

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

**EL ROL DE LOS POLINIZADORES Y LA
FILOGENIA EN LA CONFIGURACIÓN
FENOTÍPICA DE LOS ELAIÓFOROS EN
*NIEREMBERGIA (SOLANACEAE)***

Tesinista: María Noel Augusto

Firma:

Directora: Dra. Alicia N. Sérsic

Firma:

Co-directora: Dra. Constanza C. Maubecin

Firma:

Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral, Instituto Multidisciplinario de Biología
Vegetal (UNC - CONICET), Córdoba, Argentina.

2019

El rol de los polinizadores y la filogenia en la configuración fenotípica de los elaióforos en *Nierembergia* (Solanaceae)

Tribunal Examinador

Nombre y Apellido: Dr. Leonardo Amarilla

Firma:

Nombre y Apellido: Dra. Raquel Scrivanti

Firma:

Nombre y Apellido: Dra. Ana Pía Wiemer

Firma:

Calificación:

Fecha:

AGRADECIMIENTOS

A mis directoras Dra. Constanza Maubecin y Dra. Alicia Sérsic que me acompañaron en todo momento, cuyos comentarios y sugerencias fueron de un valor inapreciable, sin ellas esto no podría haber sido posible.

A todo el grupo hermoso del laboratorio de Biología Floral que me contuvo en todo momento, dándome siempre una mano si la necesitaba.

A mi familia que siempre estuvo al lado mío acompañándome en esta hermosa carrera que elegí.

A mi compañero que siempre estuvo para sostenerme.

A mi amiga Rocío y mi prima Laura por ayudarme con el diseño de las imágenes y las tapas de la tesina.

A mis amigas que siempre me apoyaron.

Índice

Resumen	5
Introducción	5
Objetivo general	11
Objetivos específicos	11
Materiales y métodos	11
Análisis de datos	14
Resultados	19
Discusión	36
Conclusiones	39
Bibliografía	40
Apéndice Suplementario 1	45
Apéndice Suplementario 2	48

EL ROL DE LOS POLINIZADORES Y LA FILOGENIA EN LA CONFIGURACIÓN FENOTÍPICA DE LOS ELAIÓFOROS EN *NIEREMBERGIA* (SOLANACEAE)

RESUMEN

Los sistemas conformados por plantas oleíferas y abejas recolectoras de aceites son considerados como especializados dentro de los mutualismos planta-polinizador. En estos sistemas, los polinizadores son importantes agentes de selección de rasgos florales, y estudios previos muestran que las características de los elaióforos, en particular, pueden estar asociadas a las estructuras recolectoras de las patas de las abejas. Sin embargo, los rasgos florales, y entre ellos las recompensas, también pueden estar condicionados filogenéticamente. A nivel macroevolutivo, aún no se ha evaluado la influencia relativa de estos factores (polinizadores vs. filogenia) sobre los atributos de los elaióforos florales. Las flores de los taxa de *Nierembergia* (Solanaceae) son polinizadas por una gran diversidad de abejas recolectoras de aceite que difieren en tamaño corporal y longitud de patas recolectoras de aceites, por lo que resulta un sistema ideal para explorar estas hipótesis. En este trabajo evaluamos la relación entre la variación fenotípica de los elaióforos en *Nierembergia* y la de sus polinizadores en un marco filogenético. A partir de mediciones morfométricas de los elaióforos florales de 16 taxa, se realizaron ANOVAs para observar la variación del fenotipo del elaióforo entre los taxa de *Nierembergia*; a su vez se observó la variación fenotípica multivariada a través de un Análisis de Componentes Principales. Se exploró la influencia de la filogenia sobre la variación fenotípica construyendo un filomorfoespacio con los ejes de máxima variación, se calculó la señal filogenética y se realizaron filofenogramas de cada variable. Por otro lado, para observar la asociación entre rasgos del elaióforo y de los polinizadores, se realizaron Mínimos Cuadrados Generalizados Filogenéticos y ANOVAs de cada variable en función del tamaño del cuerpo y patas del polinizador más frecuente. Los análisis comparados filogenéticos mostraron que algunos caracteres del elaióforo se encontraron parcialmente conservados en la filogenia (ej. extensión del elaióforo). Sin embargo, la mayoría mostró patrones de convergencia fenotípica (*i.e.* algunos taxa se alejaron de taxa cercanamente emparentados en los filofenogramas). Los PGLS y ANOVAs indicaron que las flores de *Nierembergia* que son frecuentemente polinizadas por abejas de patas largas presentaron elaióforos de mayor tamaño, más extensos, menos densos y con mayor cantidad de aceite que aquellos taxa cuyas flores son polinizadas por abejas de patas más cortas. En conclusión, la mayoría de los atributos de los elaióforos en *Nierembergia* estarían afectados por el tamaño del aparato recolector de las patas de las abejas polinizadoras, siendo estos rasgos buenos predictores de los caracteres de los polinizadores.

INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de la ecología evolutiva de la polinización, numerosos autores han sugerido que la diversidad de fenotipos florales es una adaptación que resulta de la

interacción entre plantas y polinizadores (Faegri & van der Pijl; 1966; Stebbins, 1970; Johnson & Steiner, 2000). Entre los caracteres florales, existen numerosas señales visuales, olfativas y táctiles que promueven el arribo de los visitantes. A su vez, las flores presentan atrayentes primarios que suplen necesidades esenciales del polinizador, como la alimentación o cuidado de las crías, conocidas como recompensas florales. Su función es asegurar que la visita repetida de los animales conduzca a la polinización. Las recompensas más comunes entre las plantas con flor son el polen y el néctar, aunque también existen recompensas menos frecuentes, como los aceites florales, las resinas y las fragancias (Willmer, 2004). En el estudio de las recompensas florales pueden considerarse distintos tipos de componentes, como la morfología de la estructura productora de recompensa y su ubicación en la flor, así como aspectos cualitativos y cuantitativos de la recompensa (ej: cantidad, composición química y concentración de la recompensa, entre otros). Algunos de estos caracteres pueden estar estrechamente asociados con las características de los polinizadores, mientras que otros pueden encontrarse más condicionados por otro tipo de factores como restricciones del desarrollo o factores abióticos, como la temperatura o la disponibilidad de agua. Entre estos atributos, la cantidad de recompensa de una flor es el determinante principal de la interacción planta polinizador y por lo tanto puede hallarse bajo fuertes presiones de selección (Harder *et al.*, 2001). La ubicación de la recompensa en la flor, por ejemplo, puede relacionarse con la posición del polinizador en la flor durante las visitas, pero aparentemente ésta no muestra un patrón de asociación particular con taxa, hábitat o tipo de polinizador (Willmer, 2004).

Los factores que influyen en las características de la recompensa han sido extensamente estudiados en el caso del néctar (Bernardello, 2007). Sin embargo, son pocos los trabajos que han indagado en los factores que determinan la producción y los atributos de otro tipo de recompensas. En este sentido, una de las recompensas que aún no se ha estudiado con tanta profundidad es la de los aceites florales, descubiertos a partir de las observaciones de Vogel en 1969, quien exploró el novedoso síndrome de polinización de “las flores productoras de aceite y sus abejas recolectoras”. A partir de estos primeros trabajos, diversos estudios han contribuido a la exploración de estos sistemas (revisado en

Neff & Simpson, 2017, y Possobom & Machado, 2017a). Vogel (1974) llamó elaióforos a los diferentes tipos de órganos secretores de aceite no volátil que se encuentran presentes de manera exclusiva en 11 familias de Angiospermas (Renner & Schaefer, 2010). Las abejas especializadas en la recolección de aceites florales son principalmente hembras de abejas solitarias que utilizan estructuras especializadas de sus patas delanteras y/o medias o abdomen para la recolección de este tipo de recompensa (Neff & Simpson, 1981; Cocucci *et al.*, 2000; Michener, 2007). El éxito reproductivo de estas abejas depende de la interacción con las plantas productoras de aceites, por lo que son importantes agentes de selección de rasgos en flores oleíferas. Los sistemas conformados por plantas oleíferas y abejas recolectoras de aceites son considerados como especializados dentro de los mutualismos planta-polinizador (Steiner & Whitehead, 1991; Johnson & Steiner, 2000; Renner & Schaefer, 2010).

Diversos trabajos sugieren que la producción de aceites florales y las características de los elaióforos están bajo presiones de selección mediada por polinizadores (ej: Davies & Stpiczyńska, 2009; Pansarin *et al.*, 2009). Muchos de estos estudios indagan aspectos como anatomía, histoquímica y ultraestructura de los elaióforos de una o varias especies, y los relacionan con la identidad o comportamiento de las abejas recolectoras de aceites (ej: Cocucci & Vogel, 2001; Martins & Alves-dos-Santos, 2013; Possobom *et al.*, 2015; Possobom & Machado, 2017b). Asimismo, se ha estudiado la influencia de factores bióticos y abióticos a nivel intraespecífico, y en este contexto, Cosacov y col. (2012) y Ferreiro y col. (2015) han encontrado evidencia a favor de que los polinizadores afectan la variación en la producción de aceites a nivel geográfico. Por otra parte, según Kuhlmann y Hollens (2014) existe una relación entre el tipo de pilosidad de las patas de las abejas y la disponibilidad de aceite y morfología de los elaióforos. Todos estos trabajos sugieren fuertemente que la interacción especializada entre plantas oleíferas y abejas recolectoras de aceite habría moldeado las características de los elaióforos de las flores, sin embargo, esta hipótesis aún no se ha puesto a prueba en un contexto filogenético.

Dentro de la familia Solanaceae, el género *Nierembergia* Ruiz & Pav. con 21 especies de distribución subtropical, es el único que posee la particularidad de producir aceites

florales como recompensa (Simpson & Neff 1981; Cocucci, 1991). La biología de la polinización de algunas especies se encuentra descrita en el trabajo de Cocucci (1991), y ha sido descrita para las restantes especies recientemente (Maubecin, 2019). De acuerdo a esta última descripción, los principales polinizadores de las especies de *Nierembergia* son abejas recolectoras de aceites pertenecientes a distintas tribus de la familia Apidae. La composición de los ensambles de polinizadores varía entre especies y variedades de *Nierembergia*, siendo abejas de los géneros *Chalepogenus* Holmberg, *Centris* Fabricius y *Tapinotaspis* Holmberg las que visitan más frecuentemente las flores. Estas abejas pertenecen a distintos grupos funcionales (*i.e.* grupo de polinizadores que se comportan de manera similar en una flor y ejercen presiones de selección similares; Fenster *et al.*, 2004), ya que diversos trabajos muestran que estas difieren en el tamaño corporal general, y el tamaño de las patas recolectoras de aceites en particular, en la configuración del aparato recolector en las patas y en el comportamiento de recolección de recompensas (Cocucci, 1991; Cocucci *et al.*, 2000; Sérsic, 2004; Alves-dos-Santos *et al.*, 2007; Neff & Simpson, 2017; Maubecin, 2019). Las abejas del género *Chalepogenus* son de tamaño más pequeño que las abejas de *Centris* y *Tapinotaspis* y recolectan los aceites florales con su primer par de patas desplazándose por la corola, efectuando polinización nototribica en las flores de *Nierembergia* (Figura 1; Cocucci, 1991; Maubecin, 2019). En este género, el basitarso del primer par de patas posee un aparato recolector formado por una almohadilla bien definida con pelos finamente ramificados con los que absorbe los aceites por acción capilar (Cocucci *et al.*, 2000). Las abejas de *Centris* también recolectan aceites con su primer par de patas utilizando un aparato recolector muy especializado denominado elaiospata (doble peine en la superficie ventral del basitarso anterior). Para ello, en las flores *Nierembergia* se sujetan de la columna de piezas fértiles que emerge del centro de la corola y barren la superficie de tricomas sin desplazarse, efectuando polinización nototribica (Figura 1; Cocucci, 1991). Las abejas de *Tapinotaspis*, aunque se asemejan a las de *Centris* en tamaño (Apéndice Suplementario 1), recolectan aceites con su segundo par de patas posándose en la flor por encima de la columna de piezas fértiles, efectuando polinización esternotribica (Figura 1). En este género, el aparato recolector presenta setas largas y aplanadas con márgenes

profundamente dentados en basitarso y metatarso medios, con los cuales barren la superficie del elaióforo con movimientos oscilantes y alternos de las patas medias (Cocucci, 1991; Cocucci *et al.*, 2000). Estas diferencias entre las distintas abejas que componen los ensambles de polinizadores ejercerían presiones de selección diferentes sobre las características fenotípicas de los elaióforos florales, y por lo tanto generar divergencia fenotípica en los elaióforos de las especies de *Nierembergia*.

A excepción del trabajo de Rupil (2008) que indaga la relación entre señal (área del elaióforo) y cantidad de recompensa de las flores (cantidad de tricomas productores de aceite) en *N. linariifolia*, no existen trabajos que indaguen sobre la diversidad fenotípica de los elaióforos en *Nierembergia*, así como en su relación con los polinizadores, y la implicancia que esta relación podría tener en la evolución del género. La filogenia de *Nierembergia* muestra que se trata de un grupo monofilético (Figura 2A; Tate *et al.*, 2009), y la disponibilidad de métodos comparativos filogenéticos posibilita evaluar hipótesis adaptativas en este género a nivel macroevolutivo, teniendo en cuenta de este modo que los taxa más cercanamente emparentados pueden presentar similitudes morfológicas debido a relaciones compartidas por su ancestría (Smith, 2010; Reginato & Michelangeli, 2016). Al respecto, los patrones de convergencia fenotípica (*i.e.* evolución independiente de rasgos similares en linajes evolutivos diferentes; Losos, 2011) constituyen una de las evidencias más fuertes a favor de la diversificación adaptativa de las flores en relación a sus polinizadores, sugiriendo que estos actúan como agentes de selección natural que moldean el fenotipo floral.

En este trabajo se postula que la configuración fenotípica de los elaióforos en *Nierembergia* depende tanto de las características fenotípicas de los polinizadores como de otros factores (*i.e.* factores abióticos, patrones del desarrollo, etc.), por lo que se espera que atributos como la cantidad de aceite y el tamaño del elaióforo estén relacionados mayormente a rasgos de los polinizadores (como longitud de patas recolectoras de aceite, tamaño del polinizador), mientras que otros atributos como la forma del elaióforo no estén estrechamente relacionados a rasgos de los polinizadores. En particular, se plantearon las siguientes preguntas: ¿Cómo es la variación interespecífica de los rasgos fenotípicos del

elaióforo? ¿Podría deberse esa variación a la inercia filogenética o a presión de selección ejercida por los visitantes florales? ¿Hay características de los elaióforos asociadas a características de los polinizadores?; ¿Cómo es dicha asociación?

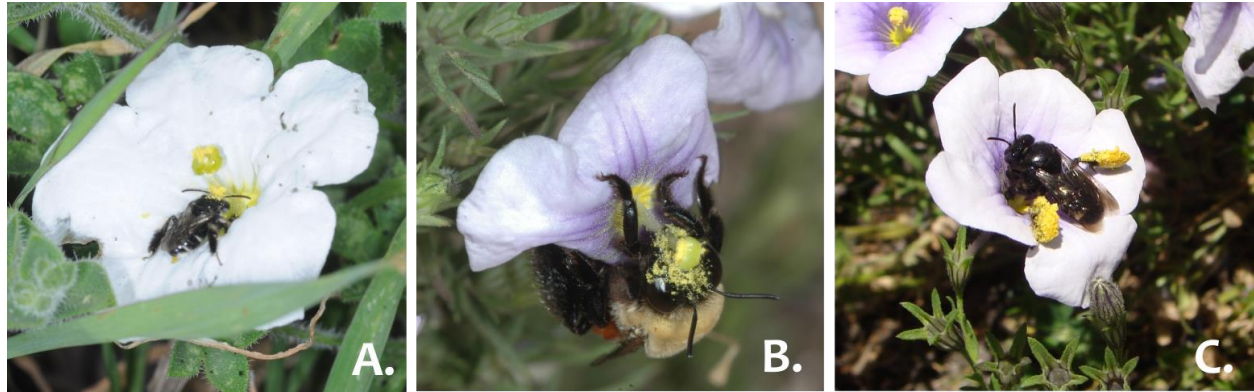


Figura 1. Imágenes de algunas abejas recolectoras de aceites que polinizan las flores de *Nierembergia*, donde se aprecian las diferencias entre géneros en cuanto a tamaño corporal, tipo de polinización que realizan y comportamiento de forrajeo de aceite. A) *Chalepongenys nigripes*, B) *Centris tricolor*, C) *Tapinotaspis chalybea*.

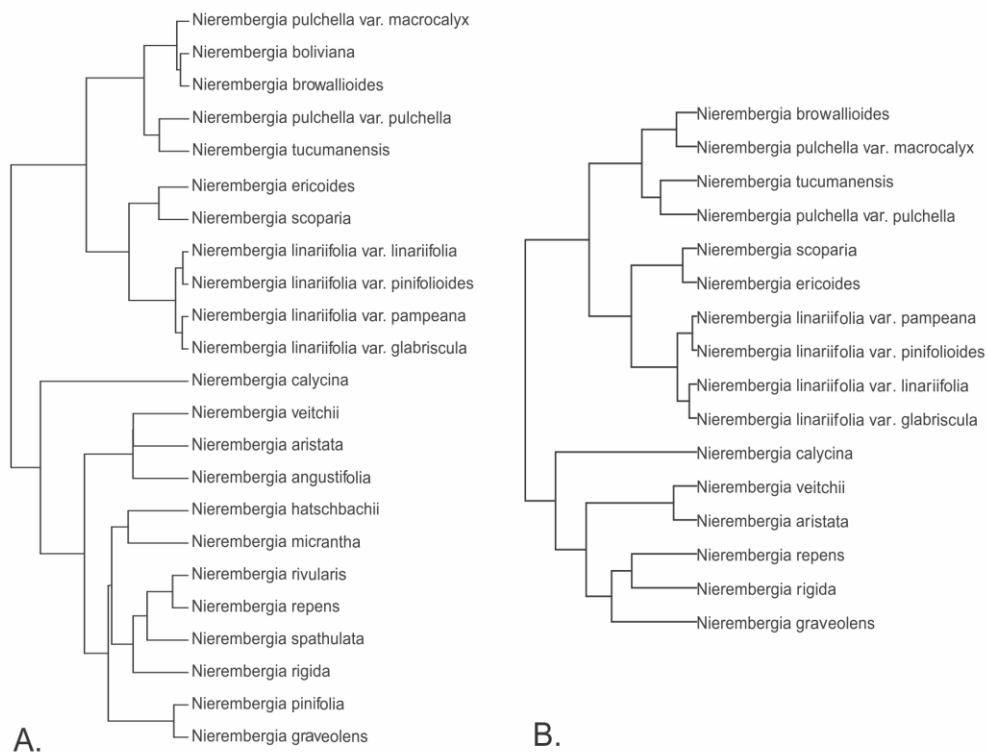


Figura 2. A. Filogenia de *Nierembergia* publicada por Tate *et al.* (2009). B. Filogenia muestreada en esta tesina.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar qué características de los elaióforos de los taxa de *Nierembergia* están relacionadas a rasgos de sus polinizadores en un marco filogenético.

Objetivos específicos:

- Caracterizar la variación interespecífica de los rasgos fenotípicos del elaióforo en un marco filogenético.
- Explorar la asociación entre la variación fenotípica del elaióforo y la de los visitantes florales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

En trabajos de campo previos realizados en Argentina y Chile se colectó material de 12 especies de *Nierembergia* y sus variedades (16 taxa en total): *N. aristata* D. Don; *N. browallioides* Griseb.; *N. calycina* Hook.; *N. ericoides* Miers.; *N. graveolens* A. St.-Hil.; *N. linariifolia* Graham var. *glabriuscula* (Dunal) A. Cocucci & Hunz. ; *N. linariifolia* Graham var. *linariifolia*; *N. linariifolia* Graham var. *pinifolioides* (Millán) A. Cocucci & Hunz.; *N. linariifolia* Graham var. *pampeana* (Millán) A. Cocucci & Hunz.; *N. scoparia* Sendtn. ; *N. pulchella* Gillies ex Miers var. *macrocalyx* (Millán) A. Cocucci & Hunz. ; *N. pulchella* Gillies ex Miers var. *pulchella*; *N. tucumanensis* Millán; *N. veitchii* Hook. ; *N. rigida* Miers y *N. repens* Ruiz & Pav. . En un sitio por especie se colectaron flores de al menos 15 individuos, que fueron conservadas en alcohol 70% para su posterior uso. Con este muestreo quedaron representados todos los clados de la filogenia (Figura 2B).

Obtención de variables fenotípicas florales

Se trabajó con 15 individuos por especie, y tres flores por individuo. Se diseccionó la corola de las flores de modo que pueda ser extendida sobre una superficie y fotografiada

por transluminancia junto a una escala de referencia. Para caracterizar y explorar la variación interespecífica en los elaióforos, se midieron las siguientes variables (Figura 3):

- Área total de la corola (A)
- Perímetro y área total del elaióforo (B y C)
- Cantidad de tricomas en un área determinada de conteo de tricomas (D)
- Radio de la superficie de la corola ocupada por tricomas (distancia máxima; E)

Las mediciones de los caracteres se realizaron sobre las fotografías digitales a través de las técnicas de morfometría lineal con el software Sigma Scan Pro 5.0.

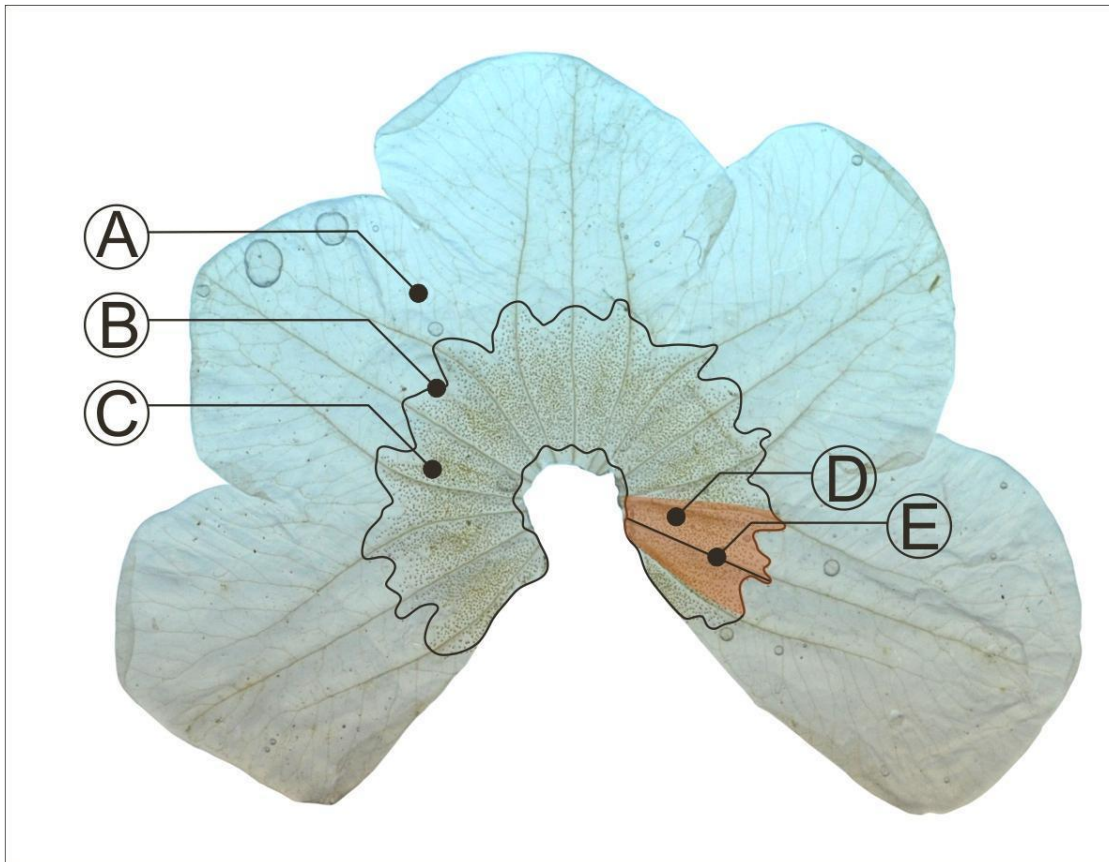


Figura 3. Fotografía de la corola de una flor de *Nierembergia linariifolia* var. *pinifolioides* en la que se ilustran las variables morfológicas medidas. A) Área de la corola, B) Perímetro del elaióforo, C) Área del elaióforo, D) Área de conteo de tricomas, E) Radio mayor del elaióforo.

A partir de las medidas morfométricas obtenidas, se determinaron las variables para el análisis de datos que a continuación se detallan:

1. Tamaño del elaióforo (área total del elaióforo, mm²)
2. Extensión del elaióforo (radio del elaióforo, mm)
3. Densidad de tricomas (cantidad de tricomas/área de conteo de tricomas: número de tricomas por mm²)
4. Porcentaje de ocupación de la corola (área elaióforo/área corola*100, %).
5. Cantidad de aceite (densidad de tricomas * área total del elaióforo: número de tricomas)
6. Forma del elaióforo

La forma del elaióforo fue cuantificada con el empleo de dos aproximaciones:

- 1) A partir de la relación entre perímetro y área del elaióforo, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Forma} = \text{perímetro} / \text{área}$$

donde el resultado del cociente tendrá un valor más alto en elaióforos de formas complejas (*i.e.* elaióforos complejos tendrán un perímetro o borde más grande para un área determinada que un elaióforo de forma más sencilla) que, en formas simples, donde el resultado del cociente será menor (Krummel *et al.*, 1987).

- 2) A partir del índice de dimensión fractal (*Df*; Krummel *et al.*, 1987; O'Neill *et al.*, 1988; Milne, 1991), que, de acuerdo a McGarigal y Marks (1995), se calcula como:

$$Df = 2 * \log \text{perímetro (mm)} / \log \text{área (mm}^2\text{)}$$

Este índice mide el grado de complejidad de la forma y sus valores oscilan entre 1 y 2. Los valores más cercanos a 1 indican que la forma es simple, mientras que los valores cercanos a 2 indican que la forma es más compleja.

A partir de la variación observada, se realizó una clasificación cualitativa de la forma de los elaióforos. De acuerdo a los valores obtenidos, los elaióforos se categorizaron como elaióforo anular, elaióforo zig-zag y elaióforo partido (Figura 4).

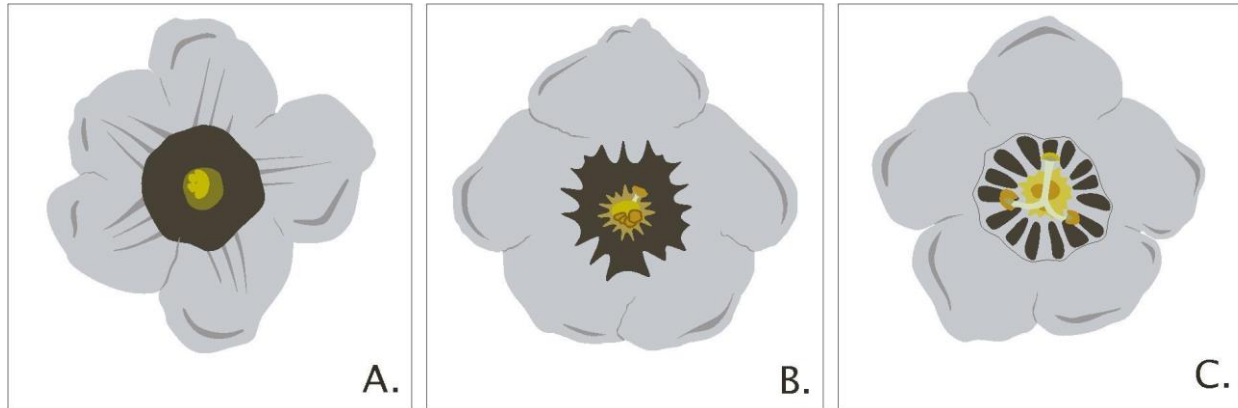


Figura 4. Esquemas de los tipos de elaióforo según su forma, donde el elaióforo está sombreado con negro. A) Elaióforo anular, B) Elaióforo zig-zag, C) Elaióforo partido.

Análisis de datos

Todos los análisis se llevaron a cabo con el programa R (R Core Team, 2019). Para implementar los análisis de método comparado filogenético se utilizaron principalmente los paquetes *phytools* (Revell, 2012) y *ape* (Paradis *et al.*, 2004) de R.

Caracterización fenotípica de elaióforos florales

A partir de los datos morfométricos se obtuvieron los valores medios de las variables fenotípicas. Con el fin de evaluar las diferencias fenotípicas entre las especies de *Nierembergia* se realizaron Análisis de la Varianza (ANOVAs) y test de Tukey *a posteriori* con las variables morfométricas de tamaño, extensión y forma del elaióforo, mientras que se utilizaron modelos lineales generalizados para las variables densidad de tricomas, porcentaje de ocupación de la corola y cantidad de aceite, apropiados para variables que presentan una distribución estadística distinta de la normal (Zuur *et al.*, 2009). En particular, para la variable porcentaje de ocupación de la corola se utilizó la función *betareg* del paquete *betareg* de R (Cribari-Neto & Zeileis, 2010).

Además, se realizaron Análisis Multivariados de la Varianza (MANOVA) y Análisis de Componentes Principales (PCA) para explorar de modo multivariado la variación fenotípica interespecífica. Por otro lado, se calcularon las correlaciones pareadas entre todas las variables morfométricas de los elaióforos, con el coeficiente *r* de Pearson, y se calculó la

significancia de los valores de r obtenidos. Para el cálculo de la correlación entre las variables del elaióforo se consideraron todos los datos de los taxa estudiados.

Patrones fenotípicos en un marco filogenético: convergencia y señal filogenética

Filofenogramas de variables cuantitativas

Un filofenograma constituye una proyección de la filogenia en un espacio definido por un eje de rasgos morfológicos (eje y), en este caso de variables fenotípicas del elaióforo, y uno de tiempo desde la raíz de la filogenia hacia el presente (eje x). Es un método que resulta útil para detectar convergencias fenotípicas. Se interpreta como evolución convergente al patrón que se observa cuando múltiples ramas del árbol llegan independientemente a una misma área del gráfico (Arbuckle & Speed, 2016).

Mapeo de caracteres y reconstrucción ancestral de la forma del elaióforo

Se realizó el mapeo estocástico sobre la filogenia de *Nierembergia* (publicada en Tate *et al.*, 2009) y la reconstrucción ancestral de la variable cualitativa de forma de los elaióforos, para observar la variación entre taxa y conocer cuál fue el estado ancestral. El mapeo estocástico es un método que considera una gran cantidad de posibles cambios a partir de un proceso estocástico, cada uno de los cuales es ponderado por su probabilidad de ocurrencia, de modo que se obtienen medidas estadísticas como la probabilidad del estado ancestral en cada nodo de la filogenia. El mapeo estocástico fue estimado en 500 árboles bayesianos con el fin de integrar la incertidumbre en la topología del árbol, longitud de ramas e historia evolutiva de los caracteres (Nielsen, 2002; Huelsenbeck *et al.*, 2003). La reconstrucción ancestral se realizó con el empleo del modelo evolutivo de tasas iguales de transición, seleccionado como el mejor modelo entre otros posibles. Para realizar estos análisis se utilizaron los paquetes *phytools* (Revell, 2012) y *ape* (Paradis *et al.*, 2004) de R.

Señal filogenética

Para evaluar si los rasgos fenotípicos de los elaióforos se encuentran asociados las relaciones filogenéticas entre taxa, se evaluó la magnitud de la señal filogenética y su

significancia estadística utilizando dos estimadores cuantitativos: K de Blomberg (Blomberg *et al.*, 2003) y λ de Pagel (Pagel, 1999). Para ambos estimadores, un valor cercano a cero indica la independencia filogenética y un valor de uno indica que los rasgos de las especies se distribuyen de acuerdo a lo esperado bajo un modelo evolutivo de Movimiento Browniano. En la estimación de K y λ se incluyeron los valores de error estándar como medida de incertidumbre en la estimación de estos parámetros, de acuerdo a lo recomendado por Alves y colaboradores (2007). Para evaluar la significancia de los estimadores se realizó un test de aleatorización, que simula conjuntos de datos al azar sobre la filogenia, para generar una distribución nula a partir de la cual se puede calcular un valor P de significancia. Un valor de $P < 0.05$ indica que el valor de señal filogenética estimado es significativo.

Filomorfoespacio

El filomorfoespacio es un espacio definido con al menos dos variables continuas medidas en diferentes taxa, en cuyo gráfico se superpone la filogenia enlazando los puntos de datos de los taxa. En este gráfico se puede interpretar como evolución convergente al patrón que se observa cuando múltiples ramas del árbol llegan independientemente a la misma área del gráfico (Arbuckle & Speed, 2016). Se construyó un filomorfoespacio entre los dos primeros componentes principales del Análisis de Componentes Principales realizado previamente con las variables fenotípicas del elaióforo de los taxa de *Nierembergia*, al que se superpuso la filogenia del género.

Asociación de las características de los elaióforos con características de los polinizadores

Obtención de variables fenotípicas de polinizadores:

Las variables fenotípicas de los polinizadores se tomaron de un trabajo previo realizado por la Dra. CC Maubecin (2019) como parte de su tesis doctoral en el Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral (IMBIV), a partir del cual se obtuvieron los siguientes datos (ver Apéndice Suplementario 1):

- Identidad y frecuencia de visita de cada especie de polinizador del ensamble de cada uno de los taxa de *Nierembergia*
- Mediciones del cuerpo de los polinizadores de las variables longitud del cuerpo, altura del cuerpo, longitud de primer par de patas y longitud del segundo par de patas, a partir de las cuales se obtuvo un valor promedio, mínimo y máximo para el ensamble de cada taxón de *Nierembergia* (ej. el máximo valor de longitud del cuerpo entre los polinizadores del ensamble de la especie *N. calycina*) y un valor de cada variable correspondiente al polinizador más frecuente del ensamble.

Análisis de Componentes Principales y filomorfoespacio de acuerdo al género de abejas más frecuente en el ensamble

A partir del Análisis de Componentes Principales realizado previamente (ver sección Caracterización fenotípica de elaióforos florales), se colorearon las observaciones de acuerdo al tamaño de los polinizadores abejas chicas (*Chalepogenus*) y abejas grandes (*Tapinotaspis* y *Centris*), también se colorearon de acuerdo a los visitantes más frecuentes del ensamble de cada taxón, con el fin de explorar patrones en la variación de las observaciones de los elaióforos de los taxa de *Nierembergia* en relación al género de polinizadores predominante en el ensamble, debido a que las abejas de los géneros *Chalepogenus*, *Centris* y *Tapinotaspis* son las que visitan más frecuentemente las flores y pertenecen a distintos grupos funcionales (ver Introducción). Asimismo, en el filomorfoespacio construido con los ejes de máxima variación fenotípica, se colorearon los distintos taxa de acuerdo al género de polinizadores predominante en el ensamble.

ANOVAs y Modelos Lineales Generalizados

Para evaluar si los rasgos fenotípicos del elaióforo difieren entre los taxa de *Nierembergia* polinizados por abejas de distinto tamaño (*i.e.* taxa polinizados principalmente por abejas de tamaño grande como *Centris* y *Tapinotaspis* -con un rango de longitud corporal promedio de 9.24 a 13.52 mm- vs. taxa polinizados principalmente por

abejas de tamaño pequeño como *Chalepogenus* -con un rango de longitud corporal promedio de 5.51 a 9.57 mm-) se realizaron Análisis de la Varianza Univariados y test de tukey *a posteriori* de las variables tamaño, extensión y forma del elaióforo, mientras que se utilizaron modelos lineales generalizados para las variables densidad de tricomas, porcentaje de ocupación de la corola y cantidad de aceite, apropiados para variables que presentan una distribución estadísticas distintas de la normal (Zuur *et al.*, 2009). En particular, para la variable porcentaje de ocupación de la corola se utilizó la función *betareg* del paquete *betareg* de R (Cribari-Neto & Zeileis, 2010).

Mínimos cuadrados generalizados filogenéticos

Para evaluar la asociación entre rasgos fenotípicos de los elaióforos y rasgos de los polinizadores, se empleó el método de mínimos cuadrados generalizados filogenéticos (PGLS) (Martins & Hansen, 1997) que consiste en construir modelos lineales (en este caso de regresión) contemplando la estructura de varianza-covarianza de los rasgos que está determinada por la filogenia del grupo en estudio. De este modo, se pueden estimar si las diferencias en los rasgos particulares de los elaióforos florales de las especies de *Nierembergia* están relacionados con alguna característica de los polinizadores, independientemente de su posible asociación con las relaciones filogenéticas.

En estos análisis se construyeron modelos entre cada una de las variables fenotípicas del elaióforo y las siguientes variables fenotípicas de los polinizadores del ensamble de cada taxón de *Nierembergia*:

- Longitud del primer par de patas del polinizador más frecuente del ensamble
- Longitud promedio del primer par de patas de los polinizadores del ensamble
- Longitud del segundo par de patas del polinizador más frecuente del ensamble
- Longitud promedio del segundo par de patas de los polinizadores del ensamble
- Longitud máxima del cuerpo de los polinizadores del ensamble
- Longitud promedio del cuerpo de los polinizadores del ensamble

RESULTADOS

Caracterización fenotípica de elaióforos florales en un marco filogenético

Variación fenotípica de elaióforos florales

Los resultados de los análisis univariados (ANOVA) y modelos lineales generalizados mostraron que los taxa de *Nierembergia* difirieron en todos los rasgos fenotípicos estudiados (Tabla 1 para ANOVAs; 82.932% y 71.191% de la variación explicada por los modelos lineales generalizados de la densidad de tricomas y la cantidad de aceite, respectivamente; $P=0.0001$ para el modelo que explica la variación en el porcentaje de ocupación de la corola). Se observó que en todos los rasgos del elaióforo considerados, el patrón de variación entre taxa fue continuo, de modo que no se observaron grupos discretos que difieran en las variables consideradas (ver gráficos de cajas y resumen estadístico en Apéndice Suplementario 2). El análisis multivariado (MANOVA) reveló que los taxa de *Nierembergia* difirieron en todos los rasgos del elaióforo considerados de manera multivariada, según test de Wilks ($\Lambda = 4.398e-05$; $P<0.05$).

ANOVAs de las variables del elaióforo

Variables	F (P)
Tamaño del elaióforo	34.914 (< 2.2e-16 ***)
Extensión del elaióforo	78.772 (< 2.2e-16 ***)
Forma del elaióforo	66.880 (< 2.2e-16 ***)

Tabla 1. Resultados de ANOVA. Se informan valores F (p).

El valor promedio del tamaño del elaióforo (área del elaióforo) varió entre 49.76 mm² y 130.76 mm², siendo *N. linariifolia* var. *glabriuscula* y *N. linariifolia* var. *pinifolioides* los taxa con elaióforos más pequeños, y *N. calycina* el taxón con elaióforos de mayor tamaño (Apéndice Suplementario 2 , Figura S3).

Con respecto a la extensión del elaióforo desde el centro del limbo hacia la periferia (variable radio del elaióforo), la especie con mayor valor medio fue *N. calycina* con 8.247mm (Figura S4 y Tabla S1 en Apéndice Suplementario 2).

En cuanto a la densidad de tricomas, *N. aristata* mostró los menores valores (31.37 tricomas por mm² en promedio) mientras que *N. browalloides* fue la que presentó mayor densidad de tricomas (106.73 por mm²) (Figura S5 en Apéndice Suplementario 2).

Con respecto al porcentaje de ocupación de la corola (área de la corola/área del elaióforo), *N. scoparia* y *N. ericoides* fueron las especies con menor superficie de la corola ocupada con elaióforo (con un promedio de 9.664%), mientras que *N. veitchii*, *N. browalloides* y *N. graveolens* mostraron una mayor superficie de la corola cubierta de tricomas (con un promedio de 30.12%; Apéndice Suplementario 2, Figura S6).

La cantidad de aceite varió entre los distintos taxa de *Nierembergia* desde un valor mínimo de 1402 tricomas hasta un máximo 13534 tricomas en total. *N. aristata* fue la especie que mostró menor cantidad de aceite (2481 tricomas en promedio; Apéndice Suplementario 2, Tabla S1). Los taxa con mayor cantidad de aceite fueron *N. tucumanensis*, *N. browalloides*, *N. calycina*, *N. pulchella* var. *pulchella* y *N. veitchii* (Apéndice Suplementario 2, Figura S7).

La estimación de la forma del elaióforo mediante dos aproximaciones diferentes arrojó resultados equivalentes (Figuras S8 y S9), por lo que sólo se mostrarán los resultados obtenidos mediante el cociente perímetro/área. Los taxa con elaióforos de forma menos complejas (*i.e.* anulares, con valores de forma entre 0.650 y 0.874) fueron todas las variedades *N. linarlifolia* y *N. graveolens*, *N. pulchella* var. *macrocalyx* y *N. tucumanensis* fueron las especies que presentaron elaióforos de formas más complejas (*i.e.* partidos, con valores de forma entre 2.070 y 2.085). Las restantes especies presentaron valores intermedios de forma (*i.e.* zigzag, con valores de forma entre 1.172 y 1.409) (Figura 5).

En resumen, *N. aristata* fue el taxón que presentó elaióforos de complejidad intermedia en su forma y comparativamente poca cantidad y densidad de tricomas. *N. browalloides* y *N. veitchii* fueron las especies que tuvieron mayor cantidad y densidad de

tricomas, ocupando gran parte de la corola. Por otro lado, *N. calycina* tuvo los elaióforos de mayor tamaño y extensión.

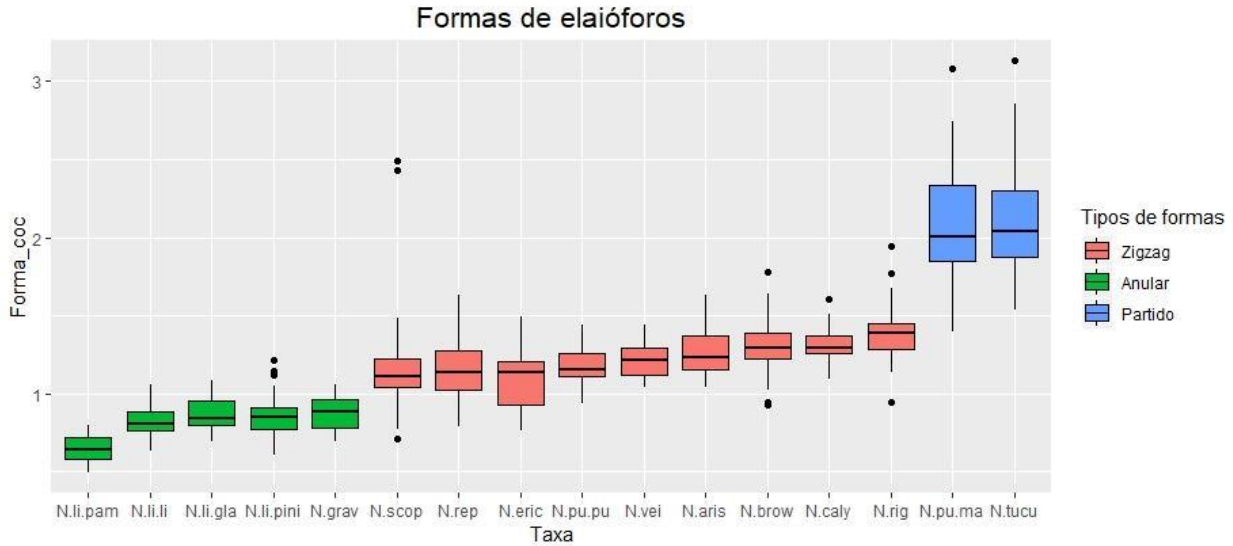
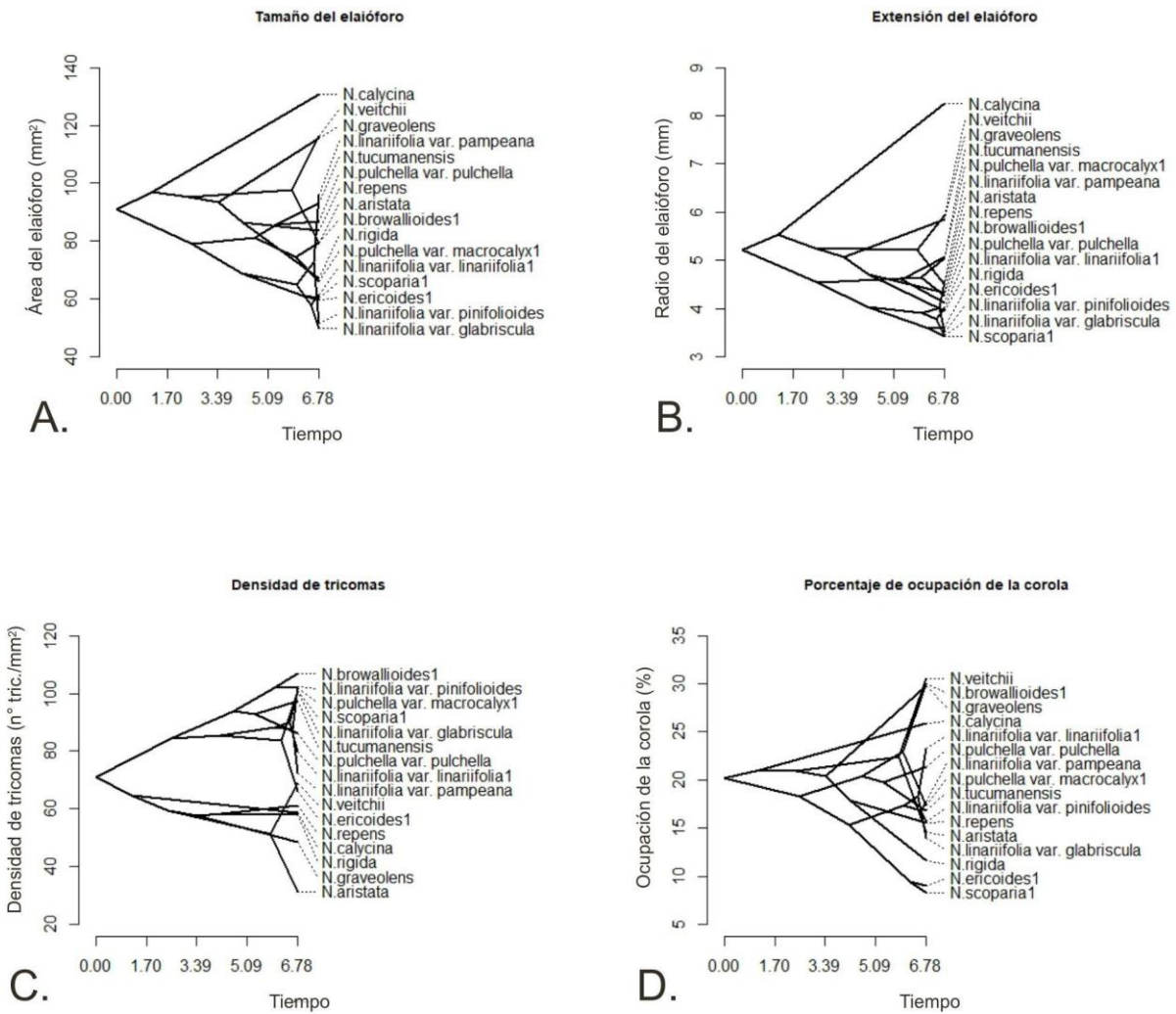


Figura 5. Gráfico de caja de la variable Forma del elaióforo (obtenida a partir del cociente perímetro/área). En colores se resaltan la clasificación cualitativa en tipos de elaióforo a partir de los valores obtenidos.

Filofenogramas

Se observó que algunos caracteres fenotípicos del elaióforo se encontraron parcialmente conservados dentro de los grandes clados de la filogenia, como en el caso de la densidad de tricomas, la extensión del elaióforo y la forma entre las variedades de *N. linariifolia*, lo que se pudo observar en el poco entrecruzamiento de ramas. Sin embargo, en la mayoría de las variables se observó convergencia fenotípica, de modo que algunos taxa se alejaron de los taxa cercanamente emparentados en los filofenogramas (ej. *N. linariifolia* var. *pampeana* se alejó considerablemente de las restantes variedades de *N. linariifolia* en los filofenogramas de tamaño, extensión del elaióforo y cantidad de aceite, así como *N. veitchii* y *N. calycina* en el filofenograma de la cantidad de aceite; Figura 6). Asimismo, en el filofenograma del porcentaje de ocupación de la corola se observó gran entrecruzamiento de ramas. En resumen, a nivel filogenético, no se observaron patrones

fenotípicos del elaióforo compartidos dentro de los clados de la filogenia, sino que los taxa presentan combinaciones particulares de rasgos.



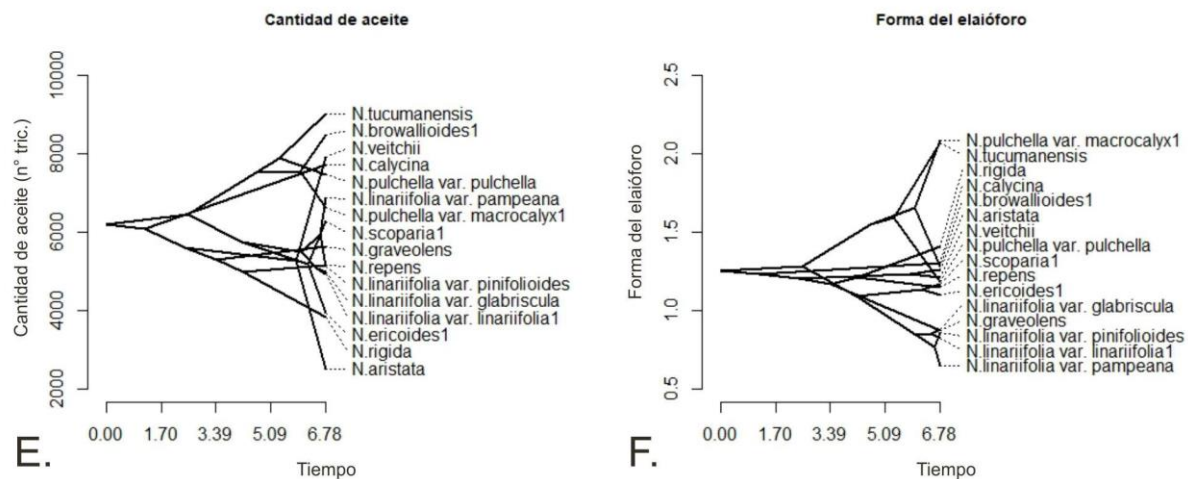


Figura 6. Filofenogramas de rasgos del elaióforo de los taxa de *Nierembergia*. A) Tamaño del elaióforo, B) Extensión del elaióforo, C) Densidad de tricomas, D) Porcentaje de ocupación de la corola, E) Cantidad de aceite, F) Forma del elaióforo.

Mapeo y reconstrucción ancestral de la forma

La reconstrucción ancestral de la forma del elaióforo mostró que el ancestro común de todos los taxa presentó un 70.2% de probabilidad de elaióforo con forma zigzag (Figura 7). La forma anular habría surgido independientemente dos veces en la filogenia, una involucrando a *N. linariifolia* y todas sus variedades y la otra transición se habría producido en el ancestro común del clado que reúne a *N. repens*, *N. rigida* y *N. graveolens* afectando a ésta última especie. Por último, la forma partida habría surgido únicamente en el clado de *N. tucumanensis* y *N. pulchella* var. *macrocalyx*, especies cercanamente emparentadas. En general, estos resultados muestran que la forma del elaióforo es un rasgo bien conservado entre los taxa de *Nierembergia*.

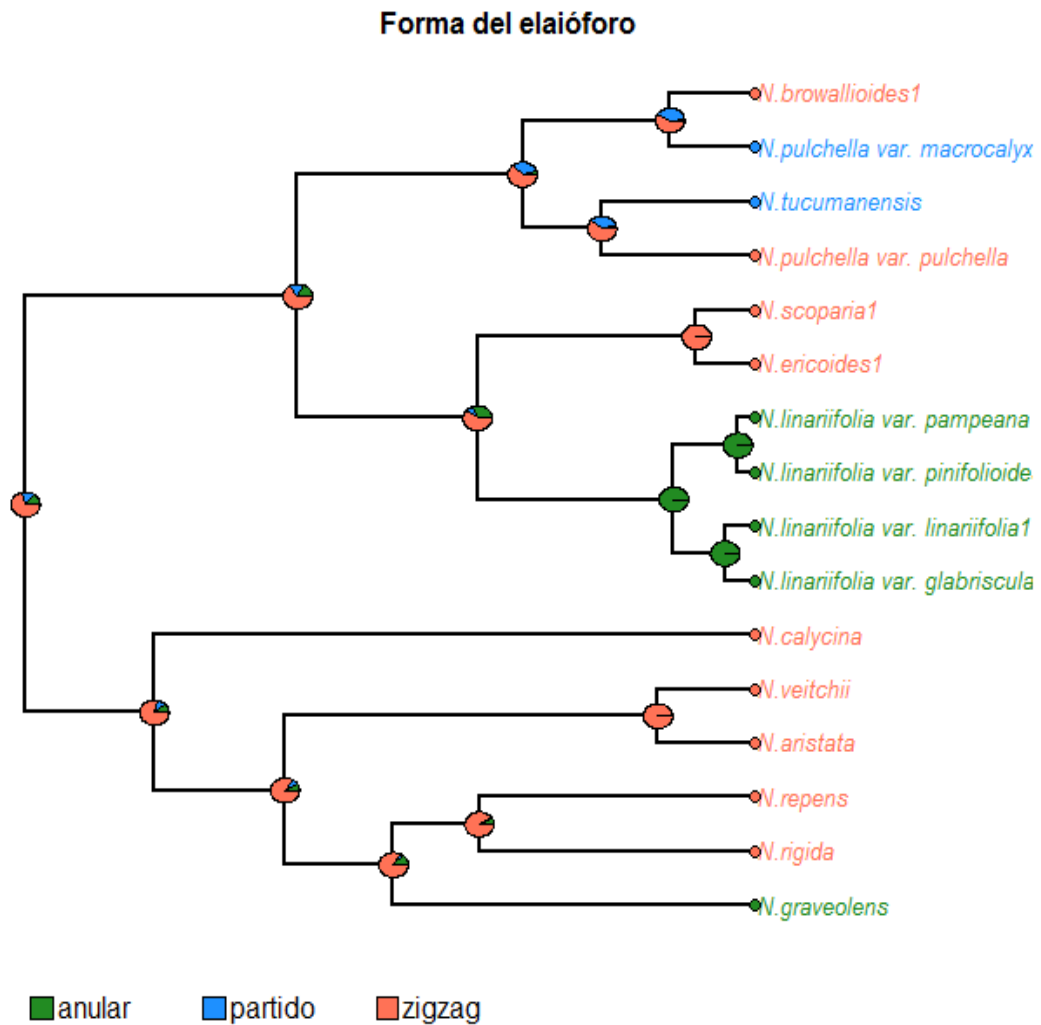


Figura 7. Mapeo y reconstrucción ancestral de la forma del elaióforo en los taxa de *Nierembergia*. Los gráficos de torta en los nodos indican la probabilidad de cada estado del rasgo en cada nodo, a partir de 500 árboles bayesianos.

Señal filogenética

En general, los parámetros de señal filogenética estimados (K de Blomberg y λ de Pagel) mostraron valores variables entre los rasgos considerados, y en general el valor P no fue significativo (Tabla 2). Sin embargo, la extensión del elaióforo mostró una señal filogenética alta y significativa, tanto para K como para λ , lo que sugiere que las relaciones de parentesco entre taxa están influenciando fuertemente los valores de esta variable (Tabla 2). Asimismo,

la variable densidad de tricomas mostró señal filogenética intermedia significativa (sólo en el parámetro λ), sugiriendo que los valores de esta variable se encontraron parcialmente asociados a la estructura filogenética (Tabla 2).

Señal filogenética

Variabes	K	P	λ	P
Tamaño del elaióforo	0.266	0.278	0.480	0.148
Extensión del elaióforo	0.670	0.016*	0.882	0.019*
Densidad de tricomas	0.307	0.154	0.527	0.016*
Porcentaje de ocupación de la corola	0.296	0.165	0.000	1
Cantidad de aceite	0.267	0.270	0.143	0.797
Forma del elaióforo	0.473	0.060	0.627	0.130

Tabla 2. Señal filogenética de cada variable del elaióforo calculada mediante los estimadores K de Blomberg (K) y λ de Pagel (λ) y su significancia estadística (P). En negrita se resaltan valores de P significativos.

Variación conjunta de rasgos de los elaióforos

El cálculo de correlaciones entre las variables fenotípicas del elaióforo mostró que existen correlaciones negativas y positivas entre rasgos. Entre las variables, la forma del elaióforo fue la que tuvo menores valores de correlación con los restantes rasgos (Tabla 3). El tamaño del elaióforo se relacionó positivamente con las variables extensión del elaióforo ($r=0.865$), porcentaje de ocupación de la corola ($r=0.652$), cantidad de aceite ($r=0.627$) y tamaño de la corola ($r=0.174$). Esto indica que los elaióforos más grandes fueron más extensos, ocuparon mayor porcentaje del área de la corola y presentaron una mayor cantidad de aceite. Por otra parte, el tamaño del elaióforo se relacionó negativamente con

la densidad de tricomas ($r = -0.42$), por lo tanto indica que elaióforos grandes tuvieron menos densidad de tricomas que elaióforos pequeños (Tabla 3).

Correlaciones pareadas entre las variables del elaióforo

	Extensión del elaióforo	Densidad de tricomas	Tamaño del elaióforo	Área de la corola	Forma del elaióforo	Porcentaje de ocupación	Cantidad de aceite
Extensión del elaióforo	1.000	-0.348	0.865	0.041	0.073	0.609	0.480
Densidad de tricomas		1.000	-0.422	-0.304	0.202	-0.075	0.454
Tamaño del elaióforo			1.000	0.176	-0.129	0.646	0.577
Área de la corola				1.000	0.021	-0.580	-0.039
Forma del elaióforo					1.000	-0.144	0.095
Porcentaje de ocupación						1.000	0.519
Cantidad de aceite							1.000

Tabla 3. Correlaciones entre rasgos del elaióforo de los taxa de *Nierembergia*.

Análisis de Componentes Principales

Los dos primeros ejes del Análisis de Componentes Principales explicaron cerca del 74.1% de la variabilidad fenotípica del elaióforo y se observó que los taxa se encuentran ampliamente distribuidos en el espacio fenotípico, en donde existe cierto grado de solapamiento entre algunos de ellos (Figura 8). El eje de máxima variación (PC1) estuvo asociado principalmente al tamaño y la extensión del elaióforo, mientras que el segundo componente (PC2) estuvo relacionado fundamentalmente con la densidad de tricomas y la cantidad de aceite (Tabla 4). Algunas especies como *N. tucumanensis* y *N. veitchii*

presentaron mayor variación (*i.e.* tamaño de las elipses) en comparación con otras especies como *N. aristata* y *N. repens*.

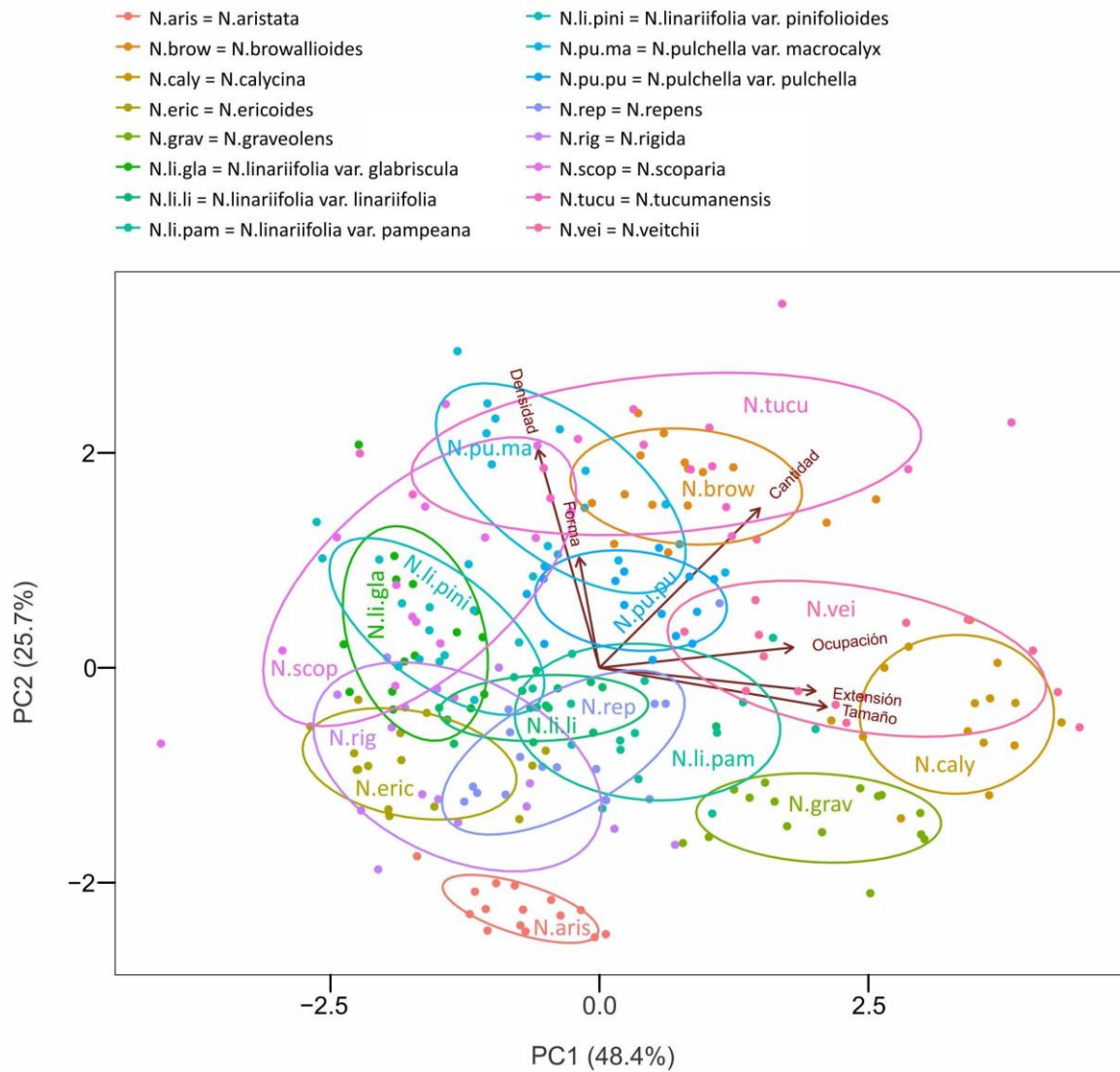


Figura 8. Análisis de Componentes Principales realizado con las variables fenotípicas del elaióforo de los taxa de *Nierembergia*. Las elipses agrupan el 95% de la variación.

Contribución de las variables fenotípicas a los dos primeros componentes principales

Variables	PC1	PC2
Tamaño del elaióforo	0.559	-0.132
Extensión del elaióforo	0.531	-0.079
Densidad de tricomas	-0.151	0.736
Porcentaje de ocupación de la corola	0.477	0.069
Cantidad de aceite	0.392	0.542
Forma del elaióforo	-0.050	0.370

Tabla 4. Contribución de las variables fenotípicas a los dos primeros componentes principales. En negrita se resaltan las variables con mayor contribución a cada uno de los ejes.

Filomorfoespacio

Los resultados del análisis de filomorfoespacio muestran que algunos linajes de *Nierembergia*, como el clado compuesto por *N. browallioides*, *N. tucumanensis*, *N. pulchella* var. *pulchella* y *N. pulchella* var. *macrocalyx*, ocupan regiones discretas del morfoespacio, donde los taxos más cercanamente emparentados se encuentran próximos en el espacio multivariado, sugiriendo, para esos taxa, la existencia de inercia filogenética en el fenotipo del elaióforo (Figura 9). Por otro lado, también se observó que especies hermanas como *N. aristata*/*N. veitchii*, *N. rigida*/*N. graveolens*, *N. scoparia*/*N. ericoides* y las 4 variedades de *N. linariifolia* se recuperan notablemente separadas en el filomorfoespacio (Figura 9).

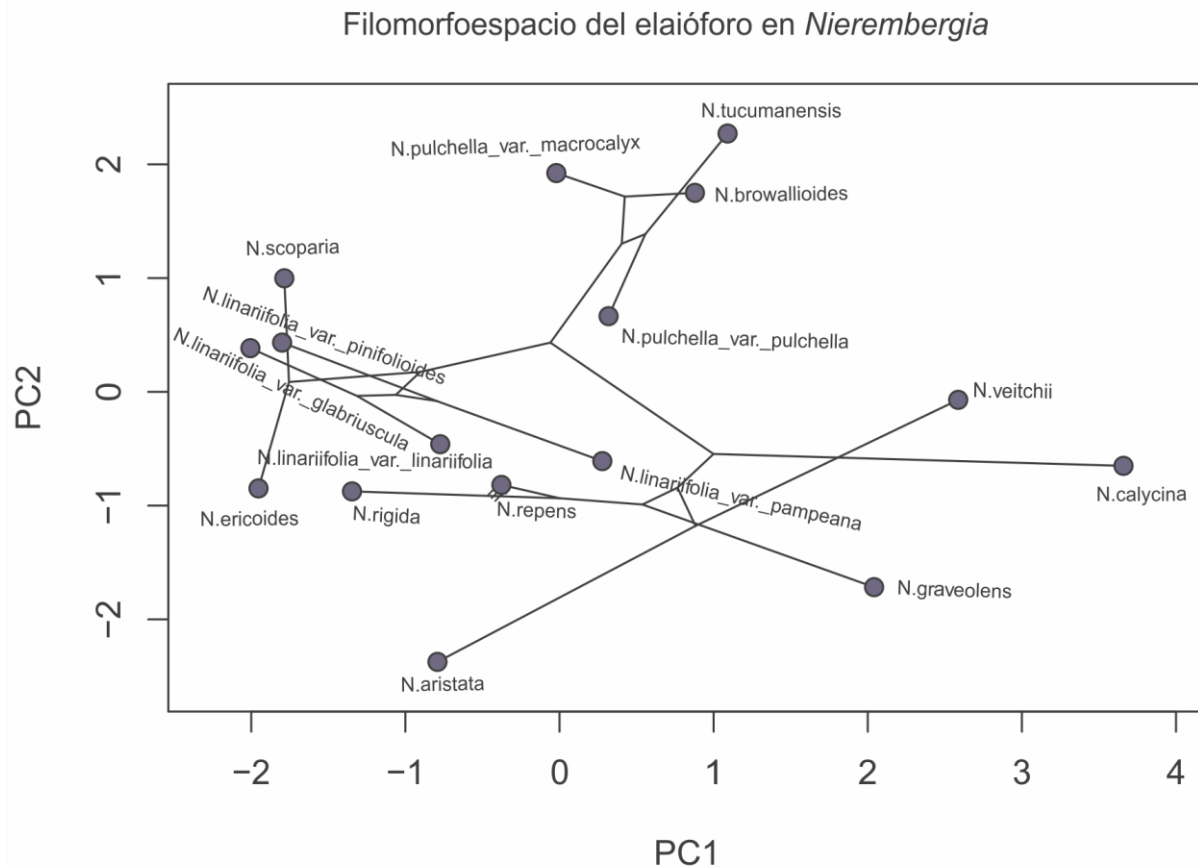


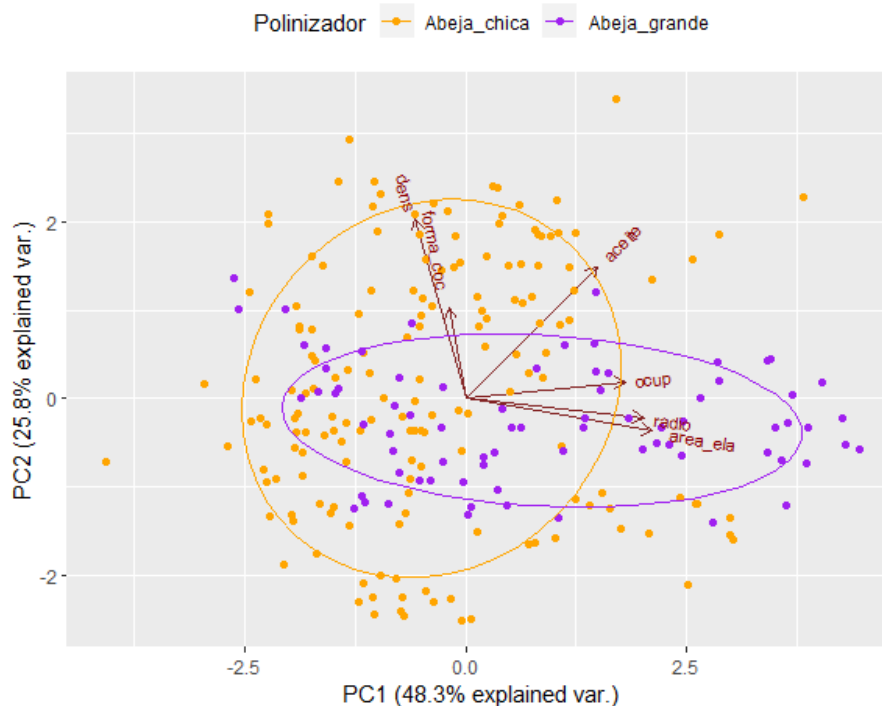
Figura 9. Filomorfoespacio construido con los dos primeros ejes de máxima variación fenotípica (PC1 y PC2) del elaióforo de las flores de *Nierembergia*.

Asociación de las características de los elaióforos de *Nierembergia* con características de los polinizadores

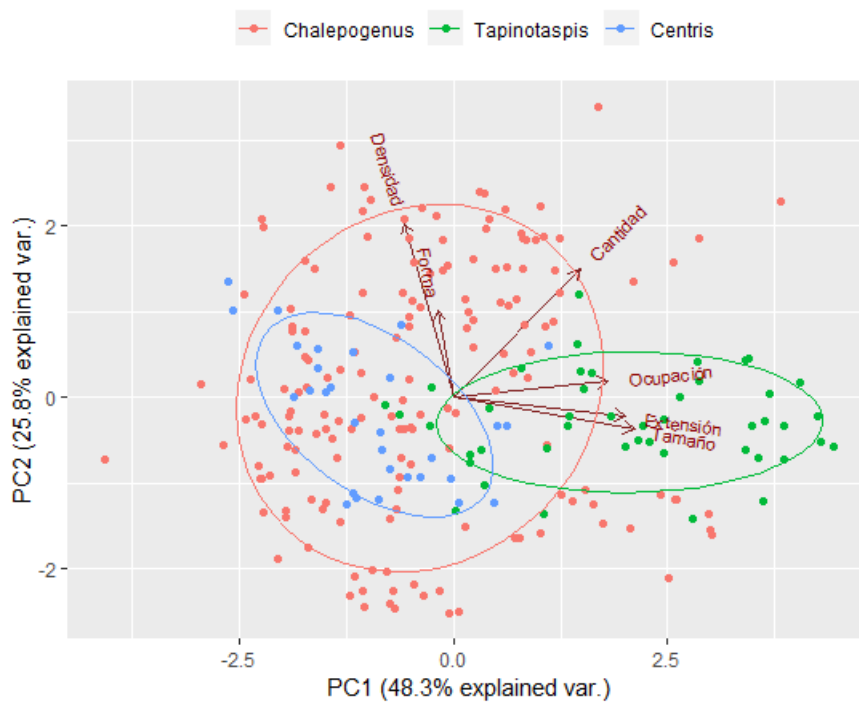
Análisis de componentes principales con las variables del elaióforo en función de los polinizadores más frecuentes.

Se observó que hay solapamiento en el espacio multivariado que ocupan las observaciones de elaióforos de los taxa de *Nierembergia* que son visitados por abejas chicas (*Chalepogenus*) y abejas grandes (*Tapinotaspis* y *Centris*). A su vez los elaióforos de especies visitadas por abejas de tamaño chico (*Chalepogenus*) presentan una gran variación en relación a todas las variables consideradas, ocupando gran parte del espacio multivariado. Los elaióforos de flores que son forrajeados por abejas de mayor tamaño (*Centris* y

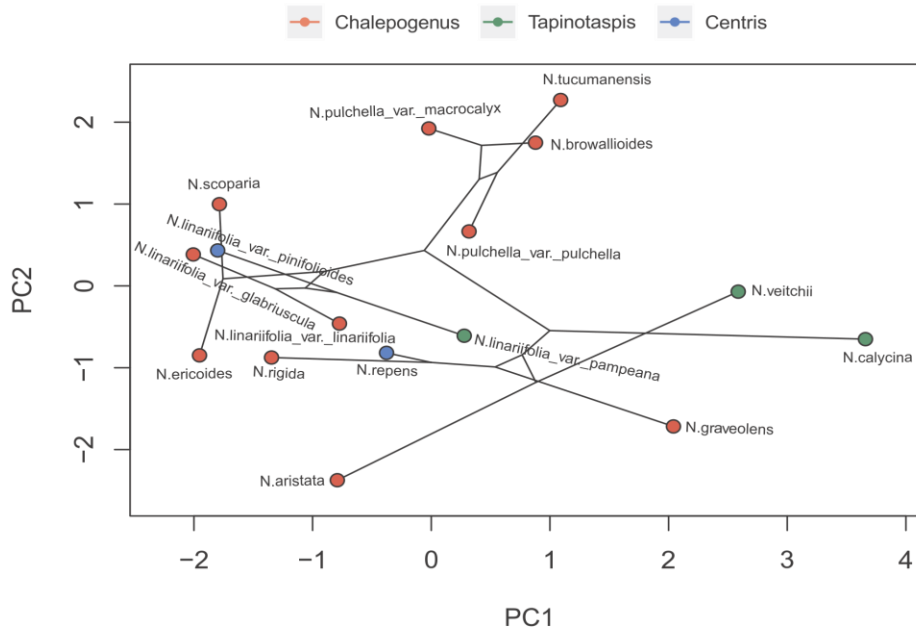
Tapinotaspis) presentan una menor o similar densidad de tricomas que los que son forrajeados por *Chalepogenus* (figura 10 A). Se observó que hay solapamiento en el espacio multivariado que ocupan las observaciones de elaióforos de los taxa de *Nierembergia* que son visitados principalmente por abejas de los géneros *Centris* y *Chalepogenus*, mientras que los elaióforos de flores que son visitadas principalmente por *Tapinotaspis* se encuentran parcialmente solapados con aquellos de flores visitadas por otros géneros de abejas (Figura 10B). Los elaióforos de especies visitadas por *Chalepogenus* presentan una gran variación en relación a todas las variables consideradas, ocupando gran parte del espacio multivariado. Los elaióforos de flores que son forrajeados por abejas de *Centris* y *Tapinotaspis* presentan una menor o similar densidad de tricomas que los que son forrajeados por *Chalepogenus*. De acuerdo a este ordenamiento, *Tapinotaspis* visita flores con elaióforos de mayor tamaño y extensión que los demás géneros de abejas, y que además ocupan una mayor parte de la corola. El filomorfoespacio reveló que hay convergencia fenotípica en cuanto a las especies de *Nierembergia* que son visitadas predominantemente por abejas de los géneros *Centris* y *Tapinotaspis* (Figura 10C).



A.



B.



C.

Figura 10. Análisis de Componentes Principales (A) de las variables fenotípicas de los elaióforos de *Nierembergia* pintados en relación al tamaño del polinizador, (B) Análisis de Componentes Principales y filomorfoespacio (C) en relación al género de polinizadores más frecuente en los ensambles de polinizadores.

ANOVAS y Modelos Lineales Generalizados

Se encontraron diferencias significativas en el tamaño de los elaióforos entre flores visitadas por abejas grandes (*i.e. Centris* y *Tapinotaspis*) y abejas pequeñas (*i.e. Chalepogenus*) ($F= 9.069$, $p=0.009$; Figura 11), así como con respecto a la variable extensión del elaióforo ($F= 6.152$, $p=0.027$; Figura 11). Para las demás variables no se encontraron diferencias significativas entre los grupos propuestos. De este modo, los taxa de *Nierembergia* polinizados predominantemente por abejas grandes presentaron elaióforos de mayor tamaño y extensión (con un tamaño promedio de 106.643 mm^2 y una extensión promedio de 5.771 mm) que aquellos taxa polinizados predominantemente por abejas pequeñas, que presentaron elaióforos de menor tamaño (72.639 mm^2 en promedio) y extensión (4.239 mm en promedio) (Figura 11). Por otro lado, a pesar de que se observó que los valores medios de densidad de tricomas y cantidad de aceite difieren entre los grupos de taxa propuestos (Figura 11), los modelos lineales generalizados sólo explicaron un 9.99% de la variación en el caso de la densidad de tricomas, y un 7.52% de la variación en el caso de la cantidad de aceite.

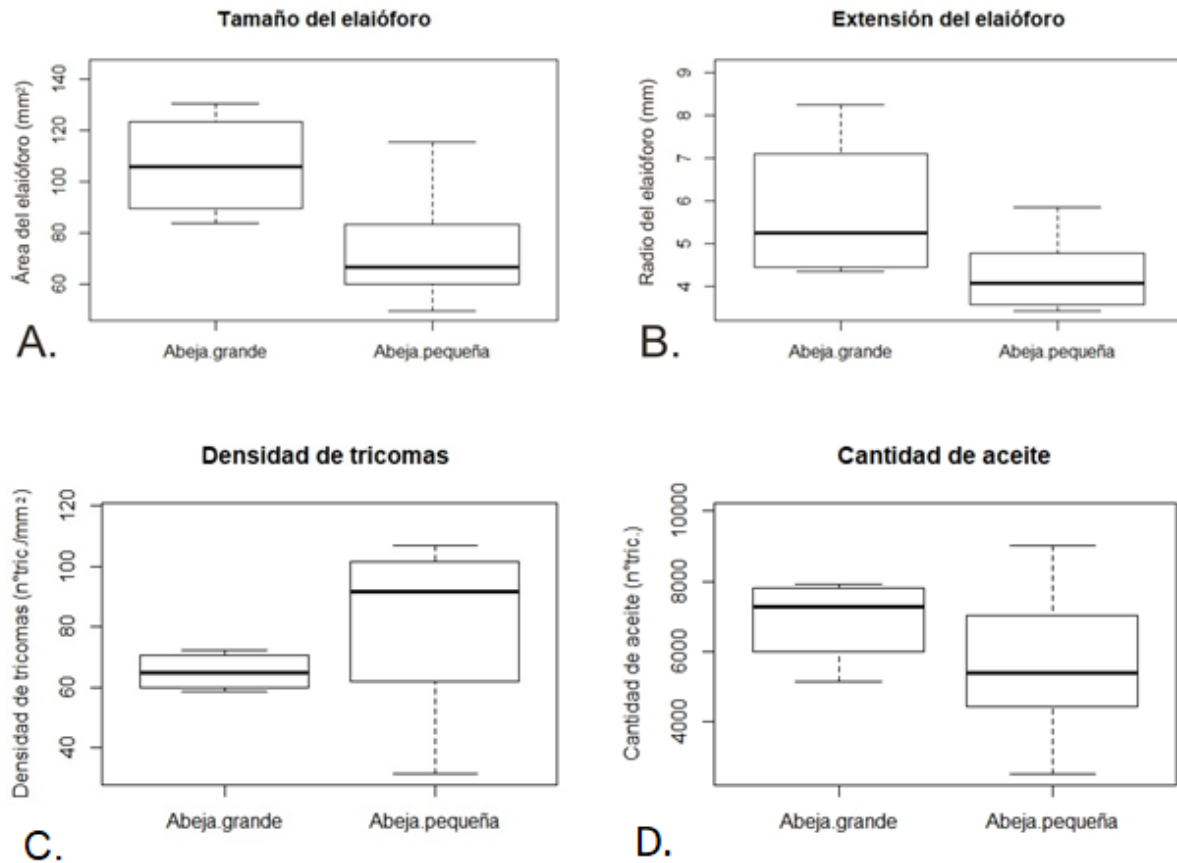


Figura 11. Gráficos de Boxplot realizados a partir de los ANOVAS significativos. A) Tamaño del elaióforo ; B) Extensión del elaióforo ; C) Densidad de tricomas y D) Cantidad de aceite.

Mínimos cuadrados generalizados filogenéticos

Los análisis de PGLS mostraron que hay asociación positiva entre el tamaño, la extensión del elaióforo y la cantidad de aceite con la longitud del primer y segundo par de patas del polinizador más frecuente (Tabla 5). Esto indicó que las flores de los taxa de *Nierembergia* que son frecuentemente polinizados por abejas de patas largas presentaron elaióforos de mayor tamaño, más extensos y con mayor cantidad de aceite que los de aquellos taxa cuyas flores son polinizadas por abejas de patas más cortas (Figura 12, 13 y 14). Por otro lado, se encontró que la densidad de tricomas está asociada negativamente con la longitud del primer y segundo par de patas del polinizador más frecuente. Esto indica que las flores de los taxa de *Nierembergia* que son frecuentemente polinizados por abejas

de patas largas presentaron elaióforos menos densos que los de taxa polinizados por abejas con patas más cortas (Figura 15).

Mínimos Cuadrados Generalizados Filogenéticos

Variables fenotípicas del elaióforo	Variables fenotípicas de polinizadores					
	pata1_frec	pata1_prom	pata2_frec	pata2_prom	long.max.polin	long.prom.polin
Tamaño del elaióforo	10.465 (0.000)	10.418 (0.07)	7.837 (0.000)	8.469 (0.036)	2.575 (0.268)	4.997 (0.145)
Extensión del elaióforo	0.258 (0.006)	0.179 (0.365)	0.191 (0.005)	0.155 (0.256)	0.035 (0.639)	0.079 (0.48)
Densidad de tricomas	-6.19 (0.014)	-2.726 (0.602)	-4.933 (0.000)	-3.460 (0.337)	0.988 (0.618)	-0.778 (0.794)
Porcentaje de ocupación de la corola	0.521 (0.53)	-1.083 (0.484)	0.406 (0.507)	-0.643 (0.552)	-0.575 (0.322)	-0.699 (0.425)
Cantidad de aceite	461.286 (0.025)	624.031 (0.119)	327.385 (0.032)	440.099 (0.115)	225.928 (0.138)	313.287 (0.173)
Forma del elaióforo	-0.045 (0.21)	-0.055 (0.417)	-0.035 (0.183)	-0.046 (0.33)	-0.017 (0.496)	-0.031 (0.414)

Tabla 5. Resultados de las regresiones realizadas por el método de Mínimos Cuadrados Generalizados Filogenéticos entre las variables fenotípicas del elaióforo (tamaño y extensión del elaióforo, densidad de tricomas, porcentaje de ocupación de la corola, cantidad de aceite y forma del elaióforo) y longitud del 1^{er} y 2^{do} par de patas del polinizador más frecuente (pata1_frec, pata2_frec), longitud promedio del 1^{er} y 2^{do} par de patas del polinizador (pata1_prom, pata2_prom) y longitud de los polinizadores (long.max.polin y long.prom.polin). En cada caso, se indica el valor de R^2 y el P de significancia. En negrita se indican las asociaciones que resultaron significativas.

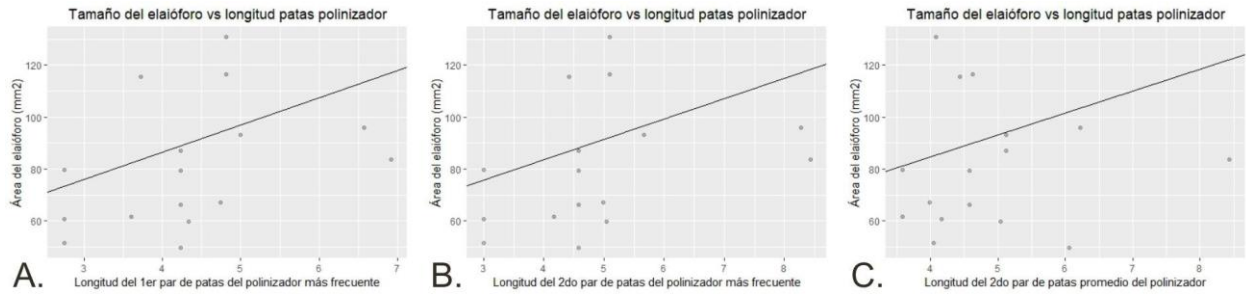


Figura 11. Gráficos de PGLS. A) Tamaño del elaióforo vs longitud del 1^{er} par de patas del polinizador más frecuente. B) Tamaño del elaióforo vs longitud del 2^{do} par de patas del polinizador más frecuente. C) Tamaño del elaióforo vs longitud promedio del 2^{do} par de patas del polinizador más frecuente.

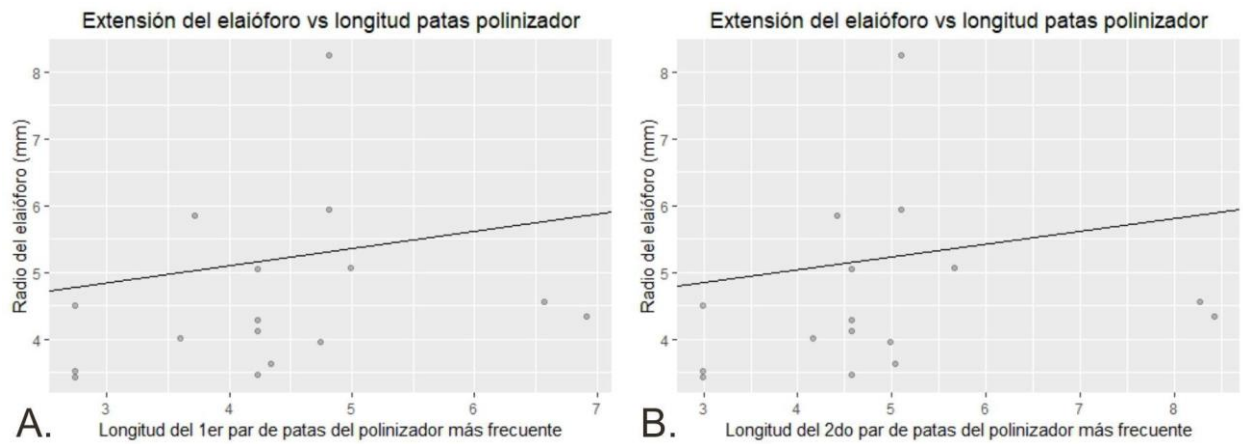


Figura 12. Gráficos de PGLS. A) Extensión del elaióforo vs longitud del 1^{er} par de patas del polinizador más frecuente. B) Extensión del elaióforo vs longitud del 2^{do} par de patas del polinizador más frecuente.

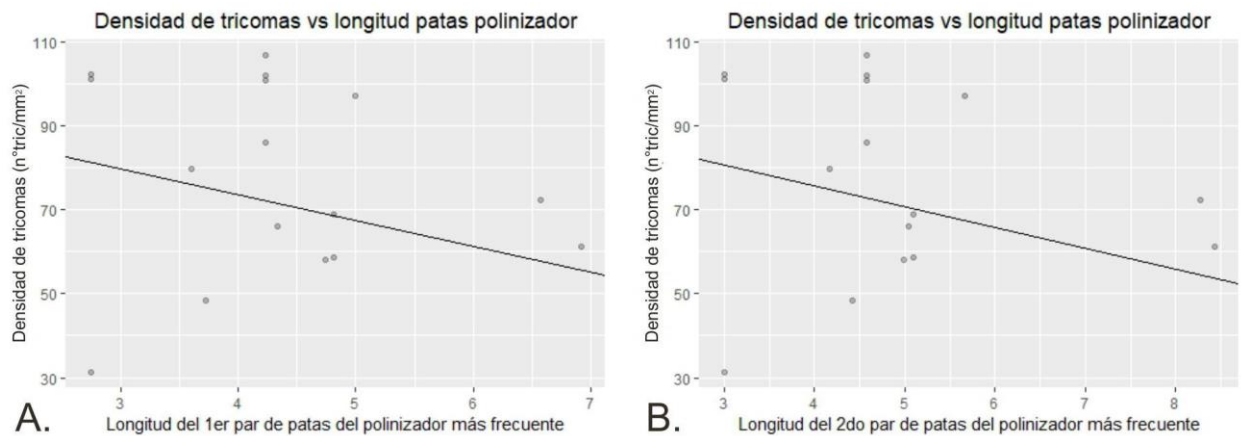


Figura 13. Gráficos de PGLS. A) Densidad de tricomas vs longitud del 1^{er} par de patas del polinizador más frecuente. B) Densidad de tricomas vs longitud del 2^{do} par de patas del polinizador más frecuente.

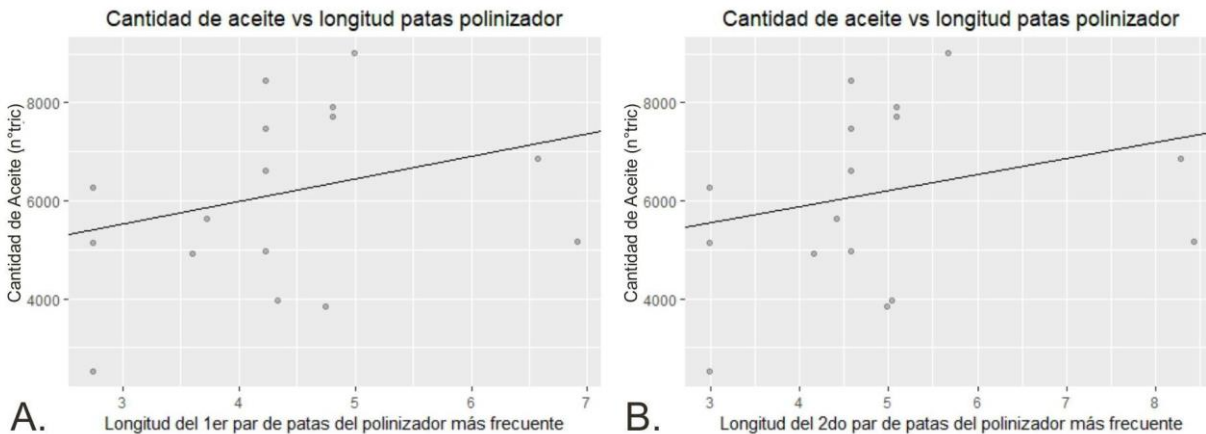


Figura 14. Gráficos de PGLS. A) Cantidad de aceite vs longitud del 1^{er} par de patas del polinizador más frecuente. B) Cantidad de aceite vs longitud del 2^{do} par de patas del polinizador más frecuente.

DISCUSIÓN

A pesar de que se han realizado diversos estudios acerca de los elaióforos florales, en general éstos han explorado la variación desde un abordaje microscópico y meramente descriptivo, de modo que la conexión entre la variación morfológica y los mecanismos de evolución fenotípica ha sido poco examinada en este contexto. Luego de realizar una búsqueda bibliográfica exhaustiva, consideramos que este es el primer trabajo comparativo que indaga en los factores que pudieran estar influyendo en la evolución de la configuración morfológica de los elaióforos a nivel macroevolutivo y en el valor adaptativo de estos rasgos florales. Este tipo de preguntas sólo había sido abordada en relación a otro tipo de recompensas florales, el néctar (Chalcoff *et al.*, 2017), por lo que en este sentido, el presente trabajo contribuye fundamentalmente al debate histórico sobre cuáles son las principales fuerzas que condicionan los atributos de las recompensas florales (*i.e.* factores bióticos vs. otros factores), y al considerar las relaciones filogenéticas entre taxa, además proporciona evidencia sólida a favor de la asociación entre ciertos rasgos del elaióforos y los polinizadores.

Los resultados de este trabajo muestran que en *Nierembergia* los elaióforos de las distintas especies en general presentan una distribución espacial de tricomas conservada

(i.e. forma en zigzag) pero varían considerablemente en cuanto a tamaño, extensión, cantidad de aceite y densidad de tricomas. En relación a los factores que moldean el fenotipo del elaióforo de los taxa de *Nierembergia*, encontramos que éstos poseen algunos rasgos que se encuentran compartidos entre taxa cercanamente emparentados, es decir que se encuentran conservados a nivel filogenético, mientras que otros rasgos del fenotipo del elaióforo están asociados a características de los polinizadores. Los rasgos estudiados del elaióforo de *Nierembergia* se correlacionaron fuertemente entre sí, lo que no resulta sorprendente ya que se originan del mismo meristema floral (Conner & Sterling 1995, Diggle 2002). El tamaño, la extensión, el porcentaje de ocupación y la cantidad de aceite son atributos que se asociaron positivamente. Sin embargo, elaióforos de mayores dimensiones presentaron una baja densidad de tricomas, es decir que no aumentaron su número de tricomas sino sólo el área en donde se distribuyen dichos tricomas. Además cabe destacar que el tamaño del elaióforo no está relacionado al tamaño de la corola, lo que indica que el primero no es un rasgo alométrico, reforzando la hipótesis de que puede ser un rasgo bajo selección mediada por polinizadores y que podría evolucionar independientemente del tamaño de la flor. En este trabajo encontramos que los visitantes florales con mayor longitud de patas favorecerían elaióforos grandes, extensos, con poca densidad de tricomas y con gran cantidad de aceite. Este hallazgo contribuye a la evidencia presentada en otros trabajos previos en sistemas de flores oleíferas y abejas recolectoras de aceite, donde se observó que la longitud de las patas recolectoras está asociada a características del elaióforo o de la estructura contenedora de aceites (Vogel, 1974; Steiner y Whitehead 1990, 1991). Algunas de estas variables además mostraron convergencia fenotípica, lo que podría considerarse como evidencia de las presiones de selección ejercidas por polinizadores (Fenster, 2004). De acuerdo a los resultados obtenidos, se podría concluir que la variación fenotípica de los elaióforos en taxa de *Nierembergia* es el resultado de la acción conjunta de factores históricos (filogenéticos) y bióticos (presión selectiva por polinizadores); no obstante, no se puede descartar la acción de otros factores no considerados en este trabajo.

Se observó que algunos rasgos del elaióforo no sólo están relacionados a características de las abejas recolectoras en general, como tamaño de las patas

recolectoras, sino que también difieren de acuerdo a características más particulares de los polinizadores, como el tipo de forrajeo que realizan y las estructuras presentes en las patas recolectoras. Los elaióforos de las flores que son forrajeados predominantemente por especies de abejas de tamaño grande, como *Centris* y *Tapinotaspis* difieren principalmente en tamaño, extensión, cantidad de aceite y densidad de tricomas de los que son forrajeados por *Chalepogenus*. Sin embargo, en el ordenamiento multivariado a partir del PCA (Figura 10) se observó que los elaióforos de las especies visitadas predominantemente por *Tapinotaspis* presentan mayor tamaño y extensión que los de flores visitadas por los *Chalepogenus* y *Centris*, y que además ocupan una mayor parte de la corola. En este ordenamiento se esperaba confirmar a nivel multivariado que los elaióforos de especies visitadas por abejas grandes (*i.e.* *Centris* y *Tapinotaspis*) compartían características, como gran tamaño y cantidad de aceite, y difieren mayormente de los de especies visitadas predominantemente por abejas pequeñas. Sin embargo, cabe señalar que los análisis realizados para evaluar la relación entre los rasgos del elaióforo y de los polinizadores se basaron en las especies de polinizadores más predominantes en el ensamble de cada taxón de *Nierembergia*. En este sentido, esto implica una simplificación de la gran diversidad de polinizadores presentes en los ensambles de los taxa de *Nierembergia* (Buchmann, 1987; Cocucci, 1991; Cosacov *et al* 2008; Renner & Schaefer, 2010; Neff & Simpson, 2017; Maubecin, 2019). Es posible que el polinizador más frecuente del ensamble ejerza presiones de selección más intensas sobre algunos rasgos del fenotipo, por lo que al considerar rasgos de manera individual estos efectos quedan en evidencia, mientras que a nivel multivariado no solo se observa la variación en los rasgos sino también las relaciones que existen entre los distintos rasgos del elaióforo, sobre las que también actúan distintas presiones de selección impuestas por los polinizadores. Por otro lado, la configuración multivariada de los elaióforos podría estar relacionada no sólo al tamaño general del cuerpo del polinizador sino también a otro tipo de rasgos. Si bien, la longitud de las patas de *Tapinotaspis* supera a las de *Chalepogenus* y no supera a las de *Centris*, *Tapinotaspis* difiere de las otras abejas en el comportamiento de forrajeo que realizan al arribar a la flor. *Centris* y *Chalepogenus* se posan en el limbo de la corola y con sus patas delanteras barren la superficie del elaióforo

con movimientos de barrido utilizando su primer par de patas, en las que poseen peines muy particulares y almohadillas absorbentes, y que en el caso de *Centris* además incluyen un aparato recolector de aceite que se denomina elaiospata u órgano en cuchara (Neff & Simpson, 1981, Cocucci *et al.*, 2000). *Tapinotaspis*, en cambio, se sujeta de las anteras con las patas delanteras y con movimientos alternos de las patas medias (único par de patas con estructuras recolectoras) recolecta el aceite (Cocucci, 1991). Las patas medias de las abejas de *Tapinotaspis* son proporcionalmente más largas que sus patas delanteras. Es posible, por lo tanto, que el fenotipo de las abejas, definido de una manera más amplia (*i.e.* considerando también el comportamiento de forrajeo y la configuración) esté afectando diferencialmente algunos rasgos del elaióforo.

Finalmente, en futuros estudios sería importante seguir profundizando en dilucidar aún más si el fenotipo del elaióforo está respondiendo a múltiples factores extrínsecos como la variación geográfica y climática, por lo tanto, se podrían tener en cuenta también la latitud y longitud, la altitud, y el régimen de temperaturas y precipitaciones de los lugares donde se tomaron las muestras para poder discernir si hay otros factores influyendo en la variabilidad entre los taxa. También sería recomendable incluir más de una población por especie para considerar la variación intraespecífica.

CONCLUSIONES

Concluimos que el fenotipo del elaióforo en los taxa de *Nierembergia* presenta rasgos conservados filogenéticamente (por ejemplo; forma del elaióforo) y rasgos que mostraron convergencia fenotípica (por ejemplo; tamaño del elaióforo, cantidad de aceite, porcentaje de ocupación de la corola), a su vez estos últimos estuvieron asociados al tamaño del polinizador y la longitud de sus patas recolectoras.

Sugiriendo que estos rasgos podrían tener un valor adaptativo y que la evolución de estos rasgos podría estar influida por la presión de selección mediada por polinizadores.

Los patrones de variación fenotípica observados en un marco filogenético y la asociación de ciertos rasgos con características de los polinizadores indican que la variación fenotípica de los elaióforos de *Nierembergia* sería el resultado de la acción conjunta de factores históricos

y bióticos; no obstante, no se puede descartar la acción de otros factores no considerados en este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta, M. C., Moscone, E. A., & Cocucci, A. A. (2016). Using chromosomal data in the phylogenetic and molecular dating framework: karyotype evolution and diversification in *Nierembergia* (Solanaceae) influenced by historical changes in sea level. *Plant Biology*, *18*(3), 514-526.

Alves-dos-Santos, I., Machado, I. C., & Gaglianone, M. C. (2007). História natural das abelhas coletoras de óleo. *Oecologia Brasiliensis*, *11*(4), 544-557.

Arbuckle, K., & Speed, M. P. (2016). Analysing convergent evolution: A practical guide to methods. In *Evolutionary biology* (pp. 23-36). Springer, Cham.

Bernardello, G. (2007) En *Nectaries and nectar* (pp. 19-128). Springer Netherlands.

Blomberg, S. P., Garland, T., & Ives, A. R. (2003). Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution*, *57*(4), 717-745.

Buchmann, S. L. (1987). The ecology of oil flowers and their bees. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *18*(1), 343-369.

Chalcoff, V. R., Gleiser, G., Ezcurra, C., & Aizen, M. A. (2017). Pollinator type and secondarily climate are related to nectar sugar composition across the angiosperms. *Evolutionary ecology*, *31*(4), 585-602.

Cocucci, A. A. (1991). Pollination biology of *Nierembergia* (Solanaceae). *Plant Systematics and Evolution*, *174*(1-2), 17-35.

Cocucci, A. A., Sérsic, A., & Roig-Alsina, A. (2000). Oil-collecting structures in Tapinotaspidini: their diversity, function and probable origin. *Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft*, *90*, 51-74.

Cocucci, A. A., & Vogel, S. (2001). Oil-producing flowers of *Sisyrinchium* species (Iridaceae) and their pollinators in southern South America. *Flora*, *196*(1), 26-46.

- Conner, J. K., & Sterling, A.** (1995). Testing hypotheses of functional relationships: a comparative survey of correlation patterns among floral traits in five insect-pollinated plants. *American Journal of Botany*, 82(11), 1399-1406.
- Cosacov, A., Nattero, J., & Cocucci, A. A.** (2008). Variation of pollinator assemblages and pollen limitation in a locally specialized system: the oil-producing *Nierembergia linariifolia* (Solanaceae). *Annals of botany*, 102(5), 723-734.
- Cosacov, A., Cocucci, A. A., & Sérsic, A. N.** (2012). Variación geográfica de la recompensa floral de *Calceolaria polyrhiza* (Calceolariaceae): Influencia de factores bióticos y abióticos. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 47(3-4), 363-373.
- Cribari-Neto, F., and Zeileis, A.** (2010). Beta Regression in R. *Journal of Statistical Software*, 34(2), 1–24. <http://www.istatsoft.org/v34/i02/>.
- Davies, K. L., & Stpicyńska, M.** (2009). Comparative histology of floral elaiophores in the orchids *Rudolfiella picta* (Schltr.) Hoehne (Maxillariinae sensu lato) and *Oncidium ornithorhynchum* HBK (Oncidiinae sensu lato). *Annals of Botany*, 104(2), 221-234.
- Diggle, P. K.** (2002). A developmental morphologist's perspective on plasticity. *Evolutionary Ecology*, 16(3), 267-283.
- Faegri, K., & Van Der Pijl, L.** (1966). *The principles of pollination ecology*. 248 S. Toronto.
- Fenster, C. B., Armbruster, W. S., Wilson, P., Dudash, M. R., & Thomson, J. D.** (2004). Pollination syndromes and floral specialization. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 35, 375-403.
- Ferreiro, G., Baranzelli, M. C., Sérsic, A. N., & Cocucci, A. A.** (2015). Clinal variability of oil and nectar rewards in *Monttea aphylla* (Plantaginaceae): relationships with pollinators and climatic factors in the Monte Desert. *Botanical journal of the Linnean Society*, 178(2), 314-328.
- Harder, L.D., Williams, N.M., Jordan, C.Y. & Nelson, W.A.** (2001). En *Cognitive Ecology of Pollination* (pp. 297-317). Edited by Chittka, L., & Thomson, J. D. Cambridge University Press.
- Huelsenbeck, J. P., Nielsen, R., & Bollback, J. P.** (2003). Stochastic mapping of morphological characters. *Systematic Biology*, 52(2), 131-158.
- Johnson, S. D., & Steiner, K. E.** (2000). Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology & Evolution*, 15(4), 140-143.

- Krummel, J. R., Gardner, R. H., Sugihara, G., O'Neill, R. V., & Coleman, P. R. (1987).** Landscape patterns in a disturbed environment. *Oikos*, 321-324.
- Kuhlmann, M., & Hollens, H. (2014).** Morphology of oil-collecting pilosity of female *Rediviva* bees (Hymenoptera: Apoidea: Melittidae) reflects host plant use. *Journal of natural history*, 49(9-10), 561-573.
- Losos, J. B. (2011).** *Lizards in an evolutionary tree: ecology and adaptive radiation of anoles* (Vol. 10). Univ of California Press.
- Martins, E. P., & Hansen, T. F. (1997).** Phylogenies and the comparative method: a general approach to incorporating phylogenetic information into the analysis of interspecific data. *The American Naturalist*, 149(4), 646-667.
- Martins, A. C., & Alves-dos-Santos, I. (2013).** Floral-oil-producing Plantaginaceae species: geographical distribution, pollinator rewards and interactions with oil-collecting bees. *Biota Neotropica*, 13(4), 77-89.
- Maubecin CC (2019).** El rol de los polinizadores y la historia filogenética sobre la divergencia, integración y modularidad del fenotipo floral de *Nierembergia* (Solanaceae). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. 15 marzo 2019.
- McGarigal, K., & Marks, B. J. (1995).** FRAGSTATS: spatial pattern analysis program for quantifying landscape structure. *Gen. Tech. Rep. PNW-GTR-351. Portland, OR: US Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station. 122 p, 351.*
- Michener, C.D. (2007).** *The bees of the world*, 2nd edn. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- Milne, B. T. (1991).** Heterogeneity as a multiscale characteristic of landscapes. In *Ecological heterogeneity* (pp. 69-84). Springer, New York, NY.
- Nattero, J., Cocucci, A. A., & Medel, R. (2010).** Pollinator-mediated selection in a specialized pollination system: matches and mismatches across populations. *Journal of Evolutionary Biology*, 23(9), 1957-1968.

- Neff, J. L., & Simpson, B. B.** (1981). Oil-collecting structures in the Anthophoridae (Hymenoptera): morphology, function, and use in systematics. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 95-123.
- Neff, J. L., & Simpson, B. B.** (2017). Vogel's great legacy: The oil flower and oil-collecting bee syndrome. *Flora*, 232, 104-116.
- O'Neill, R. V., Krummel, J. R., Gardner, R. E. A., Sugihara, G., Jackson, B., DeAngelis, D. L., ... & Dale, V. H.** (1988). Indices of landscape pattern. *Landscape ecology*, 1(3), 153-162.
- Pagel, M.** (1999). Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature*, 401(6756), 877.
- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K.** (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20(2), 289-290.
- Pansarin, L. M., DE Moraes Castro, M & Sazima, M.** (2009). Osmophore and elaiophores of *Grobya amherstiae* (Catantopidae, Orchidaceae) and their relation to pollination. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 159(3), 408-415.
- Possobom, C. C. F., Guimarães, E., & Machado, S. R.** (2015). Structure and secretion mechanisms of floral glands in *Diplopterys pubipetala* (Malpighiaceae), a neotropical species. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 211, 26-39.
- Possobom, C.C. & Machado, S.R.** (2017a). *Acta Botanica Brasilica*, 3.
- Possobom, C.C., & Machado, S.R.** (2017b). *Plant Systematics and Evolution*, 1-18.
- R Core Team** (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Sitio web: <https://www.R-project.org/>.
- Reginato, M., & Michelangeli, F. A.** (2016). Untangling the phylogeny of *Leandra* s. str. (Melastomataceae, Miconieae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 96, 17-32.
- Renner, S. S., & Schaefer, H.** (2010). The evolution and loss of oil-offering flowers: new insights from dated phylogenies for angiosperms and bees. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1539), 423-435.
- Revell, L. J.** (2012). phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution*, 3(2), 217-223.

- Rupil, G.** (2008). Señales florales de recompensa, cantidad de recompensa y su relación con los polinizadores en *Nierembergia linariifolia* Graham. Tesina de grado. Universidad Nacional de Córdoba.
- Sérsic, A. N.** (2004). Reproductive biology of the genus *Calceolaria*. *Stapfia*, 82, 1-121.
- Simpson, B. B., & Neff, J. L.** (1981). Floral rewards: alternatives to pollen and nectar. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 301-322.
- Smith, S. D., Ané, C., & Baum, D. A.** (2008). The role of pollinator shifts in the floral diversification of *Lochroma* (Solanaceae). *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 62(4), 793-806.
- Smith, S. D.** (2010). Using phylogenetics to detect pollinator-mediated floral evolution. *New Phytologist*, 188(2), 354-363.
- Stebbins, G. L.** (1970). Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: pollination mechanisms. *Annual review of ecology and systematics*, 1(1), 307-326.
- Steiner, K. E., & Whitehead, V. B.** (1990). Pollinator adaptation to oil-secreting flowers--*Rediviva* and *Diascia*. *Evolution*, 44(6), 1701-1707.
- Steiner, K. E., & Whitehead, V. B.** (1991). Oil flowers and oil bees: further evidence for pollinator adaptation. *Evolution*, 45(6), 1493-1501.
- Tate, J. A., Acosta, M. C., McDill, J., Moscone, E. A., Simpson, B. B., & Cocucci, A. A.** (2009). Phylogeny and character evolution in *Nierembergia* (Solanaceae): molecular, morphological, and cytogenetic evidence. *Systematic Botany*, 34(1), 198-206.
- Vogel, S.** (1969). *Abstracts XIth Internatl. Bot. Congr. Seattle*, 229.
- Vogel, S.** (1974). *Tropische und Subtropische Pflanzenwelt*, 7: 285-547.
- Willmer, P.** (2004). En *Pollination and floral ecology* (pp. 105-257). Princeton University Press.
- Zuur, A., Ieno, E. N., Walker, N., Saveliev, A. A., & Smith, G. M.** (2009). *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Springer Science & Business Media.

Apéndice Suplementario 1. Datos previos del ensamble de polinizadores de los taxa de *Nierembergia*, obtenidos de la tesis doctoral de la Dra. CC Maubecin (Maubecin 2019) realizado en el Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral (IMBIV-UNC).

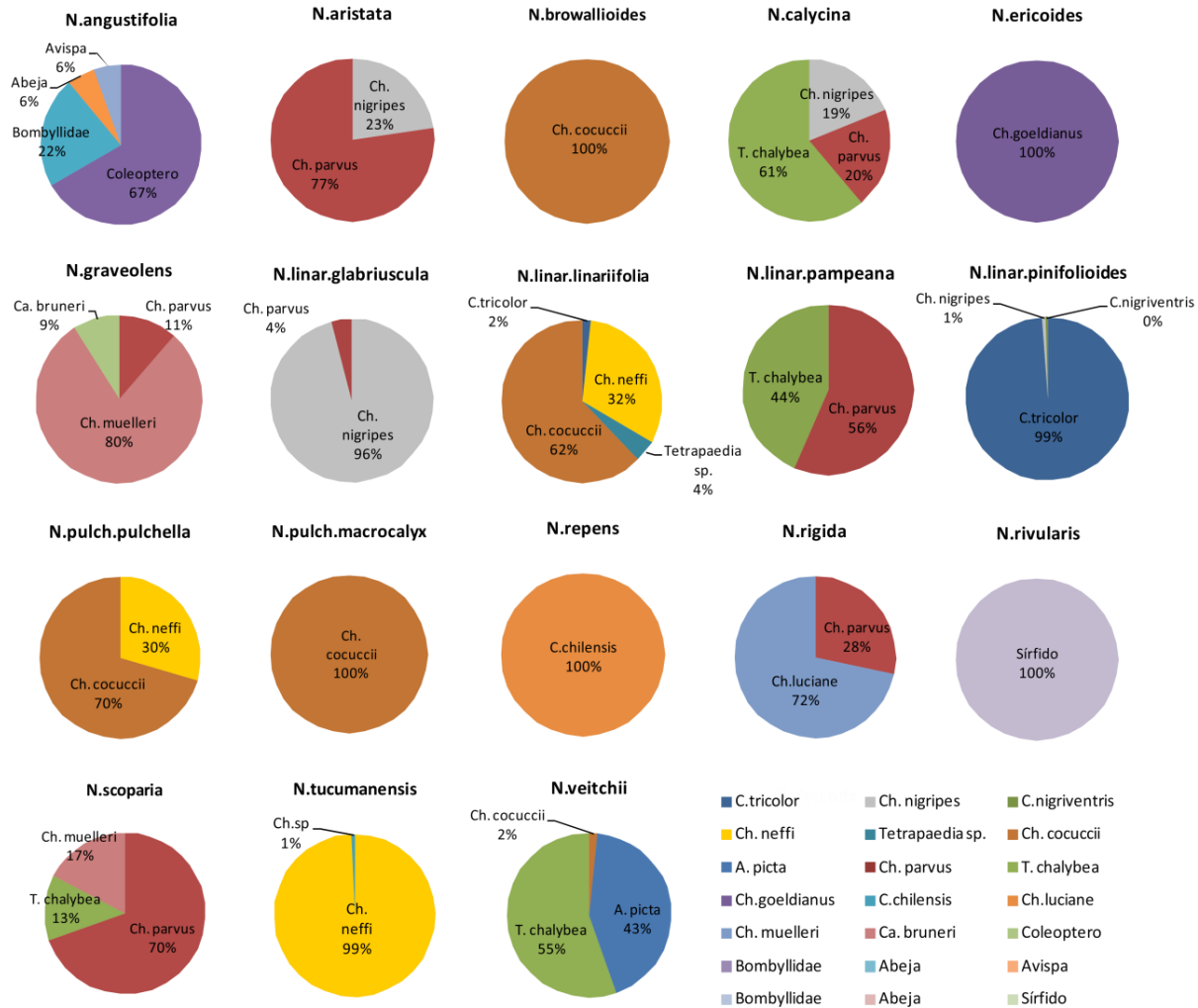


Figura S1. Proporción de visitas (%) de cada una de las especies de polinizadores que componen el ensamble de las especies y variedades de *Nierembergia*. Algunas de las especies no fueron consideradas para su estudio en esta tesina. Abreviaturas de géneros: C= Centris; Ch= Chalepogenus; A=Arhysocele; Ca= Caenonomada; T= Tapinotaspis.

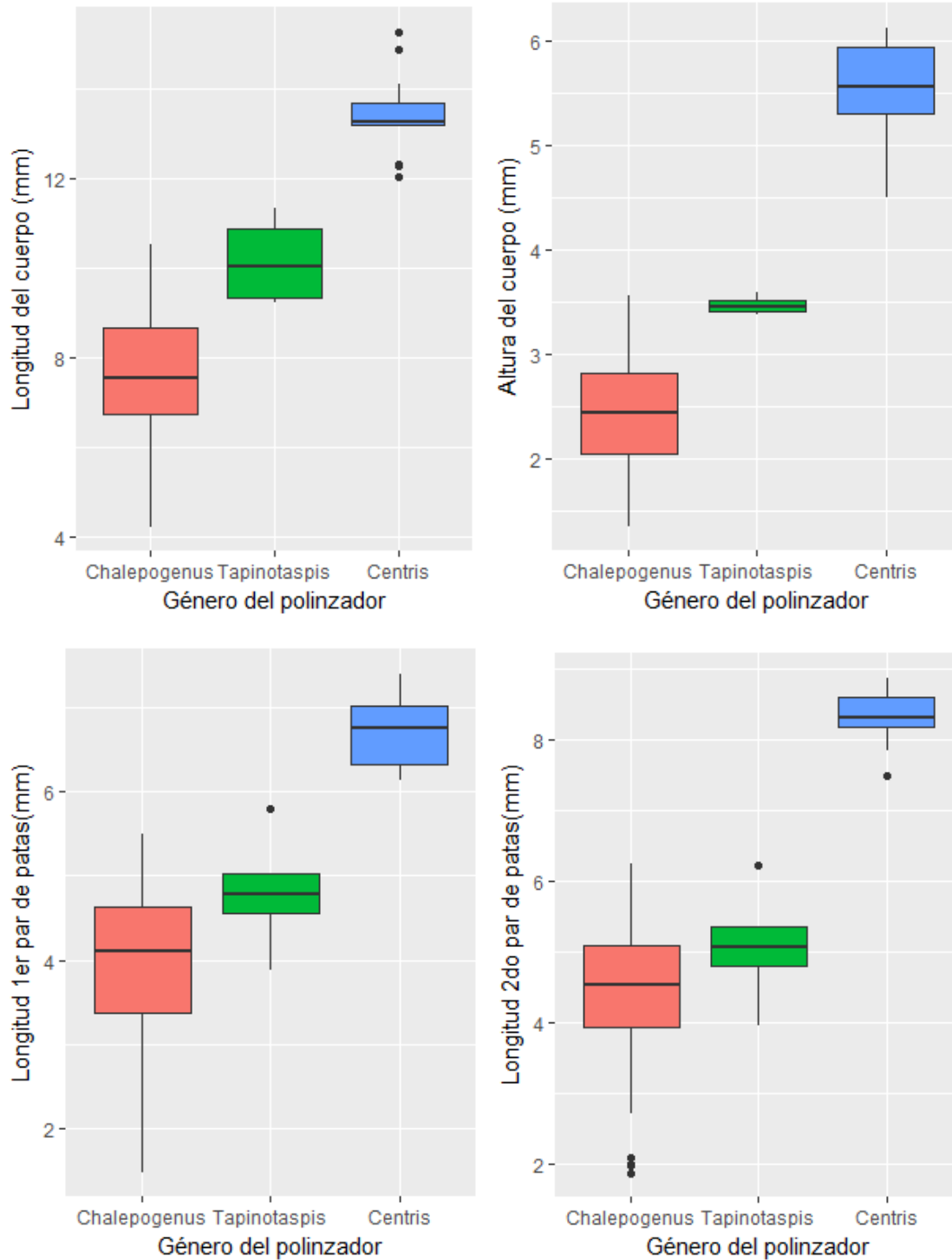


Figura S2. Gráficos de caja de la longitud del cuerpo, altura del cuerpo, longitud del primer par de patas y longitud del segundo par de patas de los polinizadores de *Nierembergia* pertenecientes a los géneros *Chalepogenus*, *Tapinotaspis* y *Centris*.

Apéndice Suplementario 2. Boxplot y tabla de promedio de cada variable del elaióforo en los taxa de *Nierembergia*.

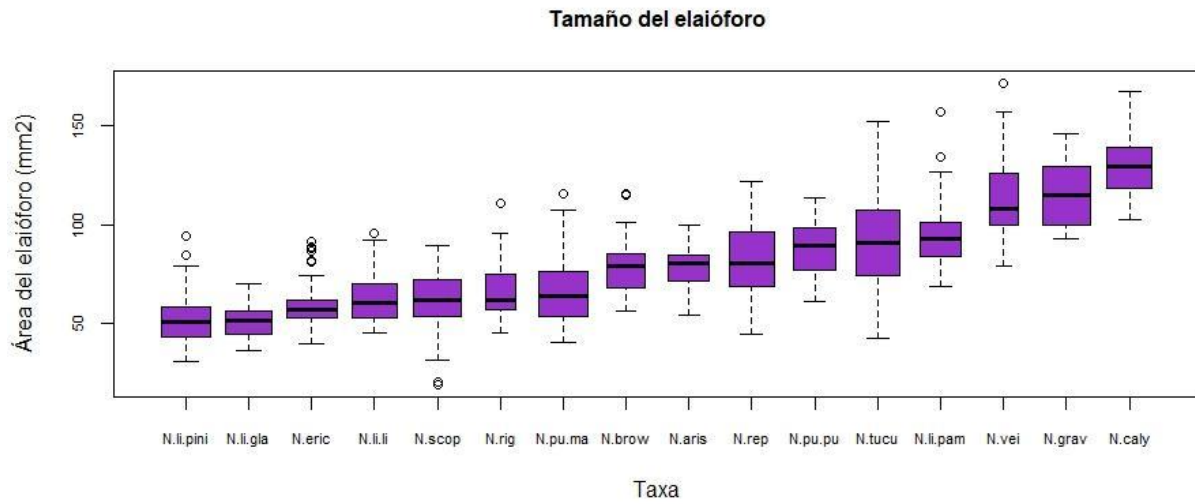


Figura S3: Boxplot del tamaño del elaióforo (mm²) de los taxa de *Nierembergia*.

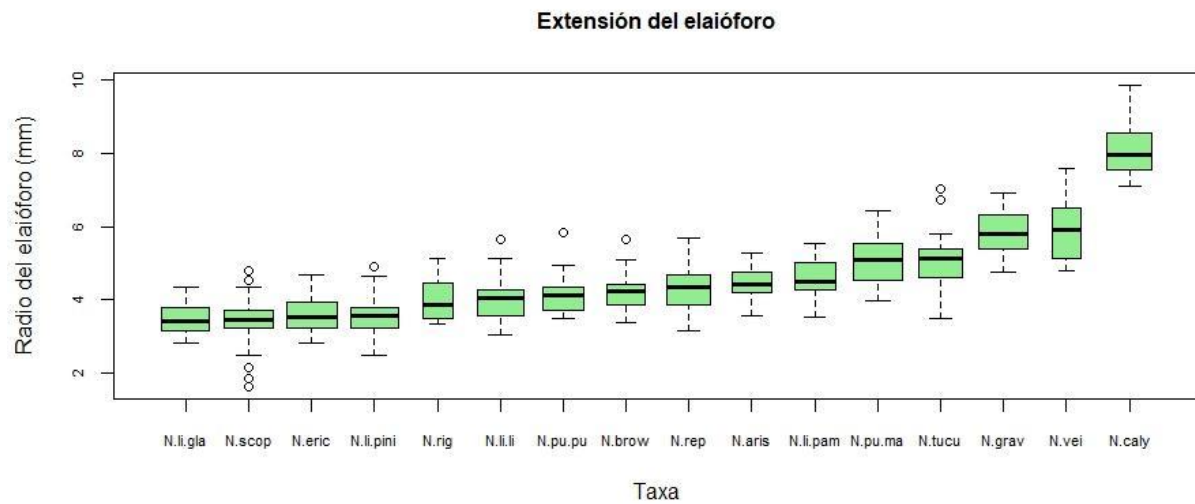


Figura S4: Boxplot de Extensión del elaióforo (mm) de los taxa de *Nierembergia*.

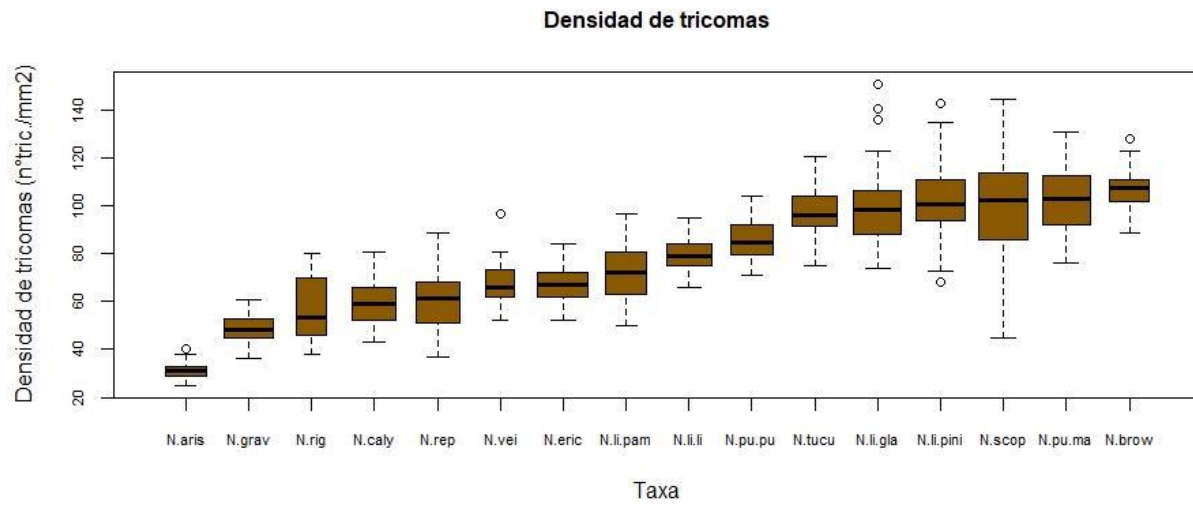


Figura S5: Boxplot de la densidad de tricomas (n°tric./mm2) de los taxa de *Nierembergia*.

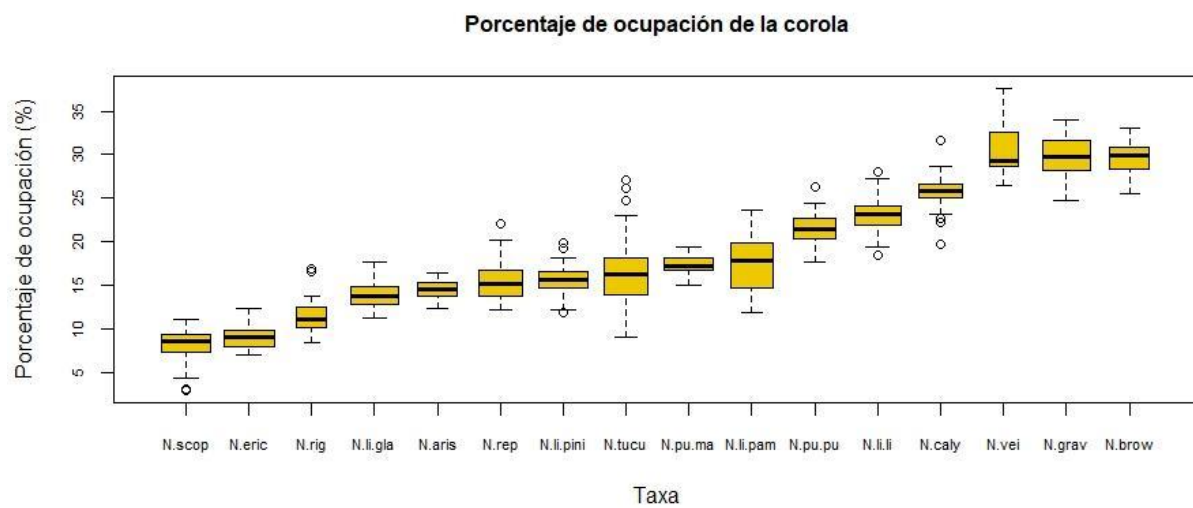


Figura S6: Boxplot del porcentaje de ocupación de la corola (%) por parte del elaióforo en las flores de los taxa de *Nierembergia*.

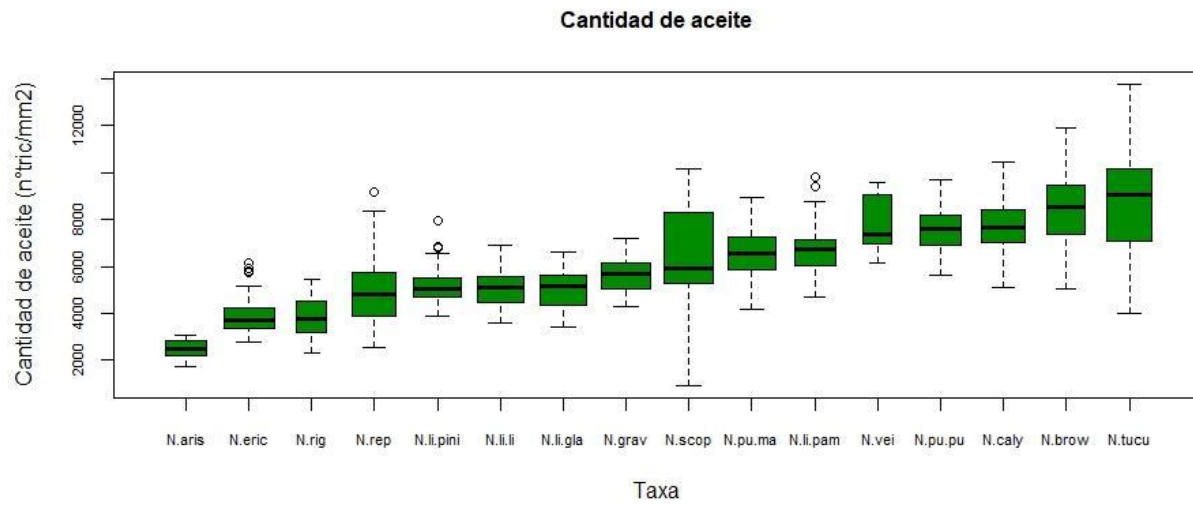


Figura S7: Boxplot del cantidad de aceite (n°tric.) de los taxa de *Nierembergia*.

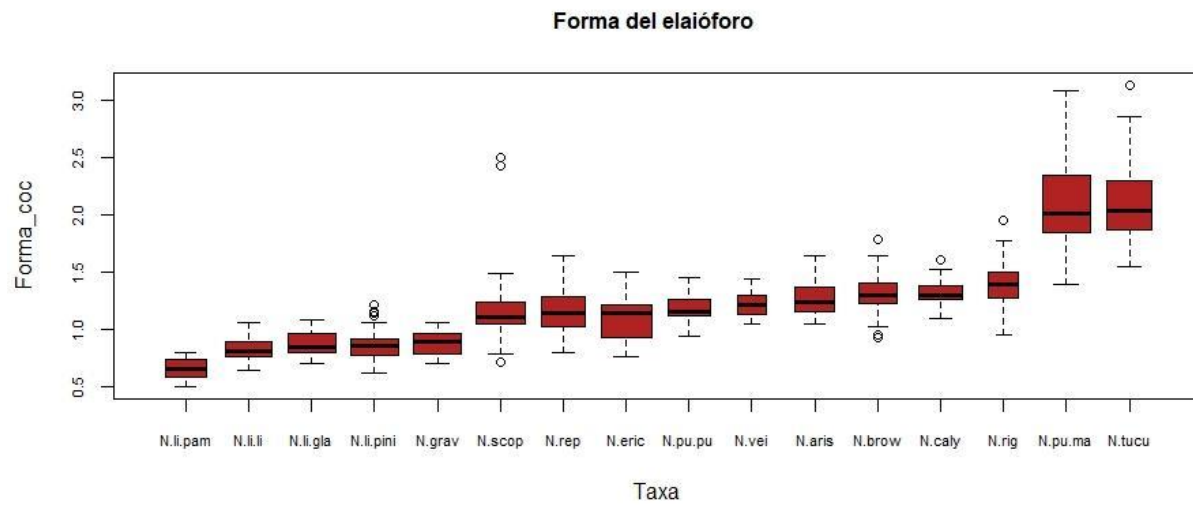


Figura S8: Boxplot del forma de l elaióforo (cociente per/área) de los taxa de *Nierembergia*.

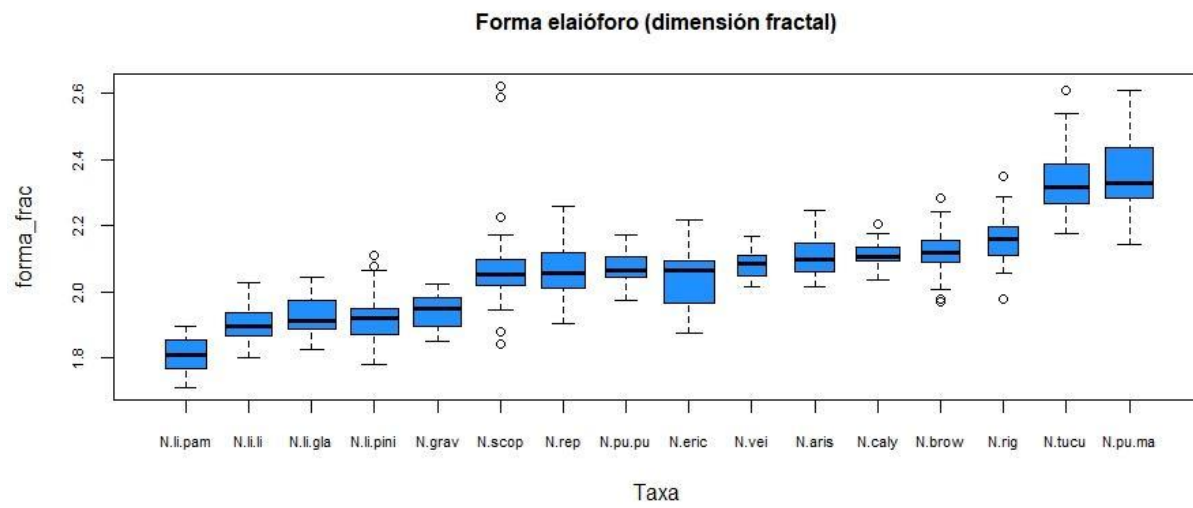


Figura S9: Boxplot del forma del elaióforo (dimensión fractal) de los taxa de *Nierembergia*.

Promedios de cada variable de los taxa de *Nierembergia*

Taxa	Tamaño del elaióforo	Extensión del elaióforo	Densidad de tricomas	Porcentaje de ocupación	Cantidad de aceite	Forma coc	Forma DF
<i>N. aristata</i>	79.587	4.494	31.378	14.589	2481.251	1.263	2.106
<i>N. browalliodes</i>	79.294	4.274	106.733	29.96	8412.346	1.283	2.113
<i>N. calycina</i>	130.759	8.247	58.778	25.866	7649.266	1.305	2.109
<i>N. ericoides</i>	59.802	3.624	66.067	9.069	3916.671	1.1	2.043
<i>N. graveolens</i>	115.651	5.851	48.367	29.841	5566.192	0.874	1.941
<i>N. linariifolia var glabiuscula</i>	49.769	3.455	100.944	13.968	4953.865	0.879	1.933
<i>N. linariifolia var linariifolia</i>	61.659	4.017	79.889	23.283	4892.116	0.824	1.905
<i>N. linariifolia var pampeana</i>	95.854	4.559	72.367	17.762	6816.118	0.65	1.808
<i>N. linariifolia var pinifoliodes</i>	51.67	3.518	102.144	15.708	5115.042	0.862	1.923
<i>N. pulchella var macrocalyx</i>	66.214	5.056	101.9	17.361	6591.549	2.085	2.351
<i>N. pulchella var pulchella</i>	86.951	4.118	86.122	21.391	7423.034	1.181	2.074
<i>N. repens</i>	83.636	4.336	61.089	15.541	5120.631	1.15	2.061
<i>N. rigida</i>	67.293	3.959	58.1	11.657	3810.806	1.409	2.162
<i>N. scoparia</i>	60.587	3.431	101.011	8.267	6250.798	1.172	2.074
<i>N. tucumanensis</i>	93.199	5.07	97.211	16.847	8965.961	2.07	2.325
<i>N. veitchii</i>	116.324	5.94	68.867	30.563	7841.128	1.211	2.08

Tabla S1: Promedios de cada variable de los taxa de *Nierembergia*.