tal como se describió ya en el primer capítulo de esta tesis *S. chilense* presenta una distribución más occidental mientras que *S. iridifolium ssp. valdivianum* es más frecuente hacia el centro y este de Sudamérica.

Análisis cromosómicos

Si bien no se pudo contar con claridad el número cromosómico de las especies en todos los casos, se determinó que *S. chilense* en los sitios evaluados presentó un número cromosómico mayor a 50, determinándose un $2n=64$ en Cuesta Blanca, mientras que *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Cuesta Blanca y Tandil presentaron un $2n=32$. Fig. 2 (pág. 92).

Análisis filogenéticos y mapeo de caracteres

Mediante el análisis realizado con Parsimonia, se obtuvieron 48 árboles de mínima longitud ($L = 1967$ pasos). Los resultados obtenidos por Parsimonia y MV son similares, por lo que sólo se muestra el árbol más probable, obtenido por MV en la Fig. 3 (pág. 93). Si bien los soportes obtenidos son moderados, *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* resultaron no ser especies filogenéticamente hermanas. *S. chilense* aparece como grupo hermano de un gran clado dentro del cual está incluido *S. iridifolium ssp. valdivianum*.

Los resultados de la reconstrucción del carácter arquitectura floral realizada sobre la topología derivada del análisis filogenético de MV utilizando los métodos de Parsimonia y MV fueron similares por lo que sólo se muestra el mapeo obtenido mediante Parsimonia en la Fig. 4 (pág. 94). La mayoría de las especies presentan arquitectura rotácea, siendo éste el estado ancestral. El estado hipocrateriforme evolucionó al menos 7 veces de manera independiente. El tipo de arquitectura de las flores estuvo significativamente correlacionado con el tipo de polinizadores ($r=-63,15$; $p=0,0$) encontrándose presente la arquitectura hipocrateriforme sólo en aquellas especies polinizadas por abejas colectoras de aceite.

DISCUSIÓN

Si bien la evaluación de la posibilidad de especiación simpátrica requiere de estudios más complejos y profundos, en este capítulo se evaluaron algunas pautas a modo de aproximación a la temática en *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum*. Como ya se mencionó en la introducción, Coyne y Orr (2004) proponen cuatro aspectos para establecer si las especies podrían haberse originado en simpatría:

Las especies deben ser en gran parte o totalmente simpátricas. Al evaluar las distribuciones de las especies, se determinó que, si bien las mismas coexisten en algunos sitios a lo largo de sus rangos de distribución, son mayormente alopátricas. Según Ravenna (1969 ayb) *S. chilense* se distribuye en regiones situadas por encima del paralelo 45, mientras que *S. iridifolium ssp. valdivianum* presenta la distribución más amplia del género encontrándose desde Méjico o tal vez Estados Unidos por todos los países hasta Tierra del Fuego. El hecho de que nuestros resultados reflejen una distribución un poco más restringida puede deberse a cierto sesgo generado por los Herbarios consultados, los cuales

es probable tengan una mayor representación de ejemplares colectados en regiones cercanas a los mismos. Si bien la superposición geográfica actual de estas dos especies de *Sisyrinchium* es muy poca, uno podría esperar que por ejemplo, las especies que se formaron simpátricamente expandan sus rangos de distribución con el tiempo, reduciendo el rango de superposición (Coyne y Orr 2004).

Las especies deben tener sustancial aislamiento reproductivo, preferentemente basado en diferencias genéticas. Como ya se menciona en el Capítulo 1 las especies se encuentran aisladas por una combinación de mecanismos y si bien existe variabilidad a nivel geográfico en las contribuciones de cada tipo de aislamiento, las barreras temporales y mecánicas tendrían un rol importante en la actualidad para estas especies. El carácter arquitectura floral que es el que en gran parte determina el comportamiento de los polinizadores y en consecuencia el depósito diferencial del polen sobre el cuerpo de las abejas, parece haber sido ancestralmente rotáceo y habría evolucionado independientemente en al menos siete oportunidades hacia el fenotipo hipocrateriforme, que está asociado significativamente con la polinización por abejas colectoras de aceites.

Según estudios recientes (Chauveau et al. 2011 y Silvério et al. 2012) los elaióforos evolucionaron probablemente 2 veces de manera independiente en el género conduciendo a la formación de dos linajes. Uno de ellos distribuido dentro del rango de *Chalepogenus sp.* y el otro dentro del rango *Lanthanomelissa sp.* Las especies incluidas en el primer grupo presentan elaióforos cuyas cutículas se rompen con facilidad. Por otro lado, las especies del segundo grupo (en el que están incluidas *S. chilense*, *S. iridifolium ssp. valdivianum* y *S. platense*) presentan tricomas con cutículas gruesas que sólo pueden ser rotas por estructuras especiales de las patas delanteras de abejas del género *Lanthanomelissa*. Cabe destacar que la arquitectura hipocrateriforme se encuentra presente en ambos linajes, por lo que al momento de evaluar la posible influencia de las abejas colectoras de aceites en la aparición de la barrera mecánica hay que considerar no sólo las posibles presiones selectivas ejercidas por *Lanthanomelissa sp.* sino también aquellas vinculadas a *Chalepogenus sp.*

Las especies simpátricas deben ser filogenéticamente hermanas. *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* resultaron no ser filogenéticamente hermanas. La filogenia realizada por Chauveau et al. (2011) es la primera filogenia molecular del género y por lo tanto, la más completa hasta el momento. Si bien incluye a un gran número de especies y de marcadores moleculares, es necesario realizar nuevos estudios que abarquen a una

mayor cantidad de especies y/o utilizando otros genes para poder determinar con mayor precisión la relación entre *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum*.

La historia biogeográfica y evolutiva de los grupos debe hacer la existencia de una fase alopátrica poco probable. Cómo ya se mencionó anteriormente, este es un grupo que recién está comenzando a explorarse a nivel molecular. La mejor aproximación para abordar el tema de la especiación simpátrica es realizar estudios de biogeografía comparada (Coyne y Orr 2004) entre las especies de *Sisyrinchium* susceptibles de haberse originado por mecanismos en simpatría y asociar esta información a la filogeografía de las abejas polinizadoras.

En cuanto a la posibilidad de poliploidización, en este capítulo el objetivo propuesto fue simplemente determinar el nivel de ploidía de las especies. Según bibliografía previa el número básico para estas especies sería de $X=8$ (Rudall et al. 1986). Se determinó que el número cromosómico de *S. iridifolium ssp. valdivianum* es $2n=32$, lo cual coincide con estudios previos en la especie (Oliver y Lewis 1962). En el caso de *S. chilense* sólo en Cuesta Blanca se pudo determinar que el número cromosómico es de $2n=64$. Registros previos en esta especie señalan como número cromosómico $2n=16$ (Rudall et al. 1986, Bocher 1966). Es decir que las dos especies analizadas serían poliploides. *S. iridifolium ssp. valdivianum* sería tetraploide, mientras que *S. chilense* (al menos en la población de Cuesta Blanca) sería una especie octoploide. Según Rodríguez 1986 eventos de alopoliploidia pueden haber dado origen a nuevas especies en el género. Son necesarios estudios más profundos para evaluar si las barreras reproductivas temporales y mecánicas están asociadas a cambios en el nivel de ploidía.

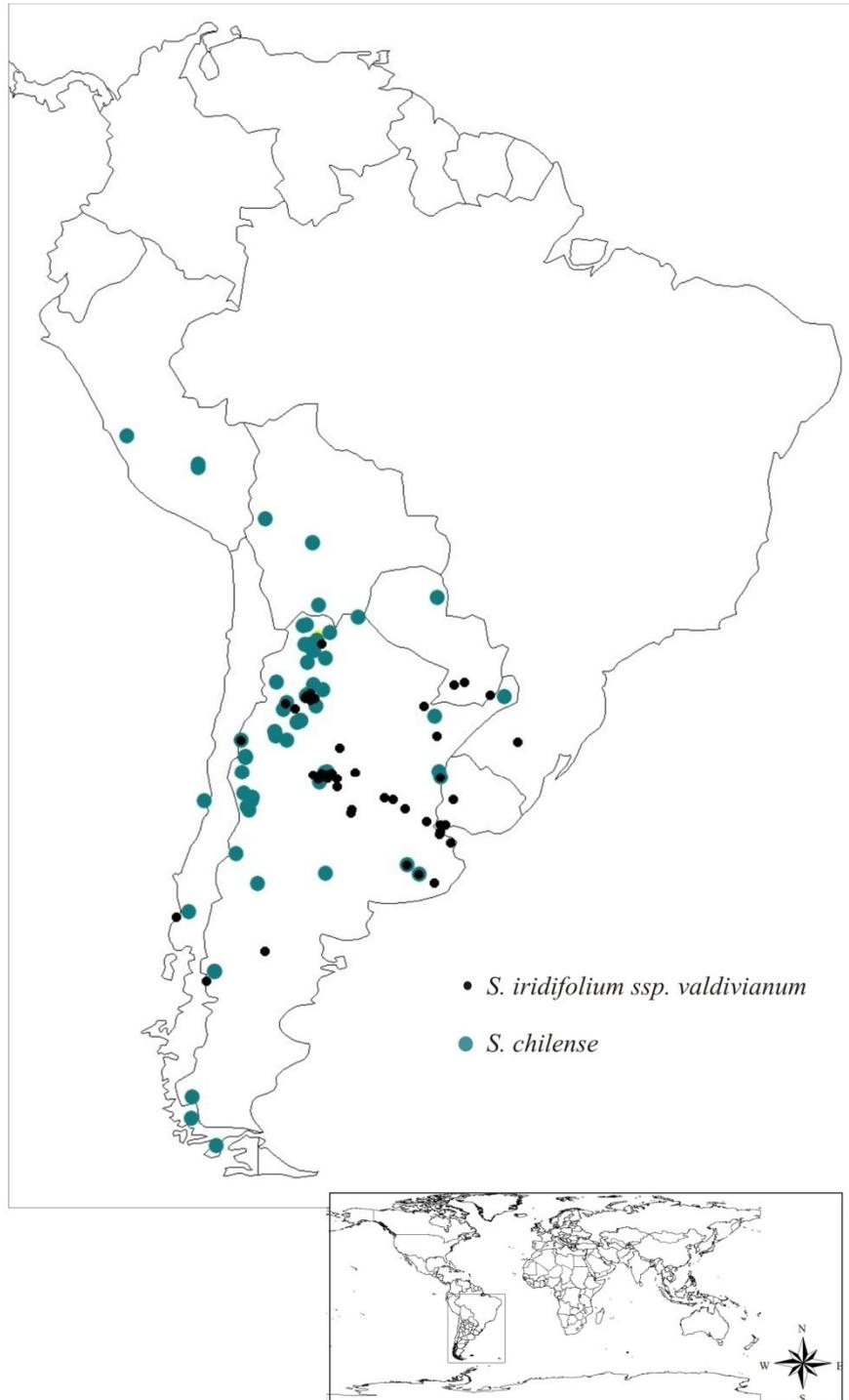


Figura 1: Mapa de distribución de *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum*.

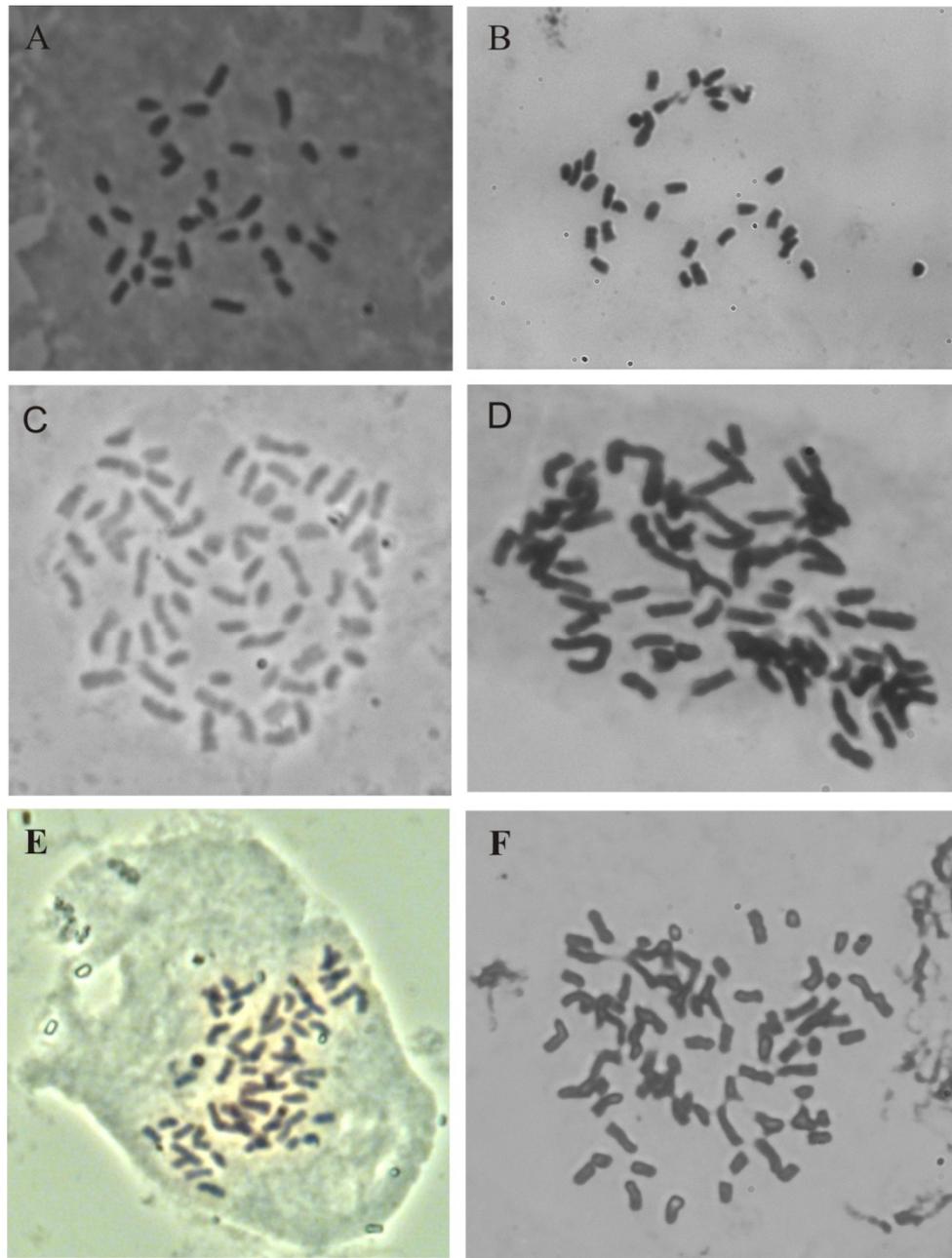


Figura 2: Cromosomas en metafases mitóticas. **A:** *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Cuesta Blanca ($2n=32$). **B:** *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Tandil ($2n=32$). **C:** *S. chilense* de Cuesta Blanca ($2n=64$). **D:** *S. chilense* de Tandil ($2n=+$ de 60). **E:** *S. chilense* de Santa María de Punilla ($2n=+$ de 50). **F:** *S. chilense* de Pampa de Achala ($2n=+$ de 60).

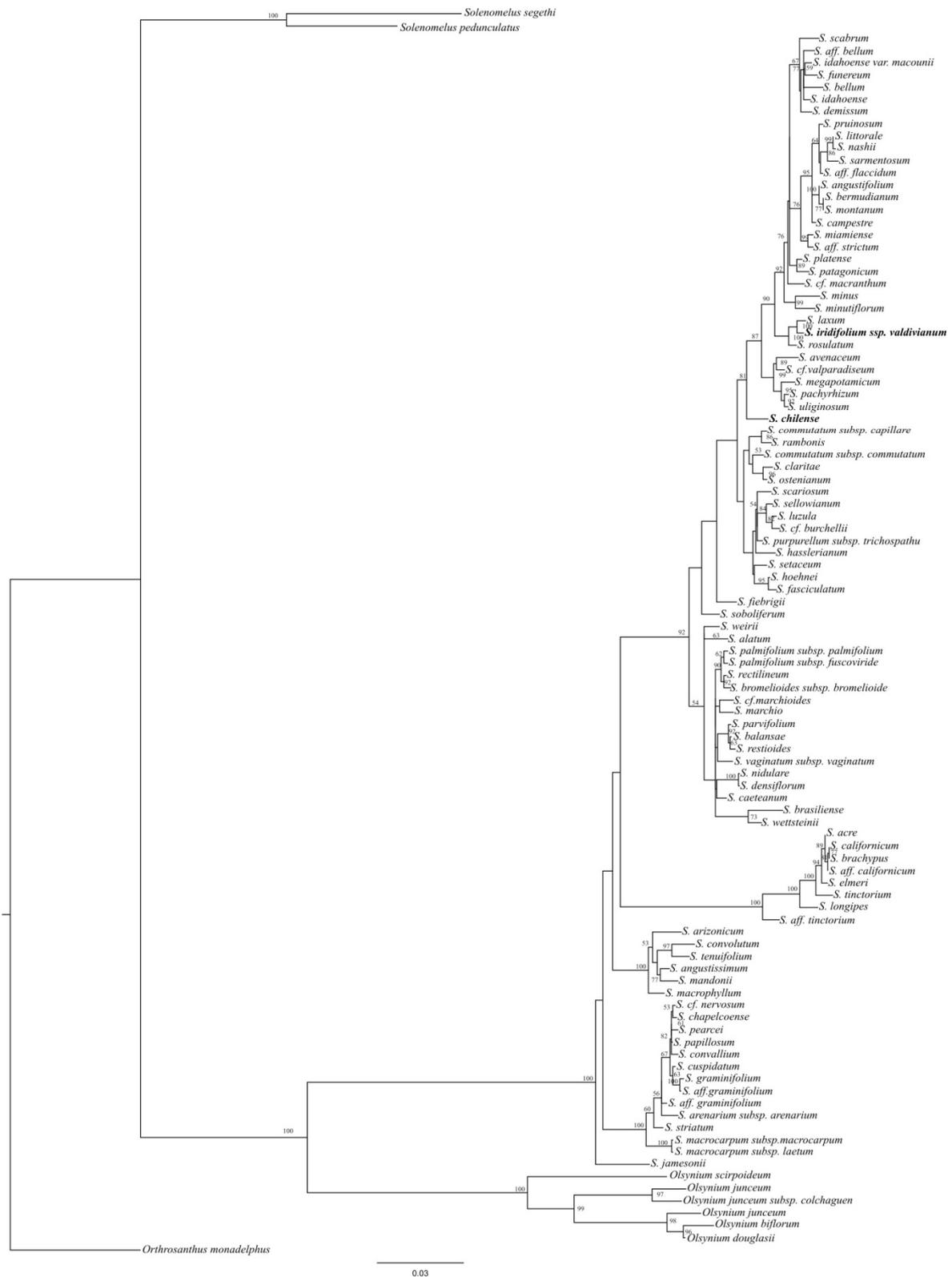


Figura 3: Árbol filogenético más probable, obtenido por MV. En negrita se muestran las dos especies de interés en este estudio.

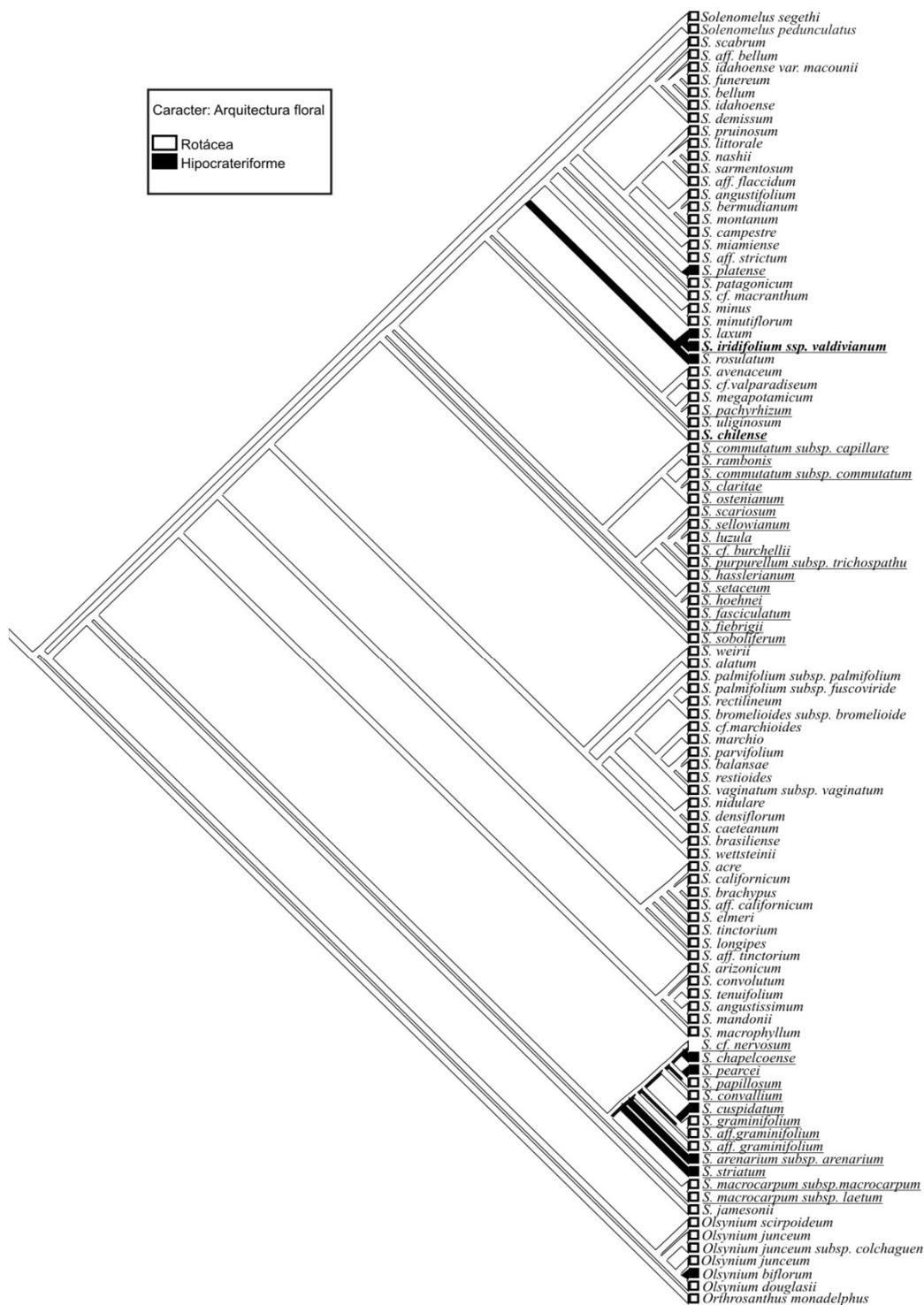


Figura 4: Reconstrucción, utilizando Parsimonia, del carácter “arquitectura floral” realizado sobre la topología derivada del análisis filogenético de MV. En negrita se muestran las especies de nuestro interés. Subrayadas se señalan aquellas especies que serían polinizadas por abejas colectoras de aceites.

BIBLIOGRAFÍA

- AKAIKE H. 1974. A new look at statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19: p.716–729.
- ALBERT AYK, AND SCHLUTER D. 2005. Selection and the origin of species. *Current Biology* 15: p.283–288.
- BARLUENGA M, AND MEYER A. 2004. The Midas Cichlid species complex: incipient sympatric speciation in Nicaraguan cichlid fishes? *Molecular Ecology* 13: p.2061–2076.
- BOCHER TW. 1966. Experimental an cytological studies on plant species X. *Sisyrinchium* with special reference to the Greenland representatives. *Botanisk Tidsskrift* 61: p.273–290.
- CHAUVEAU O ET AL. 2011. Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. *Annals of Botany* 107: p.1287–1312.
- COCUCCI AA, AND VOGEL S. 2001. Oil producing species of *Sisyrinchium* (Iridaceae) and their pollination by oil-collecting bees in subtropical South America. *Flora* 196: p.26–46.
- COYNE JA, AND ORR HA. 2004. Speciation. Sinauer Associates, Sunderland, Sunderland, Massachusetts USA.
- DRESSLER RL. 1968. Pollination by Euglossine bees. *Evolution* 22: p.202–210.
- FELSENSTEIN J. 1985. Phylogenies and the comparative data. *American Naturalist* 125: p.1–15.
- FUTUYMA DJ. 2005. Evolutionary biology. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- GISLASON D. 1999. Rapid and coupled phenotypic and genetic divergence in Icelandic Artic char (*Salvelinus alpinus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 56: p.2229–2234.

- GOLOBOFF P, FARRIS J, AND NIXON K. 2003. TNT: Tree analysis using New Technology [online program, documentation]. Website <http://www.zmuc.dk/public/phylogeny/TNT>.
- GRANT V. 1994. Modes and origins of mechanical and ethological isolation in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: p.3–10.
- GUINDON S, AND GASCUEL O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: p.679–704.
- GUINDON S, LETHIEC F, DUROUX P, AND GASCUEL O. 2005. PHYML online—A web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research* 33: p.W557–W559.
- JONG K. 1997. Laboratory manual of plant cytological techniques. Royal Botanical Garden, Edinburgh.
- KWAK MM. 1978. Pollination, hybridization and ethological isolation of *Rhinanthus minor* and *R. Serotinus* (Rhinanthoideae: Scrophulariaceae) by bumblebees (*Bombus* Latr.). *Taxon* 27: p.145–158.
- MADDISON WP, AND MADDISON DR. 2007. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis, version 2.0 [online program, documentation]. Website <http://mesquiteproject.org>.
- OLIVER RL, AND LEWIS WH. 1962. Chromosome numbers of *Sisyrinchium* (Iridaceae) in eastern North America. *Sida* 1: p.43–48.
- PAULUS HF, AND GACK C. 1990. Pollinators as pre-pollinating isolation factors: evolution and speciation in *Ophrys* (Orchidaceae). *Israel Journal of Botany* 39: p.43–79.
- POSADA D, AND CRANDALL KA. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: p.817–818.
- RAVENNA PF. 1969a. In Flora de la Provincia de Buenos Aires., Iridaceae. Colección científica del INTA, Buenos Aires.

- RAVENNA PF. 2001. Iridaceae of the Cuyo Region, Argentina. *Onira* 6: p.7–8.
- RAVENNA PF. 1969b. Iridaceae. In Flora Patagónica. Colección científica del INTA., Buenos Aires.
- RODRÍGUEZ R. 1986. Die chilenischen Arten der Gattung *Sisyrinchium* L. (Iridaceae). *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 22: p.97–201.
- RUDALL P, KENTON AY, AND LAWRENCE TJ. 1986. An anatomical and chromosomal investigation of *Sisyrinchium* and allied genera. *Botanical Gazette* 147: p.466–477.
- SAVOLAINEN V ET AL. 2006. Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature* 441: p.210–213.
- SCHLIEWEN UK, TAUTZ D, AND PÄÄBO S. 1994. Sympatric speciation suggested by monophyly of crater lake cichlids. *Nature* 368: p.629–632.
- SEGRAVES KA, AND THOMPSON JN. 1999. Plant polyploidy and pollination: floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia*. *Evolution* 53: p.1114–1127.
- SILVÉRIO A, NADOT S, SOUZA-CHIES TT, AND CHAUVEAU O. 2012. Floral rewards in the tribe Sisyrinchieae (Iridaceae): oil as an alternative to pollen and nectar? *Sexual Plant Reproduction* 25: p.267–279.
- TAYLOR EB, AND MCPHAIL JD. 1999. Evolutionary history of an adaptive radiation in species pairs of threespine sticklebacks (*Gasterosteus*): insights from mitochondrial DNA. *Biological Journal of the Linnean Society* 66: p.271–291.
- TAYLOR EB, AND MCPHAIL JD. 2000. Historical contingency and ecological determinism interact to prime speciation in Sticklebacks, *Gasterosteus*. *Proceedings of the Royal Society of London* 267: p.2375–2384.

CAPÍTULO 4

ANÁLISIS DE LA POSIBILIDAD DE DESPLAZAMIENTO DE CARACTERES EN *SISYRINCHIUM CHILENSE* Y *SISYRINCHIUM IRIDIFOLIUM* SSP. *VALDIVIANUM*

INTRODUCCIÓN

Brown y Wilson (1956) introdujeron el término **desplazamiento de caracteres** para describir la observación común de que las especies tienden a mostrar diferencias más acentuadas en las zonas de superposición. Las explicaciones más comunes a este fenómeno serían la competencia por un recurso limitante o el reforzamiento de aislamiento reproductivo. Schluter (1988b) amplió el uso de este término para definir cualquier proceso de evolución fenotípica forjado o mantenido por competencia inter-específica. Esto incluye no solo divergencia de especies simpátricas sino también procesos relacionados, tales como el mantenimiento de las diferencias en simpatría y la liberación de caracteres una vez removidos los competidores.

En el caso de las plantas con flores, el desplazamiento de caracteres puede ser el resultado de competencia inter-específica por el mismo polinizador. Dicha competencia incluye, al menos, dos tipos principales de mecanismos de interacción: el primero se presenta cuando una de las especies de plantas es más eficaz en atraer a los polinizadores por lo que reduce las visitas y en consecuencia el éxito reproductivo de la otra especie; el segundo caso ocurre cuando los polinizadores no presentan preferencias por ninguna de las especies y ocasionan transferencia de polen entre ellas provocando pérdida de polen u oclusión de los estigmas con polen impropio y consecuentemente una disminución en el éxito reproductivo de las especies (Waser 1983). Estos dos mecanismos pueden tener distintas consecuencias en la ecología y evolución de las plantas. En el primer caso, la selección natural favorecería aquellos caracteres (color, forma) que mejoren la atracción de los polinizadores disponibles. En el segundo caso en cambio, serían favorecidos los rasgos (como la orientación de las partes florales y la fenología floral) que minimicen la recepción de polen heteroespecífico y maximicen la de polen con-específico. Según Waser (1983), el segundo caso es el más frecuente en la naturaleza y es el que promueve y mantiene las diferencias en caracteres relacionados con la polinización en especies de plantas

simpátricas, mientras que, el primero puede llevar, en casos extremos, a la extinción, al menos a escala local, de la especie menos favorecida.

Varios estudios han documentado posibles casos de desplazamiento en caracteres relacionados a la polinización tales como, la longitud de las piezas fértiles, el lugar de depósito del polen sobre los mismos polinizadores, el tiempo de floración, el largo de la corola, el color de las flores etc. (Miyake y Inoue 2003, Hansen et al. 2000, Caruso 1999, Armbruster et al. 1994, Armbruster y Herzig 1984, Brown y Brown 1979, ver también revisión de Schluter 2000, Rathcke 1983 y Waser 1983) pero sólo en uno de ellos se evaluaron los patrones de selección fenotípica mediada por polinizadores. Según Caruso (1999, 2000) como consecuencia de la competencia se espera que las especies simpátricas difieran en el modo e intensidad en que la selección natural está operando sobre los rasgos florales. Es decir, el modo y la intensidad de selección deberían verse influenciados por la presencia del competidor (Caruso 2000).

Patrones como los encontrados en poblaciones simpátricas de *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* donde se observa una clara separación en los horarios de floración y un depósito diferencial de polen sobre el cuerpo de los mismos polinizadores podrían haberse originado por procesos de desplazamiento de caracteres debido a la competencia por el mismo polinizador: abejas colectoras de aceite de la especie *Lanthanomelissa discrepans*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si los patrones actuales observados podrían haberse originado por desplazamiento de caracteres debido a competencia por el mismo polinizador.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar si las especies hibridizan.
- Determinar si el éxito reproductivo de cada especie disminuye en presencia de la otra especie.
- Determinar si las especies son polinizadas por los mismos agentes tanto en las poblaciones simpátricas como en las alopátricas.

- Determinar si la presencia de la potencial especie competidora influye en la tasa con que los principales polinizadores visitan las flores.
- Determinar si existen diferencias más acentuadas entre las especies (en caracteres de las flores y en los patrones de floración) en las poblaciones simpátricas que en las poblaciones alopátricas.
- Determinar si la selección fenotípica sobre caracteres florales claves difiere entre poblaciones simpátricas y alopátricas y si estas diferencias pueden atribuirse a competencia por el polinizador.

SITIOS DE ESTUDIO

Se trabajó en 6 sitios (ver Fig. 1; pág. 122):

- 2 poblaciones simpátricas (las mismas en las que se trabajó en el Capítulo 1): **Tandil y Cuesta Blanca.**

- 2 poblaciones alopátricas de *S. iridifolium* ssp. *valdivianum*: **Agua de Oro** (Córdoba), 31°4'4,2"S; 68°18'16,2"O y **Cerro Azul** (Córdoba), 31°4'28,1"S; 64°19'5,5"O.

- 2 poblaciones alopátricas de *S. chilense*: **Santa María de Punilla** (Córdoba), 31°17'12,8"S; 64°27'40,7"O y **Pampa de Achala** (que si bien, como vimos en el Capítulo 1, coexiste con *S. unguiculatum*, ésta no sería una especie competidora por no compartir polinizadores).

MÉTODOS

En los sitios alopátricos (Cerro Azul, Agua de Oro y Santa María de Punilla) que no fueron incluidos en el Capítulo 1 de esta tesis, se evaluaron los patrones de floración, el sistema reproductivo, el elenco de polinizadores y el color de las flores. En la población de Santa María de Punilla no pudieron evaluarse todos los aspectos mencionados debido a que durante uno de los años de estudio el pasto fue cortado antes de que las observaciones se completaran y al año siguiente muy pocos individuos dieron flor debido probablemente a una fuerte sequía.

Patrones diarios de floración

Se evaluaron los patrones de floración de *S. iridifolium ssp. valdivianum* en Agua de Oro y Cerro Azul y de *S. chilense* en Santa María de Punilla. Para esto, en cada población se delimitaron parches en los que el número de flores abiertas se cuantificó cada 15 minutos. Luego, se realizaron curvas con los porcentajes de flores abiertas (número de flores abiertas *100/número máximo de flores abiertas) en función del tiempo.

Dependencia de los polinizadores para la producción de frutos y semillas

Se evaluó el sistema reproductivo en las dos poblaciones monoespecíficas de *S. iridifolium ssp. valdivianum*. Se utilizaron 32 y 25 individuos por tratamiento en Agua de Oro y Cerro Azul respectivamente. Como dicha especie crece en la orilla de ríos y los sitios mencionados son turísticos, las plantas no pudieron dejarse embolsadas hasta la formación de los frutos. Es por esto que, se embolsaron flores durante las aproximadamente 4hs que permanecían abiertas. Cabe recordar que las flores de esta especie sólo abren un día. Una vez que cerraban, se quitaron las bolsas y se colocaron hilos de un color que indicaba la Autopolinización Espontánea en los pedicelos florales. Por otro lado, flores que no habían sido embolsadas se marcaron con hilos de un color diferente que indicaba el tratamiento de Polinización Libre. Luego de aproximadamente un mes se registró la formación de frutos y los frutos formados se colectaron para cuantificar el número de semillas que se compararon con un test de Wilcoxon no paramétrico. Como se trabajó con una flor por individuo los resultados de fructificación fueron 0 y 1 por lo que los tratamientos se compararon con un test de contingencia Chi cuadrado que trabaja con distribuciones binomiales. Se utilizó el programa Infostat v.1.1 (Di Rienzo et al. 2000).

En *S. chilense* de Santa María de Punilla el sistema reproductivo no fue evaluado ya que se observó que en este sitio esta especie es también protándrica.

Hibridación entre las especies

Se realizaron en invernadero cruzamientos manuales recíprocos entre las flores de ambas especies. Se colocó polen de *S. chilense* proveniente de 5 sitios (Pampa de Achala, Agua de Oro, Cuesta Blanca, Santa María de Punilla y Tandil) sobre los estigmas de 47 flores de *S. iridifolium ssp. valdivianum* de la población de Agua de Oro. Cabe aclarar que

los individuos de *S. chilense* de Agua de Oro utilizados fueron plantas aisladas que se encontraron a más de 10km de la población de *S. iridifolium ssp. valdivianum*. El tratamiento recíproco (es decir, utilizando como receptor de polen a *S. chilense*) se realizó en 11 flores a las que se les colocó polen proveniente de *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Agua de Oro. Se cuantificó la proporción de fructificación (frutos formados/ flores tratadas), el número de semillas, y el porcentaje de semillas germinadas. Se realizaron comparaciones entre lo obtenido para los cruzamientos inter-específicos (sin discriminar por sitio) y los tratamientos de AE y PL realizados para evaluar la dependencia de los polinizadores. Para comparar la proporción de fructificación se realizó un test de contingencia Chi cuadrado, mientras que para el número de semillas y el porcentaje de germinación se realizaron análisis de la varianza no paramétricos (Kruskal Wallis). Se utilizó el programa Infostat v.1.1 (Di Rienzo et al. 2000). Finalmente, las plántulas correspondientes a los híbridos se trasplantaron y se conservaron hasta su fructificación.

Cabe destacar que los cruzamientos inter-específicos se hicieron utilizando las flores que iban abriendo a diario. Los individuos de las distintas especies provenientes de las poblaciones simpátricas no florecieron sincronizadamente por lo que los cruzamientos entre los mismos no pudieron llevarse a cabo.

Elenco de polinizadores, tasas de visita, comportamiento y lugar de depósito de polen.

Se dedicaron 6 horas y media y 8 horas a la observación de polinizadores de *S. iridifolium ssp. valdivianum* en Agua de Oro y Cerro Azul respectivamente. Se realizaron censos de 20 minutos en los que se observaron diferentes grupos de individuos elegidos al azar. En cada censo se registró el número de flores observadas, número de visitas realizadas por cada insecto y la identidad del polinizador. A partir de estos datos se calculó para cada censo la tasa de visitas por flor por unidad de tiempo (número de visitas/número flores observadas/horas de observación). Se estimó además el porcentaje de visitas (%) de cada polinizador en relación al total de visitas observadas (número de visitas de un polinizador dado*100/ el total de visitas de todos los insectos registrados). Los insectos colectados fueron identificados mediante la comparación de los ejemplares capturados con colecciones de referencia depositadas en el Laboratorio de Biología Floral, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (colectados por el Dr. Andrea Cocucci) o fueron enviados al Dr. Roig-Alsina (Museo Argentino de Ciencias Naturales) y al Dr. Claudio

Sosa (Cátedras de Entomología e Introducción a la Biología, FCEFyN, UNC) para su identificación. Por otro lado, los insectos capturados fueron analizados bajo lupa estereoscópica para determinar la presencia o no de polen de *Sisyrinchium* en el cuerpo de los mismos. Esta información fue complementada con el registro del comportamiento de los insectos al visitar las flores. Cabe destacar que, el pequeño tamaño de algunos de los insectos observados impidió detectar, a campo, las sutiles diferencias existentes entre las especies. Es por esto que las visitas realizadas por halíctidos se analizaron conjuntamente sin discriminar por especie, al igual que las realizadas por coléptidos.

En el caso de *S. chilense* de Santa María de Punilla no se realizaron censos pero si se observaron polinizadores que luego fueron capturados e identificados.

Color de las flores

En *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Cerro Azul y Agua de Oro se midieron los espectros de reflexión de los tépalos de flores frescas con un espectrofotómetro USB 4000 (Ocean Optics, Florida, USA). Tal como se realizó en el Capítulo 1, las medidas de reflexión a diferentes longitudes de onda (cada 0,22nm entre los 300 y 700nm) se redujeron a 8 variables mediante la siguiente fórmula: $\sum 0,22S_i$, donde S_i es el porcentaje de reflexión de la superficie de la flor cada 0,22 nm. Luego se calcularon los promedios de los valores obtenidos en 8 franjas de 50 nm. Por otro lado, y siguiendo la metodología explicada en el Capítulo 1, se analizaron los espectros teniendo en cuenta la visión de la principal abeja polinizadora. Para esto, se estimaron los valores correspondientes a la proporción de cuantos capturados por cada uno de los tres fotorreceptores de los ojos de *Anthophora acervorum*.

El color no pudo ser evaluado en *S. chilense* de Santa María de Punilla.

Éxito reproductivo y tasas de visitas en poblaciones simpátricas y alopátricas

Se comparó el número de semillas entre las poblaciones simpátricas y alopátricas de cada una de las especies a los fines de conocer si la presencia de una especie con la que comparten polinizadores provoca una disminución en el éxito reproductivo. Se realizaron Análisis de la Varianza anidando el factor sitio (cada una de las poblaciones) dentro del tipo de población (simpátrica y alopátrica) con el programa JMP v.7. La variación entre

individuos dentro de cada sitio fue utilizada como el término de error (Sokal y Rohlf, 1995).

Por otro lado, para cada especie, se comparó la tasa de visitas de *Lanthanomelissa discrepans* entre poblaciones simpátricas y alopátricas para determinar si, en presencia de la especie competidora la frecuencia con que el principal polinizador visita las flores se ve afectada. Para esto se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal Wallis con el programa Infostat v.1.1 (Di Rienzo et al. 2000).

Diferencias entre las especies en caracteres fenotípicos en poblaciones simpátricas y alopátricas.

VARIABLES MORFOMÉTRICAS DE LAS FLORES: Se trabajó con entre 80 y 100 individuos por población y especie. A cada individuo se le retiró una flor que fue fotografiada en vista frontal y luego conservada en alcohol 70%. Posteriormente, a cada flor se le quitaron los tépalos y fue fotografiada con una cámara digital Leica DFC 420 bajo una lupa Leica M420. Luego se le retiraron las anteras para dejar visible las ramas estigmáticas y se tomó nuevamente una fotografía bajo lupa. Con el programa Sigma Scan se midieron las siguientes variables: área de la flor (en las fotos de la flor completa, Fig. 2C; pág. 123), la longitud de la columna estaminal y el área del elaióforo (en las fotos de las flores antes de la remoción de las anteras, Fig. 2 B; pág. 123) y la longitud del estilo (en las fotos en las que las anteras de las flores ya habían sido retiradas, Fig. 2 A; pág. 123).

Por un lado, para conocer como esta estructurada la variación de cada una de las variables mencionadas, para cada especie se realizaron ANOVAs anidados con los niveles “tipo de población” (simpátrica y alopátrica), “sitio” (cada una de las poblaciones) dentro de cada tipo de población e individuos dentro de cada sitio. Este último nivel fue utilizado como el término de error (Sokal y Rohlf, 1995). Se utilizó el programa JMP v.7.

Color: Se realizó un análisis de componentes principales con las 8 variables de color obtenidas para *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Cerro Azul y Agua de Oro, más las obtenidas para las poblaciones simpátricas y para *S. chilense* de Pampa de Achala en el Capítulo 1. Con los 2 primeros ejes del PCA se realizaron ANOVAs anidados con el programa JMP v.7, anidando el factor sitio dentro del tipo de población (alopátrica o simpátrica). Esto se realizó para *S. iridifolium ssp. valdivianum*. En el caso de *S. chilense* no se pudo realizar este tipo de análisis por no tener réplicas del nivel “tipo de población”,

por lo que se realizó un Análisis de la Varianza comparando ambos ejes entre los 3 sitios (Cuesta Blanca, Tandil y Pampa de Achala) con el programa Infostat v.1.1 (Di Rienzo et al. 2000).

Por otro lado, los locis de color correspondientes a la proporción de quantos capturados por cada uno de los tres fotorreceptores de las abejas en cada una de las poblaciones (simpátricas y alopátricas) se representaron en un triángulo de Maxwell (tal como se describe en el Capítulo 1) a los fines de evaluar si los polinizadores detectan mayores diferencias entre las especies en poblaciones simpátricas que en alopátricas.

Variables morfométricas y color de las flores: para evaluar si las diferencias entre especies eran mayores en simpatría que en alopatría se evaluaron tanto las variables morfométricas arriba mencionadas como los dos primeros ejes del PCA realizado con las 8 variables de color. Se procedió de la siguiente manera: se calcularon todas las diferencias pareadas entre individuos de las dos especies para a) poblaciones alopátricas, b) poblaciones simpátricas (Cuesta Blanca y Tandil). Luego, para probar si la media de las diferencias entre especies provenientes de poblaciones simpátricas difería de la media de las diferencias provenientes de las alopátricas se utilizó una técnica de re-muestreo. Se extrajeron sub-muestras con reposición y del mismo tamaño que la población original (muestras bootstrap) de los individuos de ambas especies de poblaciones alopátricas. Para cada sub-muestra se calculó la media de todas las diferencias pareadas posibles entre individuos de las dos especies. Esto se repitió 1000 veces para obtener una distribución de la diferencia media entre las especies en poblaciones alopátricas. Se consideró que la diferencia media entre especies de cada una de las poblaciones simpátricas era significativamente distinta si eran menores que el percentil 5 o mayores que el percentil 95 de la distribución de la media entre las especies en poblaciones alopátricas. La rutina descripta, diseñada por el Dr. Santiago Benitez Vieyra (Lab. Ecología Evolutiva - Biología Floral, IMBIV, CONICET-UNC) se realizó con el programa R 2.14.1 (disponible online en <http://www.r-project.org>).

Patrones de floración: Para evaluar si los patrones de floración se solapaban menos en las poblaciones simpátricas que en poblaciones alopátricas, se calculó el área de superposición entre las dos curvas de floración diaria (A_I) y luego la relación entre el área de intersección y el área de la curva de cada especie (A_i). Para esto, se trabajó con una

planilla de cálculo en Microsoft Excel tal como se explica en el Capítulo 1. Esto se realizó para las 4 posibles combinaciones de poblaciones alopátricas de cada una de las especies:

-*S. iridifolium ssp. valdivianum* de Cerro Azul x *S. chilense* de Santa María de Punilla

-*S. iridifolium ssp. valdivianum* de Cerro Azul x *S. chilense* de Pampa de Achala

-*S. iridifolium ssp. valdivianum* de Agua de Oro x *S. chilense* de Santa María de Punilla

-*S. iridifolium ssp. valdivianum* de Agua de Oro x *S. chilense* de Pampa de Achala

Los valores obtenidos se compararon visualmente (sin análisis estadísticos por la falta de réplicas) con aquellos estimados en el Capítulo 1 para las poblaciones simpátricas (Tandil y Cuesta Blanca).

Selección fenotípica

Los estudios de selección fenotípica se llevaron a cabo para ambas especies en todos los sitios mencionados (simpátricos y alopátricos).

Se trabajó con 37 a 123 individuos por especie en cada población (ver Tabla 3; pág. 119). En cada individuo se tomó una fotografía con una escala de una flor que luego fue conservada en etanol 70%. Posteriormente, a cada flor se le quitaron los tépalos y la columna estaminal dispuesta al lado de una escala fue fotografiada con una cámara digital Leica DFC 420 bajo una lupa Leica M420 (Fig. 2; pág. 123). Tanto la longitud del estilo, como el área de la flor se midieron con el programa Sigma Scan en las fotografías calibradas con la escala (Fig. 2 B y C; pág. 123). Por otro lado, se colectaron 5 frutos por individuo. El número de semillas por fruto fue cuantificado y se calculó un valor promedio por individuo que fue utilizado como medida de éxito reproductivo.

Para los análisis de selección fenotípica las variables (longitud del estilo y área de la flor) fueron estandarizadas a media cero y varianza 1, mientras que la medida de éxito reproductivo (número de semillas promedio) de cada individuo fue relativizada por la media poblacional.

Se estimaron los siguientes parámetros: oportunidad de selección (I) y gradientes de selección lineales (β_i), cuadráticos (γ_{ii}) y correlacionales (γ_{ij}).

Para estimar los gradientes de selección se siguió el método propuesto por Lande y Arnold (1983). Los gradientes de selección miden el cambio que resulta de la selección debido a efectos directos, es decir, independientemente de los efectos indirectos de otros

rasgos. Los gradientes lineales (selección direccional), cuadráticos (selección estabilizadora/disruptiva) y correlacionales se estimaron mediante regresiones múltiples.

Para calcular los parámetros mencionados se utilizó el paquete estadístico Rcmdr del programa R 2.14.1 (disponible online en <http://www.r-project.org>).

En aquellos casos en que se obtuvieron resultados significativos se realizaron regresiones no paramétricas Cubic Spline (Schluter 1988a).

RESULTADOS

Patrones diarios de floración

Al igual que lo observado en una de las poblaciones simpátricas (Cuesta Blanca) (Fig. 7A del Capítulo 1; pág. 51) las flores de *S. iridifolium ssp. valdivianum* (de Cerro Azul y Agua de Oro) abren más temprano que las flores *S. chilense* (de Santa María de Punilla) (Fig. 3; pág. 124).

Dependencia de los polinizadores para la producción de frutos y semillas

Se determinó que tanto en Agua de oro como en Cerro Azul las plantas pueden autopolinizarse. No se hallaron diferencias significativas en la proporción de fructificación bajo los tratamientos de AE y PL (χ^2 Pearson=0,14; p=0,7039 para Cerro Azul y χ^2 Pearson=0,36; p=0,5506 para Agua de Oro). En Agua de Oro se obtuvieron significativamente mas semillas por PL que por AE (W=658; p=<0,0001) mientras que en Cerro Azul no se hallaron diferencias significativas, aunque los valores máximos en el número de semillas fueron observados bajo PL (W=581,5 p=0,2769) (Fig. 4; pág. 125).

Hibridación entre las especies

Los resultados correspondientes a los cruzamientos inter-específicos se muestran en la Fig. 5 (pág. 126).

Al utilizar como receptor de polen a *S. iridifolium ssp. valdivianum* se obtuvieron híbridos con individuos de *S. chilense* provenientes de 4 de las 5 poblaciones utilizadas. Sin embargo, la proporción de fructificación y el número de semillas por fruto de estos

cruzamientos fueron significativamente menores a los obtenidos bajo los tratamientos de AE y PL (χ^2 Pearson 22,79; $p < 0,0001$ y Test de Kruskal Wallis $H=15,08$; $p=0,0005$).

No se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de germinación de las semillas producto de cruzamientos inter-específicos y los demás tratamientos de sistema reproductivo (Test de Kruskal Wallis, $H=3,37$; $p=0,1358$). Las dos plantas híbridas obtenidas dieron flores en el invernadero, las cuales presentaron el mismo aspecto y arquitectura de la especie materna (*S. iridifolium ssp. valdivianum*). El 100% de las flores de dichas plantas formaron frutos por autopolinización espontánea.

Aquellos cruzamientos en los que se utilizaron como receptores de polen a flores de *S. chilense* y como dadores de polen a flores de *S. iridifolium ssp. valdivianum* no formaron frutos.

Elenco de polinizadores, tasas de visita, comportamiento y lugar de depósito de polen.

En la Fig. 6 A y B (pág. 127) se muestran los porcentajes y tasas de visitas de los distintos insectos que se determinó visitaban a las flores de las 2 especies de *Sisyrrinchium*.

Tanto en Agua de Oro como en Cerro Azul los insectos que se observaron visitando las flores de *S. iridifolium ssp. valdivianum* fueron abejas colectoras de aceites de la especie *Lanthanomelissa discrepan*, colétidos (de los géneros *Colletes*, *Leioproctus*, *Hylaeus*), halíctidos (*Dialictus* y *Augochlora*), avispas del género *Trimeria* y sírfidos del género *Toxomerus*. En Cerro Azul se observaron además a abejas del género *Rophitulus* (Andrenidae) que no pudieron, a campo, distinguirse de los colétidos por lo que fueron incluidas con los mismos en los análisis de tasa y % de visitas. A excepción de *Lanthanomelissa discrepan*, todos los insectos observados buscaban polen en las flores. Si bien los colétidos y halíctidos hacían contacto con las piezas fértiles al visitar las flores, en los ejemplares colectados no se observó polen presente en sus cuerpos. En Agua de Oro el 86% de las visitas fueron realizadas por abejas de la especie *L. discrepan*, las cuales visitaron las flores con frecuencias de 1,39 v/h/flor. En el caso de Cerro Azul sólo el 38% de las visitas fueron realizadas por abejas colectoras de aceites a frecuencias de 0,2 v/h/f. Si bien el mayor % de visitas (49%) fue realizado por halíctidos, los cuales visitaron las flores en frecuencias de 0,245 v/h/f, cabe recordar que los mismos no fueron vistos transportando polen y que estos valores incluyen al menos a 2 especies de halíctidos ya que los mismos no pudieron distinguirse a campo (Fig. 6 A y B; pág. 127).

En el caso de *S. chilense* de Santa María de Punilla si bien no se cuantificó la tasa de visitas si se observaron abejas de la especie *Lanthanomelissa discrepans* exclusivamente.

En los ejemplares de *L. discrepans* capturados tanto en Cerro Azul como en Agua de Oro y Santa María de Punilla se observó abundante cantidad de polen. El lugar de depósito de polen de *S. chilense* es en el tórax y abdomen mientras que el de *S. iridifolium ssp. valdivianum* es depositado en el tórax y la cabeza de las abejas colectoras de aceites.

Color de las flores

Los espectros de las flores de *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Agua de Oro y Cerro Azul muestran un pico de mayor reflexión en el violeta entre los 400 y 450 nm aproximadamente (Fig. 7; pág. 128).

Tasas de visitas y éxito reproductivo en poblaciones simpátricas y alopátricas

Éxito reproductivo: La estadística descriptiva de esta variable se muestra en la Tabla 2 (pág. 118). En el caso de *S. iridifolium ssp. valdivianum*, los ANOVAs anidados indicaron que la variación entre poblaciones alopátricas y simpátricas ($F= 60,71$; $p<0,0001$) y entre sitios dentro de cada tipo de población ($F= 45,98$; $p<0,0001$) es estadísticamente significativa. Por su parte, los componentes de la varianza muestran que el 32,6% de la variación es debida a diferencias entre sitios, y el 67,4% es debida a variación intra-poblacional. El tipo de población no explicó nada de la variación observada.

En el caso de *S. chilense*, los ANOVAs anidados indicaron que la variación entre poblaciones alopátricas y simpátricas ($F= 6,675$; $p=0,0102$) y entre sitios dentro de cada tipo de población ($F= 13,485$; $p<0,0001$) es estadísticamente significativa. Por su parte, los componentes de la varianza muestran que el 9,6% de la variación es debida a diferencias entre sitios mientras que el 88,5% es debida a variación intra-poblacional. Al igual que en la otra especie, el tipo de población no explicó nada de la variación observada.

Tasas de visita de *Lanthanomelissa discrepans*: La estadística descriptiva de esta variable se muestra en la Tabla 1 (pág. 117). En el caso de *S. iridifolium ssp. valdivianum* se hallaron diferencias significativas en la frecuencia en la que las abejas visitan a las flores en los distintos sitios ($H=17,85$; $p<0,0001$). Agua de oro recibió significativamente más visitas que el resto de las poblaciones.

En el caso de *S. chilense* se hallaron diferencias significativas en las frecuencias en que *Lanthanomelissa discrepans* visita a las flores entre los sitios Pampa de Achala y Tandil ($H=5,37$; $p<0,0231$), siendo significativamente menos frecuentes las visitas de dicha abeja en el sitio alopatrico.

Diferencias entre las especies en caracteres fenotípicos en poblaciones simpátricas y alopatricas.

Variabes morfométricas de las flores: La estadística descriptiva de estas variables se muestra en la Tabla 3 (pág. 119). Los componentes de la varianza se muestran en la Fig. 8 (pág. 129). En el caso de *S. iridifolium ssp. valdivianum* y para todas las variables evaluadas (longitud de estambre y estilo, área del elaióforo y de la flor) la mayor fuente de variabilidad fue la diferencia entre individuos dentro de cada población. El resto de la variación fue explicada casi en su totalidad por el factor “sitio”. El “tipo de población”, es decir, si las poblaciones eran simpátricas o alopatricas no explicó prácticamente nada de la variación observada.

En el caso de *S. chilense*, el componente inter-poblacional fue mayor al intra-poblacional y al explicado por el tipo de población para tres de las 4 variables evaluadas (longitud de estilo y estambre y área de la flor). En el caso del área del elaióforo la mayor variabilidad fue explicada a nivel intra-poblacional y por el tipo de población, siendo el aporte del componente “sitio” mínimo. Para todas las variables se observó que el tipo de población explicaba más en *S. chilense* que en *S. iridifolium ssp. valdivianum* donde su efecto fue casi nulo.

Color: Los dos primeros ejes del análisis de componentes principales (Fig. 9; pág. 130) explicaron el 96% de la variación observada. En la Tabla 4 (pág. 120) se muestran las correlaciones de las variables de color con los dos primeros ejes del PCA.

Para el caso de *S. chilense* los ANOVAs realizados con cada uno de los dos primeros ejes del PCA mostraron diferencias significativas (PC1: $F=20,85$; $p<0,0001$ y PC2: $F=62,43$; $p<0,0001$) entre los tres sitios evaluados (Cuesta Blanca, Tandil y P. de Achala).

En el caso de *S. iridifolium ssp. valdivianum*, los ANOVAs anidados mostraron diferencias significativas al evaluar el factor sitio (PC1: $F= 13,99$; $p<0,0001$ y PC2: $F=3,77$; $p=0,0001$) pero no se hallaron diferencias en relación al factor “tipo de población” (PC1: $F=19,55$; $p=0,0562$ y PC2: $F=0,003$; $p=0,9584$). Al analizar los componentes de la

varianza, para el primer eje se observó que el 61,5% era explicado por el componente “sitio”, el 36,8% por variación intra-poblacional y el 1,7% por el factor “tipo de población”. Para el PC2, el factor “sitio” explicó el 50,9 % mientras que el resto de la variación fue explicado por variación intra-poblacional.

Al analizar el color teniendo en cuenta la visión del polinizador, se observó que, a excepción de *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Tandil, los locis de color del resto de las especies y poblaciones aparecen entremezclados en el diagrama ternario (Fig. 10; pág.131).

Variables morfométricas y color de las flores: En todas las variables morfométricas florales evaluadas las diferencias medias observadas entre las especies de las poblaciones simpátricas fueron menores a la distribución de medias de las poblaciones alopátricas. Es decir, que contrario a lo esperado las diferencias entre las especies fueron menores en simpatría que en alopatría, sin embargo en todos los casos dichas diferencias no fueron significativas (Fig. 11 A-D; pág. 132). Al evaluar las variables de color, observamos que las especies en simpatría mostraron significativamente mayores diferencias que las alopátricas en el CP2 siendo mayores las diferencias entre las especies coexistentes de Tandil que entre las especies de Cuesta Blanca. En el caso del CP1 las diferencias medias observadas en las poblaciones simpátricas, si bien fueron no mostraron diferencias significativas con respecto a las poblaciones alopátricas (Fig. 11 E y F; pág. 132).

Patrones de floración: En el caso de *S. iridifolium ssp. valdivianum* (Fig. 12A; pág. 133) se observó que en la población simpátrica de Cuesta Blanca dicha especie presentó un menor grado de solapamiento en la floración con *S. chilense* en relación a lo observado para *S. iridifolium ssp. valdivianum* de las poblaciones alopátricas en tres de las combinaciones evaluadas. Sólo en una de las combinaciones (*S. iridifolium ssp. valdivianum* de Cerro Azul x *S. chilense* de Santa María de Punilla) la especie mostró un valor de aislamiento en la floración igual al observado en dicho sitio simpátrico. Por otro lado, la población de Tandil mostró los valores de aislamiento más bajos observados, es decir que fue el sitio en el que la especie floreció simultáneamente por más tiempo con *S. chilense*.

En el caso de *S. chilense* (Fig. 12B; pág. 133) se observó que en Cuesta Blanca esta especie presentó valores de aislamiento en la floración mayores que en los sitios alopátricos

para tres de las combinaciones evaluadas. Sólo en una de las combinaciones (*S. chilense* de Santa María de Punilla x *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Cerro Azul) la especie mostró un valor de aislamiento igual al observado en Cuesta Blanca. En el otro sitio simpátrico evaluado (Tandil), *S. chilense* mostró valores menores a los observados para dicha especie en dos de las combinaciones de especies pertenecientes a sitios alopátricos.

Selección fenotípica

No se encontraron gradientes significativos para ninguna de las dos variables y en ninguna de las poblaciones de *S. chilense* evaluadas. En el caso de *S. iridifolium ssp. valdivianum* se detectó selección direccional positiva para la longitud del estilo en Cuesta Blanca y Tandil y para el área de la flor en la población de Agua de Oro (Fig. 13 y 14; pág. 134 y 135). Se detectó, además, selección correlacional entre ambas variables en Cuesta Blanca, viéndose favorecidos aquellos individuos con flores más grandes y estilos más largos (Fig. 13 y 15; pág. 134 y 136).

Las oportunidades para la selección fueron mayores en los sitios simpátricos que en los alopátricos (Tabla 5; pág. 121).

DISCUSIÓN

Los resultados de los cruzamientos inter-específicos mostraron que las especies pueden formar híbridos sólo cuando se usa como receptores de polen a individuos de *S. iridifolium ssp. valdivianum*. Sin embargo sólo el 15% de dichos cruzamientos dieron fruto y el número de semillas de esos frutos fue significativamente menor a la cantidad presente en aquellos producto de cruzamientos intra-específicos (2 semillas vs 45 a 80 semillas respectivamente). Si bien no se realizaron ensayos con polen mixto para evaluar los efectos de la presencia de polen impropio, de darse intercambio de polen entre las especies en las poblaciones naturales, probablemente esto influiría negativamente en el éxito reproductivo de las mismas.

Tanto la frecuencia con que las abejas colectoras de aceites visitan las flores, como la cantidad de semillas por fruto variaron entre los sitios para ambas especies. Estas diferencias no estuvieron asociadas a la presencia de la otra especie de *Sisyrinchium*, lo cual indicaría que la coexistencia de las potenciales especies competidoras no se ve reflejada en una disminución en el éxito reproductivo de las especies. Como bien se

determinó en el Capítulo 1, en la población de Cuesta Blanca, la combinación de mecanismos de aislamiento temporales y mecánicos harían poco probable que exista flujo de polen inter-específico y por lo tanto que exista competencia por el polinizador debida a oclusión de los estigmas con polen impropio. En el caso de Tandil la probabilidad de que las abejas colectoras de aceites transfieran polen entre las especies sería mayor ya que los patrones de floración diarios de ambas especies se solapan en gran medida.

De existir competencia generada por oclusión de los estigmas con polen impropio, esperaríamos que esté operando selección direccional en sentidos opuestos, es decir, que las especies coexistentes tiendan a diferenciarse más en la longitud de los estilos. Por ejemplo, aquellos individuos con estilos más cortos (en el caso de *S. iridifolium ssp. valdivianum*) tendrían menor probabilidad de recibir polen de la especie con estilos más largos (*S. chilense*) y por lo tanto tendrían un mayor éxito reproductivo. Por otro lado, si existiera competencia por atraer al polinizador se esperaría que, en las poblaciones simpátricas, se vieran favorecidos caracteres atractivos tales como el tamaño de las flores. Los resultados de los análisis de selección fenotípica mostraron que las oportunidades para la selección fueron mayores en las poblaciones simpátricas que en las alopátricas. No se detectaron gradientes significativos sobre ninguno de los caracteres y en ninguno de las poblaciones de *S. chilense*. Sin embargo, contrario a lo esperado, se detectó selección direccional positiva sobre la longitud del estilo en *S. iridifolium ssp. valdivianum* en ambos sitios simpátricos. Es probable que, las diferencias existentes entre las especies en el tamaño de los estigmas permitan que las especies evolucionen hacia una menor separación en las piezas fértiles y aun así no compitan. Por otro lado, la separación en los horarios de floración podría impedir por si misma la competencia por el polinizador. Este es el primer estudio en el que se evaluó la selección fenotípica en poblaciones simpátricas y alopátricas de las dos especies coexistentes. Caruso (1999) evalúa los patrones de selección natural desde la perspectiva de una sola de las especies competidoras.

Una predicción de la teoría de desplazamiento de caracteres es que la intensidad de la competencia declina con el tiempo (Pritchard y Schluter 2001). En este trabajo no se hallaron indicios de que exista competencia en la actualidad, sin embargo, las diferencias actuales podrían explicarse por eventos de desplazamientos de caracteres ocurridos en el pasado, lo cual se vería reflejado en mayores diferencias en caracteres fenotípicos claves en la poblaciones simpátricas que en las alopátricas.

Al evaluar a cada especie de *Sisyrinchium* por separado, teniendo en cuenta el sitio de procedencia y el tipo de población (simpátrica, alopátrica) se determinó que la variación

observada tanto en caracteres vinculados al ajuste (longitud de estambre y de estilo) como en caracteres atractivos (color, tamaño de las flores, área del elaióforo como indicativo de la producción de aceites como recompensa) fue explicada principalmente por el factor sitio o por variaciones a nivel intra-poblacional. Esto indica que las variaciones podrían deberse a factores que no fueron contemplados, como por ejemplo de tipo climático o edáfico. La presencia de la potencial especie competidora no explicó prácticamente nada de la variación observada en *S. iridifolium ssp. valdivianum* y, si bien explicó entre el 14 y el 37 % de la variación en *S. chilense*, la tendencia fue opuesta a la esperada bajo la hipótesis de desplazamiento de caracteres. Es decir, los individuos de las poblaciones de Tandil y Cuesta Blanca (simpátricas) presentaron flores más pequeñas, con menor superficie cubierta por el elaióforo y con estilos y estambres más cortos que las poblaciones alopátricas de la misma especie.

Al considerar las diferencias en rasgos morfométricos de las flores entre *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* se observó que, contrario a lo esperado, las mismas fueron menores en las poblaciones mixtas que en las alopátricas. Las únicas variables analizadas que mostraron mayores diferencias en simpatría fueron las resumidas por el segundo eje del análisis de componentes principales del color de las flores. Sin embargo, no queda claro si dichas diferencias en el color serían detectadas por los polinizadores. Si bien en el triángulo de Maxwell las especies de las poblaciones simpátricas también aparecieron más distantes entre sí que las especies pertenecientes a sitios alopátricos, como bien se destacó en el Capítulo 1, esta metodología no permite determinar cuál es la distancia mínima entre los locis representados en el diagrama ternario que los polinizadores pueden reconocer como objetos distinguibles. Las dos especies de *Sisyrrinchium* evaluadas fueron principalmente visitadas por abejas de la especie *Lanthanmelissa discrepans* tanto en las poblaciones simpátricas (como ya se había descrito en el Capítulo 1) como en las poblaciones alopátricas (según se determinó en el presente Capítulo). A diferencia de lo que ocurre en Cuesta Blanca, donde las especies coexistentes son casi exclusivamente polinizadas por dichas abejas colectoras de aceites, en la población de Tandil el aislamiento etológico entre las especies de *Sisyrrinchium* cumpliría un rol importante (Fig. 18 y 19 del Capítulo 1; pág. 62 y 63). En este sitio, el ensamble de halíctidos de ambas especies es distinto, por lo que quizás las diferencias observadas en el color podrían representar una señal que les permite, a dichos insectos, distinguirlas. Sin embargo, esto es sólo una especulación, habría que hacer entrevistas florales para ver cómo actúan las distintas especies de halíctidos cuando se les ofrecen flores de las dos especies de

Sisyrinchium. Si bien en Cuesta Blanca las diferencias en el color también fueron mayores que en las poblaciones alopátricas, esta tendencia fue mucho más marcada en Tandil, donde los individuos de *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* florecen juntos durante casi todo el período diario de floración. Si consideramos, además, que la barrera mecánica no es total, quizás una de las estrategias para evitar la competencia en este sitio esté vinculada a la especialización en distintos polinizadores.

En cuanto a la posibilidad de desplazamiento de caracteres en los patrones de floración, se observó una mayor separación temporal en la población simpátrica de Cuesta Blanca con respecto a lo observado al combinar los patrones de floración de las especies provenientes de poblaciones monoespecíficas. La tendencia opuesta fue observada en Tandil, donde el solapamiento en la floración fue casi total. Sin embargo, el tiempo de floración es un carácter que varía mucho a lo largo del rango geográfico de las especies, en general y estas variaciones pueden ser atribuidas a variaciones en la latitud, elevación, u otros factores climáticos tales como el fotoperíodo, la temperatura y la humedad (Rathcke y Lacey 1985, Waser 1983). De esto se desprende que resulta difícil atribuir las mayores diferencias observadas en una de las poblaciones simpátricas a procesos vinculados a la competencia por el polinizador.

Si bien este tipo de estudios comparativos entre poblaciones alopátricas y simpátricas hacen difícil detectar las causas concretas y descartar otros factores no controlados, sirven para detectar patrones interesantes que podrán luego ser investigados en profundidad, por ejemplo, combinando estudios observacionales con enfoques más experimentales en los que se manipule el grado de solapamiento o similitud entre individuos de las dos especies en los rasgos de interés y se mida, luego, el efecto que estos cambios tienen sobre el comportamiento de los polinizadores y sobre el éxito reproductivo de las plantas (Waser 1978).

Un aspecto a tener en cuenta es que, no solo el desplazamiento de caracteres sino también otros mecanismos tales como: la presencia de flores más longevas, la autopolinización o cambios en el ensamble de polinizadores pueden evitar la competencia (Rathcke 1988). Al menos dos de estos mecanismos operan en *Sisyrinchium*: autopolinización en *S. iridifolium ssp. valdivianum* y la existencia de polinizadores no compartidos entre las especies en la población de Tandil.

Una explicación alternativa a que: especies con tamaños similares colonicen un lugar y evolucionen en sentidos opuestos para minimizar la competencia por el recurso (desplazamiento de caracteres) es la exclusión competitiva, esto quiere decir que solo

pueden coexistir aquellas especies que colonizan un hábitat y son lo suficientemente distintas (Losos 1990). La existencia de poblaciones simpátricas de otras especies de *Sisyrinchium* (*S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum* y *S. platense*) con patrones de aislamiento mecánico y temporal similares a los observados en *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* y el hecho de que especies coexistentes con similar morfología floral sean polinizadas por distintos agentes es sugestivo de que un mecanismo de exclusión competitiva podría haber operado en este género. Sin embargo, son necesarios estudios más precisos con una perspectiva más filogenética para comenzar a dilucidar estos interrogantes. Según Grant (1972) las dificultades para obtener evidencia certera se debe a la complejidad de los posibles patrones de desplazamiento. Algunas de las principales dificultades que menciona son: identificar las poblaciones originales y las derivadas e identificar el estado de los caracteres antes del contacto.

En esta tesis no se detectó evidencia de desplazamiento de caracteres vinculado al depósito diferencial de polen en los sitios simpátricos estudiados. Se encontraron indicios de que la separación temporal podría explicarse por este tipo de mecanismo en al menos una de las poblaciones mixtas. Sin embargo, como ya se mencionó, son necesarios estudios más profundos que combinen enfoques observacionales, experimentales y filogenéticos para comenzar a comprender los mecanismos que han operado en el género *Sisyrinchium*.

Tabla 1: Cantidad de censos (n), medias y desvíos estándares (D.E.) de la tasa de visita (visitas/hora/flor) de *Lanthanomelissa discrepans* en los distintos sitios y especies.

Especie	Sitio	Tipo de población	n	Media	D.E.
<i>S. chilense</i>	P. de Achala	Alopátrica	51	0,08	0,24
<i>S. chilense</i>	Cuesta Blanca	Simpátrica	47	0,39	0,83
<i>S. chilense</i>	Tandil	Simpátrica	49	0,58	1,03
<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Cerro Azul	Alopátrica	30	0,2	0,59
<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Agua de Oro	Alopátrica	33	1,39	1,96
<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Cuesta Blanca	Simpátrica	58	0,14	0,35
<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Tandil	Simpátrica	23	0,1	0,37

Tabla 2: Estadística descriptiva de la variable “número de semillas por fruto” en los distintos sitios y especies. n: cantidad de frutos evaluados; D.E.: desvío estándar; C.V.: coeficiente de variación.

Especie	Sitio	Tipo de población	n	Media	D.E.	C.V.
<i>S. chilense</i>	P. de Achala	Alopátrica	91	13,65	5,60	41,06
<i>S. chilense</i>	Santa María de Punilla	Alopátrica	62	18,37	8,00	43,58
<i>S. chilense</i>	Cuesta Blanca	Simpátrica	78	15,69	8,22	52,43
<i>S. chilense</i>	Tandil	Simpátrica	89	12,25	6,25	51,04
<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Cerro Azul	Alopátrica	99	48,34	13,72	28,39
<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Agua de Oro	Alopátrica	123	66,43	12,68	19,09
<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Cuesta Blanca	Simpátrica	93	50,9	25,04	49,19
<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Tandil	Simpátrica	96	37,86	14,24	37,60

Tabla 3: Estadística descriptiva de las variables morfométricas de las flores evaluadas en los distintos sitios y especies. n: cantidad de flores evaluadas; D.E.: desvío estándar; C.V.: coeficiente de variación.

Rasgo	Especie	Sitio	Tipo de población	n	Media	D.E.	C.V.
Long. estambre	<i>S. chilense</i>	P. de Achala	Alopátrica	91	4,98	0,24	4,90
	<i>S. chilense</i>	Santa María de Punilla	Alopátrica	88	4,98	0,37	7,47
	<i>S. chilense</i>	Cuesta Blanca	Simpátrica	86	4,75	0,36	7,52
	<i>S. chilense</i>	Tandil	Simpátrica	89	3,87	0,37	9,69
	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Cerro Azul	Alopátrica	98	2,61	0,15	5,74
	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Agua de Oro	Alopátrica	113	2,70	0,18	6,67
	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Cuesta Blanca	Simpátrica	106	2,59	0,15	5,83
	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Tandil	Simpátrica	96	2,27	0,25	11,07
Long. estilo	<i>S. chilense</i>	P. de Achala	Alopátrica	91	4,88	0,26	5,37
	<i>S. chilense</i>	Santa María de Punilla	Alopátrica	88	4,50	0,34	7,65
	<i>S. chilense</i>	Cuesta Blanca	Simpátrica	86	4,44	0,33	7,52
	<i>S. chilense</i>	Tandil	Simpátrica	89	3,70	0,40	10,71
	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Cerro Azul	Alopátrica	98	2,18	0,14	6,24
	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Agua de Oro	Alopátrica	113	2,31	0,18	7,70
	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Cuesta Blanca	Simpátrica	106	2,24	0,16	7,28
	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Tandil	Simpátrica	96	1,98	0,25	12,63
Área elaióforo	<i>S. chilense</i>	P. de Achala	Alopátrica	91	1,54	0,29	18,85
	<i>S. chilense</i>	Santa María de Punilla	Alopátrica	88	1,39	0,29	20,87
	<i>S. chilense</i>	Cuesta Blanca	Simpátrica	86	1,14	0,22	19,25
	<i>S. chilense</i>	Tandil	Simpátrica	89	1,19	0,22	18,40
	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Cerro Azul	Alopátrica	98	0,74	0,10	12,95
	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Agua de Oro	Alopátrica	113	0,79	0,11	14,39
	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Cuesta Blanca	Simpátrica	106	0,81	0,13	15,78
	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Tandil	Simpátrica	96	0,64	0,20	30,28
Área flor	<i>S. chilense</i>	P. de Achala	Alopátrica	85	200,42	43,08	21,50
	<i>S. chilense</i>	Santa María de Punilla	Alopátrica	88	122,42	30,09	24,58
	<i>S. chilense</i>	Cuesta Blanca	Simpátrica	84	96,43	22,14	22,96
	<i>S. chilense</i>	Tandil	Simpátrica	79	123,88	40,65	32,81
	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Cerro Azul	Alopátrica	66	58,81	11,62	19,76
	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Agua de Oro	Alopátrica	95	65,43	18,87	28,84
	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Cuesta Blanca	Simpátrica	106	54,49	11,55	21,20
	<i>S. iridifolium ssp. valdivianum</i>	Tandil	Simpátrica	34	71,76	10,52	14,67

Tabla 4: Correlaciones de las 8 variables de color con los dos primeros ejes del análisis de componentes principales (PCA)

<u>Variable</u>	<u>PC1</u>	<u>PC2</u>
300-350	-0,92	0,37
350-400	-0,97	0,15
400-450	-0,93	-0,24
450-500	-0,96	-0,28
500-550	-0,97	-0,05
550-600	-0,97	0,06
600-650	-0,98	0,00

Tabla 5: Oportunidad de selección (*I*) para cada especie en las seis poblaciones estudiadas.
n: cantidad de individuos evaluados.

Especie	Sitio	Tipo de población	n	I
<i>S. chilense</i>	Pampa de Achala	Alopátrica	91	0,17
<i>S. chilense</i>	Santa María de Punilla	Alopátrica	61	0,19
<i>S. chilense</i>	Cuesta Blanca	Simpátrica	86	0,30
<i>S. chilense</i>	Tandil	Simpátrica	93	0,26
<i>S. iridifolioum ssp. valdivianum</i>	Agua de Oro	Alopátrica	123	0,04
<i>S. iridifolioum ssp. valdivianum</i>	Cerro Azul	Alopátrica	99	0,08
<i>S. iridifolioum ssp. valdivianum</i>	Cuesta Blanca	Simpátrica	93	0,24
<i>S. iridifolioum ssp. valdivianum</i>	Tandil	Simpátrica	37	0,15

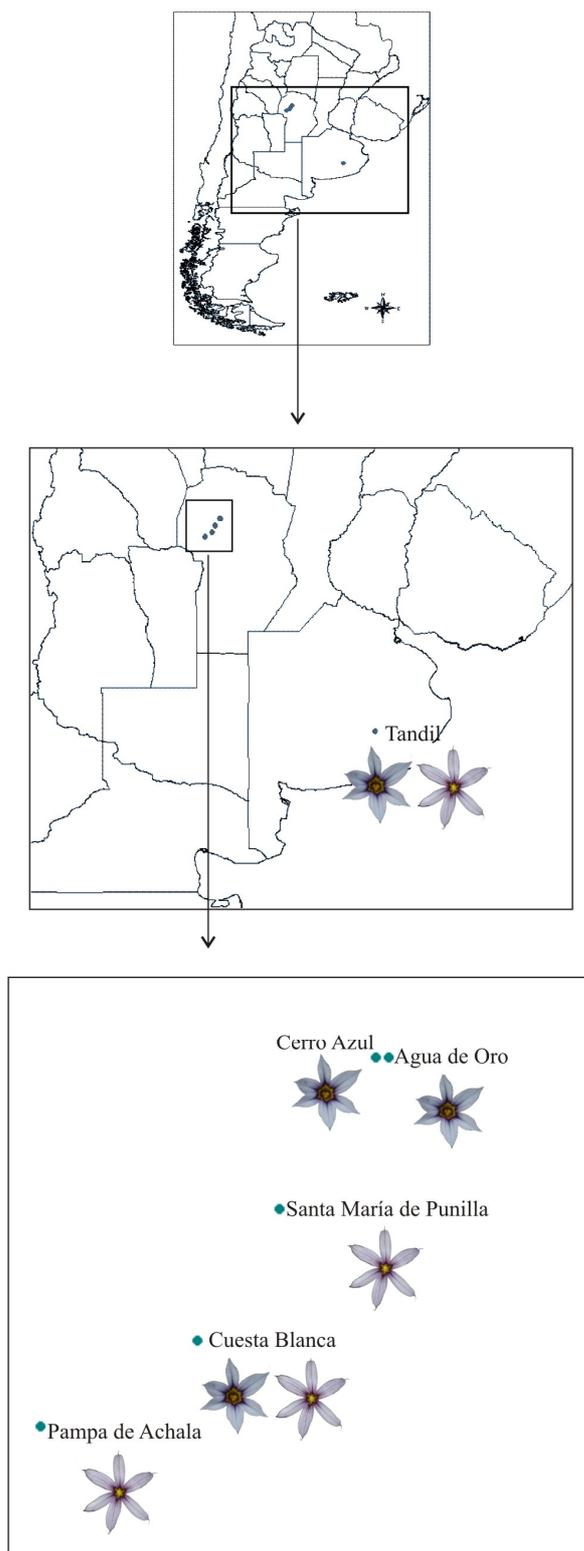


Figura 1: Sitios de muestreo. Sitios simpátricos: Cuesta Blanca y Tandil. Sitios alopátricos de *S. iridifolium ssp. valdivianum*: Cerro Azul y Agua de Oro. Sitios alopátricos de *S. chilense*: Santa María de Punilla y Pampa de Achala.

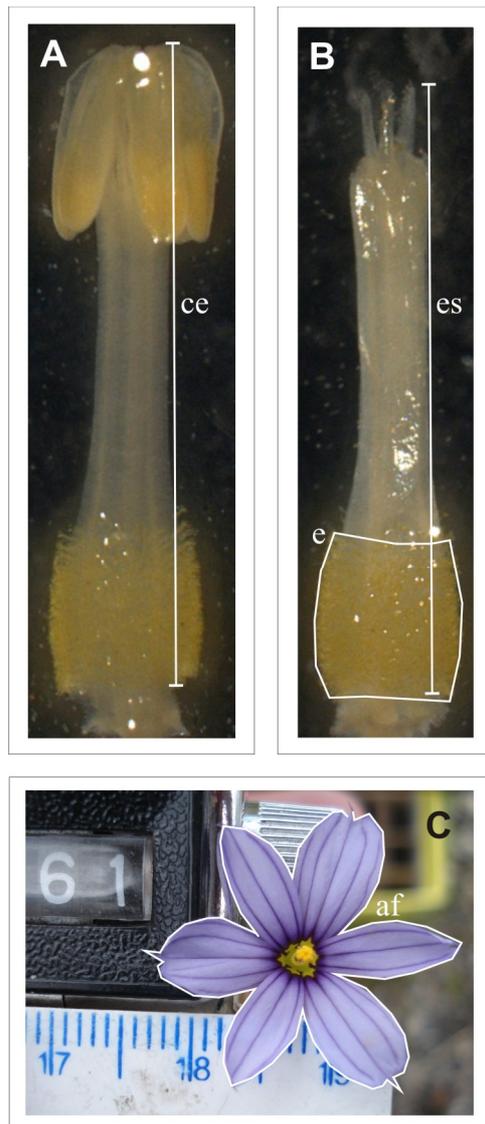


Figura 2: Variables morfométricas de las flores. **A:** foto bajo lupa de una flor de *S. chilense* una vez removidos los tépalos. La línea blanca muestra como se midió la longitud de la columna estaminal. **B:** foto bajo lupa de una flor de *S. chilense* una vez removidos los tépalos y las anteras. La línea blanca muestra la longitud del estilo y la superficie delineada en blanco muestra el área del elaióforo. **C:** vista frontal de una flor de *S. chilense*. La línea blanca muestra como se midió el área de la flor. **ce:** columna estaminal. **es:** estilo. **e:** elaióforo. **af:** área de la flor.

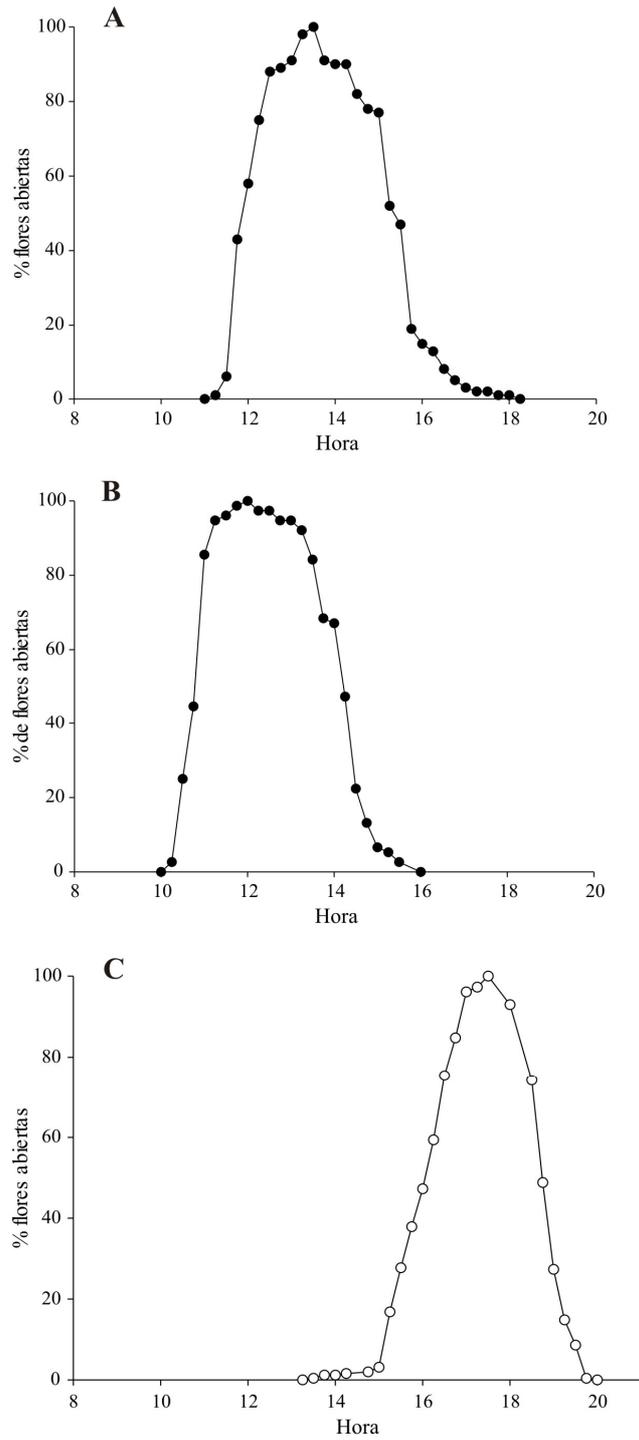


Figura 3: Patrones de floración diario de *Sisyrrinchium* en poblaciones alopátricas. **A:** Agua de Oro. **B:** Cerro Azul. **C:** Santa María de Punilla. Los círculos rellenos representan a *S. iridifolium ssp. valdivianum*, mientras que los círculos vacíos representan a *S. chilense*.

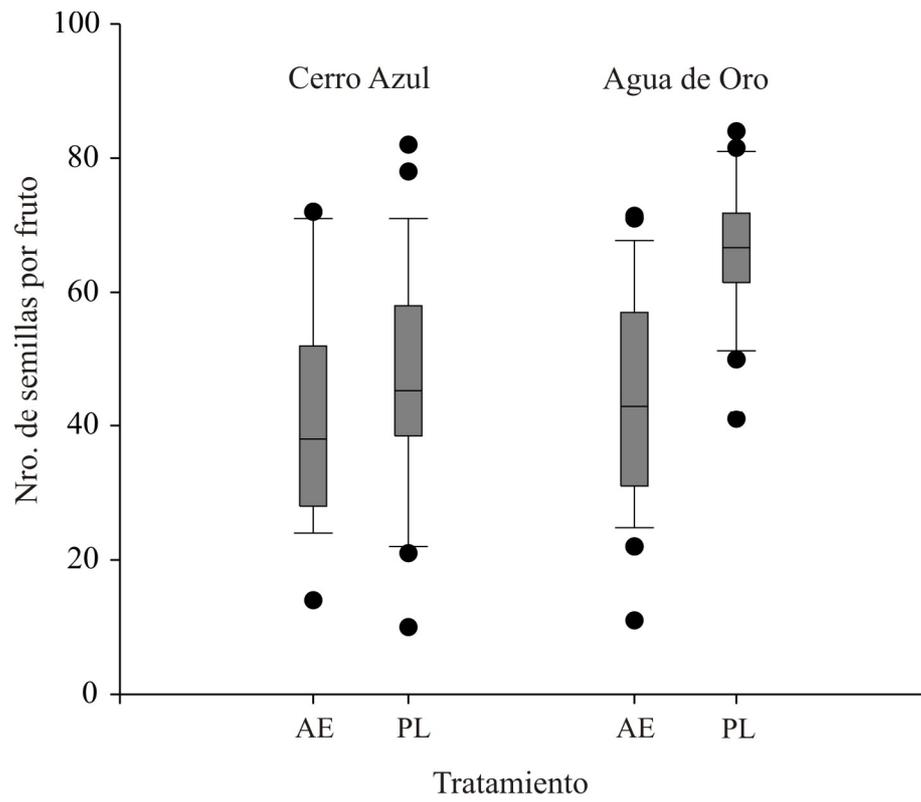


Figura 4: Sistema reproductivo de *S. iridifolium ssp. valdivianum* en Cerro Azul y Agua de Oro. Número de semillas promedio para los tratamientos de Autopolinización Espontánea (AE) y Polinización Libre (PL).

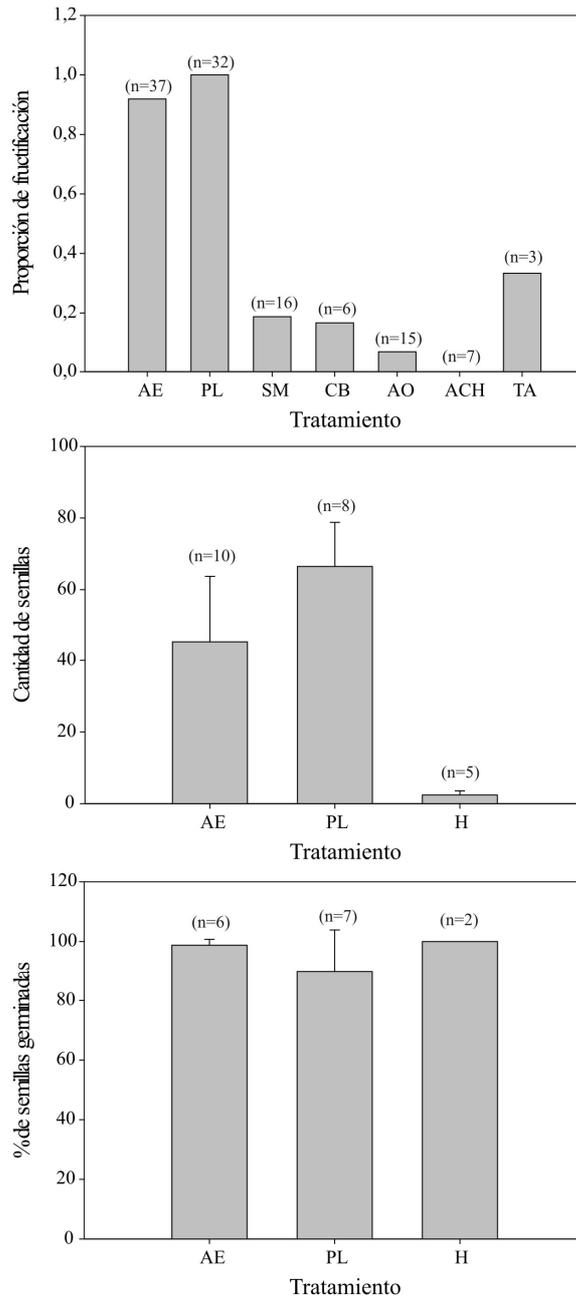


Figura 5: Proporción de fructificación, semillas formadas y porcentaje de germinación producto de cruzamientos entre *S. iridifolium ssp. valdivianum* proveniente de Agua de Oro (receptor de polen) y *S. chilense* de distintos sitios (dador de polen) comparado con los tratamientos de Autopolinización Espontánea (AE) y Polinización Libre (PL). Las iniciales indican el sitio de procedencia de los individuos de *S. chilense* utilizados. **SM:** Santa María de Punilla; **CB:** Cuesta Blanca; **AO:** Agua de Oro; **ACH:** Pampa de Achala; **TA:** Tandil. **H:** cruzamientos híbridos (independientemente del sitio de procedencia de los dadores de polen).

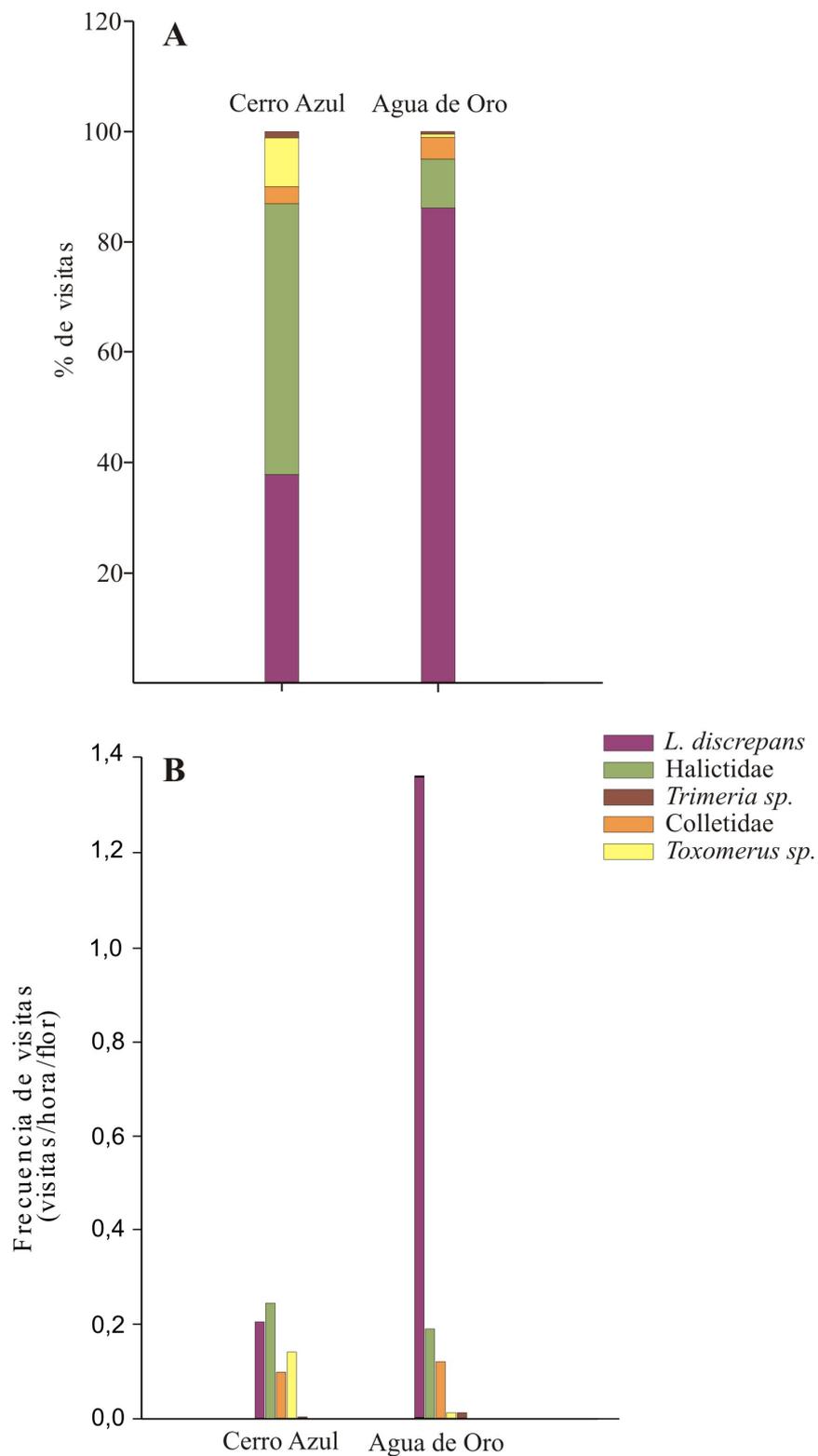


Figura 6: Porcentajes y tasas de visita de los visitantes observados en *S. iridifolium ssp. valdivianum* en las poblaciones de Cerro Azul y Agua de Oro. **A:** Porcentajes de visitas **B:** Tasas de visitas (visitas/hora/flor).

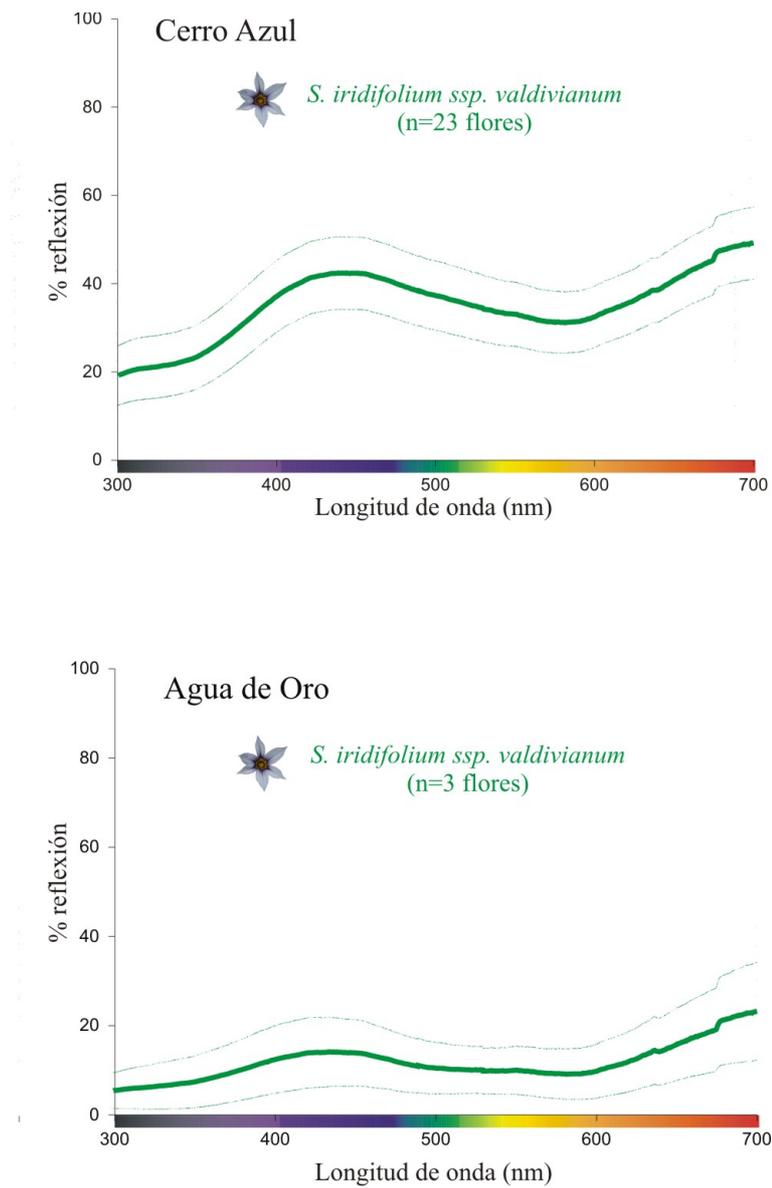


Figura 7: Espectros de reflexión de los tépalos de *S. iridifolium ssp. valdivianum* en Cerro Azul y Agua de Oro. La línea continua muestra el promedio por especie de los valores de reflexión para cada longitud de onda y las líneas de puntos indican el desvío estándar.

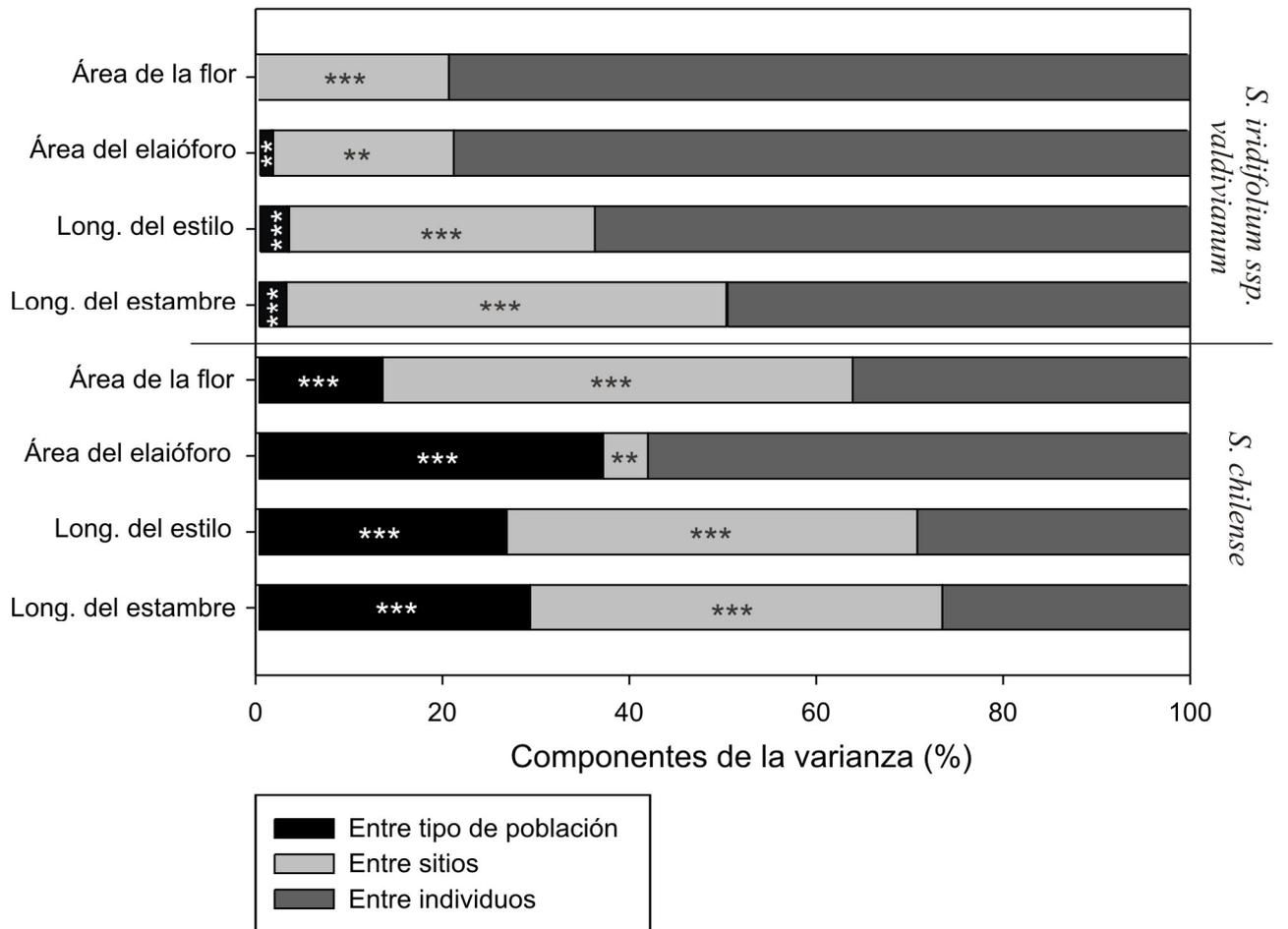
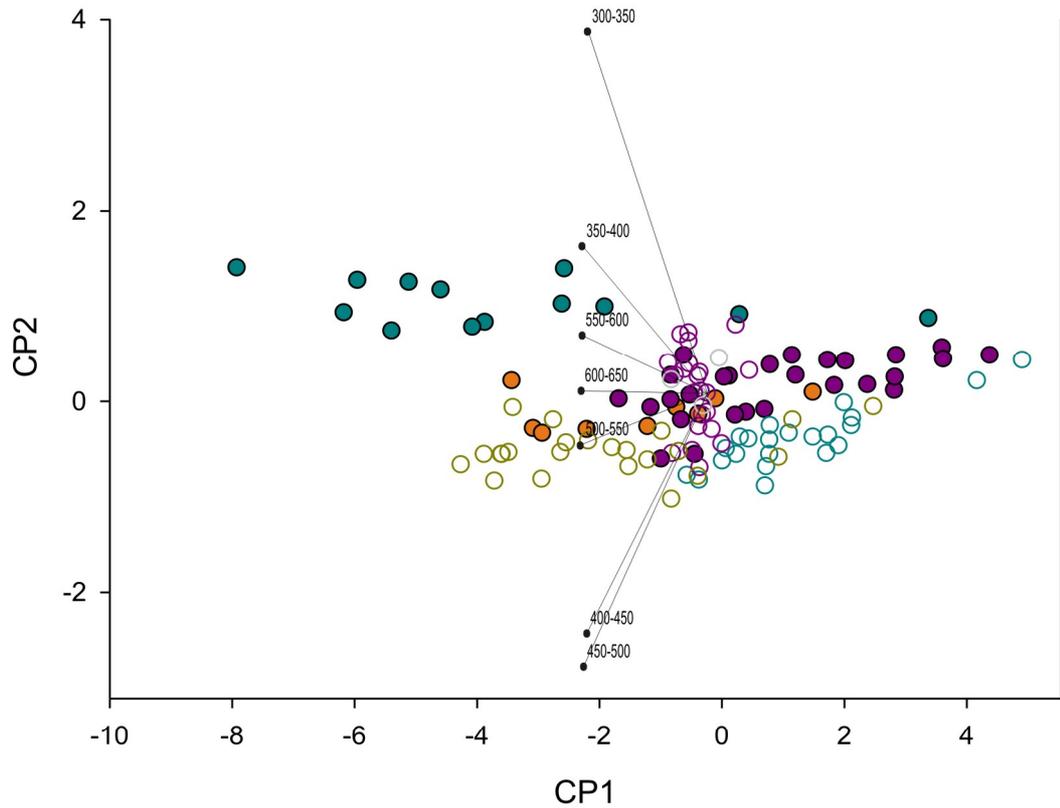


Figura 8: Descomposición de la varianza total de cada rasgo morfológico en sus respectivos componentes de varianza estimados a partir del ANOVA anidado realizado con tres niveles jerárquicos: entre tipo de poblaciones, entre sitios y entre individuos. Se muestra la significancia estadística de cada nivel de anidamiento. *** $p < 0,0001$; ** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.



- *S. chilense* P. de Achala
- *S. chilense* Cuesta Blanca
- *S. chilense* Tandil
- *S. iridifolium ssp. valdivianum* Tandil
- *S. iridifolium ssp. valdivianum* Cuesta Blanca
- *S. iridifolium ssp. valdivianum* Cerro Azul
- *S. iridifolium ssp. valdivianum* Agua de Oro

Figura 9: Gráfico biplot donde se muestra el ordenamiento de los individuos de las dos especies de *Sisyrrinchium* estudiadas en función de los dos primeros ejes del análisis de componentes principales (PCA) realizado con 8 variables de color. Cada círculo representa una flor. Con distintos colores están representadas las distintas poblaciones estudiadas. Los círculos rellenos representan a *S. chilense* mientras que los círculos vacíos representan a *S. iridifolium ssp. valdivianum*. La longitud y dirección de las flechas indican la contribución de cada variable de color a los dos componentes principales.

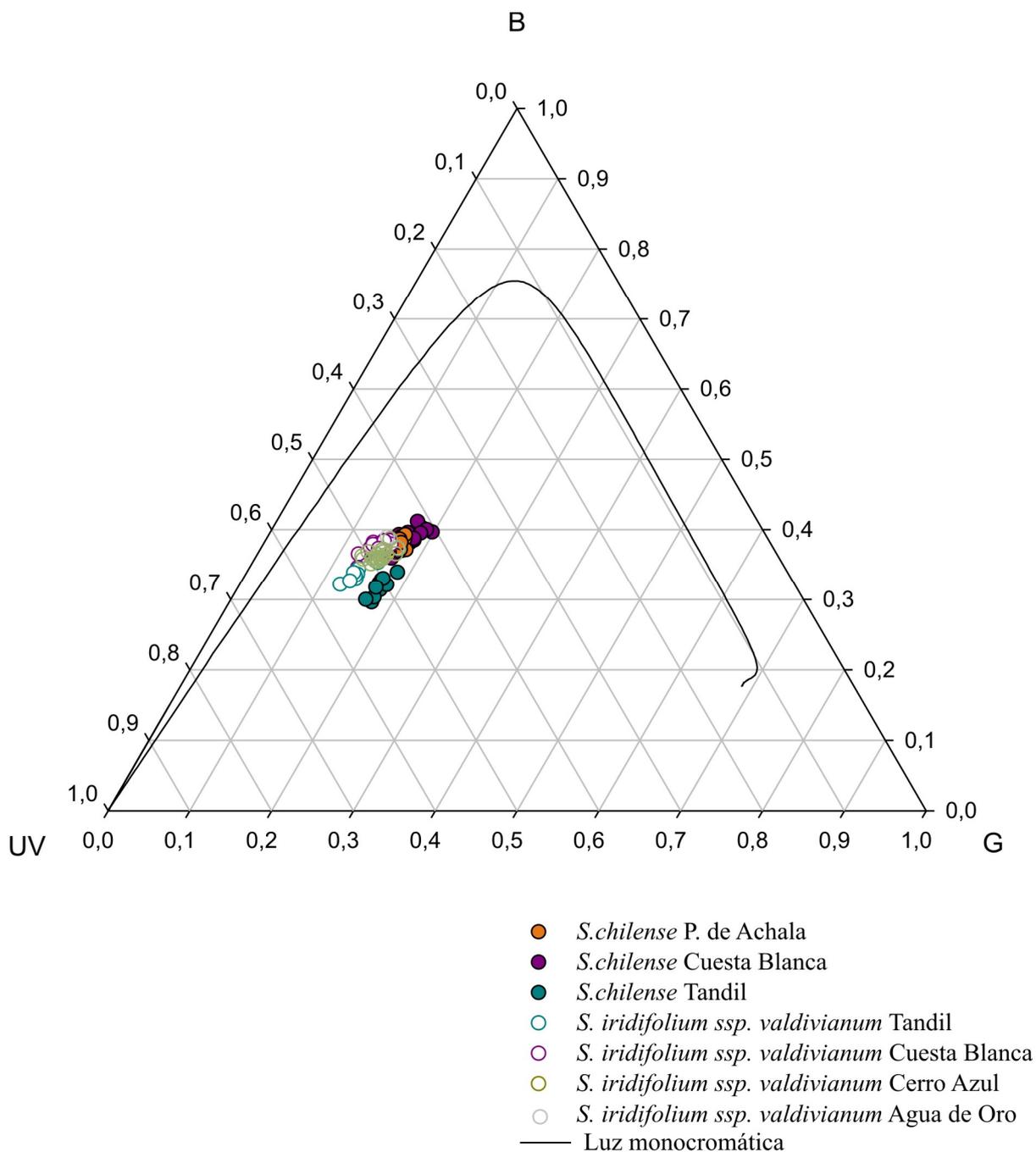


Figura 10: Triángulo de Maxwell. Los tres ejes del triángulo representan la proporción de excitación de cada uno de los tres fotorreceptores provocada por los tépalos de las especies de *Sisyrrinchium* estudiadas. Cada loci dentro del triángulo representa a una flor. Con distintos colores están representadas las distintas poblaciones estudiadas. Los círculos rellenos representan a *S. chilense* mientras que los círculos vacíos representan a *S. iridifolium ssp. valdivianum*. La línea negra representa la línea monocromática.

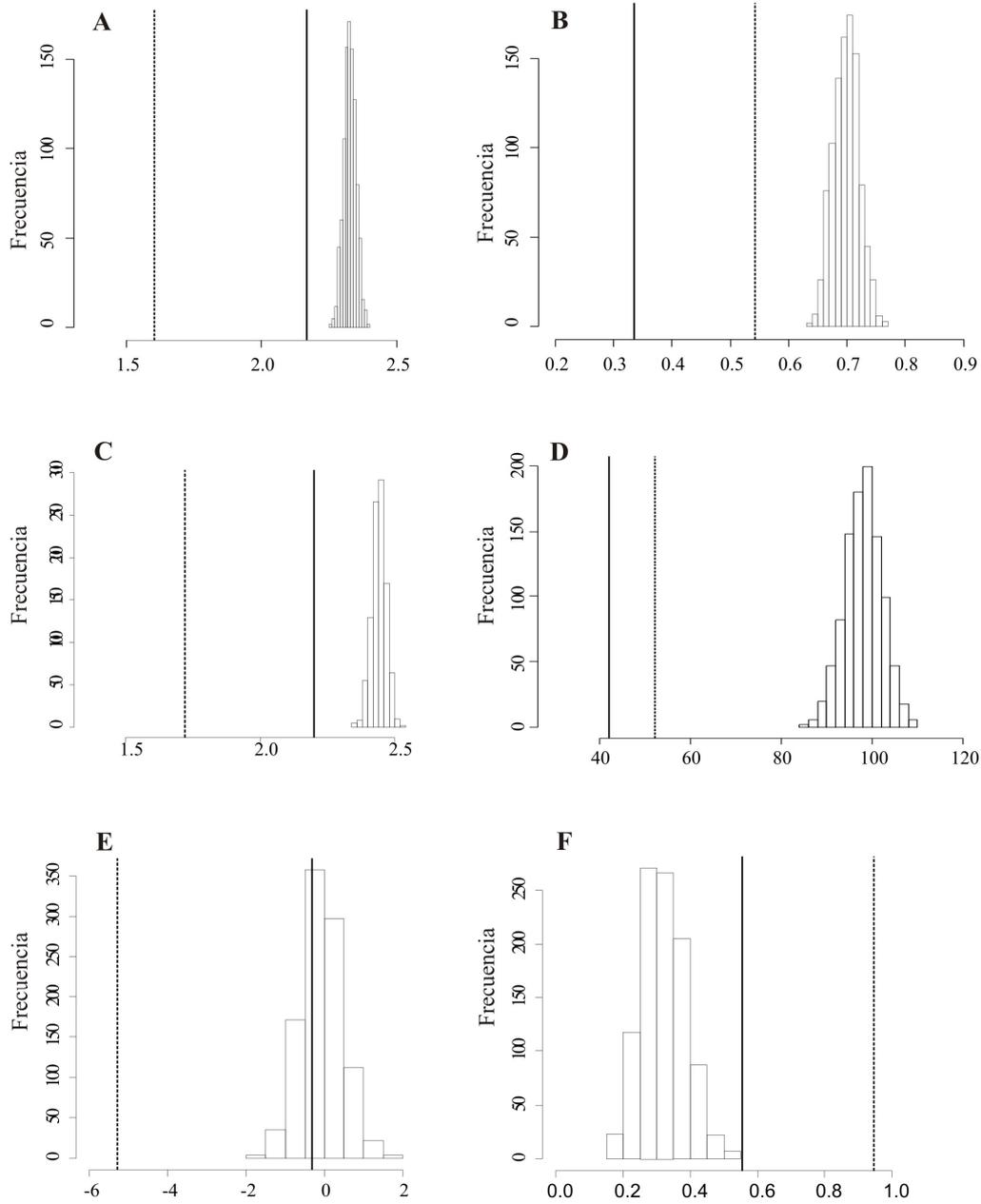


Figura 11: Diferencias entre especies en poblaciones simpátricas y alopátricas en variables morfométricas y de color. Los histogramas representan la distribución de medias de las diferencias entre especies de poblaciones alopátricas generada por re-muestreo para cada variable. Las líneas representan las diferencias medias observadas en las poblaciones simpátricas. La línea de puntos corresponde a la población de Tandil y la línea continua a la población de Cuesta Blanca. **A:** estambre. **B:** área del elaióforo. **C:** estilo. **D:** área de la flor. **E:** CP1. **F:** CP2.

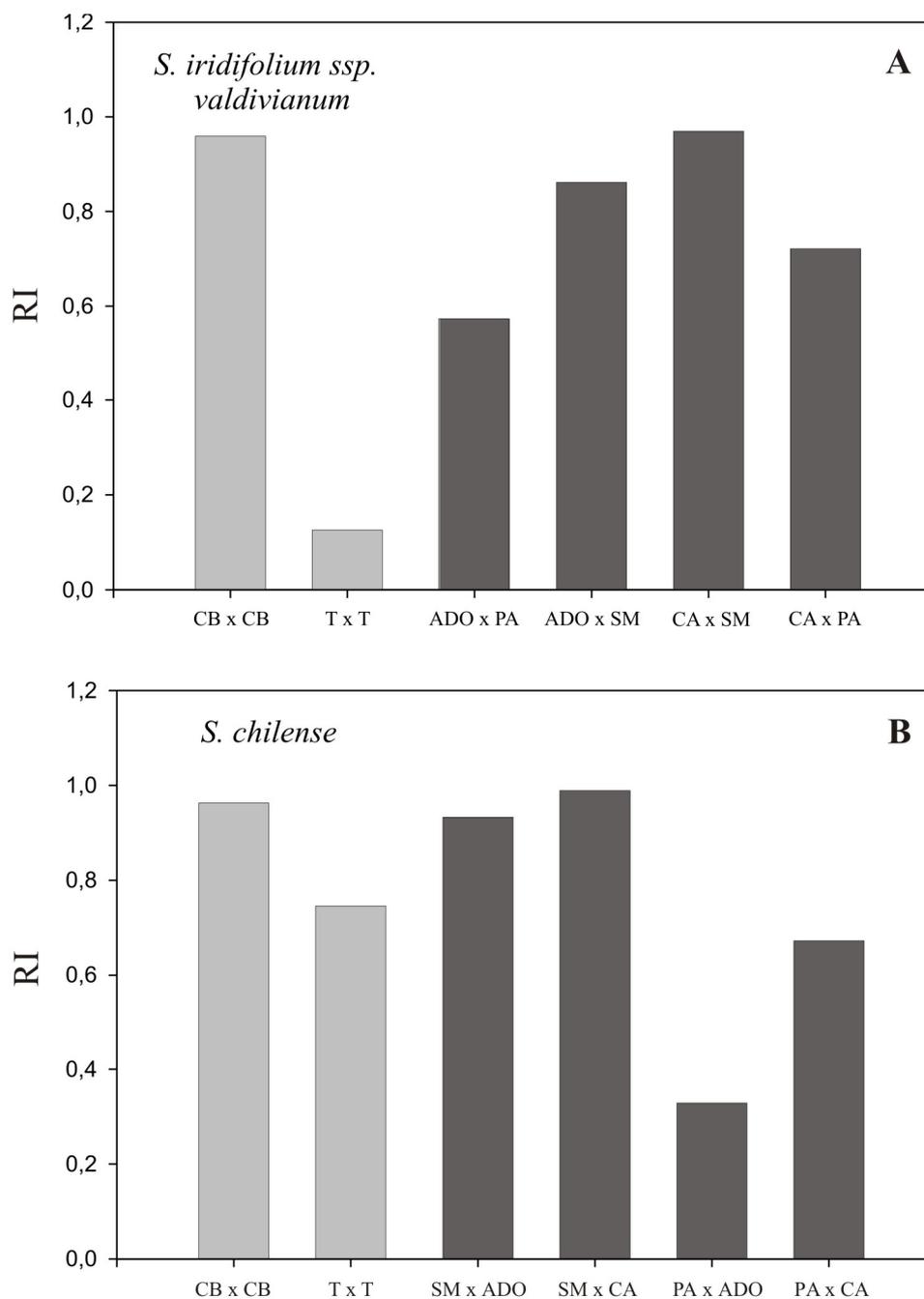


Figura 12: Grado de aislamiento de los patrones de floración de *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* de poblaciones simpátricas y alopatricas. **A:** *S. iridifolium ssp. valdivianum*. **B:** *S. chilense*. Las barras de color gris claro corresponden a las combinaciones de especies que crecen en simpatría, mientras que las barras más oscuras corresponden a todas las combinaciones posibles entre las poblaciones alopatricas de ambas especies. CB: Cuesta Blanca; T: Tandil; ADO: Agua de Oro; PA: Pampa de Achala; SM: Santa María de Punilla; CA: Cerro Azul.

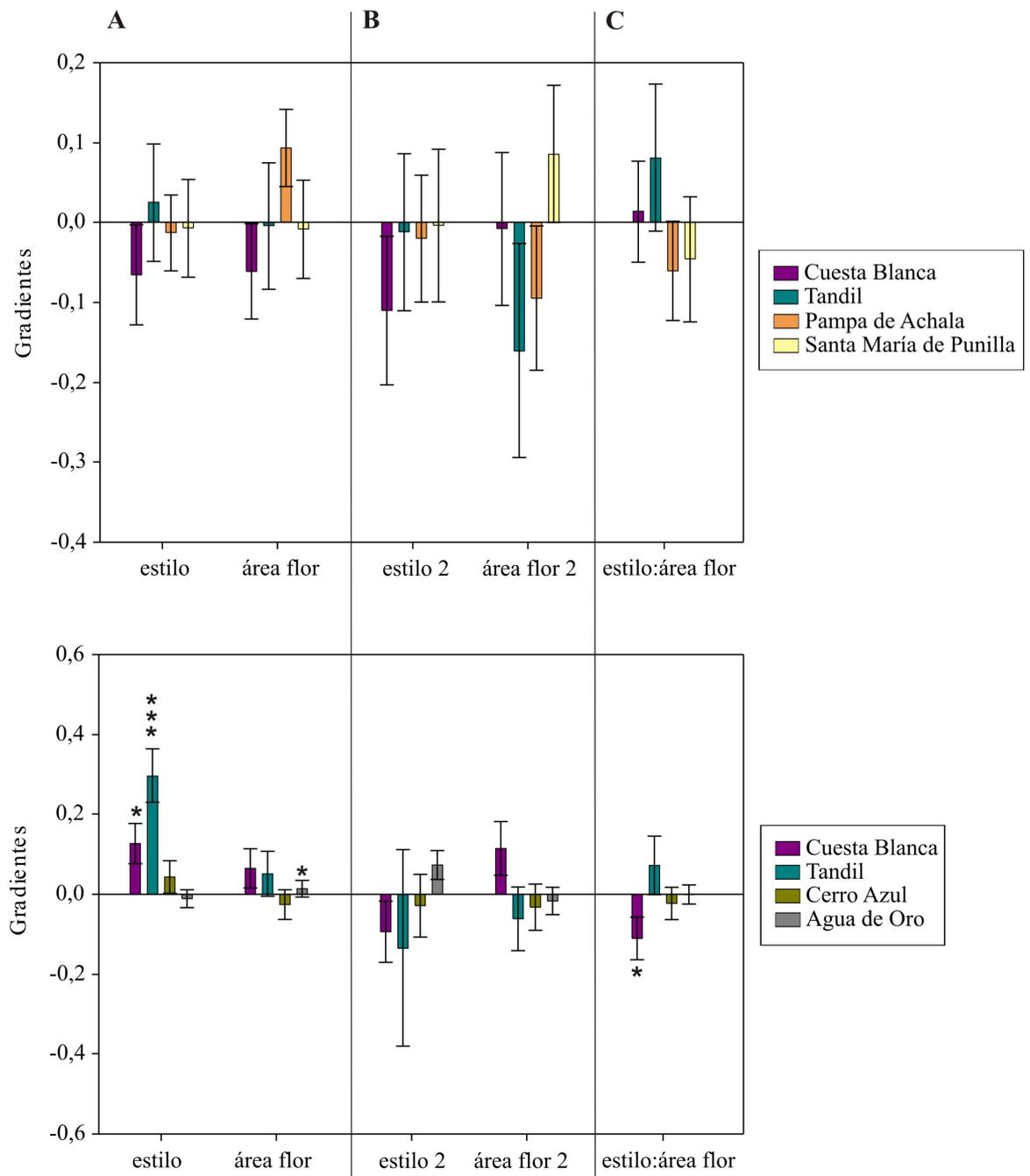


Figura 13: Gradientes de selección de las especies estudiadas en cada población. La barras de error indican \pm DE. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. **A:** Gradientes de selección lineales (selección direccional). **B:** Gradientes de selección cuadráticos (selección estabilizadora o disruptiva). **C:** Gradientes de selección correlacional. En la parte superior se muestran los gradientes de *S. chilense*. En el gráfico inferior se muestran los gradientes de *S. iridifolium ssp. valdivianum*.

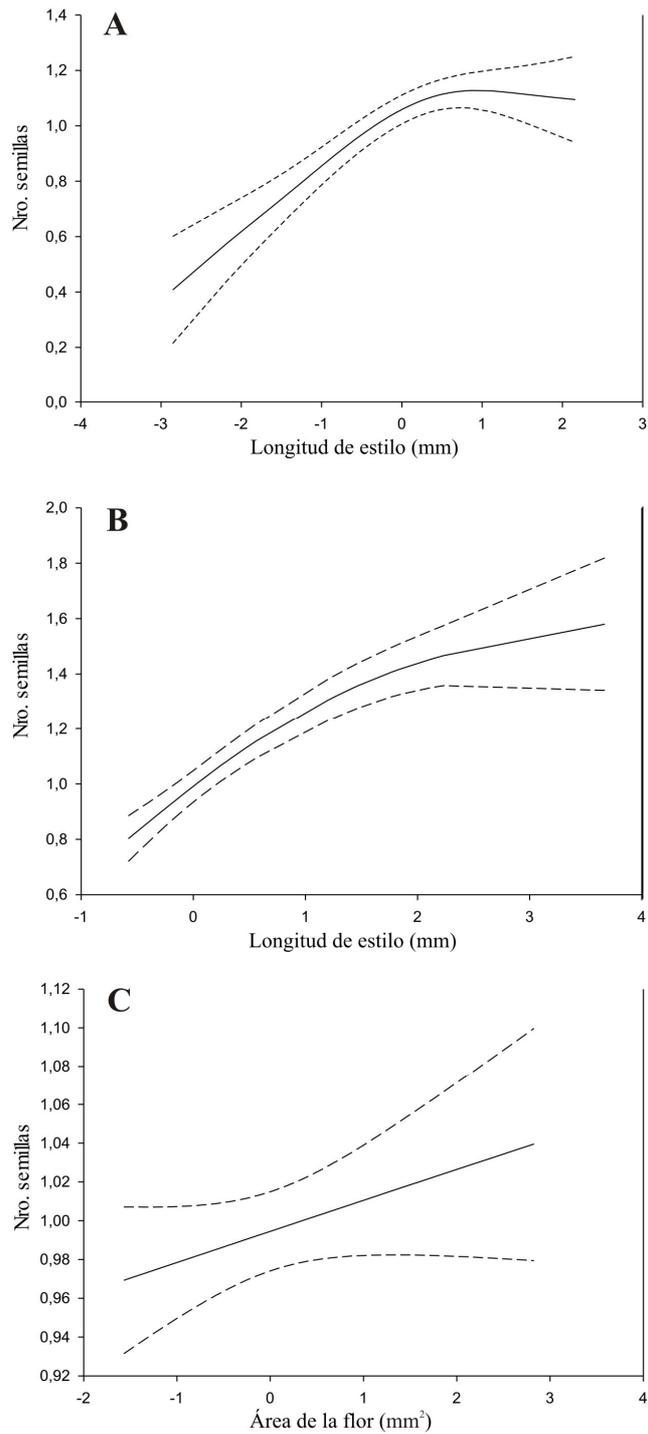


Figura 14: Regresiones Cubic Spline entre las variables estandarizadas y la medida de éxito reproductivo. **A:** Relación entre la longitud del estilo y el número de semillas en *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Cuesta Blanca. **B:** Relación entre la longitud del estilo y el número de semillas en *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Tandil. **C:** Relación entre el área de la flor y el número de semillas en *S. iridifolium ssp. valdivianum* de Agua de Oro. Las líneas de puntos representan el error estándar.

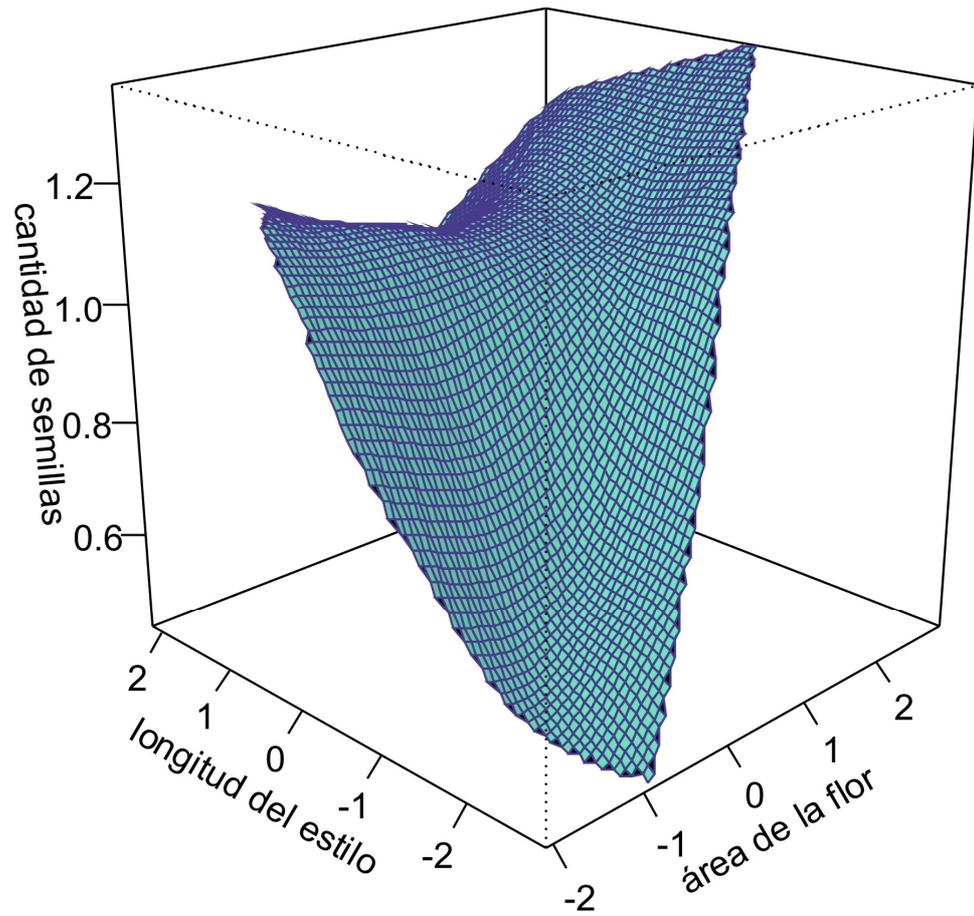


Figura 15: Superficie de selección para el número de semillas en función de dos rasgos: longitud del estilo y área de la flor en *S. iridifolium* ssp. *valdivianum* de la población de Cuesta Blanca.

BIBLIOGRAFÍA

- ARMBRUSTER WS, EDWARDS ME, AND DEBEVEC EM. 1994. Floral character displacement generates assemblage structure of Western Australian triggerplant (*Stylidium*). *Ecology* 75: p.315–329.
- ARMBRUSTER WS, AND HERZIG AL. 1984. Partitioning and sharing of pollinators by four sympatric species of *Dalechampia* (Euphorbiaceae) in Panama. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 71: p.1–16.
- BROWN JH, AND BROWN AK. 1979. Convergence, competition, and mimicry in a temperate community of hummingbird pollinated flowers. *Ecology* 60: p.1022–1035.
- BROWN WL, AND WILSON EO. 1956. Character displacement. *Systematic Zoology* 5: p.49–64.
- CARUSO MC. 2000. Competition for pollination influences selection on floral traits of *Ipomopsis aggregata*. *Evolution* 54: p.1546–1557.
- CARUSO MC. 1999. Pollination of *Ipomopsis aggregata* (Polemoniaceae): effects of intra vs. interspecific competition. *American Journal of Botany* 86: p.663–668.
- GRANT V. 1972. Convergent and divergent character displacement. *Biological Journal of the Linnean Society* 4: p.39–68.
- HANSEN TF, ARMBRUSTER WS, AND ANTONSEN L. 2000. Comparative Analysis of Character Displacement and Spatial Adaptations as Illustrated by the Evolution of *Dalechampia* Blossoms. *The American Naturalist* 156: p.S17–S34.
- LANDE R, AND ARNOLD SJ. 1983. The Measurement of selection on correlated characters. *Evolution* 37: p.1210–1226.
- LOSOS JB. 1990. A phylogenetic analysis of character displacement in Caribbean *Anolis* lizards. *Evolution* 44: p.558–569.
- MIYAKE T, AND INOUE K. 2003. Character displacement in style length between pollinator-sharing *Clerodendrum trichotomum* and *C. izuinsulare* (Verbenaceae). *Plant Systematics and Evolution* 243: p.31–38.
- PRITCHARD JR, AND SCHLUTER D. 2001. Declining interspecific competition during character displacement: summoning the ghost of competition past. *Evolutionary Ecology Research* 3: p.209–220.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2010. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- RATHCKE B, AND LACEY EP. 1985. Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:p.179-214.
- RATHCKE B. 1988. Flowering phenologies in a shrub community: competition and

constraints. *Journal of ecology* 76: p.975–994.

DI RIENZO J, ROBLEDO W, CASANOVES F, AND BALZARINI M. 2000. Software estadístico Infostat v1.1. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba.

SCHLUTER D. 1988a. Estimating the form of natural selection on a quantitative trait. *Evolution* 42: p.849–861.

SCHLUTER D. 1988b. Character displacement and the adaptive divergence on finches on islands and continents. *The american naturalist* 131: p.799–824.

SCHLUTER D. 2000. The ecology of adaptive radiation. Oxford university press, New York.

SOKAL RR, AND ROHLF FJ. 1995. Biometry. Freeman y Company, New York.

WASER NM. 1983. Competition for pollination and floral character differences among sympatric plant species: a review of evidence. In Handbook of experimental pollination ecology, 277–293. Van Nostrand Reinhold, New York.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

El género *Sisyrinchium* es uno de los más grandes, más ampliamente distribuidos y taxonómicamente más complejo de la familia Iridácea. Su sistemática permanece aún poco resulta y si bien estudios recientes han arrojado luz sobre sus relaciones filogenéticas y los posibles procesos evolutivos relacionados a su asociación con abejas colectoras de aceites, quedan muchos aspectos por abordar. Los resultados de esta tesis brindan una primera aproximación a temas tan complejos como la especiación y el desplazamiento de caracteres. El conocimiento de los patrones (vinculados a: mecanismos de aislamiento reproductivo, competencia por el polinizador, selección fenotípica en especies coexistentes) que operan en la actualidad es necesario para explorar luego, por ejemplo, los procesos históricos implicados en la radiación del género.

En esta tesis se determinó que:

- El aislamiento en especies de *Sisyrinchium* coexistentes se produce por una combinación de barreras pre-zigóticas temporales y florales variando su importancia a nivel geográfico. La separación en el horario de floración diario y el depósito diferencial de polen sobre el cuerpo de abejas colectoras de aceites del género *Lanthanomelissa* son barreras que operan en la actualidad (al menos en los sitios estudiados) manteniendo el aislamiento entre dos pares de especies: *S. chilense* - *S. iridifolium ssp. valdivianum* y *S. platense* – *S. pachyrhizum ssp. pachyrhizum*.
- El carácter arquitectura floral (vinculado al aislamiento mecánico), parece haber sido ancestralmente rotáceo y habría evolucionado independientemente en al menos siete oportunidades hacia el fenotipo hipocrateriforme, que está asociado significativamente con la polinización por abejas colectoras de aceites.
- No se halló evidencia de especiación simpátrica entre *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum*.
- *S. chilense* y *S. iridifolium ssp. valdivianum* son poliploides, sin embargo no se determinó si las barreras reproductivas temporales y mecánicas estarían asociadas a cambios en el nivel de ploidía.
- No se detectó evidencia de desplazamiento de caracteres vinculado al depósito diferencial de polen en los sitios simpátricos de *S. chilense* y *S. iridifolium ssp.*

valdivianum estudiados. Se encontraron indicios de que la separación temporal podría explicarse por este tipo de mecanismo en al menos una de las poblaciones mixtas.

- La existencia de poblaciones simpátricas de otras especies de *Sisyrinchium* (*S. pachyrhizum* ssp. *pachyrhizum* y *S. platense*) con patrones de aislamiento mecánico y temporal similares a los observados en *S. chilense* y *S. iridifolium* ssp. *valdivianum* y el hecho de que especies coexistentes con similar morfología floral sean polinizadas por distintos agentes es sugestivo de que mecanismos de exclusión competitiva podrían haber actuado en este género.
- El hecho de que exista hibridación entre *S. chilense* y *S. iridifolium* ssp. *valdivianum*, indica que es necesario contemplar la posibilidad de que haya operado un proceso de “reinforcement” entre las especies.

Es necesario abordar estudios a mayor escala, abarcando mayor cantidad de especies, y rangos geográficos más amplios, combinando enfoques filogenéticos, filogeográficos, citogenéticos y ecológicos para continuar dilucidando los procesos implicados en la evolución de especies del género *Sisyrinchium*.