

UCH-FC
DOC-EBE
M385
C.2

**EVOLUCIÓN DE LA INTEGRACIÓN FLORAL EN EL GÉNERO
SCHIZANTHUS (SOLANACEAE) EN ASOCIACIÓN A LOS SISTEMAS
DE POLINIZACIÓN Y REPRODUCCIÓN**

Tesis

entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias

Por

MARÍA FERNANDA PÉREZ TRAUTMANN

Noviembre, 2004

Directores de Tesis: Dra. Mary T. Kalin Arroyo

Dr. Rodrigo Medel

Dr. Mark Hershkovitz



**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

MARÍA FERNANDA PÉREZ TRAUTMANN

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis, rendido el 7 de octubre del 2004.

Directores de Tesis:

Dra. Mary T. Kalin Arroyo

Dr. Rodrigo Medel

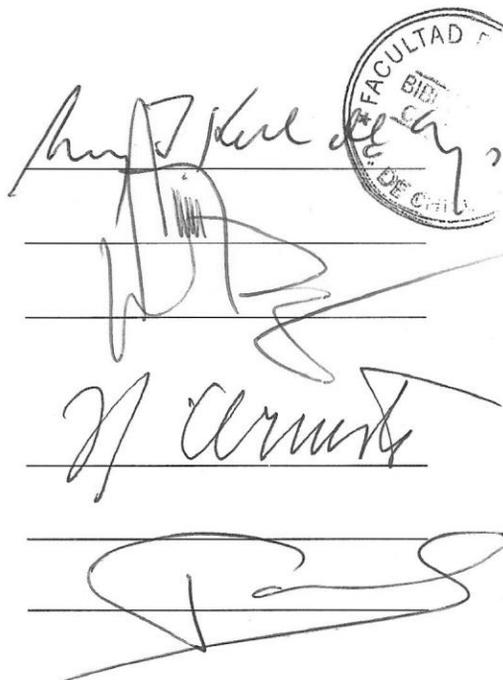
Dr. Mark Hershkovitz

Comisión de evaluación de la tesis

Dr. Juan Armesto

Dr. Lohengrin Cavieres

Dr. Elie Poulin



The image shows three handwritten signatures on horizontal lines. The top signature is in cursive and appears to be 'Mary T. Kalin Arroyo'. The middle signature is also in cursive and appears to be 'Rodrigo Medel'. The bottom signature is in cursive and appears to be 'Juan Armesto'. To the right of the signatures is a circular stamp with the text 'FACULTAD DE CIENCIAS' at the top, 'BIBLIOTECA' in the center, and 'UNIVERSIDAD DE CHILE' at the bottom.

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá y a mi papá por esos largos paseos en los bosques del sur y por haberme heredado ese cariño y admiración por la naturaleza.

A mi hermana Javiera por todo lo que es para mí mi hermana.

A mi Isa y a mi Joni por su cariño y apoyo.

A mis tutores, Mary Kalin y Rodrigo Medel por su comprensión, apoyo y paciencia durante todos estos años.

A Carolina Villagrán, Juan Armesto y Mary Kalin por haberme mostrado la flora de Chile y por haberme enseñado a observar la inmensa cantidad de plantas que siempre estuvieron ahí, pero que nunca vi.

A mi mamá, a mis hermanos Antonio y Santiago, a mi abuela Nela, a mi prima Sam, a mis cuñadas Paulina y Carola, a Carmencha y a todos los que me ayudaron a cuidar a mi Isa en terreno.

Quisiera agradecer a todos los amigos y compañeros que me ayudaron a terminar esta tesis; especialmente a mi amiguita Denise Rougier por sus conversaciones, sugerencias y apoyo; a Cristián Zavaleta por su ayuda en el laboratorio; a Ana María Humaña por su ayuda en muchas cosas y por su buena disposición; a Willi y Lorena por su hospitalidad en Aucó; a Leandro por su ayuda en la identificación de los insectos; a Carezza por haberme acordado de todos los plazos; a mi hermano Santiago por haberme enseñado a programar.

A los amigos y compañeros de Facultad: Carolina, Pablo, Felipe, Juan Valencia, Claudia, Alejandro, Claudia, Pato, Toño, Pancha, Paulina, Sean, Jaime, Soledad, Kester, Feña, Gastón, Juan Luis...

A los amigos de siempre.

A los miembros de la comisión por su tiempo, sugerencias y disposición.

A las ánimas benditas por haber cuidado las casitas.

A CONAF y a los guarda-parques del Parque Nacional Fray Jorge, Parque Nacional la Campana, Reserva Nacional Río Clarillo y Reserva Nacional Lago Peñuelas.

La realización de esta tesis fue posible gracias al financiamiento otorgado por: Beca doctoral Conicyt, Proyecto Fondecyt 2010023 para estudiantes de doctorado; Proyecto P99-103-F-ICM del Centro Milenio para Estudios Avanzados en Ecología e Investigaciones en Biodiversidad (CMEB); Beca de Doctorado del Proyecto P02-051-F del CMEB, Fundación Mellon.

ÍNDICE DE MATERIAS

Lista de Tablas	viii
Lista de Figuras.....	xi
Resumen	xvii
Abstract	xxi
Capítulo 1. Introducción General	1
Modelo de Estudio	9
Hipótesis y Predicciones	14
Objetivos específicos	15
Organización de Tesis	15
Capítulo 2. Relaciones filogenéticas entre las especies del género <i>Schizanthus</i> inferidas a partir de datos moleculares.....	24
Resumen.....	24
Introducción	25
Métodos	27
Resultados	38
Discusión	47
Referencias	51
Capítulo 3. Evolución de los sistemas de reproducción en el género <i>Schizanthus</i>	
Resumen.....	56
Introducción	57
Métodos	59
Resultados	65
Discusión	73
Referencias	76
Capítulo 4. Evolución de los sistemas de polinización del género <i>Schizanthus</i> : consecuencias sobre la evolución de la morfología floral	80
Resumen.....	80
Introducción	81

Métodos	84
Resultados	93
Discusión	103
Referencias	108
Capítulo 5. Análisis filogenético de los patrones de correlación fenotípica de la corola en el género <i>Schizanthus</i> : dilucidando el papel de los polinizadores en la integración floral	113
Resumen.....	113
Introducción	114
Métodos	118
Resultados	125
Discusión	134
Referencias	139
Capítulo 6. Discusión y Conclusión General	144

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1. Especies incluidas en el estudio y localidades donde fueron colectados los materiales para la extracción de ADN	28
Tabla 2.2. Características de las secuencias de las regiones, ITS, trnF/ndhJ y waxy, y de los datos combinados	39
Tabla 2.3. Resultados de los análisis de máxima parsimonia de los datos de las regiones ITS, trnF/ndhJ, ITS y waxy, y de los datos combinados	40
Tabla 2.4. Resultados y parámetros estimados en los análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana de las regiones ITS, trnF/ndhJ, waxy, usando el modelo de evolución GTR+I. MV: Máxima Verosimilitud. BAY: Inferencia bayesiana, en este caso los parámetros fueron estimado a partir de los 800 árboles muestrados	41
Tabla 3.1. Ubicación de los sitios de estudio. Además se muestran las abreviaturas de cada especie utilizadas en el resto del capítulo	60
Tabla 3.2. Resultados de los experimentos de autofertilización espontánea y de polinización cruzada en 9 especies de <i>Schizanthus</i> . Para cada tratamiento se indica: el número de flores marcadas recuperadas (FL); el porcentaje promedio de frutos producidos por planta respecto al número de flores marcadas recuperadas (XX_{FR}); y el promedio del número de semillas promedio producidas por flor marcada recuperada (XX_{SEM}). Además se indican las significancias estadísticas de las pruebas de permutación realizadas sobre las diferencias entre los tratamientos en el porcentaje de frutos producidos por planta (p-FR) y el número de semillas promedio producidas por flor (p-SEM). También se muestra el índice de autofertilización (A). Ver texto para su descripción. Ver Tabla 3.1 para abreviaturas de especies	70

Tabla 4.1. Síndromes de Polinización y caracteres florales continuos y discretos considerados en este estudio. COR: tamaño de la; TR-LI: tamaño relativo del labio superior (residuales de la regresión entre el área del labio inferior y el tamaño de la corola); LR-TU: largo relativo del tubo coralino (residuales de la regresión entre el largo del tubo y el largo de la corola); COM: complejidad de la corola (razón entre perímetro y área de la corola); color: color de la corola; OR-SL: orientación de las secciones laterales; SLE: presencia (1) o ausencia (0) de un sistema de liberación explosivo de polen; LE: largo de los estambres; DH: dehiscencia de las anteras. Ver abreviatura de las especies en Tabla 3.1 (capítulo 3).....	95
Tabla 3.2. Tasa de visitas y tipo de polinizador observado en las las poblaciones de <i>Schizanthus</i> estudiadas en relación al síndrome de polinización. Himen: himenópteros; Dipt: dípteros; Lepid: lepidópteros. Ver abreviaciones de las especies en Tabla 2.1	98
Tabla 4.3. Valores de los parámetros de los modelos de evolución estimados de los datos de tamaño y forma de la corola de <i>Schizanthus</i> , sintetizada en Partial Warps (puntajes promedio de CVA sobre partial warps) o en variables individuales. En paréntesis se indican el intervalo de confianza al 95%	103
Tabla 5.1. Lista de taxa y sitios de estudio	120
Tabla 5.2. Valores promedio de los caracteres florales considerados en el estudio. Al lado de cada especie, se señala el mecanismo de polinización, el sistema de reproducción (cuando es conocido), y el número de individuos medidos. Ver Tabla 5.1 para abreviaciones de las especies y Figura 5.1 para abreviaciones de los mecanismos de polinización, sistemas de reproducción y caracteres florales	126

- Tabla 5.3. Variación en el grado de integración de la corola en *Schizanthus*. El grado de integración fue medido como la varianza de valores propios de las matrices de correlación y fue corregido según el número de flores muestreadas en cada especie (INTc). El intervalo de confianza fue estimado por remuestreo a partir de 1000 simulaciones. Además se muestra el número de correlaciones significativas entre los cinco caracteres 127
- Tabla 5.4. Similitud en los patrones de integración de la corola entre las especies de *Schizanthus*. Los valores corresponden a los índices de similitud entre las matrices de correlación fenotípica de cada par de especies. Con letras se indica la significancia de los índices de similitud según prueba de Mantel. Ver Tabla 5.1 para abreviaciones de las especies 129
- Tabla 5.5. Comparaciones entre las matrices de correlación observadas y cuatro matrices teóricas que representan el acoplamiento entre todos los lóbulos de la corola (T_I), el desacoplamiento de la quilla (T_Q), el desacoplamiento de las alas (T_A) y el desacoplamiento de las alas y la quilla (T_{QA}). Los valores corresponden a los coeficientes de correlación entre las matrices. La significancia estadística se estimó usando la prueba de Mantel. Ver Tabla 5.1 para abreviaciones de las especies ... 134

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Distribución y morfología floral de las 12 especies descritas de *Schizanthus*.

Los puntos corresponden a las coordenadas de las colectas almacenadas en la Base Electrónica de la Flora de Chile de la Universidad de Concepción y del Museo de Historia Natural. Para todas las especies se muestran fotografías frontales de la corola. En algunos casos también se muestran fotografías laterales de las flores ... 11

Figura 1.2. Morfología floral del género *Schizanthus*, representada por la especie *S. hookeri* 12

Figura 1.3. Síndromes de polinización en el género *Schizanthus*. A) Falenofilia, representado por *S. integrifolius*; B) Melitofilia, representado por *S. tricolor* 13

Figura 2.1. Resultados del análisis de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud de los datos de las regiones trnF/ndhJ, ITS y waxy, considerados individualmente. A-C) Árboles de consenso estricto de (A) los 14 árboles más parsimoniosos producidos con la región trnF/ndhJ, (B) los 9 árboles más parsimoniosos producidos con los datos de la región ITS y (C) los 8 árboles más parsimoniosos producidos con la región waxy. D-F) Filogramas de los árboles de máxima verosimilitud producidos con los datos de las regiones: (D) trnF/ndhJ, (E) ITS y (F) waxy. Arriba de los nodos se indican los valores de bootstrap cuando son mayores a 50%. En D-F, el largo de las ramas es proporcional al número de cambios 42

Figura 2.3. Resultados de los análisis de máxima parsimonia y de inferencia bayesiana de los datos combinados de las regiones trnF/ndhJ, ITS y waxy. A) Filograma de uno de los 6 árboles más parsimoniosos obtenidos. Los números arriba de las ramas

corresponden a los valores de bootstrap. Con * se indican los nodos que colapsan en el árbol consenso estricto de los 6 árboles más parsimoniosos. El largo de las ramas es proporcional al número de cambios. B) Filograma de uno de los árboles con mayor probabilidad *a posteriori* según análisis de inferencia bayesiana. Los números arriba de las ramas corresponden a las probabilidades *a posteriori* de cada nodo. Con * se indican los nodos que colapsan en el árbol consenso de los 800 árboles muestreados en análisis. El largo de las ramas es proporcional al número de cambios. Con círculos se indica el clima en que crecen las especies según Di Castri y Hayek: rojo, perárido; naranja, árido; amarillo, semiárido; verde, subhúmedo; azul, perhúmedo. Con letras se indica la zona ocupada por las especies: C, costa; P, precordillera; A, altoandina. Además se muestran los tipo florales característicos de los clados (dibujos tomados de Grau & Grönbach 1984) 47

Figura 3.1. Imágenes del labio superior e inferior de la flor después de ser aplanados y escaneados, mostrando los lóbulos de la corola (estandarte, secciones laterales, alas, quilla) y el tubo coralino. El tamaño de la corola fue estimado como la suma de las áreas de los lóbulos de la corola, pero sin considera el tubo coralino 63

Figura 3.2. Desarrollo floral en los tres tipos florales encontrados en *Schizanthus*. A) Flores hercógamas permanentes con sistema de liberación explosiva de polen, representado por *S. tricolor*. B) Flores hercógamas permanentes sin sistema de liberación explosiva de polen, representado por *S. integrifolius*. C) Flores hercógamas temporales, representado por *S. candidus*. La posición de las anteras y del estigma se indican con las letras A y E respectivamente, con un asterisco se señala el momento cuando el estigma se vuelve receptivo 68

Figura 3.3. Trayectorias evolutivas de los sistemas de reproducción y de caracteres florales asociados. A) Reconstrucción del estado ancestral del grado de autofertilización espontánea con el criterio de máxima parsimonia. B) Reconstrucción del estado ancestral del grado de hercogamia con el criterio de máxima parsimonia. C) Reconstrucción del tamaño de la corola con el criterio de máxima parsimonia cuadrática ponderada. Ver abreviatura de las especies en Tabla 3.1 (Capítulo 3). Los árboles filogenéticos corresponden al árbol obtenido por inferencia bayesiana a partir de las secuencias de las regiones de ADN, *trnF/ndhJ*, *waxy* e ITS (Fig 2.2, capítulo 2) 72

Figura 4.1. Imágenes del labio superior e inferior de la flor de *Schizanthus hookeri* después de ser aplanados y escaneados, mostrando los caracteres florales y posición de los 10 “landmarks” considerados en el estudio. Los caracteres son: estandarte, secciones laterales, alas, quilla y tubo coralino. Los “landmarks” en el labio superior son: (1) extremo superior del estandarte, (2) punto de unión entre estandarte y secciones laterales, (3) punto superior de secciones laterales, (4) punto inferior de secciones laterales, (5) inserción del estandarte y secciones laterales en el tubo coralino y (6) extremo inferior del tubo coralino. Los “landmarks” en el labio inferior son: (7) extremo superior de quilla; (8) punta de la quilla, (9) extremo superior de la alas, (10) inserción de las alas en tubo coralino 88

Figura 4.2. Síndromes de polinización en el género *Schizanthus*. A) Falenofilia, representado por *S. integrifolius*, corresponde a flores blancas, con secciones laterales orientadas lateralmente, labio inferior reducido y tubo coralino largo. B y C) Melitofilia, representado por *S. tricolor* y *S. hookeri*, corresponde a flores

coloridas, secciones laterales orientadas frontalmente, labio inferior desarrollado, con mecanismo de liberación explosivo de polen, con tubo coralino corto o largo. D y E) Especies que no se corresponden con ninguno de los dos síndromes reconocidos por Cocucci (1989): (D) *S. grahamii* con flores rojas, tubo coralino largo, corola orientada frontalmente, labio inferior reducido, relacionada más bien con un síndrome de ornitofilia; (E) *S. parvulus*, especie con características semejantes a las especies melitofilas, pero con estandarte prolongado en una protuberancia donde se deposita el néctar 89

Figura 4.3. Ordenación de los 180 ejemplares muestreados de las 12 especies de *Schizanthus* a lo largo de los dos ejes canónicos de los partial warps. Las deformaciones en la forma del labio superior e inferior a lo largo de los ejes se representan a través de las grillas de curvamiento. El tamaño de la grillas del labio superior e inferior fue dibujado proporcional a la razón de tamaños de ambas estructuras. Además se muestran las imágenes escaneadas de la corola de 4 especies que representan extremos de los ejes canónicos. También se muestra el síndrome de polinización asignado a cada grupo de especies de acuerdo al criterio de Cocucci (1989). Ver abreviatura para las especies en Tabla 3.1 (capítulo 3) 96

Figura 4.4. Reconstrucción de los estados ancestrales de los síndromes de polinización y del tipo de visitante observado con el criterio de Máxima Parsimonia. Los árboles filogenéticos corresponden al árbol obtenido por inferencia bayesiana a partir de las secuencias de las regiones de ADN, trnF/ndhJ, waxy e ITS (Fig 2.3, capítulo 2). Ver abreviación de las especies en Tabla 3.1 100

Figura 4.5. Trayectorias evolutivas de los caracteres florales asociados a la polinización.

A- C) Reconstrucción de los estados ancestrales de los caracteres discretos: (A) mecanismo floral, (B) orientación de las secciones laterales, (C) color de la corola. D-F) Reconstrucción de los estados ancestrales con criterio de MP cuadrática ponderada por el largo de ramas de los caracteres florales continuos: (D) largo relativo del tubo coralino, (E) tamaño relativo del labio inferior y (F) complejidad de la corola. Los árboles filogenéticos corresponden al árbol obtenido por inferencia bayesiana a partir de las secuencias de las regiones de ADN, trnF/ndhJ, waxy e ITS (Fig 2.2, capítulo 2). Ver abreviación de las especies en Tabla 3.1 101

Figura 5.1. Morfología floral y mecanismos de polinización en *Schizanthus*. A) Imágenes del labio superior e inferior de la flor de *S. hookeri* después de ser disectada y aplanada, mostrando los cinco caracteres medidos: largo de estandarte (EST), largo de secciones laterales (SL), largo de tubo coralino (TU), largo de la quilla (QUI) y largo de las alas (ALA). B) Sistemas de polinización y de reproducción presentes en el género *Schizanthus*: (1) flores autógamas sin sistema de liberación explosiva de polen (SLE), representado por *S. candidus*; 2) flores exógamas con SLE gatillado por presión en alas, representado por *S. tricolor*; (3) flores exógamas con SLE gatillado por presión en quilla, representado por *S. hookeri*; (4) flores exógamas sin SLE, representado por *S. integrifolius* 119

Figura 5.2. Trayectorias evolutivas de los patrones de integración de la corola de las especies de *Schizanthus*. Los dibujos corresponden a las redes de correlaciones significativas entre los caracteres, una línea gruesa conectando dos caracteres representa una correlación significativa superior a 0,6, y una línea delgada una

correlación significativa inferior a 0,6. La topología es parte del árbol obtenido por inferencia bayesiana a partir de las secuencias de las regiones trnF/ndhJ, ITS y waxy (ver Figura 2.2 en Capítulo 2). Debajo de cada especie se señala el mecanismo de polinización y el sistema de reproducción cuando es conocido (ver abreviaturas en Fig 5.1) 128

Figura 5.3. Comparación del grado de integración floral (INTc) entre las especies exógamas (gris) y autógamias (blanco) pertenecientes a los dos clados de *Schizanthus* donde ha evolucionado la autogamia. Las barras corresponden a las desviaciones estándar estimadas por remuestreo a partir de 1000 repeticiones 131

Figura 6.1. Modelo de evolución de la integración floral 149

RESUMEN

La integración floral, referida a la variación coordinada de los caracteres florales, ha sido vista principalmente como una adaptación para la polinización por animales. Sin embargo, el papel de los polinizadores como principales moduladores de la forma floral ha sido cuestionado sobre crecientes evidencias de estudios ecológicos que muestran una tendencia a la generalización y dinamismo de los sistemas de polinización. Como alternativa a la selección por polinizadores, se ha propuesto que la integración floral puede ser consecuencia de factores asociados al desarrollo.

Los principales objetivos de esta tesis fueron examinar los patrones evolutivos de la integración floral en el género *Schizanthus* e identificar la respuesta de la integración a cambios en la dependencia de polinizadores o en los modos de polinización. Si los polinizadores tienen una gran influencia en la integración floral es esperable que: (1) el grado de integración de caracteres florales asociados a la atracción de polinizadores disminuya al reducirse la dependencia de las plantas por sus polinizadores; (2) la estructura de la integración floral varíe al cambiar las relaciones funcionales entre los caracteres durante la polinización. Para evaluar estas predicciones se realizó un estudio comparativo entre los patrones de integración de caracteres de la corola y los sistemas de reproducción y polinización en las especies del género *Schizanthus* (Solanaceae) en un contexto filogenético. Este estudio incluyó: (1) la construcción de una hipótesis filogenética del género; (2) la caracterización de los sistemas de reproducción de las especies y de sus trayectorias evolutivas; (3) la caracterización de los sistemas de

polinización y de sus trayectorias evolutivas; y (4) el análisis de los patrones evolutivos de la integración de la corola con relación a la filogenia y ecología de las especies.

El género *Schizanthus* conformado por 12 especies de plantas anuales distribuidas en Chile y Argentina, brinda condiciones apropiadas para evaluar estas predicciones: sus flores zigomórficas y bilabiadas presentan un sistema especializado de polinización, y presenta una amplia variación interespecífica en la morfología floral que se corresponde con tres síndromes de polinización, melitofilia, falenofilia y ornitofilia.

La hipótesis filogenética del género inferida a partir de las secuencias de las regiones trnF/ndhJ del ADN de cloroplasto e ITS y waxy del ADN nuclear, muestra que las especies xerofíticas del desierto, *S. integrifolius*, *S. lacteus*, *S. candidus* y la especie cordillerana de la zona mediterránea árida, *S. alpestris*, forman un clado claramente aislado de las demás especies. Éstas a su vez se separan en dos subclados, uno formado por las especies altoandinas *S. hookeri* y *S. grahamii*; y otro formado por la especie del desierto, *S. laetus* y un grupo de especies predominantemente mesofíticas, *S. litoralis*, *S. porringens*, *S. tricolor*, *S. pinnatus* y *S. parvulus*.

El monitoreo del desarrollo floral y la estimación de la capacidad de autofertilización en 9 especies del género, demostró que el sistema reproductivo es variable, con especies exógamas, altamente dependientes de polinizadores, y con especies adaptadas a la autogamia retardada, con una alta capacidad de autofertilización espontánea. Observaciones realizadas para evaluar los síndromes de polinización mostraron que hay una correspondencia parcial entre el síndrome y el tipo de visitante, con una tendencia de las especies exógamas a ser más generalistas que lo predicho por el síndrome. Reconstrucciones de las trayectorias evolutivas de los sistemas de

reproducción y polinización indicaron que el estado ancestral del género era exógamo y melitófilo. La autogamia retardada habría evolucionado en dos ocasiones independientes en el desierto y la estepa altoandina. En estos ambientes, también habría evolucionado la falenofilia y la ornitofilia, en correspondencia con la adquisición de polinización por lepidóteros y picaflores, respectivamente. Estas transiciones ocurrirían sin la pérdida del polinizador ancestral, dando lugar a estados generalistas. Esta gradualidad en las transiciones se manifiesta también en los patrones de cambio gradual acelerado con que evolucionan el tamaño y la forma de la corola.

La variación en los sistemas de polinización y reproducción encontrada en el género *Schizanthus* permitió evaluar la influencia de la selección mediada por polinizadores en la integración floral. Los resultados indicaron que el grado y los patrones de integración varían entre las especies de *Schizanthus* y que estas variaciones son independientes de la historia filogenética, pero están relacionadas con cambios en los sistemas de reproducción y polinización. Contrario a lo esperado, el grado de integración fue mayor en las especies menos dependientes de polinizadores en los dos linajes de *Schizanthus* donde la autogamia derivó de ancestros exógamos. Sin embargo, de acuerdo a lo esperado, los patrones de integración difirieron entre las especies exógamas con distintos mecanismos de polinización, en una forma consistente con variaciones en las funciones de los caracteres durante la polinización. Cuando los caracteres pierden su función en la polinización tienden a desacoplarse de los otros caracteres de la corola.

El mayor grado de integración de la corola observado en las especies menos dependientes de polinizadores sugiere que en *Schizanthus* la integración de la corola

resulta de factores distintos a la selección por polinizadores, tales como factores asociados al desarrollo. Sin embargo, las diferencias en los patrones de integración encontradas entre las especies exógamas de *Schizanthus* con distintos mecanismos de polinización, sugieren que estos factores no constituyen restricciones suficientemente fuertes como para prevenir la evolución independiente de los caracteres de la corola bajo un régimen de selección adecuado. En las especies exógamas, la selección por polinizadores puede modular los patrones de integración de una manera inesperada, promoviendo el desacoplamiento de los caracteres florales no asociados funcionalmente.

ABSTRACT

Floral integration, defined as coordinated variation between floral traits, has been viewed as an adaptation for animal pollination. However, the role of pollinators as the principal architects of floral morphology has been questioned on the basis of ecological studies that show a tendency in nature toward generalization and dynamism in systems of pollination. As an alternative to pollinator selection, floral integration has been considered a product of development.

In this thesis patterns of floral integration were examined in relation to functional pollinator dependence. If pollinators influence floral integration, the level of integration of floral traits involved in attraction of pollinators should decrease as the level of dependence on pollinators becomes reduced; and the floral integration structure should change as the functional relations between floral characters change. To evaluate these predictions a comparative study of patterns of integration and reproductive systems was conducted in the genus *Schizanthus* in a phylogenetic context. The study included: (1) the construction of a phylogenetic hypothesis; (2) characterization of reproductive systems; (3) characterization of pollination reproductive systems; (4) and the analysis of patterns of corolla integration.

Schizanthus comprises 12 species of annual herbs distributed in Chile and Argentina. This genus provides conditions for evaluating the predictions of the thesis: its zygomorphic and bilabiate flowers present a specialized system of pollination, and their species present a great variation in floral morphology corresponding to the syndromes of melittophily, phalaenophily and ornithophily.

The phylogenetic hypothesis was estimated with partial waxy gene, ITS and intergenic trnF-ndhJ DNA sequences. The xerophytic species, *S. candidus*, *S. integrifolius*, *S. lacteus* and *S. alpestris* form a clade that is strongly isolated from the remainder of the genus. The remaining eight species are separated in two subclades: one comprising the high Andean species, *S. hookeri* and *S. grahamii*, and the other comprising the desert species, *S. laetus* and the mesophytic species, *S. litoralis*, *S. porringens*, *S. tricolor*, *S. pinnatus* y *S. parvulus*.

Floral monitoring and estimates of the capacity for automatic self-pollination showed that species of *Schizanthus* range from strong outcrossing (exogamous) to delayed selfing (autogamous). Pollinator observations showed partial correspondence between visitor type and traditional pollination syndrome, with a tendency for the exogamous species to be more generalist than predicted by the syndrome. Reconstructions of the evolutionary trajectories of the pollination and reproductive system showed exogamy and melittophily to be the ancestral states in the genus. Delayed selfing evolved on two independent occasions in the northern deserts and high Andean ecosystems. The phalaenophily evolved in the deserts and ornithophily evolved in high Andean. The pollination transitions occurred with the conservation of ancestral pollinators, producing generalist states.

The variation in *Schizanthus* pollination and reproductive systems allowed evaluate the influence of pollinator mediated selection on corolla integration. The results showed that the variation of corolla integration patterns in *Schizanthus* is independent of phylogenetic history, but it is associated with changes in pollination and reproductive systems. The magnitude of corolla integration was lower in the less pollinator dependent

species in the two lineages where the autogamy has evolved. However, the integration patterns differed between the exogamous species with different pollination mechanisms according with variation in the functions of the traits on pollination: when the traits lost their function on pollination, they tend to decoupling of the remainder corolla traits.

The higher corolla integration magnitude found in the less pollinator dependent species indicates that in *Schizanthus* the basis of floral integration may lie in developmental causes. However, the differences on integration patterns found in exogamous species with different pollination mechanisms indicate that pollinator selection in exogamous species can modify the underlying pattern, but in an unexpected way: leading to functional decoupling of floral traits instead of integration among all floral traits.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La forma y función de las flores de las angiospermas es extraordinariamente diversa; no hay ninguna estructura reproductiva en cualquier otro grupo de organismos que presente mayor diversidad que las flores (Barrett 2004). Esta extraordinaria diversificación ha sido atribuida a cambios adaptativos de los caracteres florales asociados al tipo de agente polinizador y, en particular, a la promoción de la polinización cruzada (Ornduff 1969, Stebbins 1970, Faegri & van der Pijl 1979, Barrett & Graham 1997, Barrett 2004).

La modelación de la forma floral por selección mediada por polinizadores involucra no sólo un efecto sobre el valor promedio de algunos caracteres florales, sino también un efecto sobre la coordinación de varios caracteres florales. Darwin (Traducción 1983) fue el primero en proponer que la selección natural puede causar la covariación de las partes de una flor que interactúan en la polinización. Posteriormente, este fenómeno fue llamado selección correlacional (Stebbins 1950, Armbruster 1991, Armbruster 1996); la idea es que si los caracteres florales están asociados funcionalmente y la adecuación biológica depende de su interacción, los polinizadores pueden modificar selectivamente tal correlación. De esta manera, se ha sugerido que los polinizadores puede llevar a la integración floral, es decir, a la variación coordinada de los caracteres florales. Por ejemplo, Stebbins (1974) señala *“como adaptación para la polinización cruzada por animales con hábitat especializados, como abejas, mariposas... la flor se volverá una estructura altamente integrada, con todas sus partes precisamente ajustadas unas a otras”*.

Berg (1960) fue la primera en explicitar claramente una hipótesis funcional para la existencia de relaciones entre varios caracteres. Ella predijo que en plantas con sistema de polinización especializado, debido a la fuerte selección por polinizadores, los caracteres florales deberían ser menos variables y deberían exhibir mayor integración entre ellos que con los caracteres vegetativos. Berg (1960) propuso que de este modo la selección operaría para mantener los caracteres florales y vegetativos en distintas “pleiades” (módulos o grupos de caracteres que tienden a covariar, pero que se mantienen relativamente independientes unos de otros).

La hipótesis de Berg ha sido examinada en estudios posteriores, y ha sido validada solo parcialmente. Aunque se ha mostrado una relativa independencia entre caracteres florales y vegetativos (Conner & Sterling 1995, Armbruster et al. 1999), también se ha notado que las correlaciones dentro del módulo floral pueden ser relativamente débiles (Herrera 1990), y que incluso pueden generarse compromisos o correlaciones negativas entre caracteres florales masculinos y femeninos (Davis 2001). Por otra parte, en estudios comparativos no se ha encontrado una relación positiva entre el grado de integración floral y el de especialización de los sistemas de polinización (Armbruster et al. 1999) o entre el grado de integración y el de especialización del ensamble local de polinizadores (Herrera et al. 2002). Estos resultados llevaron a cuestionar dos aspectos importantes de la hipótesis de Berg; en primer lugar, que todos los caracteres florales estén integrados, es decir, que tiendan a covariar; y en segundo lugar, que la selección mediada por polinizadores sea la principal causa de covariación de los caracteres florales. Como alternativa a la selección mediada por polinizadores se ha propuesto que

la integración de la corola puede ser causada por factores genéticos o asociados al desarrollo.

Esta discusión se enmarca en dos temas más generales; una respecto al papel de los polinizadores como principales moduladores de la morfología floral; y otra respecto a la importancia de la selección natural en la evolución de la integración fenotípica. Ambos aspectos se discuten a continuación.

Restricciones al papel de los polinizadores como moduladores de la morfología floral

Gran parte de las investigaciones en el área de la forma floral han examinado la función adaptativa de los caracteres florales y sus dinámicas de interacción con los polinizadores. Estudios comparativos y ecológicos han aportado distintas evidencias de adaptación de la morfología floral a los polinizadores. La inclusión de la forma de las flores en la descripción de los síndromes de polinización (Faegri & van der Pijl 1979) ha sido considerada una de las principales evidencias de la naturaleza adaptativa de la morfología floral. Así, flores de diferentes linajes con combinaciones y características particulares (color, forma, producción de néctar, olores, etc.) se asocian a grupos particulares de polinizadores. Estudios de selección fenotípica mediada por polinizadores, en poblaciones naturales o manipuladas experimentales, han mostrado que el éxito reproductivo de un individuo depende de sus caracteres florales, en la medida que éstos afectan la remoción y/o depositación de polen por polinizadores (Murcia 1990, Johnston 1991, Andersson & Widén 1993, Morgan & Schoen 1997). Estudios sobre el comportamiento de animales polinizadores, han reportado preferencias de los animales por flores con características morfológicas particulares

(Meléndez-Ackerman et al. 1997). Por otra parte, estudios comparativos han mostrado que variaciones en la dependencia de las plantas de sus polinizadores (debido a variaciones en el nivel de autogamia o capacidad de autofertilización) se asocian a cambios morfológicos en caracteres que afectan la atracción o son recompensa para polinizadores, como es el tamaño de la corola (Vasek & Härding 1976, Vasek & Weng 1988, Wyatt 1984), producción de polen (Cruden 1977, Vasek & Weng 1988, Schoen 1977) y producción de néctar (Wyatt 1984).

A pesar de estos antecedentes, en la última década varios autores han cuestionado la universalidad de la naturaleza adaptativa de la morfología floral frente a los polinizadores y el papel de éstos en la especiación de las plantas (Arroyo & Squeo 1990, Herrera 1996, Steven & Steiner 2000, Gómez 2002). Crecientes evidencias de estudios ecológicos muestran una tendencia en la naturaleza hacia la generalización y dinamismo de los sistemas de polinización (Waser et al. 1996, Ollerton 1996, Gómez & Zamora 1999). Se ha argumentado que esta baja especificidad podría contrarrestar las potenciales presiones selectivas de los polinizadores sobre la morfología floral (Ollerton 1996, Herrera 1996, Waser et al. 1996, Aigner 2001, Johnson & Steiner 2000). Además, se ha resaltado la importancia que podría tener una serie de factores intrínsecos (formas de vida, desarrollo) y factores ecológicos (microhábitat, herbivoría) en restringir la respuesta adaptativa de las plantas a la selección natural (Herrera 1993). Estas restricciones podrían explicar, en algunos casos, la falta de correspondencia entre el ensamble actual de polinizadores y la morfología floral. Como alternativa a las presiones selectivas de los polinizadores, se han señalado otros mecanismos no adaptativos que podrían explicar la divergencia floral (Wilson & Thomson 1996).

Papel de la selección natural en la evolución de la integración fenotípica

La integración fenotípica fue inicialmente definida por Olson y Miller (1958) como la suma de la totalidad de los caracteres, los cuales en su interdependencia de forma producen un organismo. La integración fenotípica se ha caracterizado en función de los patrones de covariación o correlación de los caracteres (Cheverud et al 1999, Herrera et al. 2002). El análisis de los patrones de correlación permite evaluar dos aspectos de la integración, el grado y la estructura (ver Herrera et al 2002). El grado se refiere a cuán integrados o correlacionados están los caracteres fenotípicos. La estructura se refiere a cómo se organizan los caracteres, y da cuenta de si existen módulos o subgrupos de caracteres que tienden a covariar y que se mantienen relativamente independientes unos de otros (Olson y Miller 1958, Berg 1960, Magwene 2001).

En los últimos años ha habido un creciente interés sobre la relevancia evolutiva de la integración fenotípica, en particular, sobre los factores que pueden influenciar su evolución (Wagner & Altenberg 1996, Armbruster 1996, Roff 2000, Schwenk & Wagner 2001, Marroig & Cheverud 2001, Stepan et al. 2002, Murren 2002, Pigliucci 2003). Se ha propuesto que además de la selección natural, otros factores podrían generar covariación entre caracteres fenotípicos, como correlaciones genéticas (Lande 1979, Lande & Arnold 1983, Price & Langen 1992) y correlaciones ligadas al desarrollo (Cheverud 1996, Wilkins 2002, Klingenberg 2004). Estos factores podrían limitar o restringir la respuesta independiente o autónoma de caracteres particulares a presiones selectivas específicas y, a la vez, limitar la evolución de los patrones de integración. A

continuación se exponen estos factores y se discute si efectivamente éstos pueden limitar la respuesta de las correlaciones fenotípicas a la selección natural.

Correlaciones genéticas. Se ha sugerido que las correlaciones fenotípicas serían la expresión de correlaciones genéticas causadas por pleiotropía o ligamiento genético. Originalmente se propuso que las correlaciones genéticas se mantendrían constantes dentro de un linaje restringiendo la respuesta a la selección natural. Esta restricción evolutiva obedecería a que los mecanismos genéticos subyacentes no permitirían una alta producción de fenotipos variables por mutación, y de permitirlos, éstos estarían acompañados por cambios concomitantes en otros aspectos del fenotipo (Lande 1979, Lande & Arnold 1983, Price & Langen 1992). Aunque tanto en plantas como en animales, se ha mostrado que las correlaciones fenotípicas son similares a las correlaciones genéticas (Cheverud 1988, Arnold 1992, Roff 1996, Waitt & Levin 1998), también se ha notado que las correlaciones genéticas y fenotípicas pueden variar dentro de un linaje (revisado por Roff 2000, Stepan et al. 2002). En el caso de las correlaciones fenotípicas entre caracteres florales, se ha mostrado que éstas pueden variar entre especies congénicas, poblaciones o tipos florales de la misma especie (Kudoh et al. 2001, Herrera et al. 2002, Murren et al. 2002, Ushimaro et al. 2003, pero ver Herrera 1990). Considerando esta variación, se ha propuesto que la selección natural podría generar patrones adaptativos de correlaciones genéticas y que por ende, éstas no constituirían una restricción significativa a la evolución morfológica (Armbruster 1996, Cheverud 1996).

Correlaciones ligadas al desarrollo. La integración o covariación caracteres también puede ser el resultado de interacciones en el desarrollo; ya sea por conexiones directas

entre las vías de desarrollo que producen los caracteres, o por variación paralela de las vías de desarrollo que responden al mismo factor extrínseco (Cheverud 1996, Wilkins 2002, Klingenberg 2004). En el caso de los caracteres florales se ha sugerido que estos tenderían a permanecer ligados por únicamente por pertenecer a la misma unidad de desarrollo (revisado por Murren 2000), y que las interacciones serían especialmente fuertes los caracteres florales pertenecientes al mismo verticilo (ver Herrera et al 2002). Runions y Gerber (2000) evaluaron si la integración en el desarrollo puede limitar la evolución independiente de caracteres florales y, de esta manera, restringir la respuesta a la selección natural. Los autores compararon dos subespecies de *Clarkia*, una exógama y otra autógena, y examinaron las diferencias en los patrones de desarrollo floral y en los patrones de covariación de los caracteres. Al encontrar que los patrones de desarrollo floral y los patrones de covariación de caracteres no se conservaban entre las subespecies, los autores concluyeron que los factores del desarrollo no limitan la evolución independiente de los caracteres florales en estas subespecies.

A pesar del creciente número de estudios sobre integración fenotípica, todavía no hay un consenso sobre la importancia de la selección natural y de otros factores que podrían promover la integración fenotípica o la organización de los fenotipos en módulos o unidades de covariación (Armbruster 1996, Murren 2002, Pigliucci 2003). Para dar luces sobre esta problemática se ha resaltado la importancia de realizar estudios comparativos que combinen información filogenética y ecológica (Roff 2000, Pigliucci 2003), y que permitan evaluar en forma conjunta el efecto de la selección natural y la historia evolutiva en los patrones de integración (ver por ejemplo, Jerningan et al. 1994,

Marroig & Cheverud 2001, Murren et al. 2002). En el caso de los caracteres florales, se ha resaltado la importancia de realizar estudios que abarquen distintos modos o tipos de polinización, y que permitan identificar los impactos de distintas presiones selectivas en las correlaciones fenotípicas (Murren 2002, ver por ejemplo, Herrera et al. 2002).

El principal objetivo de esta tesis fue examinar los patrones de integración floral de las especies del género *Schizanthus* e identificar cómo han evolucionado los patrones de integración floral en relación a cambios en la dependencia funcional de polinizadores y en los modos de polinización. Para ello, se realizó un estudio comparativo entre los patrones de integración de caracteres florales y los sistemas de reproducción y polinización del género *Schizanthus*, en un contexto filogenético.

El género *Schizanthus* está conformado por 12 especies de plantas anuales y bianuales distribuidas en Chile y Argentina (Grau & Grönbach 1984). El género se eligió porque sus flores zigomórficas y bilabiadas presentan un sistema de polinización especializado (Cocucci 1989), y porque las especies presentan una amplia variación en la forma y color de las flores. Aún cuando no se han realizado observaciones sistemáticas de polinizadores, la amplia variación en la morfología floral sugiere en el género pueden haber diferencias interespecíficas en el tipo de polinizador y en la función de los caracteres durante la polinización. Además se han descrito diferencias interespecíficas en la posición y en el grado de ejercer de los estambres (Walters 1969), que sugieren que en el género también puede haber diferencias interespecíficas en el grado de hercogamia (distancia espacial entre los órganos reproductivos) y por ende, en la dependencia de polinizadores. A continuación se discuten otros antecedentes del modelo de estudio.

MODELO DE ESTUDIO

El género *Schizanthus* fue establecido por Ruiz y Pavón (1798), usando como especie tipo a *S. pinnatus*. Hasta el momento 45 nombres de especies y 5 variedades han sido registradas en la literatura (Gray Herbarium Card Index). La primera revisión crítica del género fue escrita por Reiche en 1910. Revisiones posteriores fueron realizadas por Sudzuki (1969), Walters (1969), y Grau y Gronbach (1984). Para el desarrollo de esta tesis se siguió el tratamiento del género dado por Grau y Gronbach, quienes reconocen doce especies, sin variedades. El reconocimiento de una treceava especie, *S. coccineus*, fue propuesto por Watson en 1998, como basónimo de *S. grahamii* var. *coccineus*. Sin embargo, esta proposición no fue considerada para el desarrollo de esta tesis, porque otros autores han criticado el reconocimiento de esta nueva especie, adjudicándola a variaciones en forma y color de *S. grahamii* (Clodomiro Marticorena, Universidad de Concepción, comunicación personal).

Afinidades taxonómicas del género

Schizanthus presenta características morfológicas muy particulares, que han dado origen a una larga discusión respecto a sus afinidades taxonómicas. Inicialmente, *Schizanthus* fue incluido en la familia Scrophulariaceae, principalmente por sus flores zigomórficas y estambres didínamos. Posteriormente, se traspasó a la familia Solanaceae, basándose en la existencia de características químicas y anatómicas comunes con otros miembros esta familia, como la presencia de tropano alcaloides (Gámbaro et al 1982), floema interno, gineceo con orientación recta, endosperma nucleado (revisado por Hunziker 1979).

Dentro de las Solanáceas, *Schizanthus* se incluyó inicialmente en la tribu Salpiglossidae. Sin embargo, Grau y Gronbach (1984), basándose en las características morfológicas únicas de *Schizanthus* como la presencia de un anillo de islas floemáticas al interior del xilema (en vez de un macizo sólido como en las otras Solanáceas) y el tipo de inflorescencia (más simple que las de la Solanaceae), sugirieron que el género podría tener una posición aislada y haber tenido un desarrollo paralelo temprano a partir de la base de la familia. El aislamiento de *Schizanthus*, también ha sido sugerido por estudios químicos que indican que éste presenta un espectro de alcaloides único en la familia (Tétényl 1989). Finalmente, estudios filogenéticos basados en datos moleculares (Olmstead & Palmer 1992), muestran a *Schizanthus* como una tribu monogénica, derivadamente tempranamente dentro de las Solanáceas, y separada de otras especies de la tribu Salpiglossidae. Actualmente *Schizanthus*, es considerada una tribu monogénica, Schizanthoideae, ubicada dentro de las Solanáceas

Distribución del Género

El género *Schizanthus* se restringe a Chile y Argentina. Las 12 especies descritas crecen en Chile, y se distribuyen entre los 24 y 42° S de latitud (Fig.1.1), ocupando diversas formaciones vegetacionales: desierto, matorral y bosque esclerófilo, estepa altoandina, bosque caducifolio (regiones según Gajardo 1993).

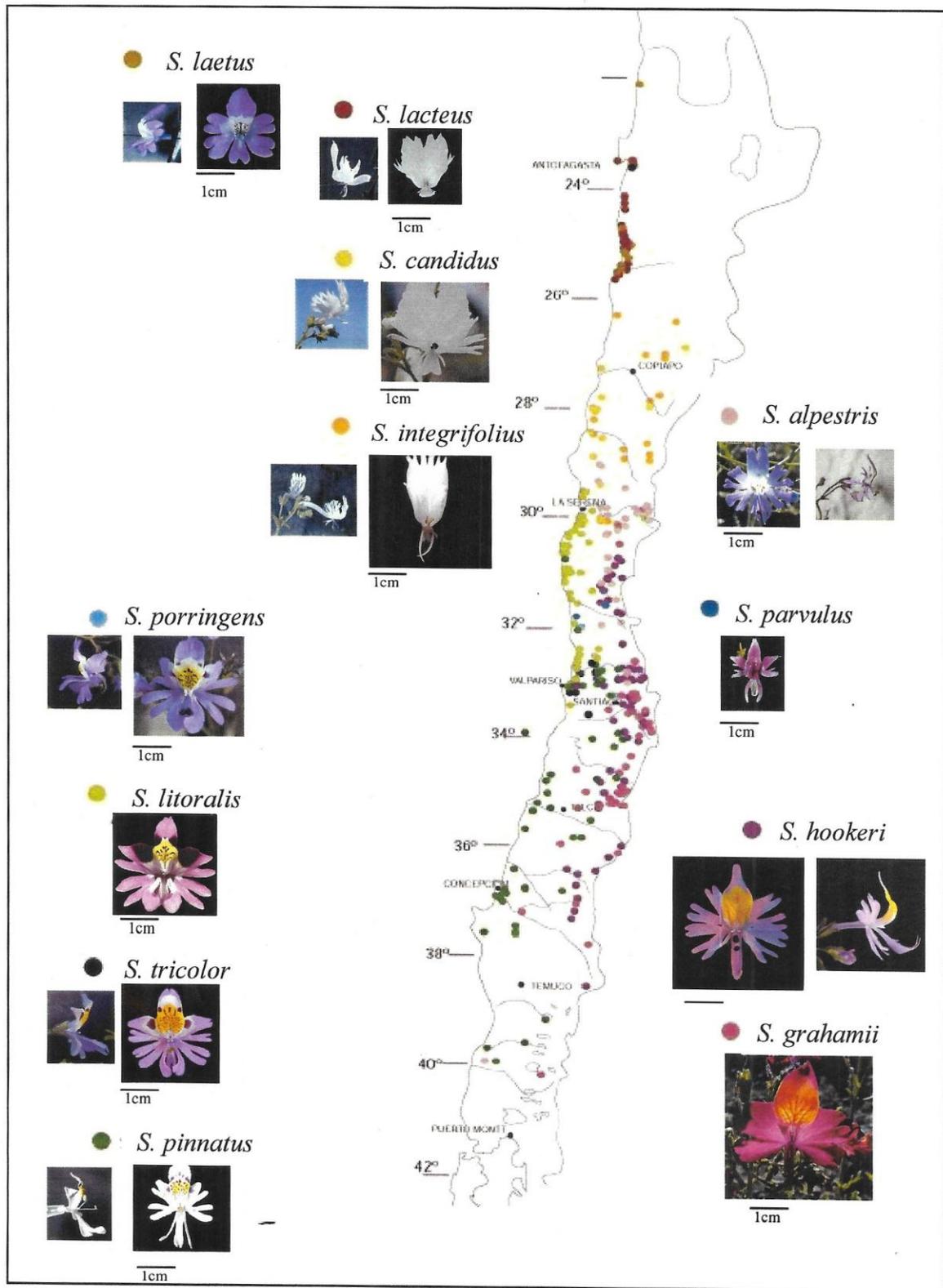


Fig. 1.1. Distribución y morfología floral de las 12 especies descritas de *Schizanthus*. Los puntos corresponden a las coordenadas de las colectas almacenadas en la Base Electrónica de la Flora de Chile de la Universidad de Concepción y del Museo de Historia Natural. Para todas las especies se muestran fotografías frontales de la corola. En algunos casos también se muestran fotografías laterales de las flores.

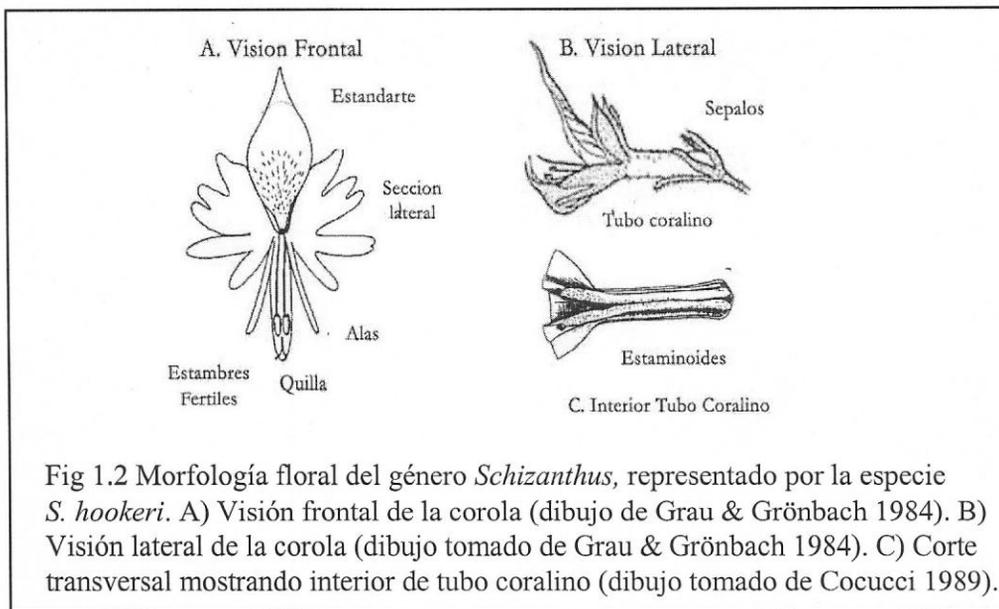


Fig 1.2 Morfología floral del género *Schizanthus*, representado por la especie *S. hookeri*. A) Visión frontal de la corola (dibujo de Grau & Grönbach 1984). B) Visión lateral de la corola (dibujo tomado de Grau & Grönbach 1984). C) Corte transversal mostrando interior de tubo coralino (dibujo tomado de Cocucci 1989).

Morfología del género

Schizanthus esta conformado por hierbas anuales o bianuales de hasta 1 m de alto, cubiertas de pelos simples o glandulosos. Las flores son zigomórficas y bilabiadas, con una forma similar a la de las papilionáceas (Fig. 1.2). La corola está formada por 5 pétalos parcialmente fusionados en un tubo coralino. Los tres pétalos superiores forman el labio superior, el pétalo del medio forman el estandarte y los dos pétalos laterales forman las secciones laterales, las cuales están divididas en dos o más lóbulos. Los dos pétalos inferiores conforman el labio inferior, cada uno está profundamente cortado en el medio, las dos mitades interiores de estos pétalos se unen y forman la quilla y las dos mitades exteriores forman dos alas. El androceo es incompleto, sólo 2 de los 5 estambres son fértiles, éstos crecen juntos dentro del tubo. Los filamentos de los dos estaminoides más grandes dividen al tubo coralino en dos conductos longitudinales, el ventral aloja al gineceo y el dorsal tiene carácter nectarífero, en su extremo exterior se asocia con la guía nectarífera y en la base con el nectario.

Variación interespecífica en la morfología floral

Las especies de *Schizanthus* presentan una amplia variación en el tamaño, color y forma floral (Fig.1.1). El tamaño de la corola varía desde 0,5 cm a 6 cm. Las flores pueden ser de colores pálidos o de colores intensos. Por ejemplo, las especies del desierto son blancas, mientras que las especies altoandinas presentan un estandarte amarillo que contrasta con el color lila o rojo de las secciones laterales. La forma de la corola también es variable, especialmente el tamaño y forma del labio inferior, el largo del tubo coralino, y la orientación y segmentación de las secciones laterales del labio superior. Estas variaciones permiten reconocer dos síndromes de polinización (Fig.1.3): melitofilia o polinización por himenópteros y falenofilia o polinización por lepidópteros nocturnos (Cocucci 1989). La melitofilia es asociada a flores violetas, con secciones laterales orientadas frontalmente, labio inferior desarrollado y un sistema de liberación explosivo de polen (SLE). La falenofilia es asociada a flores blancas, con las secciones laterales orientadas hacia atrás, labio inferior reducido y sin SLE.

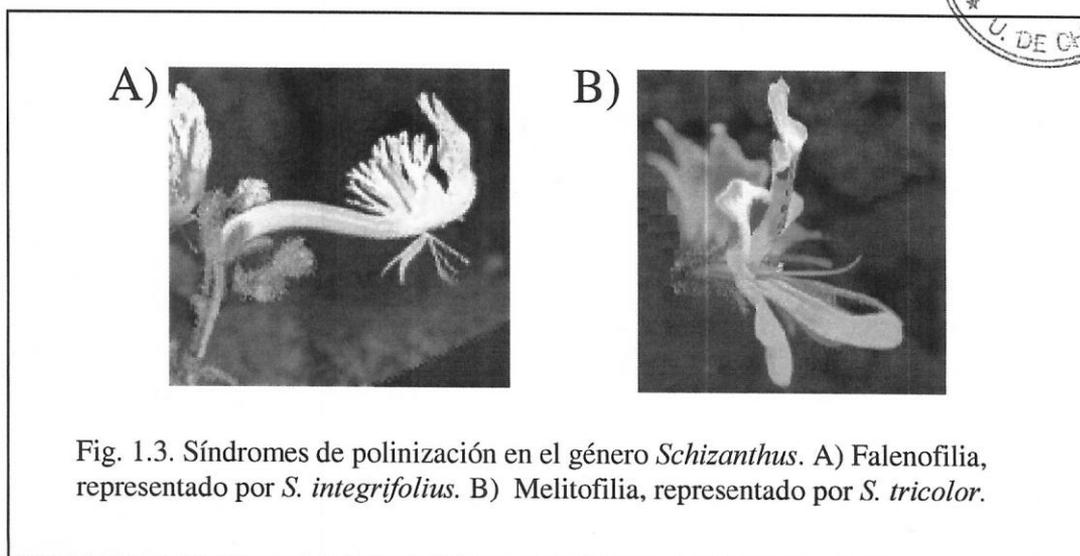


Fig. 1.3. Síndromes de polinización en el género *Schizanthus*. A) Falenofilia, representado por *S. integrifolius*. B) Melitofilia, representado por *S. tricolor*.

HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

En la tesis se evaluaron las siguientes hipótesis y predicciones;

H1: Si en el género *Schizanthus*, la evolución de la integración floral es producto de un proceso no adaptativo o selectivamente neutro, entonces se espera que:

- Exista una fuerte señal filogenética en los patrones de integración floral, aún cuando los sistemas de polinización y de reproducción no muestren un patrón conservativo en la filogenia.

H2: Si en el género *Schizanthus*, la integración de la corola es consecuencia de la selección mediada por polinizadores, entonces se espera que:

- Una disminución en la dependencia de polinizadores debiera conllevar una reducción en el grado de integración entre los caracteres florales que promueven la polinización por animales.
- Cambios en las relaciones funcionales entre los caracteres florales durante la polinización, producto de diferencias en los mecanismos de polinización, debieran conllevar cambios en la estructura de la integración floral

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para evaluar las predicciones señaladas y someter a prueba las hipótesis se consideraron los siguientes objetivos específicos:

- Construir una hipótesis filogenética de las especies del género *Schizanthus* inferida a partir de datos independientes de la morfología floral.
- Caracterizar los sistemas de reproducción del género *Schizanthus* y examinar sus trayectorias evolutivas.
- Caracterizar los sistemas de polinización del género *Schizanthus* y examinar sus trayectorias evolutivas.
- Examinar la variación interespecífica en los patrones de integración de los caracteres de la corola en *Schizanthus* y su relación con la historia filogenética y ecología de las especies.

ORGANIZACIÓN DE LA TESIS

La tesis está organizada en seis capítulos. El primer capítulo corresponde a esta introducción. Los cuatro capítulos siguientes están escritos en forma de artículos y abordan los cuatro objetivos específicos propuestos.

- El segundo capítulo trata sobre las relaciones filogenéticas del género *Schizanthus* inferidas a partir de datos independientes de la morfología floral. En este capítulo se presenta la construcción de una hipótesis filogenética del género inferida a partir de las secuencias de los genes ITS y waxy del ADN nuclear y de la región trnF/ndhJ del ADN de cloroplasto. Se comparan los resultados con los obtenidos por otros autores sobre la

base de datos químicos y morfológicos y se discute la solidez de los datos moleculares para estimar las relaciones filogenéticas en el género.

- El tercer capítulo trata sobre la evolución de los sistemas de reproducción en el género *Schizanthus*. Se caracterizan los sistemas de reproducción de 9 especies del género, a través del seguimiento del desarrollo floral y estimaciones de la capacidad de autofertilización espontánea. Sobre la hipótesis filogenética construida para el género se trazan las trayectorias evolutivas de los sistemas reproductivos con el objeto de determinar la dirección, frecuencia y ambientes en que ocurren las transiciones. Adicionalmente se evalúa cómo cambia el tamaño de la corola en estas transiciones.
- El cuarto capítulo trata sobre la evolución de la morfología floral y de los sistemas de polinización del género. Se estudia en detalle la morfología floral de las especies y se examina la validez de los síndromes de polinización descritos para el género a través de la observación de sus polinizadores. Sobre la hipótesis filogenética construida se trazan las trayectorias evolutivas de los síndromes de polinización y de los polinizadores asociados con el objeto de determinar la dirección, frecuencia y ambientes en que ocurren las transiciones. Además se trazan las trayectorias evolutivas de los caracteres florales para determinar cómo cambian éstos durante las transiciones entre sistemas de polinización y analizar el compromiso entre selección natural e inercia filogenética en la evolución de la morfología floral.
- El quinto capítulo trata sobre la evolución de la integración floral en *Schizanthus* en relación a cambios en los sistemas de polinización y reproducción. En este capítulo se entra de lleno a responder las principales hipótesis planteadas en el proyecto. Se

examina la variación en los patrones de integración de la corola entre las especies de *Schizanthus* y su relación con la historia filogenética, y ecología de las especies.

Finalmente, el sexto capítulo es una conclusión general, donde sobre la base de los resultados de esta tesis se elabora un modelo que resume el papel de la selección natural mediada por polinizadores y otros factores en la evolución de los patrones de integración de la corola en *Schizanthus*.

REFERENCIAS

- ACKERLY DD & MJ DONOGHUE 1998 Leaf size, sampling allometry and Corner's rules: phylogeny and correlated evolution in maples (*Acer*). *American Naturalist* 152:767-791
- AIGNER PA 2001 Optimality modeling and fitness trade-offs: when should plants become pollinator specialists? *Oikos* 95:177-184.
- ANDERSSON S & B WIDÉN 1993 Pollinator-mediated selection on floral traits in a synthetic population of *Senecio integrifolius* (Asteraceae) *Oikos* 66:72-79
- ARMBRUSTER WS 1991 Multilevel analysis of morphometric data from natural plant populations: insights into ontogenetic, genetic and selective correlations in *Delechia scadens*. *Evolution* 45:1229-1244
- ARMBRUSTER WS 1996 Evolution of floral morphology and function: an integrative approach to adaptation, constraint and compromise in *Dalechampia* (Euphorbiaceae). En: Lloyd DG & SCH Barrett (eds). *Floral Biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants*: 241-272. Chapman & Hall, New York
- ARMBRUSTER WS & KE SCHWAEGERLE 1996 Causes of covariation of phenotypic traits among populations. *Journal of Evolutionary Biology* 9:261-276

- ARMBRUSTER WS, Di STILIO VS, TUXILL JD, FLORES TC & JL VELÁSQUEZ
1999 Covariance and decoupling of floral and vegetative traits in nine neotropical plants: a re-evaluation of Berg's correlation-pleiades concept. *American Journal of Botany* 86:39-55
- ARNOLD SJ 1992 Constraints on phenotypic evolution. *American Naturalist* 140: S85-S107
- ARNOLD SJ & P PHILLIPS 1999 Hierarchical comparison of genetic variance-covariance matrices II. Coastal-inland divergence in the garter snake, *Thamnophis elegans*. *Evolution* 53:1516-1527
- ARROYO MTK & F SQUEO 1990 Relationship between plant breeding systems and pollination. En: Kawano (ed). *Biological approaches and evolutionary trends in plants*: 205-227. Academic Press, London
- BAKER RH & GS WILKINSON 2003 Phylogenetic analysis of correlations structure in stalk-eyed flies *Diasemopsis*, Diopsidae. *Evolution* 5:87-103
- BARRETT SCH 2004 Flower diversity and plant mating strategies. En: McGraw-Hill Yearbook of Science & Technology: 110-113. McGraw Hill Inc, New York
- BARRETT SCH & SW GRAHAM 1997 Adaptative radiation in the aquatic plant family Pontederiaceae: insight from phylogenetic analysis. En: Givnish TJ, Sytsma KJ (eds). *Molecular evolution and adaptative radiation*: 225-258. Cambridge University Press, Cambridge
- BERG RL 1960 The ecological significance of correlation pleiades. *Evolution* 17:171-180
- COCUCCI A 1989 El mecanismo floral de *Schizanthus*. *Kurtziana* 20:113-132
- CONNER JK & A STERLING 1995 Testing hypotheses of functional relationships: a comparative survey of correlation patterns among floral and vegetative traits in five insect-pollinated plants. *American Journal of Botany* 82:1399-1406
- CRUDEN WR 1977 Pollen-ovules ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31:32-46
- CHEVERUD JM 1988 A comparison of genetic and phenotypic correlations. *Evolution* 42:958-968

- CHEVERUD JM 1996 Developmental integration and the evolution of pleiotropy. *American Zoology* 36:44-50
- DARWIN C 1983 El origen de las especies (traducción): 200-203. Altamira, Madrid
- DAVIS SL 2001 Phenotypic and genetic correlations among floral traits in two species of *Thalictrum*. *The Journal of Heredity* 92:361-366
- FÆGRI K & L van der PIJL 1979. The principles of pollination ecology. Pergamon Press, New York
- GÁMBARO V, LABBE C & M CASTILLO 1982 Angeloyl, tigloyl and seneciolyxotropane alkaloids from *Schizanthus hookeri*. *Phytochemistry* 22:1838-1839
- GÓMEZ JM 2002 Generalización en las interacciones entre plantas y animales. *Revista Chilena de Historia Natural* 75:105-116
- GÓMEZ JM & R ZAMORA 1999 Generalization vs. specialization in the pollination system of *Hormatophylla spinosa* (Cruciferae). *Ecology* 80:796-805
- GOODIN JT & MS JOHNSON 1992 Patterns of morphological covariation in *Partula*. *Systematic Biology* 41:292-304
- GRAY HERBARIUM CARD INDEX
- GRAU J & E GRÖNBACH 1984 Untersuchungen zur Variabilität in der Gattung *Schizanthus* (Solanaceae). *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 20:111-203
- HERRERA CM 1990 The adaptedness of the floral phenotype in a relict endemic, hawkmoth-pollinated violet. 2. Patterns of variation among disjunct populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 40:275-291
- HERRERA CM 1993 Selection on complexity of floral outline in a hawkmoth-pollinated violet. *Evolutionary Trends in Plants* 7:9-13
- HERRERA CM 1996 Floral traits and plant adaptation to insect pollinators: a devil's advocate approach. En: Lloyd DG & SCH Barrett (eds). *Floral Biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants* 65-87. Chapman and Hall, New York
- HERRERA CM, CERDA X, GARCIA MB, GUITIAN J, MEDRANO M, REY PJ & AM SANCHEZ-LAFUENTE 2002 Floral integration, phenotypic covariance

- structure and pollinator variation in bumblebee-pollinated *Helloborus foetidus*. *Journal of Evolutionary Biology* 15:108-121
- HUNZIKER AT 1979 South American Solanaceae: a synoptic survey. En: Hawkes JG, Lester RN & AD Skelding (eds). *The Biology and Taxonomy of Solanaceae*: 49-85. Academic Press, London
- JERNIGAN RW, CULVER DC & DW FONG 1994 The dual role of selection and evolutionary history as reflected in genetic correlations. *Evolution* 48:587-596
- JOHNSTON MO 1991 Natural selection on floral traits in two species of *Lobelia* with different pollinators. *Evolution* 45:1468-1479
- JOHNSON SD & KE STEINER 2000 Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology and Evolution* 15:140-143
- KLINGENBERG CP 2004 Integration, modules and development: molecules to morphology to evolution. En: Pigliucci M & K Preston (eds). *Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes*. Oxford University Press, New York
- KUDOH H, SUGAWARA T, WU S & J MURATA 2001 Morph-specific correlations between floral traits in a distylous *Ophioriza napoensis* Rubiaceae population in southern China. *Journal of Tropical Ecology* 17:719-728
- LANDE R 1979 Quantitative genetic analysis of multivariate evolution, applied to brain: body size allometry. *Evolution* 33:402-416
- LANDE R & SJ ARNOLD 1983 The measurement of selection on correlated characters. *Evolution* 37:1210-1226
- MARROIG G & JM CHEVERUD 2001 A comparison of phenotypic variation and covariation patterns and the role of phylogeny, ecology, and ontogeny during cranial evolution of New World monkeys. *Evolution* 55:2576-2600
- MELÉNDEZ-ACKERMAN E, CAMPBELL DR & NM WASER 1997 Hummingbird behavior and mechanism of selection on flower color in *Ipomopsis*. *Ecology* 78:2532-2541
- MORGAN MTD, SHOEN DJ & TM BATAILLON 1997 The evolution of self fertilization in perennials. *The American Naturalist* 150:618-638

- MURREN CJ 2002 Phenotypic integration in plants. *Plant Species Biology* 17:89-99
- MURREN CJ, PENDLETON N & M PIGLIUCCI 2002 Evolution of phenotypic integration in *Brassica* Brassicaceae. *American Journal of Botany* 89:655-663
- OLMSTEAD, RG & JD PALMER 1992 A chloroplast DNA phylogeny of *Solanaceae*. Subfamilial relationships and character evolution. *Annals of Missouri Botanical Garden* 79:346-360
- OLSON E & R MILLER 1958 Morphological integration. University of Chicago Press, Chicago
- OLLERTON J 1996 Reconciling ecological processes with phylogenetic patterns: the apparent paradox of plant-pollinator systems. *Journal of Ecology* 84:767-769
- ORNDUFF R 1969 Reproductive biology in relation to systematic. *Taxon* 18:121-123
- PIGLIUCCI M 2003 Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes. *Ecology Letters* 6:265-272
- PIGLIUCCI M, CAMEL K & J SCHMITT 1999 Evolution of phenotypic plasticity: a comparative approach in the phylogenetic neighborhood of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Evolutionary Biology* 12:779-791
- PRICE T & T LANGEN 1992 Evolution of correlated characters. *Trends in Ecology and Evolution* 7:307-310
- REICHE C 1910 Flora de Chile: 5. Santiago
- RISKA B 1985 Group size factors and geographic variation of morphometric correlation. *Evolution*: 39:792-803
- ROFF DA 1996 The evolution of genetic correlations: an analysis of patterns. *Evolution* 50:1392-1403
- ROFF DA 2000 The evolution of the G matrix: selection or drift? *Heredity* 84:135-142
- RUIZ H & PAVON J 1798 Flora Peruviana et Chilensis: I. Madrid
- RUNIONS CJ & M GEBER 2000 Evolution of the self-pollinating flower in *Clarkia xantiana* Onagraceae. I. Size and development of floral organs. *American Journal of Botany* 87:1439-1451

- SCHOEN DJ 1977 Morphological, phenological, and pollen-distribution evidence of autogamy and xenogamy in *Gilia achilleifolia* (Polemoniaceae). *Systematic Botany* 2:280-286
- SCHWENK K & GP WAGNER 2001 Function and the evolution of phenotypic stability: connecting pattern to process. *American Zoologist* 41:552-563
- STEBBINS GL 1970 Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, 1: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1:307-326
- STEBBINS GL 1974 Flowering plants. Evolution above the species level. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts
- STEPPAN SJ, PHILLIPS P & D HOULE 2002 Comparative quantitative genetics: evolution of the G matrix. *Trends in Ecology and Evolution* 17:320-327
- STEVEN J & K STEINER 2000 Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology and Evolution* 15:1-10
- SUDZUKI F 1969 Tesis Ingeniero Agrónomo. Santiago
- USHIMARO A, ITAYAKI T & H ISHI 2003 Floral correlations in an andromonoecious species, *Commelina communis* Commelinaceae. *Plant Species Biology* 18:103-106
- VASEK FC & J HARDING 1976 Outcrossing in natural populations. V. Analysis of outcrossing, inbreeding, and selection in *Clarkia exilis* and *Clarkia tembloriensis*. *Evolution* 30:403-411
- VASEK FC & V WENG 1988 Breeding systems of *Clarkia* sect. *Phaeostoma* (Onagraceae): I. Pollen-Ovule Ratios. *Systematic Botany* 13: 336-350
- WAGNER GP & L ALTENBERG 1996 Perspective: Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution* 50:967-976
- WAITT DE & LEVIN DA 1998 Genetic and phenotypic correlations in plants: a botanical test of Cheverud's conjecture. *Heredity* 80:310-319
- WALTERS D 1969 A Revision of the genus *Schizanthus* (Solanaceae). Ph. D. Thesis, Indiana University
- WASER NM, CHITTKA L, PRICE M, WILLIAMS N & J OLLERTON 1996 Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* 77:1043-1060

- WATSON J 1997 En: Hoffmann A, Arroyo MTK, Liberona F, Muñoz M & J Watson (eds). *Plantas Alroandinas en la Flora Silvestre de Chile*: 140. Fundación Claudio Gay, Santiago
- WILKINS AS 2002 *The evolution of developmental pathways*. Sinauer Associates, Sunderland
- WILSON P & JD THOMSON 1996 How do flowers diverge? En: Lloyd DG & SCH Barrett (eds). *Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants*: 88-111. Chapman and Hall, New York
- WYATT R 1984 The evolution of self-pollination in granite outcrop species of *Arenaria* (Caryophyllaceae). I. Morphological correlates. *Evolution* 19:804-816

CAPÍTULO 2. RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *SCHIZANTHUS* INFERIDAS A PARTIR DE DATOS MOLECULARES

RESUMEN

El género *Schizanthus* (Solanaceae) está conformado por 12 especies de plantas anuales y bianuales distribuidas principalmente en Chile. Aunque se han realizado estudios basados en datos químicos y morfológicos, debido a los altos niveles de homoplasia presentados, las relaciones filogenéticas entre las especies no han sido completamente aclaradas. En este trabajo, se analizaron con los métodos de máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana las secuencias de la región espaciadora trnF/ndhJ del ADN del cloroplasto, de la región ITS completa de ADN ribosomal nuclear y de la región parcial del gen nuclear waxy que codifica para la enzima GBSSI. Las regiones del ADN nuclear presentaron una mayor variabilidad que la región trnF/ndhJ del ADN de cloroplasto. Aunque los datos de las regiones nucleares presentan diferencias en la posición de algunas especies, los datos son congruentes. En la hipótesis construida con los datos combinados se pueden reconocer tres grupos de especies que se corresponden parcialmente con los grupos reconocidos a partir de datos morfológicos. Las especies xerofíticas del desierto *S. integrifolius*, *S. lacteus*, *S. candidus* y la especie cordillerana de la zona mediterránea árida, *S. alpestris*, forman un clado claramente aislado de las otras especies. Las especies restantes se separan en dos subclados, uno formado por las especies altoandinas *S. hookeri* y *S. grahamii*; y otro grupo formado por

la especie del desierto, *S. laetus* y por las especies predominantemente mesofíticas, *S. litoralis*, *S. porringens*, *S. tricolor*, *S. pinnatus* y *S. parvulus*.

INTRODUCCIÓN

El género sudamericano *Schizanthus* (Ruiz & Pavón 1798) se ha destacado por la morfología inusual de sus flores dentro de la familia Solanaceae, especialmente por su marcada zigomorfía (Hunziker 1979, Knapp 2002). Estudios filogenéticos basados en datos moleculares muestran a *Schizanthus* como una tribu monogénica (Schizanthoideae) derivada tempranamente dentro de las Solanáceas (Olmstead & Palmer 1992). Este aislamiento se manifiesta también en sus características morfológicas (Grau & Grönbach 1984) y químicas (Tétényl 1987) únicas en la familia, que dieron lugar a una larga discusión respecto a sus afinidades taxonómicas (Bentham en De Candolle 1848, Walters 1969, Hunziker 1979, Gámbaro et al. 1982, Tétényl 1987).

Schizanthus está conformado por 12 especies de plantas anuales y bianuales (Grau & Grönbach 1984), distribuidas en Chile y Argentina entre los 24 y 40° de latitud sur, ocupando diversas formaciones vegetacionales: desierto, matorral y bosque esclerófilo, estepa altoandina, bosque caducifolio (regiones según Gajardo 1993).

Las relaciones entre las especies de *Schizanthus* han sido estudiadas sobre la base de datos morfológicos (Grau & Grönbach 1984) y químicos (Peña & Muñoz 2002). Considerando principalmente la morfología de flores y frutos, Grau y Grönbach (1984) dividen al género *Schizanthus* en cuatro grupos de parentesco morfológicamente distinguibles: el primero conformado por las especies del desierto *S. candidus*, *S.*

integrifolius y *S. lacteus*, de flores blancas, orientadas hacia atrás, labio inferior reducido y tubo coralino largo; el segundo grupo conformado por las especies altoandinas *S. hookeri* y *S. grahamii* de flores coloridas, orientadas hacia delante y tubo coralino largo; el tercer grupo conformado por las especies del semidesierto *S. porringens* y *S. litoralis* con flores coloridas, orientadas hacia delante, labio inferior desarrollado y tubo coralino corto; el cuarto grupo conformado por las especies *S. tricolor* y *S. pinnatus* con una morfología floral semejante al grupo anterior, pero distribuidas más al sur. Las otras tres especies del género, *S. laetus*, *S. alpestris* y *S. parvulus*, presentan flores con características particulares dentro del género, y los autores no les reconocen relaciones de parentesco obvias.

Los grupos reconocidos por Grau y Grönbach, no son distinguidos en un estudio cladístico de *Schizanthus* (Peña & Muñoz 2002) basado en 11 caracteres morfológicos y en la presencia-ausencia de 10 alcaloides (estudiados en 6 de las 12 especies). Estos autores proponen tres pasos evolutivos. Primero, un taxón primitivo representado por *S. integrifolius*, *S. lacteus*, *S. candidus* y *S. pinnatus*; un segundo grupo representado por *S. parvulus*, *S. porringens*, *S. laetus* y *S. tricolor* y un tercer grupo representado por *S. grahamii*, *S. hookeri*, *S. alpestris* y *S. litoralis*, donde la evolución química correría desde derivados simples de pirrolidina a compuestos diméricos o triméricos de serie de tropanos más complejos. La interpretación de Peña y Muñoz (2002), sin embargo, se dificulta por el alto nivel de homoplasia de sus datos y por la ausencia de estudios químicos en otras seis especies, donde los caracteres indeterminados fueron tratados como sinapomorfías.

El objetivo de este trabajo es aclarar las relaciones filogenéticas entre las especies de *Schizanthus*, a partir de datos independientes de la morfología floral. Para lo cual se secuenciaron: la región espaciador trnF/ndhJ del ADN del cloroplasto, la región ITS completa del ADN ribosomal nuclear, la región parcial del gen waxy que codifica para la enzima GBSSI. La región ITS ha sido el marcador molecular más utilizado en sistemática de angiospermas (Baldwin et al. 1995, Hershkovitz et al. 1999), particularmente para el diagnóstico de relaciones entre géneros cercanos o grupos infragenéricos. La región waxy, aunque en menor medida, también ha sido usada en estudios filogenéticos (Masson-Gamer et al. 1998, Whitson & Manos 1999, Peralta & Spooner 2001). En algunos casos se ha encontrado que puede presentar una variabilidad comparable (Miller et al. 1999) o mayor que la región ITS (Masson-Gamer & Kellogg 1996). La región trnF/ndhJ del ADN del cloroplasto ha sido menos utilizada, aún cuando estudios filogenéticos en una gramínea muestran que la región puede presentar una mayor variabilidad que una de las regiones de cloroplasto más frecuentemente utilizada, la región espaciadora trnL/trnF (Xu & Ban 2004).

MÉTODOS

Nomenclatura taxonómica

Para la identificación de las especies se siguió el tratamiento de Grau & Grönbach (1984), quienes reconocen 12 especies (ver Fig.1.1 en la Introducción). Se colectó material de una población de cada una de las 12 especies descritas. Las ubicaciones de los sitios de colecta se detallan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Especies incluidas en el estudio y localidades donde fueron colectados los materiales para la extracción de ADN.

Espece	Localidad
<i>Schizanthus</i> Ruiz et Pav.	
<i>S. alpestris</i> Poep. ex Benth.	CHILE. IV Región: Valle del Elqui, Cuesta la Viñita, 820 msnm, 29°51'S - 70°49'W.
<i>S. candidus</i> Lindl.	CHILE. III Región: Huasco, Playa Arrayán, 40 msnm, 28°15'S - 71°09'W.
<i>S. grahamii</i> Gill. ex Hook.	CHILE. VII Región: Termas del Flaco. 1750 msnm
<i>S. hookeri</i> Gill. ex Graham	CHILE. Región Metropolitana: Sector Farellones, camino Valle Nevado, 2450 msnm, 33°21'S - 70°16'W.
<i>S. integrifolius</i> Phil.	CHILE. III Región: Alto del Carmen, 710 msnm, 28°45'S-70°29'W.
<i>S. lacteus</i> Phil.	CHILE. II Región: Paposó, Quebrada de Matancilla, 144 msnm, 25°06'S - 70°27'W.
<i>S. laetus</i> Phil.	CHILE. II Región: Paposó, 455 msnm, 25°00'S - 70°26'W.
<i>S. litoralis</i> Phil.	CHILE. IV Región: Parque Nacional Fray Jorge, 30°38'S-71°40'W.
<i>S. parvulus</i> Sudzuki	CHILE. IV Región: Reserva Nacional Las Chinchillas, Quebrada el Cobre, 580 msnm, 31°29'S-71°05'W
<i>S. pinnatus</i> Ruiz et Pav.	CHILE. Región Metropolitana: Reserva Nacional Río Clarillo, 800 msnm, 33°43'S - 70°56'W.
<i>S. porringens</i> Graham	CHILE. IV Región: Hornitos, 110 msnm, 29°38'S - 71°17'W.
<i>S. tricolor</i> Grau et Gronb.	CHILE. IV Región: Papudo, 130 msnm, 32°31'S - 71°28'W.

Extracción de ADN

EL ADN genómico de las 12 especies estudiadas fue extraído de muestras de hojas y yemas florales colectadas en terreno y secadas en silica gel. Para la extracción se usó el DNEasy Plant mini kit (Quiagen) y se siguió el protocolo sugerido por los fabricantes. La cantidad de ADN extraído fue cuantificada en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de Etidio y usando concentraciones conocidas de fago lambda como referencia (10, 25, 50 y 100 ng). Los geles fueron corridos en cámaras de electroforesis a 60 mV por 40 min, y fotografiados en un transiluminador UV.

Amplificación de ADN

Se amplificaron tres regiones de ADN con el método de PCR: (1) la región *trnF/ndhJ* del ADN del cloroplasto, que corresponde a la región espaciadora entre los genes que codifican para el ARN de transferencia del aminoácido fenilalanina y para la subunidad J de la nitrogenodeshidrogenasa; (2) la región ITS del ADN ribosomal nuclear que incluye las regiones espaciadoras ITS 1 e ITS 2 y la secuencia codificante de la subunidad 5.8S; y (3) la secuencia parcial del gen *waxy* del ADN nuclear que codifica para la enzima ligadora de gránulos almidón sintetasa (GBSSI). Los protocolos específicos usados para la amplificación de cada región se detallan más abajo. La cantidad, tamaño y calidad de los productos de PCR obtenidos fueron evaluados en geles de agarosa al 2% (en TBE) teñidos con Bromuro de Etidio, usando como referencia el marcador de peso molecular Φ 174 DNA/BsuRI (Fermentas). Los geles fueron corridos en cámaras de electroforesis a 60 mV por 1 hr. y fotografiados en un transiluminador

UV. En cada reacción se incluyeron controles negativos para detectar posibles contaminantes. Los productos de PCR fueron purificados por precipitación con glicol polietileno (PEG) (ver detalles en Glenn 2003), para lo cual se incubaron a 37° C por 15 min en una solución de PEG 8000 (Sigma) al 20% y 2,5M NaCl. Después de centrifugar a máxima velocidad, el precipitado se lavó tres veces con etanol al 80% y se resuspendió en 17 µl de agua destilada.

(1) trnF/ndhJ. Esta región se amplificó en dos etapas siguiendo el protocolo de Hershkovitz & Zimmer (1997). Primero a partir del ADN genómico se amplificó un producto de doble hebra utilizando la pareja de partidores degenerados GYTGGTAGAGCAGAGGACTG y trnf/ndhj 2 , localizados en la posición 47773 y 50254 del genoma del cloroplasto de *Nicotiana tabacum*. Posteriormente, el producto de PCR de doble hebra obtenido, se reamplificó en forma asimétrica, utilizando uno de los partidores internos GGACTGAAAATCCTCGTGTC o TGGATAGGATGGCCCTTAC5, localizados en las posiciones 50268 y 51057 respectivamente de *N. tabacum*. Este protocolo permite obtener como ADN templado productos enriquecidos con ADN de una hebra en dirección 3' o 5'. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador marca Eppendorff Modelo 5331 en un volumen final de 25 µl y usando 0,6 u/ul Taq DNA Polimerasa, Buffer 1x, 1,5 mM MgCl₂, 100 µM dNTP, 1 µM partidores, 0,2 a 2 ng de ADN genómico (para la primera amplificación) o 0,5 µl del producto de PCR (para la segunda amplificación), con todos los reactivos de marca Promega. Se usó el siguiente protocolo de temperaturas para la primera amplificación: 97 °C-45 seg.; 2 ciclos de 96 °C-30 seg., 52°C- 30 seg., 72°C-2

min; 2 ciclos de 96°C-30 seg., 50°C-30 seg., 72° C 2 min; 26 ciclos de 96°C-45 seg., 48°C-45 seg., 72°C-2 min; extensión final 72°C-7 min. Para la amplificación asimétrica se usó el siguiente programa: 97°C-1 min, 20 ciclos de 94°C-1 min, 50°C-30 seg., 72°C-2,5 min. Para alcanzar las temperaturas de alineamiento se usó una rampa de 1,5°C/seg.

(2) ITS. Esta región también se amplificó en dos etapas siguiendo el protocolo de Hershkovitz & Zimmer (1997). Primero a partir del ADN genómico se amplificó un producto de doble hebra utilizando la pareja de partidores TTTCTTTTCCTCCGCTTA e GAAGGAGAAGTCGTAACAAG. Posteriormente, el producto de PCR de doble hebra se reamplificó asimétricamente usando el partidor interno ITS4 (White et al. 1990) para obtener el ADN templado de hebra única con dirección 5'y el partidor N18L18 (Hershkovitz & Zimmer 1997) para obtener el ADN templado en la dirección opuesta. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl y usando 0,5 µ/µlTaq DNA Polimerasa, 1X Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 100 µM dNTP, 1µM partidores, 2 a 20 ng de ADN genómico (para la primera amplificación) o 0,7 µl del producto de PCR (para la segunda amplificación). El siguiente programa de temperaturas se usó para la primera amplificación: 97° C 2 min; 3 ciclos de 94° C 45 seg., 52.5°C-45 seg., 72° C 2 min; 27 ciclos de 94° C 45 seg., 50°C-45 seg., 72°C-2 min; extensión final a 72°C-7 min. Para la amplificación asimétrica se usó el siguiente programa: 97°C-1 min, 20 ciclos de 94°C-1 min, 48°C-1 min, 72°C-2 min. Para alcanzar las temperaturas de alineamiento se usó una rampa de 1.5°C/seg.

(3) Waxy. Una región de 850 Kb fue amplificada usando la pareja de partidores CTAYAARMGAGGGGTTGATCG y GCRTTCATCCAGTTGATTTTC localizados en el exón 2 y exón 7 de *Solanum tuberosum* (especie donde fue clonado el gen por van der

Leij et al. 1991). Para 11 de las 12 especies estudiadas el producto de PCR de doble hebra obtenido pudo ser secuenciado directamente usando partidores internos. El ADN de *S. alpestris* presentó un alto nivel de polimorfismo intragenómico y debió ser clonado. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 50 μ l, usando 0,8 μ / μ l Taq DNA Polimerasa, 1X Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 100 μ M dNTP, 1,2 μ M partidores, 2 a 20 ng de ADN genómico. Se utilizó el mismo programa de temperaturas que para la primera amplificación de la región trnF/ndhJ.

Clonación

Los productos de PCR purificados con PEG, debieron ser repurificados en geles de agarosa para obtener una ligación exitosa. Para lo cuál, los productos se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% disuelto en TAE por 2:30 a 50 V. Una banda de 850 Kb fue extraída con un bisturí y purificada con silica (Frank 1997). Para la ligación y clonación se utilizó el InsT/A clone PCR product cloning kit (Fermentas) y se siguió el protocolo del fabricante con algunas modificaciones. La reacción de ligación se realizó en un volumen de 15 μ l con ligasa, buffer, PEG a 22° y por 2 hrs. El producto de la ligación se examinó en un gel de agarosa al 2%, usando como referencia (1) el producto de PCR sin ligar, (2) plastidio abierto sin inserto, y (3) plastidio cerrado sin inserto. La transformación se realizó en células XL1-Blue *Epicurian coli* cultivadas en placas con LB y Tetraciclina 12 μ M. Se incluyeron tres controles en la transformación: dos controles negativos, uno con agua y otro con el plastidio cerrado sin inserto, y un control positivo con un plastidio con un inserto control. Para la selección de las colonias

transformadas se utilizaron placas con medio LB con 50 μ M de Ampicilina, 12 μ M de Tetraciclina, 40 μ l de IPTG, 40 μ l de Galactosa. Se obtuvieron un 80% de colonias blancas, de las cuales se seleccionaron 15. Los fragmentos de waxy se amplificaron usando los mismos partidores y condiciones que para las otras especies de *Schizanthus*, pero agregando en el ciclo de temperaturas, un golpe inicial de calor a 100°C por 2 min para provocar la lisis celular.

Secuenciación

Los productos de PCR de hebra única (en el caso de ITS y trnF/ndhJ) y de doble hebra (en el caso de waxy) fueron secuenciados en ambas direcciones usando el ABI Prism BigDye Cycle Sequencing Ready Reaction kit, siguiendo el protocolo del fabricante con algunas modificaciones. Las reacciones de secuencia fueron realizadas en un volumen final de 20 μ l, usando 1,5 μ l Big Dye versión 3.1, 1X Buffer, 0,16 μ M de partidores, 10 ng del producto de PCR purificado (PEG). Para secuenciar los fragmentos de ITS y de trnF/ndhJ se utilizó el mismo grupo de partidores internos que en la amplificación por PCR. Para secuenciar el gen waxy se usaron los partidores internos GGCACACTGCTCTACTTCC y GRTAKGCAATGTTGTGGATGC. Las reacciones de secuenciación fueron realizadas en un termociclador, con el siguiente programa de temperaturas: 96°C 1 min, 35 ciclos de 96°C 40 seg, 50°C 10 seg (rampa 1,0°C/seg.), 60°C 4 min. Para remover el exceso de terminadores marcados, los productos de secuenciación fueron precipitados en acetato de amonio, EDTA y etanol 90%, liofolizados y resuspendidos en 15 μ l de formamida high-dye, siguiendo el protocolo del

fabricante. Posteriormente, los productos de secuenciación fueron corridos en un secuenciador ABI 3100 y las secuencias obtenidas fueron examinadas con el programa ABI. Las secuencias en la dirección 5' y 3' obtenidas para cada producto de PCR fueron comparadas y corregidas usando el programa Bioedit (Hall 1999), a partir de las cuales fue generada una secuencia consenso.

Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas fueron alineadas manualmente usando el programa Bioedit. Los datos de la región trnF/ndhJ, ITS y waxy se analizaron por separado con los métodos de máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (MV). Los datos fueron combinados y analizados además con el método de inferencia Bayesiana (MB).

Los análisis de MP se realizaron con el programa PAUP 4.0 (Swofford 1998), a través de búsquedas exhaustiva y tratando a los caracteres como no ordenados y con pesos equivalentes. Los múltiples árboles más parsimoniosos se combinaron en un árbol consenso estricto. Para evaluar la homoplasia, se estimaron el índice de consistencia (CI) y el índice de retención (RI). El apoyo estadístico de los nodos del árbol fue evaluado por remuestreo (Felsenstein 1985), utilizando 1000 repeticiones realizadas con el método de búsqueda heurística, a través de la adición aleatoria de taxa basada en 5 repeticiones y la reorganización de las ramas con el método de disección/reconexión (TBR branch swapping). La congruencia entre las tres regiones, trnF/ndhJ, ITS y waxy, se evaluó con la prueba de diferencias de largos (Farris et al. 1985), implementada en el programa PAUP, sobre la base de 500 repeticiones.

Los análisis de MV se realizaron con el programa el PAUP 4.0 (Swofford 1998), a partir de búsquedas heurísticas, usando la adición aleatoria de taxa (random stepwise) con 5 replicaciones, la reorganización de ramas con el método de TBR, y la opción de guardar sólo el mejor árbol. El modelo de evolución se seleccionó usando el método de Posada y Crandall (2001). Para cada grupo de datos se evaluaron distintos modelos de evolución en el árbol obtenido por el método del “Vecino más Cercano” (Neighbor Joining) y se prefirió el modelo más simple (con menos parámetros) que no fuera rechazado al ser comparado con un modelo alternativo más complejo. La preferencia por los modelos más simples se basa en que la introducción de más parámetros introduce fuentes potenciales de error (Nei & Kumar 2000). Las comparaciones entre modelos se realizaron con la prueba de razones de verosimilitud (Goldman 1993), para lo cual se estimó el operador $\delta = 2 * (\ln L_1 - \ln L_0)$ y se evaluó en una distribución χ^2 con N grados de libertad, donde $\ln L_0$ = puntaje de verosimilitud con el modelo de evolución más simple, $\ln L_1$ = puntaje de verosimilitud con el modelo de evolución más complejo, y N = diferencia en el número de parámetros entre los dos modelos. El modelo de evolución más simple que mejor se ajustó a los datos de las región trnF/ndhJ fue el modelo F81 (Felstenestein 1981). En cambio los modelos más simples que mejor se ajustaron a las regiones ITS y waxy, fueron el modelo GTR+ γ (el modelo reversible con tasa de heterogeneidad entre sitios, Rodríguez et al. 1990) y el modelo GTR + I (modelo reversible con proporción de sitios invariables). Se optó por este último modelo porque presentó un AIC ligeramente inferior (aunque no es posible realizar una prueba de razones porque los modelos no son anidados).

El apoyo estadístico de los nodos del árbol fue evaluado por remuestreo (Felsenstein 1985), utilizando 100 replicaciones realizadas con el mismo tipo de búsqueda que el usado en el análisis de remuestreo de MP.

El análisis filogenético de inferencia bayesiana se realizó con el programa Mr. Bayes versión 2.01 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). El análisis se realizó sobre los datos combinados de las tres regiones, pero organizados en tres particiones, utilizando el modelo de evolución GTR + I. Se corrieron cuatro cadenas de Markov con una temperatura de 0,2, muestreando un árbol cada 100 generaciones para 100.000 generaciones iniciadas con un árbol aleatorio. Para las inferencias filogenéticas se descartaron los primeros 200 árboles. Se computó el árbol consenso preservando los grupos o particiones que aparecen en más del 50% de los árboles y se estimó la probabilidad *a posteriori* de cada grupo o nodo según su frecuencia de aparición en éstos árboles.

Para evaluar los conflictos y el apoyo de los datos a los grupos, independiente de cualquier árbol filogenético, se realizó un análisis de espectro (Hendy & Penny 1993) con el programa SPECTRUM versión 2.3 (Charleston 1997). El apoyo es la frecuencia de cada partición en los datos, y los conflictos son la suma de las particiones contrarias.

Enraizamiento del árbol

Estudios moleculares de la familia Solanaceae indican que *Schizanthus* es un género aislado dentro de la familia y que forma una tribu monogenérica (Olmstead & Palmer 1992). De hecho, se intentó alinear las secuencias de las especies de *Schizanthus*, con la de otras Solanáceas (*Nicotiana*, *Solanum*) publicadas en la base de datos GenBank En el

caso de las regiones ITS y waxy, la divergencia era tan alta que no se pudo tener un alineamiento confiable, particularmente en los sectores polimórficos de *Schizanthus*. Se descartó entonces el uso de grupos externos para enraizar los árboles, porque se ha señalado que este criterio no es confiable cuando las especies del grupo externo son muy distantes de las especies del grupo interno, al dificultar el alineamiento y aumentar el riesgo de homoplasia (Swofford et al. 1996). Para enraizar el árbol se usó el método de Distancia Media, que coloca la raíz en la mitad de los taxa más distantes (Swofford et al. 1996). Este método exige que la tasa de evolución en todos los linajes de *Schizanthus* sea constante. Esta hipótesis se evaluó con la prueba de razones de verosimilitud de Goldman (1993), para lo cual se estimó el operador $\delta = 2 * (\ln L_1 - \ln L_0)$ y se evaluó en una distribución χ^2 con N-2 grados de libertad, donde N= número de taxa, $\ln L_0$ = puntaje de verosimilitud cuando el reloj molecular es forzado y $\ln L_1$ = puntaje de verosimilitud cuando el reloj molecular no es forzado. La hipótesis se evaluó en los tres tipos de datos por separado y en los datos combinados. La hipótesis nula, es decir, que las tasas de evolución se conservan entre todos los linajes, no fue rechazada en ninguno de los casos (trnF/ndhJ: $\chi^2_{10} = 14, p = 0,17$; ITS: $\chi^2_{10} = 14, p = 0,17$; waxy: $\chi^2_{10} = 14, p = 0,17$; combinados: $\chi^2_{10} = 10, p = 0,44$).

RESULTADOS

Características de las secuencias

Las principales características de las tres regiones estudiadas se resumen en la Tabla 2.2. La secuencia consenso de la región trnF/ndhJ de las 12 especies tiene un largo de 720 sitios, siendo 33 de ellos variables (4,6%), y 14 parsimoniosamente informativos (1,9%). Ocho inserciones/deleciones fueron identificadas, 5 de éstas parsimoniosamente informativas. Esta región presenta un bajo polimorfismo, con una divergencia promedio de 1,42 %. La secuencia consenso de la región ITS tiene un largo de 619 sitios, con 52 sitios variables (8,4%) y 35 parsimoniosamente informativos (5,7%). La región ITS presenta más polimorfismo que la región trnF/ndhJ, con una divergencia promedio de 2,84%. La secuencia consenso de la región waxy fue de 855 sitios, e incluye 5 intrones y 6 exones. La región waxy alineada presentó 61 sitios variables (7,2%) y 37 parsimoniosamente informativos (4,7%). Cinco inserciones/deleciones fueron incluidas en el alineamiento. Tres de ellas fueron parsimoniosamente informativas. La región presentó una alta variabilidad, con una divergencia promedio de 2,41%. Además, en la región waxy se encontró un importante grado de polimorfismo intragenómico. Los sectores iniciales del gen no pudieron ser leídos en las especies *S. hookeri* y *S. porringens*, por lo que en este sector los sitios fueron codificados como ambigüedades. La especie *S. alpestris* debió ser clonada. Se secuenciaron quince colonias transformadas con el fragmento de PCR. Sólo se encontraron dos secuencias con 6 bases diferentes entre las 15 colonias secuenciadas, una de ellas presentó una alta variabilidad con respecto a las otras especies del grupo y una mutación en un aminoácido conservado. A

pesar de estas diferencias, ambas secuencias se ubicaron en la misma región del árbol filogenético. Para facilitar los estudios se optó por descartar la secuencia más variable, quedando representado *S. alpestris* finalmente por un solo clon.

Tabla 2.2. Características de las secuencias de las regiones ITS, trnF/ndhJ, ITS y waxy, y de los datos combinados.

Región	trnF/ndhJ	ITS	waxy	Combinados
Largo secuencia consenso	720	619	856	2195
Nº inserciones	8	6	5	19
Nº inserciones informativas	5	0	3	7
Sitios variables	33	52	61	149
Sitios informativos	14	35	39	88
Divergencia promedio (%)	1,42	2,84	2,41	2,36
Rango divergencia (%)	0 - 3,04	0,32 - 4,20	0,12 - 4,03	0,14 - 3,48
Contenido G/C (%)	33,7	62,8	38,4	44,7

Análisis filogenético

Los resultados de los análisis filogenéticos de las regiones trnF/ndhJ, ITS y waxy (considerados individualmente) con los criterios de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud se resumen en las Tablas 2.3 y 2.4. En los tres árboles de consenso de los árboles más parsimoniosos (Fig.2.1A-C) y en los tres árboles de máxima verosimilitud (Fig.2.1D-F) producidos con los datos de cada región, se pueden reconocer tres grupos con valores de bootstrap superiores a un 75%. Un grupo está formado por las especies del desierto de corola blanca y tubo coralino largo, *S. candidus*, *S. integrifolius*, *S.*

lacteus y por la especie cordillerana de la zona mediterránea árida, *S. alpestris*, con una morfología floral distinta. Un segundo grupo está formado por las especies altoandinas de las zonas mediterráneas semiáridas y húmedas, *S. hookeri* y *S. grahamii*, de flores coloridas y tubo coralino largo. Finalmente, un tercer grupo está formado por las especies de las zonas mediterráneas semiáridas y más húmedas, *S. tricolor* y *S. pinnatus*, de flores coloridas, tubo coralino corto y labio inferior desarrollado, y por *S. parvulus*, una especie con una morfología floral bien particular dentro del género

Tabla 2.3. Resultados de los análisis de máxima parsimonia de los datos de las regiones ITS, trnF/ndhJ, ITS y waxy, y de los datos combinados.

	trnF/ndhJ	ITS	waxy	Combinados
CI*	0,93	0,86	0,94	0,88
RI*	0,93	0,88	0,96	0,90
Pasos	44	69	73	189
Nº árboles MP	14	9	8	3
Nº clados BS>70%	3	4	5	5

*CI: índice de consistencia; RI: índice de retención

Tabla 2.4. Resultados y parámetros estimados en los análisis de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana de las regiones ITS, trnF/ndhJ, waxy, usando el modelo de evolución GTR+I. MV: Máxima Verosimilitud. BAY: Inferencia bayesiana, en este caso los parámetros fueron estimado a partir de los 800 árboles muestrados.

Param.	trnF/ndhJ		ITS		Waxy	
	MV	BAY*	MV	BAY*	MV	BAY*
-lnL	1195		1267		1601	
I	0,86	0,70±0,15	0,82	0,83±0,04	0,67	0,62±0,14
F.Bases:						
A	0,32	0,32±0,02	0,20	0,20±0,02	0,27	0,27±0,01
C	0,18	0,18±0,01	0,32	0,32±0,02	0,20	0,20±0,01
G	0,15	0,15±0,01	0,30	0,30±0,02	0,18	0,18±0,01
T	0,34	0,34±0,02	0,18	0,18±0,02	0,35	0,35±0,02
r-matriz						
π_{AC}	1,56	1,96±1,28	4,28	5,68±8,01	2,24	1,86±1,29
π_{AG}	1,24	1,73±0,93	2,65	3,47±5,07	4,15	4,10±3,07
π_{AT}	0,37	0,36±0,32	2,70	3,53±4,75	5,68	4,78±3,14
π_{CG}	0,71	1,01±1,07	0,59	0,77±0,73	5	5,14±3,81
$\pi_{CT}\pi_{AT}$	0,83	1,74±0,74	8,18	11,30±11,1	6,4	5,59±3,59

*Valores = media ± desviación estándar

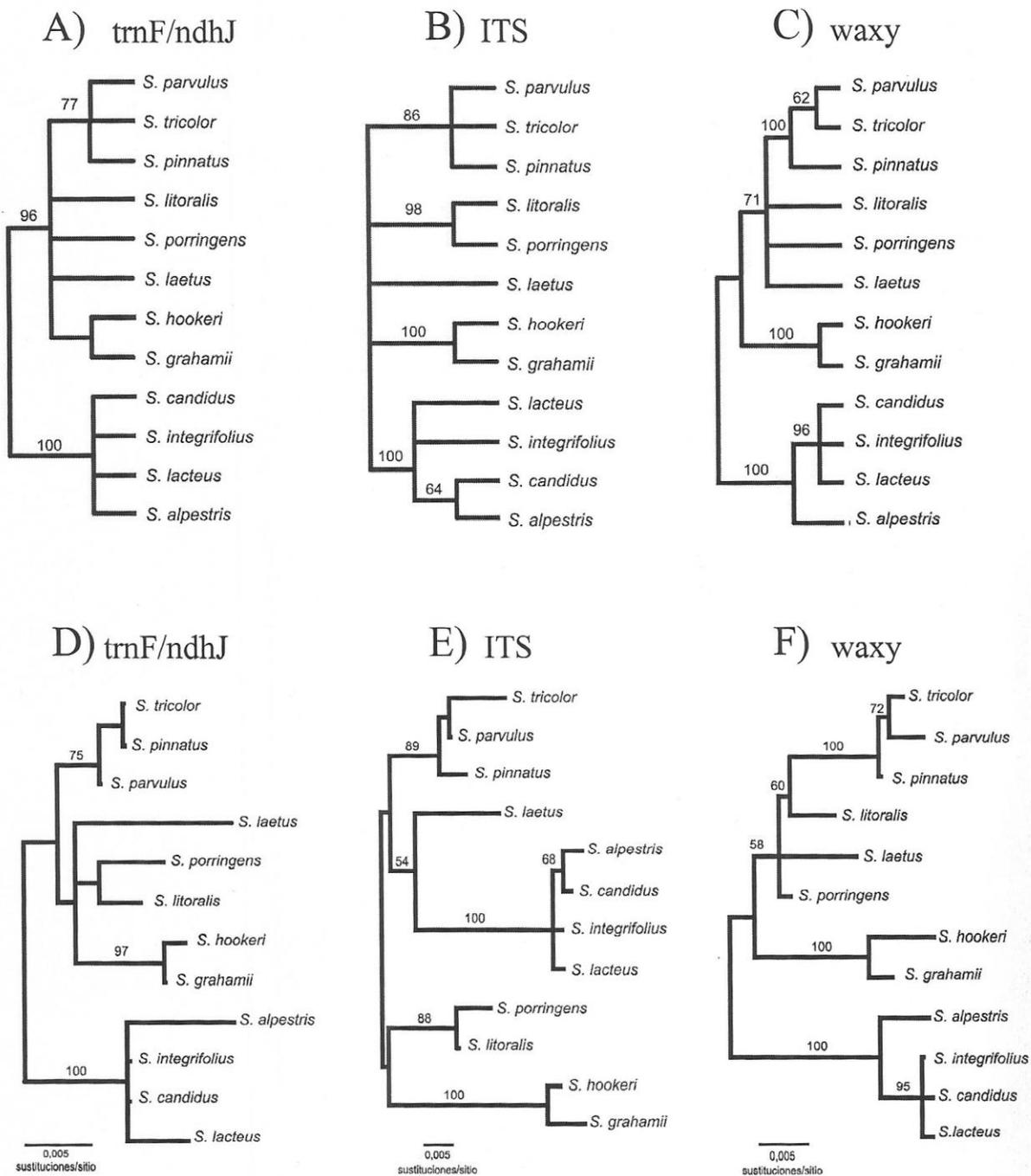


Fig. 2.1. Resultados del análisis de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud de los datos de las regiones trnF/ndhJ, ITS y waxy, considerados individualmente. A-C) Árboles de consenso estricto de (A) los 14 árboles más parsimoniosos producidos con la región trnF/ndhJ, (B) los 9 árboles más parsimoniosos producidos con los datos de la región ITS y (C) los 8 árboles más parsimoniosos producidos con la región waxy. D-F) Filogramas de los árboles de máxima verosimilitud producidos con los datos de las regiones: (D) trnF/ndhJ, (E) ITS y (F) waxy. Arriba de los nodos se indican los valores de bootstrap cuando son mayores a 50%. En D-F, el largo de las ramas es proporcional al número de cambios.

En la Figura 2.1 se puede observar que los árboles de consenso de MP y los árboles de MV producidos con cada región presentan diferencias en la posición de las otras tres especies del género, *S. litoralis* y *S. porringens*, *S. laetus* y en la posición de la raíz. A pesar de estas diferencias, los tres tipos de datos utilizados son congruentes de acuerdo a la prueba de homogeneidad de particiones; comparaciones pareadas entre éstos no rechazan su homogeneidad ($p = 0,44$ para ITS vs. waxy, $p = 0,99$ para ITS vs. trnF/ndhJ, $p = 0,77$ para waxy vs. trnF/ndhJ). A continuación se analizan las diferencias encontradas entre los tres tipos de datos en función del análisis de MP y de inferencia bayesiana (BAY) de los datos combinados y del análisis espectral de cada grupo de datos. Este análisis permite evaluar el apoyo y conflicto de las posibles particiones en que pueden ser incluidas las especies independiente de la hipótesis filogenético propuesta.

La posición de *S. litoralis* y *S. porringens* difiere entre los árboles producidos con los datos de la región ITS y trnF/ndhJ y los producidos con la región waxy. En los árboles de MP y MV de la región ITS, estas especies aparecen agrupadas en un clado con valores de bootstrap superiores a 90% (Fig. 2.1B y E). Este clado también puede ser reconocido en el análisis de MV de los datos del cloroplasto, pero con un valor de bootstrap bajo (Fig. 2.1D). En cambio, en los árboles producidos con los datos de la región waxy (Fig. 2.1C y F), este clado no es reconocido, a pesar de que esta región tiene un polimorfismo comparable con el de la región ITS e incluso ofrece un mayor número de sitios informativos. Sin embargo, el análisis espectral de los datos de la región waxy revela que esta partición no tiene conflictos y que incluso tiene algo de apoyo (conflicto = 0; apoyo = 0,0002914). En el análisis de MP y BAY de los datos combinados este

clado puede ser reconocido con un alto valor de bootstrap y una probabilidad a *posteriori* alta (Fig. 2.2A y B).

Los datos de las tres regiones también presentan diferencias en la posición de *S. laetus*, la única especie del desierto con flores coloridas, de tubo coralino corto y labio inferior desarrollado. En el árbol producido con los datos de la región ITS, *S. laetus* aparece en un grupo con las otras especies xerofíticas, *S. lacteus*, *S. integrifolius*, *S. candidus* y *S. alpestris*, mientras que en el árbol producido con los datos de la región waxy, *S. laetus* aparece en un grupo formado por todas las especies de flores de tubo coralino corto y labio inferior prominente, *S. porringens*, *S. litoralis*, *S. tricolor*, *S. pinnatus* y *S. parvulus*, distribuidas en zonas semiáridas y húmedas de la zona mediterránea. El análisis espectral de los datos de la región ITS revela que ninguna de estas dos particiones tiene apoyo, pero que la primera partición tiene menos conflicto (conflicto = 0,0006) que la segunda (conflicto = 0,0021). En cambio, el análisis espectral de los datos de la región waxy revela que la segunda partición tiene apoyo (apoyo = 0,0012), mientras que la primera partición no tiene apoyo y si tiene conflictos (conflictos = 0,016). Estos resultados, junto con los análisis de MP y BAY de los datos combinados (Fig.2.2), evidencian la ubicación de *S. laetus* en un grupo formado por todas las especies de flores coloridas y tubo coralino corto.

El enraizamiento con el método de Distancia Media de los árboles producidos con los datos de las tres regiones muestra que también hay diferencias en la posición de la raíz. En los árboles de máxima verosimilitud producidos con los datos de la región trnF/ndhJ y waxy (Fig.2.1D y F), y con los datos combinados, la raíz queda entre las especies xerofíticas, *S. lacteus*, *S. integrifolius*, *S. candidus* y *S. alpestris*, y las otras

especies del género; en cambio, en el árbol producido con los datos de la región ITS (Fig. 2.1E) la raíz queda entre las especies *S. hookeri*, *S. grahamii*, *S. porringens* y *S. litoralis*, y las otras especies del género. Para evaluar si estas diferencias se debían a la posición conflictiva de *S. laetus*, se removió esta especie y se examinó si las diferencias se mantenían. Al remover esta especie, la posición de la raíz en el árbol de MV producido con los datos de la región ITS cambia y queda entre las especies xerofíticas y las otras especies del género (datos no mostrados). Estos resultados, junto con los análisis de MP y BAY de los datos combinados (Fig.2.2) indican que la posición de la raíz estaría entre las especies xerofíticas *S. lacteus*, *S. integrifolius*, *S. candidus* y *S. alpestris* y las otras especies del género.

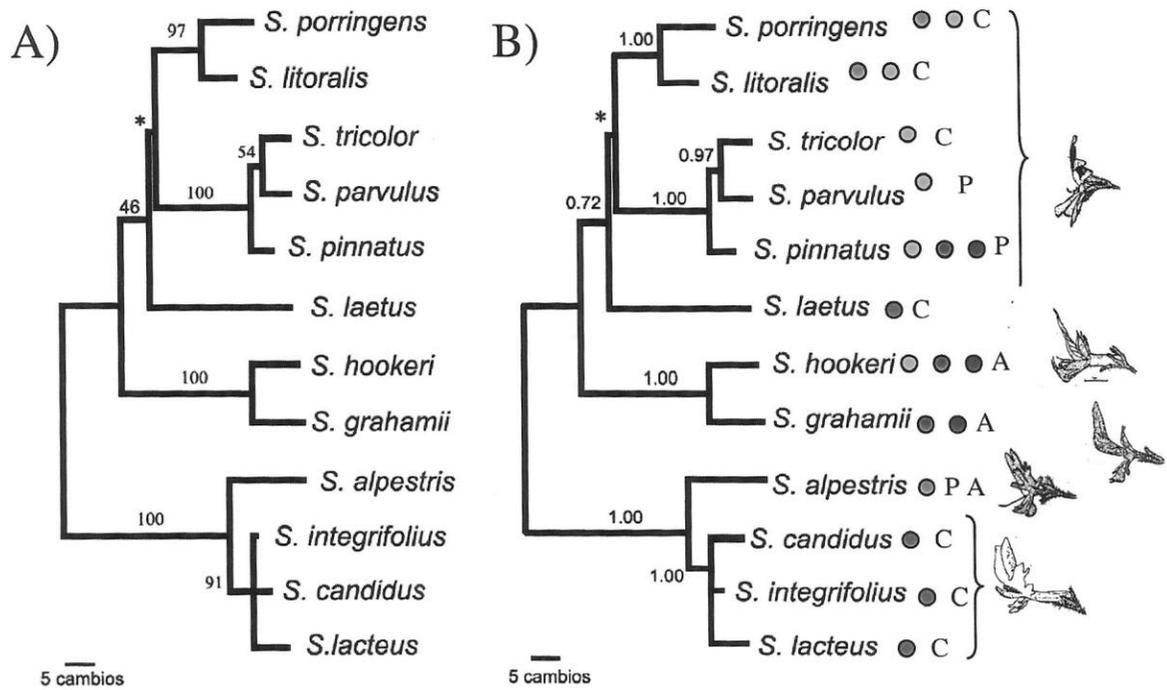


Fig. 2.2. Resultados de los análisis de máxima parsimonia y de inferencia bayesiana de los datos combinados de las regiones trnF/ndhJ, ITS y waxy. A) Filograma de uno de los 6 árboles más parsimoniosos obtenidos. Los números arriba de las ramas corresponden a los valores de bootstrap. Con * se indican los nodos que colapsan en el árbol de consenso estricto de los 6 árboles más parsimoniosos. El largo de las ramas es proporcional al número de cambios. B) Filograma de uno de los árboles con mayor probabilidad a *posteriori* según análisis de inferencia bayesiana. Los números arriba de las ramas corresponden a las probabilidades a *posteriori* de cada nodo. Con * se indican los nodos que colapsan en el árbol consenso de los 800 árboles muestreados en análisis. El largo de las ramas es proporcional al número de cambios. Con círculos se indica el clima en que crecen las especies según Di Castri y Hayek (1976): rojo, perárido; naranja, árido; amarillo, semiárido; verde, subhúmedo; azul, perhúmedo. Con letras se indica la zona ocupada por las especies: C, costa; P, precordillera; A, altoandina. Además se muestran los tipo florales característicos de los clados (dibujos tomados de Grau & Grönbach 1984).

DISCUSIÓN



La combinación de los datos de las tres regiones de ADN estudiadas permitieron clarificar las relaciones filogenéticas entre las especies de *Schizanthus* con buena resolución y con un bajos índices de homoplasia (CI y RI mayores a 0,85 en todos los análisis y bajo conflictos en los nodos según análisis de espectro). Las regiones del ADN nuclear (ITS y waxy) presentaron una mayor variabilidad que la región trnF/ndhJ del ADN de cloroplasto. Al igual que en otros taxa, la región waxy presenta una variabilidad comparable a la de la región ITS, e incluso ofrece un mayor número de sitios informativos (Masson-Gamer & Kellog 1996, Miller et al. 1999). Sin embargo, la región waxy presentó polimorfismo a nivel intragenómico en *S. alpestris*. En otras Solanáceas (Peralta & Spooner 2001) también se ha detectado polimorfismo intragenómico en el gen waxy. Varias causas pueden dar cuenta de este polimorfismo: artefactos en la amplificación por PCR (Shimada & Tada 1991), la presencia de más de un locus de ADN del gen waxy (Evans et al. 2000), o hibridización entre especies. Es poco probable que *S. alpestris* sea un híbrido, pues las secuencias de los dos clones se ubican en la misma región del árbol. Tampoco es claro que pueda existir más de un locus para el gen waxy en *Schizanthus*; aunque en *Solanum* (van der Leij et al. 1991) y en otras dicotiledóneas se ha reportado que el gen waxy es de copia única (Dry et al. 1992, Mérida et al. 1999), en Rosáceas se ha evidenciado la presencia de más de un locus de GBSSI (Evans et al. 2000).

La alta divergencia de las regiones ITS y de la región waxy con otros miembros de la familia Solanaceae, dan cuenta del aislamiento genético del género *Schizanthus* y

apoyan su inclusión en una tribu monogénica, como fue propuesto en el estudio filogenético de Olmstead & Palmer (1992) basado en la secuencia de la región rbcL. El aislamiento del género *Schizanthus* dentro de la familia Solanaceae no permitió el uso de grupos externos para enraizar los árboles filogenéticos, forzándonos a utilizar el método de Distancia Media. El uso de este método es validado al considerar la conservación de la forma de vida entre las especies de *Schizanthus* (todas las especies son anuales o bianuales) y los resultados de la prueba de reloj molecular, que sugieren que la tasa de cambio de los genes es relativamente homogénea en la filogenia. Un fuerte aislamiento genético con sus taxa hermanos también ha sido observado en *Tropaeolum*, sect *Chilensia*, con una distribución similar a la del género *Schizanthus* (Hershkovitz et al. 2004)

El enraizamiento de la filogenia con el criterio de Distancia Media separa las especies xerofíticas *S. candidus*, *S. lacteus*, *S. integrifolius* y *S. alpestris* (distribuidas en el desierto y en las zonas cordilleranas áridas de la región mediterránea) de la otra especie xerofítica del género, *S. laetus* (distribuida en el desierto) y de las especies más mesofíticas, *S. litoralis*, *S. porringens*, *S. tricolor*, *S. parvulus*, *S. pinnatus*, *S. grahamii*, *S. hookeri* (distribuidas al sur de los 30 °S por la costa y al sur de los 31° S por la cordillera en zonas semiáridas y húmedas de la región mediterránea). La separación de las especies del desierto en dos clados es consistente con las diferencias en la morfología floral observadas entre *S. laetus* y las otras especies del desierto.

La afinidad entre las especies del desierto, *S. candidus*, *S. integrifolius* y *S. lacteus* es reconocida en estudios morfológicos (Grau & Grönbach 1984, Walters 1969), sin embargo, la inclusión de *S. alpestris* en este grupo es sorprendente, pues esta especie

presenta una corola con una forma muy particular dentro del género. En *S. candidus*, *S. integrifolius* y *S. lacteus*, las flores son blancas, sin sistema de liberación explosiva de polen (SLE) (Cocucci 1989), el estandarte es obovado, las secciones laterales del labio superior son orientadas hacia atrás y divididas en múltiples segmentos lineales y el labio inferior es reducido. En cambio, en *S. alpestris*, las flores son lilas o rosadas con SLE, el estandarte es linear, las secciones laterales de la flor son orientadas hacia delante y el labio inferior está desarrollado. A pesar de las diferencias en la morfología floral, las especies del grupo comparten similitudes en la forma de la semilla (observación personal). Las relaciones entre las especies del desierto, *S. candidus*, *S. lacteus* y *S. integrifolius* no son suficientemente resueltas por nuestros datos, aunque la evidencia morfológica apoya la agrupación entre *S. candidus* y *S. lacteus*, pues estas especies presentan importantes similitudes en la morfología floral, que incluso llevaron a Walters (1963) a proponerlas como dos variedades de una especie. En el estudio cladístico de las especies de *Schizanthus* realizado por Peña y Muñoz (2002) a partir de 11 caracteres morfológicos y presencia/ausencia de 10 alcaloides, también se reconoce la afinidad entre las especies del desierto. Sin embargo, éstas aparecen agrupadas con la especie más austral del género, *S. pinnatus* y separadas de *S. alpestris*. Esta especie presenta una morfología floral muy diferente a las especies del desierto y es muy similar a *S. tricolor*. En Peña y Muñoz (2002), la agrupación de estas especies se apoya en el color de la corola, sin embargo, es importante destacar que *S. pinnatus*, a diferencia de las especies del desierto, presenta guía de néctar y puede ser bastante colorida. Lamentablemente, Peña y Muñoz (2002) no incluyeron un análisis estadístico sobre el apoyo de las particiones, y la ausencia de estudios químicos en 6 especies (donde los caracteres

fueron tratados como sinapomorfias y no como ambigüedades) dificulta la interpretación de sus resultados.

Las otras especies del género se separan en dos clados, uno formado por las especies altoandinas, *S. hookeri* y *S. grahamii*, y otro formado por *S. laetus*, *S. litoralis*, *S. porringens*, *S. tricolor*, *S. parvulus*, *S. pinnatus*. La afinidad entre las especies altoandinas es reconocida en estudios morfológicos (Grau & Grönbach 1984, Walters 1969). En ambas especies, las semillas tienen forma de riñón, las flores son grandes y coloridas, con el tubo coralino largo, el estandarte amarillo, elíptico y las secciones laterales orientadas hacia delante. Es notable que las especies de la estepa altoandina se separen de la otra especie del género que crece en altura, *S. alpestris* (entre 1000 y 3000 msnm), pero en zonas más áridas de la cordillera. Estos resultados apoyan la hipótesis que la flora altoandina de Chile puede tener distintos orígenes.

Las afinidades entre *S. laetus*, *S. litoralis*, *S. porringens*, *S. tricolor*, *S. pinnatus*, *S. parvulus*, no son reconocidas por Grau y Grönbach (1984). Sin embargo, son características comunes a este grupo, el tubo coralino corto, la prominencia de las alas del labio inferior (que incluso pueden ser más grandes que el labio superior) y el estandarte redondeado. Es importante destacar que *S. laetus* presenta diferencias importantes en el color y forma de las hojas, de los frutos y de las semillas, que dan cuenta de su aislamiento (Grau & Grönbach 1984, Walters 1969). Los datos moleculares apoyan la separación entre las especies costeras del sector más septentrional del matorral, *S. litoralis* y *S. porringens*, de las especies ubicadas más al sur, *S. tricolor*, *S. pinnatus* y *S. parvulus*. Aunque es necesario muestrear poblaciones más australes de *S. porringens* y *S. litoralis* para confirmar esta separación. La afinidad entre *S. litoralis* y *S.*

porringens, y entre *S. tricolor* y *S. pinnatus* es reconocida por Grau y Grönbach (1984) e incluso Walters (1969) las clasifica en una sola especie con dos variedades. Sin embargo, la inclusión de *S. parvulus* en el grupo de *S. tricolor* y *pinnatus* es sorprendente, pues ésta especie presenta una morfología floral muy particular dentro del género. Sus flores son muy pequeñas, con el estandarte triangular, prolongado en la parte inferior en dos protuberancias que forman una plataforma nectarífera. En este sentido es interesante destacar que Walters (1969) consideró que *S. parvulus* podía ser un tipo aberrante de la especie *S. pinnatus*.

Finalmente, se puede concluir que los grupos de parentescos inferidos a partir de los datos moleculares se corresponden parcialmente con los grupos reconocidos por Grau y Grönbach (1984) a partir de datos morfológicos, fundamentalmente florales. En particular en la posición de *S. alpestris* y *S. parvulus* con morfologías florales bien particulares dentro del género. Estas diferencias dan cuenta de la labilidad de la morfología floral del género.

REFERENCIAS

- BALDWIN BG, SANDERSON MJ, PORTER JM, WOJCIECHOWSKI MF, CAMPBELL CS & DONOGHUE MJ 1995 The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82:247-277
- BENTHAM G 1848 *Schizanthus*. En: De Candolle AP (ed). *Prodromus sytematis naturalis regni vegetabilis* 10:202-203
- CHARLESTON M 1997 Spectrum version 2.3. Distribuido por el autor en <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/~mac/spectrum/spectrum.html>

- DI CASTRI F & E HAJEK 1976 Bioclimatología de Chile. Editorial de la Universidad Católica, Santiago
- DRY I, SMITH A, EDWARDS A, BHATTACHARYYA M, DUNN P & C MARTIN 1992 Characterization of cDNAs encoding two isoforms of granule-bound starch synthase, which show differential expression in developing storage organs of pea and potato. *Plant Journal* 2:93–202
- EVANS RC, ALICE LA, CAMPBELL CS, KELLOGG EA & TA DICKINSON 2000 The granule-bound starch synthase (GBSSI) gene in the Rosaceae: multiple loci and phylogenetic utility. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17:388–400
- FARRIS JS, KÄLLERSJÖ M, KLUGE AG & C BULT 1985 Testing significance of incongruence. *Cladistic* 10:315-319
- FELSENSTEIN J 1985 Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:793-791
- FRANK MB 1997 Notes on the Purification of DNA with Glass Milk. En: Frank MB (eds). *Molecular Biology Protocols*. Disponible en <http://omrf.ouhsc.edu/~frank/glasmilk.html>. Oklahoma City
- GAJARDO R 1993 La vegetación natural de Chile. Editorial Universitaria, Santiafo, Chile
- GÁMBARO V, LABBE C & M CASTILLO 1982 Angeloyl, tigloyl and seneciolyoxytropene alkaloids from *Schizanthus hookeri*. *Phytochemistry* 22:1838-1839
- GLENN T 2003 PEG Precipitation of PCR products (web version). En: *Protocols SREL DNA Lab*. Disponible en http://www.uga.edu/srel/DNA_Lab/PEG_Precip'00.rtf. University of Georgia
- GOLDMAN N 1993 Statistical tests of models of DNA substitution. *Journal of Molecular Evolution* 36:182-198
- GRAU J & E GRÖNBACH 1984 Untersuchungen zur Variabilität in der Gattung *Schizanthus* (Solanaceae). *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 20:111-203

- HALL TA 1999 BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41:95-98
- HENDY MD & D PENNY 1993 Spectral analysis of phylogenetic data. Journal of Classification 10:5-24
- HERSHKOVITZ MA & EA ZIMMER 1997 On the evolutionary origins of the cacti. Taxon 46:217-232
- HERSHKOVITZ MA, ZIMMER EA & WJ HAHN 1999 Ribosomal DNA sequences and angiosperm systematics. En: Hollingsworth PM, Bateman RM & RJ Gornall (eds). Molecular systematics and plant evolution: 268-326. Taylor & Francis, London
- HERSHKOVITZ MA, PELLICER-HERNÁNDEZ C & MTK ARROYO 2004 Ribosomal DNA evidence for diversification and hibridization in *Tropaeolum* sect. *Chilensia* (en preparación)
- HUELSENBECK JP & F RONQUIST 2001 MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. Bioinformatics 17:754-755
- HUNZIKER AT 1979 South American Solanaceae: a synoptic survey. En: Hawkes JG, Lester RN & AD Skelding (eds). The Biology and Taxonomy of Solanaceae: 49-85. Academic Press, London
- KNAPP S 2002 Floral diversity and evolution in the Solanaceae. En: Cronk QCB, Bateman RM & JA Hawkins (eds). Developmental genetics and plant evolution. Taylor & Francis, London
- MASON-GAMER RJ, & EA KELLOGG 1996 Testing for phylogenetic conflict among molecular data sets in the tribe Triticeae (Gramineae). Systematic Biology 45:524-545
- MASON-GAMER RJ, WEIL CF & EA KELLOGG 1998 Granule-bound starch synthase: structure, function, and phylogenetic utility. Molecular Biology and Evolution 15:1658-1673

- MERIDA A, RODRIGUEZ-GALAN JM, VINCENT C & JM ROMERO 1999
Expression of the granule-bound starch synthase I (*Waxy*) gene from snapdragon is developmentally and circadian clock regulated. *Plant Physiology* 120:401–409
- MILLER RE, RAUSHER MD & PS MANOS 1999. Phylogenetic systematics of *Ipomoea* (Convolvulaceae) based on ITS and *Waxy*. *Systematic Botany* 24:209–227
- NEI M & S KUMAR 2000 *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York, New York
- OLMSTEAD, RG & JD PALMER 1992 A chloroplast DNA phylogeny of *Solanaceae*. Subfamilial relationships and character evolution. *Annals of Missouri Botanical Garden* 79:346-360
- PEÑA RC & O MUÑOZ 2002 Cladistic relationships in the genus *Schizanthus* (Solanaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 30:45-53
- PERALTA I & D SPOONER 2001 Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (*Solanum* L. section *Lycopersicon* [Mill.] Wettst. subsection *Lycopersicon*). *American Journal of Botany* 88:1888-1902
- POSADA D & K CRANDALL 2001 A comparison of different strategies for selecting models of DNA substitution. *Systematic Biology* 50:580-601
- REICHE C 1910 *Flora de Chile*: 5. Santiago
- RODRÍGUEZ FJ, OLIVER JL, MARIN A & JR MEDINA 1990 The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142:485-501
- ROUGIER DL, ARROYO MTK & MA HERSHKOVITZ (en preparación)
Phylogenetics relationships among Chilean *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae)
- RUIZ H & PAVON J 1798 *Flora Peruviana et Chilensis*: I. Madrid
- SHIMADA H & Y TADA 1991 Rapid isolation of a rice *waxy* sequence: a simple PCR method for the analysis of recombinant plasmids from intact *Escherichia coli* cells. *Gene* 98:243–248
- SUDZUKI F 1969 Tesis Ingeniero Agrónomo. Santiago
- SWOFFORD DL 1998 PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony and others methods, version 4.01b. Sinauer, Sunderland, Massachusetts

- SWOFFORD DL, OLSEN GJ, WADDELL PJ & D HILLIS 1996 Phylogenetic inference. En: Hillis DM, Moritz C and BK Mable (eds) *Molecular Systematics*. Sinauer & Associates, Sunderland, Massachusetts
- TÉTÉNYL P 1987 A chemotaxonomy classification of the *Solanaceae*. *Annals of Missouri Botanical Garden* 74:600-608
- VAN DER LEIJ FR, VISSER RGF, PONSTEIN AS, JACOBSEN E & FEENSTRA WJ 1991 Sequence of the structural gene for granule-bound starch synthase of potato (*Solanum tuberosum* L.) and evidence for a single point deletion in the *amf* allele. *Molecular Gene Genetics* 228:240-248
- WALTERS D 1969 A Revision of the genus *Schizanthus* (Solanaceae). Ph. D. Thesis, Indiana University
- WATSON JM 1998 En: Hoffman A, Arroyo MTK, Liberona F, Muñoz M & J Watson (eds). *Plantas Altoandinas de la Flora Silvestre de Chile*:140. Ediciones Fundación Claudio Gay, Santiago
- WHITE TJ, BRUNS T, LEE S & J TAYLOR 1990 Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & TH White (eds). *PCR Protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego
- WHITSON MK & P MANOS 1999. Phylogenetic utility of sequence data from two regions of nuclear DNA in clarifying sectional relationships within *Physalis*. Abstracts, XVI International Botanical Congress, Saint Louis, Missouri
- XU DH & T BAN 1997 Phylogenetic and evolutionary relationships between *Elymus humidus* and other *Elymus* species based on sequencing of non-coding regions of cpDNA and AFLP of nuclear DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 108:1443-1448

CAPÍTULO 3. EVOLUCIÓN DE LOS SISTEMAS DE REPRODUCCIÓN EN EL GÉNERO *SCHIZANTHUS* (SOLANACEAE)

RESUMEN

Se estudió el sistema reproductivo en 9 especies del género *Schizanthus*, a través del seguimiento del desarrollo floral y estimaciones de la capacidad de autofertilización espontánea. Todas las especies estudiadas son protándricas y hercógamas en las primeras etapas del desarrollo floral. Sin embargo, en tres especies (*S. candidus*, *S. grahamii* y *S. lacteus*) el estigma entra en contacto con las anteras con polen en etapas tardías del desarrollo, lo que resulta en altos índices de autofertilización espontánea. La dicogamia y la hercogamia inicial observada, sugieren que estas tres especies podrían tener una estrategia de reproducción mixta, tipo autogamia retardada. Análisis filogenéticos basados en una filogenia molecular, sugieren que el ancestro del género era exógamo y que la adaptación hacia la autogamia retardada habría evolucionado en el linaje de las especies del desierto y de la estepa altoandina. Pruebas de verosimilitud indican que cambios evolutivos en el tamaño de la corola no se correlacionan con cambios en la capacidad de autofertilización. Reconstrucciones de los estados ancestrales indican, que las especies *S. candidus* y *S. grahamii* presentan corolas más grandes que las de sus ancestros exógamos más recientes, indicando que la evolución de la autogamia retardada, a diferencia de la autogamia, no conlleva una disminución de los caracteres asociados a la atracción de polinizadores.

INTRODUCCIÓN

La transición desde la polinización cruzada a la autopolinización constituye el cambio en los sistemas reproductivos que ocurre más frecuentemente en la naturaleza (Stebbins 1974, Kohn et al. 1996, Schoen et al. 1997, Takebayashi & Morrell 2001, Barrett 2002). Se ha sugerido que esta transición podría ocurrir como una forma de asegurar la reproducción en ambientes con condiciones adversas para la polinización cruzada o por selección automática (ventaja de la autopolinización por la transmisión automática de los genes en la descendencia) (Arroyo 1973, Stebbins 1974, Lloyd 1979, Arroyo & Squeo 1990, Morgan et al. 1997). La mayor parte de los modelos teóricos sobre la evolución de los sistemas reproductivos evalúan el balance entre las fuerzas que promueven la autogamia (como el aseguramiento reproductivo y la selección automática) y las fuerzas que limitan la autogamia (como la depresión por endogamia), prediciendo dos estados evolutivos dominantes: taxa predominantemente exógamos y taxa predominantes autógamos (Charlesworth & Charlesworth 1987, Uyenoyama et al. 1993). Sin embargo, en la última década ha tomado más relevancia la posibilidad que estas fuerzas opuestas produzcan estrategias de reproducción mixtas (Schoen & Brown 1991, Schoen et al. 1996, Kalisz et al. 1999, Kalisz & Vogler 2003), especialmente en ambientes variables en cuanto a la disponibilidad de polinizadores. Un ejemplo de estrategia mixta es la autogamia retardada, donde la autogamia es pospuesta hasta que haya pasado la posibilidad de exogamia (Lloyd 1992, Sakai 1995). Este retardo puede producirse por una sobreposición parcial entre las fases masculinas y femeninas de plantas dicógamas y por cambios en las posiciones relativas de las anteras y de los estigmas durante el

desarrollo (Lyon 1992, Rathcke & Real 1993, Klips & Snow 1997, Echert & Schaeffer 1998, Kalisz et al. 1999).

A diferencia de las plantas autógamas, se ha propuesto que las plantas con estrategias de reproducción mixta pueden conservar características que aparentan ser adaptaciones para la polinización cruzada, como corolas grandes y producción de néctar (Kalisz et al. 1999). Aunque frecuentemente se ha mostrado que la autogamia se asocia a una reducción en caracteres florales relacionados con la atracción y recompensa de polinizadores, como el tamaño de la corola y la producción de néctar (Arroyo 1973, Cruden 1977, Holstford & Ellstrand 1992, Stebbins 1974, Barrett 2004), las consecuencias de la evolución de la autogamia retardada sobre este tipo de caracteres florales han sido escasamente evaluadas (pero ver Armbruster et al. 2002).

El objetivo principal de este trabajo es evaluar cómo cambia el tamaño de la corola durante las transiciones entre sistemas reproductivos en el género sudamericano *Schizanthus*. Este género se caracteriza por su inusual morfología floral para la familia Solanaceae (Knapp 2002), en particular por sus flores marcadamente zigomórficas, bilabiadas y por la presencia de un mecanismo de liberación explosivo de polen (Coccucci 1989). El género está conformado por 12 especies de plantas anuales o bianuales con variaciones importantes en el tamaño de la corola y en la posición de los estambres (Grau & Grönbach 1984). Estas especies se distribuyen principalmente en Chile, ocupando una gran diversidad de zonas vegetacionales: desierto, estepa altoandina, matorral y bosque esclerófilo (Walters 1969, Grau & Grönbach 1984).

Los objetivos de este estudio son: (1) caracterizar los sistemas de reproducción de 9 especies del género a través del seguimiento del desarrollo floral, apuntando a evaluar

posibles cambios en las posiciones relativas del estigma y de las anteras, y sobreposición entre las fases sexuales a lo largo del desarrollo floral; (2) estimar la capacidad de autofertilización espontánea de las especies; (3) trazar las trayectorias evolutivas de los sistemas de reproducción en una filogenia molecular del género; (3) evaluar cómo cambia el tamaño de la corola en relación a cambios en los sistemas de reproducción, mediante la reconstrucción de estados ancestrales y estimaciones de evolución correlacionada entre tamaño y capacidad de autofertilización.

MÉTODOS

Se estudió la morfología floral de una población de cada una de las doce especies descritas de *Schizanthus*. Sólo en nueve de ellas se pudieron estudiar experimentalmente los sistemas de reproducción. Éstas pertenecen a las especies, *S. hookeri*, *S. grahamii*, *S. alpestris*, *S. pinnatus*, *S. tricolor*, *S. porringens*, *S. lacteus*, *S. candidus* y *S. integrifolius*. La ubicación de los sitios de estudio se detalla en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Ubicación de los sitios de estudio. Además se muestran las abreviaturas de cada especie utilizada en el resto del capítulo

Especie	Abrv.	Localidad
<i>S. alpestris</i>	ALP	IV Región: Valle del Elqui, Cuesta la Viñita, 820 msnm, 29°51'S - 70°49'W
<i>S. candidus</i>	CAN	III Región: Huasco, Playa Arrayán, 40 msnm, 28°15'S - 71°09'W
<i>S. grahamii</i>	GRA	Región Metropolitana: La Parva, 2600 msnm 33°20'S - 70°16'W
<i>S. hookeri</i>	HOO	Región Metropolitana: Sector Farellones, 2450 msnm, 33°21'S - 70°16'W
<i>S. integrifolius</i>	INT	III Región: Alto del Carmen, 710 msnm, 28°45'S - 70°29'W
<i>S. lacteus</i>	LAC	II Región: Paposos, Quebrada de Matancilla, 144 msnm, 25°06'S - 70°27'W
<i>S. laetus</i>	LAE	II Región: Paposos, 455 msnm, 25°00'S - 70°26'W
<i>S. litoralis</i>	LIT	IV Región: Parque Nacional Fray Jorge, 30° 38'S - 71°40'W
<i>S. parvulus</i>	PAR	IV Región: Reserva Nacional Las Chinchillas, Quebrada el Cobre, 580 msnm, 31°29'S-71°05'W
<i>S. pinnatus</i>	PIN	Región Metropolitana: Reserva Nacional Río Clarillo, 800 msnm 33°43'S - 70°56'W
<i>S. porringens</i>	POR	IV Región: Hornitos, 110 msnm, 29°38'S - 71°17'W
<i>S. tricolor</i>	TRI	IV Región: Papudo, 130 msnm, 32°31'S - 71°28'W



Desarrollo floral

Se eligieron al azar 20 yemas de 20 individuos distintos por especie y se registró dos veces al día durante todo el desarrollo floral (2-6 días dependiendo de la especie) los siguientes parámetros: posición del estigma y de las anteras respecto a la apertura del tubo coralino; dehiscencia de las anteras; y receptividad del estigma. La receptividad del estigma fue determinada en un ensayo que detecta la presencia de peroxidasa estigmática. Para esto colectamos 20 flores en diferentes estados de desarrollo, se sumergió el estigma en una solución de agua oxigenada al 3% y se observó la presencia o ausencia de una fuerte liberación de burbujas (Keans & Inouye 1993).

Capacidad de autofertilización espontánea.

En cada especie estudiada se aislaron 10 individuos de las visitas de polinizadores utilizando mallas de nylon de 1x1x0,7 m, con el fin de evitar la entrada de insectos, pero sin gatillar artificialmente el mecanismo de liberación explosiva de polen. Se marcaron 10 yemas por individuo y se realizaron dos tratamientos: (1) autofertilización espontánea, donde 50 flores cubiertas permanecieron sin manipular para probar si las flores podían ser polinizadas automáticamente sin visitas de insectos; (2) polinización cruzada manual, donde 50 flores cubiertas con el estigma receptivo fueron polinizadas manualmente con polen de otros individuos colectados a una distancia mayor a 20 m del individuo receptor. Después de 3 a 4 semanas se colectaron y contabilizaron el número de frutos y semillas producidas por flor marcada. Para cada planta se estimó el porcentaje promedio de frutos producidos respecto al número de flores marcadas (X_{FR}) y el número de semillas promedio producidos por flor marcada (X_{SEM}). Para cada

tratamiento se estimó el valor promedio de los X_{FR} obtenidos por planta (XX_{FR}) y el valor promedio de los X_{SEM} obtenidos por planta (XX_{FR}). Para examinar si habían diferencias significativas entre los dos tratamientos en la producción de frutos o semillas se realizaron pruebas de permutaciones sobre los valores de X_{FR} o X_{SEM} respectivamente. Se estimó la diferencia en el valor promedio de X_{FR} o X_{SEM} entre los dos tratamientos y se contrastaron los valores observados con distribuciones nulas generadas aleatoriamente a través de la permutación de los datos. La probabilidad que existan diferencias entre los tratamientos se estimó como la proporción de valores aleatorios de diferencias que exceden el valor observado. Para la generación de las distribuciones nulas se realizaron 1000 simulaciones con el programa Pop Tools versión 2.6.2 (Hood 2002). Además se calculó un índice de autofertilización (A) como la razón entre el valor promedio del número de semillas producidas en promedio por flor por planta (XX_{SEM}) en el tratamiento de autofertilización espontánea y en el tratamiento de polinización cruzada. No se lograron rescatar todas las flores marcadas (en fruto o no) debido a la destrucción por agentes externos, por lo que el número de flores finalmente muestreadas varió entre 20 a 50 flores por tratamiento.

Mediciones del tamaño de la corola

Se colectaron 15 flores de 15 individuos distintos para cada especie. Las flores colectadas en terreno se guardaron en alcohol al 70%. En el laboratorio, las flores se disectaron bajo la lupa, y se separaron el labio superior e inferior para poder aplanar completamente la flor. Ambas partes fueron escaneadas. Sobre las imágenes se midió con el programa SigmaScan Pro 5.0 el área de los lóbulos de la corola: estandarte,

secciones laterales, alas y quilla (Fig. 3.1). Estas áreas fueron sumadas para estimar el área total de la corola.

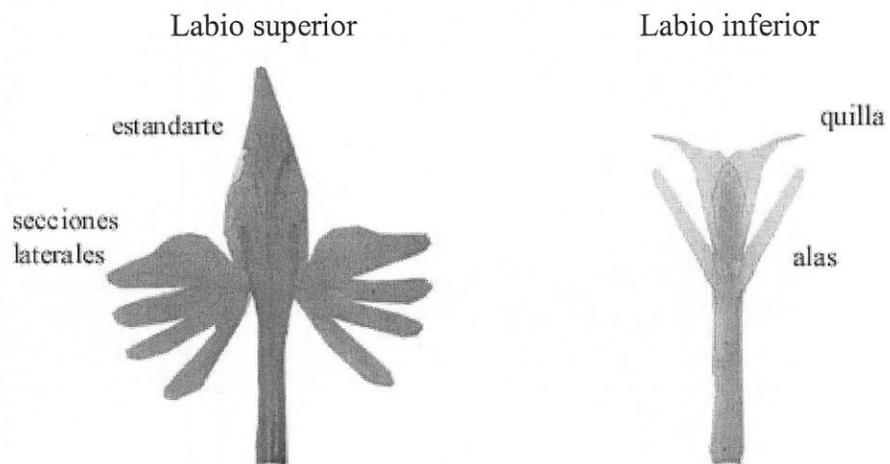


Fig. 3.1. Imágenes del labio superior e inferior de la flor después de ser aplanados y escaneados, mostrando los lóbulos de la corola (estandarte, secciones laterales, alas, quilla y el tubo coralino). El tamaño de la corola fue estimado como la suma de las áreas de los lóbulos de la corola, pero sin considerar el tubo coralino.

Trayectorias evolutivas de los sistemas de reproducción

Se mapeó el sistema reproductivo sobre la hipótesis filogenética obtenida mediante el análisis de inferencia bayesiana de los datos combinados de las secuencias ITS, waxy y trnF-ndhJ (ver Fig. 2.2B en Capítulo 2). De acuerdo al grado de autofertilización espontánea, se codificó el sistema reproductivo como un carácter discreto con dos estados posibles, autogamia y exogamia. Se reconstruyó el estado ancestral del sistema reproductivo con el criterio de máxima parsimonia (MP) utilizando el programa Mesquite (Madisson & Madisson 2004). Además se reconstruyó el estado ancestral del tipo de acercamiento de los órganos reproductivos (hercógamas permanentes y hercógamas temporales) y del tipo de mecanismo floral (con y sin sistema de liberación explosivo de polen).

Evolución correlacionada entre la capacidad de autofertilización espontánea y el tamaño de la corola.

Para evaluar si cambios en la capacidad de autofertilización se asocian a cambios en el tamaño de la corola se realizaron dos pruebas. En primer lugar, se realizó una prueba de máxima verosimilitud para detectar evolución correlacionada entre el índice de autofertilización y el tamaño de la corola, implementada en el programa Continuous (Pagel 2000, ver además Pagel 1997, 1999). Este método compara la bondad de ajuste de dos modelos, uno que permite la evolución correlacionada de dos caracteres y otro más simple que permite sólo la evolución independiente de los caracteres (modelo nulo). Como los modelos son anidados, los puntajes de verosimilitud se pueden comparar con una prueba de razones de verosimilitud, donde se estima el operador $\delta = 2 * (\ln L_1 - \ln L_0)$

y se evalúa en una distribución χ^2 con 1 grado de libertad. Se consideró que los caracteres evolucionaban en forma correlacionada si el modelo dependiente se ajustaba significativamente mejor que el modelo nulo. En segundo lugar, se comparó el tamaño de la corola de las especies autógamas con el tamaño estimado para los ancestros exógamos más próximos. Este tamaño se estimó mediante la reconstrucción de estados ancestrales con el criterio de máxima parsimonia cuadrática ponderada por el largo de ramas (Garland et al. 1997), implementado en el módulo PDAP del programa Mesquite (Madisson & Madisson 2004).

RESULTADOS

Desarrollo floral.

Las flores de las 9 especies de *Schizanthus* estudiadas son protándricas y en las primeras etapas del desarrollo presentan una separación espacial entre las anteras y el estigma. En todas las especies, el pistilo crece continuamente a lo largo del desarrollo floral, sin embargo la posición de las anteras y los patrones de elongación del estilo difieren entre las especies. En un grupo de especies, la separación entre los órganos reproductivos permanece a lo largo del desarrollo floral (hercógamas permanentes), mientras que en otro grupo de especies, el estigma receptivo entra en contacto con las anteras abiertas con polen en una etapa tardía del desarrollo floral (hercógamas temporales). A continuación se describe el desarrollo floral de ambos tipos florales:

1) Hercógamas permanentes. En las especies *S. alpestris*, *S. hookeri*, *S. integrifolius*, *S. pinnatus*, *S. porringens*, *S. tricolor*, no se observó contacto entre el estigma receptivo y las anteras durante todo el desarrollo floral. A excepción de *S. integrifolius*, todas estas especies presentan un sistema de liberación explosivo de polen. Inmediatamente después de la antesis, los estambres se encuentran adheridos a la quilla en un estado de tensión (Fig. 3.2A). Al abrirse las anteras, ya sea en forma simultánea o diferida, se puede gatillar un mecanismo de liberación explosivo de polen. Basta una leve presión sobre las alas o la quilla (dependiendo de la especie), para que uno o los dos estambres se separen de la quilla y liberen el polen en forma de cúmulo, dejando las anteras vacías. En esta etapa del desarrollo, es decir, cuando el mecanismo de polen es “gatillable”, el pistilo es relativamente corto y el estigma se encuentra no receptivo al interior del tubo coralino (en las especies de tubo coralino largo, *S. hookeri* y *S. alpestris*) o muy cercano a la apertura del mismo (en las especies de tubo coralino corto, *S. pinnatus*, *S. tricolor* y *S. porringens*). Durante el desarrollo floral, el pistilo crece continuamente y se curva hacia arriba. Cuando el pistilo sobresale más de 1 cm fuera del tubo coralino se vuelve receptivo. En esta etapa, las anteras ya han perdido el polen y están vacías.

La especie *S. integrifolius* presenta un mecanismo distinto. Esta especie no presenta un sistema de liberación explosivo de polen, los estambres son largos y no descansan sobre la quilla, sino que sobresalen bastante fuera del tubo coralino, dejando a las anteras “suspendidas” en el aire (Fig. 3.2B). Inmediatamente después de la antesis las anteras permanecen cerradas y el estigma se encuentra no receptivo al interior del tubo. Las anteras se abren en forma desfasada (primero la antera más externa) con dehiscencia extrorsa. Durante el desarrollo floral el pistilo crece continuamente y sobresale fuera del

tubo coralino; en esta etapa las anteras están vacías y comienzan a secarse. El pistilo continúa creciendo y se curva hacia arriba, cuando sobresale a más de 1 cm de la apertura del tubo, se vuelve receptivo.

2) Hercógamas temporales. Este tipo de flor está presente en *S. candidus*, *S. lacteus* y *S. grahamii*. Estas especies tampoco tienen un sistema de liberación explosivo de polen, pero a diferencia de *S. integrifolius*, los estambres son cortos y casi no sobresalen fuera del tubo coralino (Fig. 3.2C). Por lo tanto, las anteras quedan cercanas a la apertura del tubo coralino y al estandarte. Inmediatamente después de la antesis, el estigma se encuentra no receptivo al interior del tubo coralino, las anteras se abren en forma desfasada en forma introrsa (usualmente la antera más externa antes), pero no pierden el polen. El pistilo crece continuamente, cuando el estigma sobresale fuera del tubo se vuelve receptivo, y toca las anteras que están llenas de polen, o el estandarte, donde usualmente también se ha depositado el polen.



Fig. 3.2. Desarrollo floral en los tres tipos florales encontrados en *Schizanthus*. A) Flores hercógamas permanentes con sistema de liberación explosiva de polen, representado por *S. tricolor*. B) Flores hercógamas permanentes sin sistema de liberación explosiva de polen, representado por *S. integrifolius*. C) Flores hercógamas temporales, representado por *S. candidus*. La posición de las anteras y del estigma se indican con las letras A y E respectivamente, con un asterisco se señala el momento cuando el estigma se vuelve receptivo. Ver detalles en el texto.

Nivel de autofertilización espontánea

Las especies de *Schizanthus* presentan importantes diferencias en el grado de autofertilización espontánea (Tabla 3.2), que se corresponden con el tipo de flor. Las especies con flores hercógamas permanentes con SLE (*S. hookeri*, *S. alpestris*, *S. pinnatus*, *S. tricolor* y *S. porringens*) y sin SLE (*S. integrifolius*) presentan índices de autofertilización espontánea \leq a 0,2 (rango entre 0,04 a 0,2). En estas especies, la producción de frutos y semillas disminuye significativamente cuando se excluyen los polinizadores, siendo el número de semillas promedio y el porcentaje de frutos producidos por planta significativamente mayor en el tratamiento control de polinización cruzada que en el tratamiento de autofertilización espontánea (Tabla 3.2).

Las especies con flores hercógamas temporales, es decir, donde se observa un contacto tardío entre las anteras y el estigma (*S. candidus*, *S. lacteus* y *S. grahamii*), presentan índices de autofertilización espontánea superiores a 0,8. En estas especies no se encontraron diferencias significativas en el número de semillas promedio y en el porcentaje de frutos producidos por planta entre el tratamiento de autofertilización y el de polinización cruzada (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Resultados de los experimentos de autofertilización espontánea y de polinización cruzada en 9 especies de *Schizanthus*. Para cada tratamiento se indica: el número de flores marcadas recuperadas (FL); el porcentaje promedio de frutos producidos por planta respecto al número de flores marcadas recuperadas (XX_{FR}); y el promedio del número de semillas promedio producidas por flor marcada recuperada (XX_{SEM}). Además se indican las significancias estadísticas de las pruebas de permutación realizadas sobre las diferencias entre los tratamientos en el porcentaje de frutos producidos por planta (p-FR) y el número de semillas promedio producidas por flor (p-SEM). También se muestra el índice de autofertilización (A). Ver texto para su descripción. Ver Tabla 3.1 para abreviaturas de especies.

Esp	Autofertilización			Polinización cruzada			Autof. vs Cruzada		A
	Fl	XX_{FR}	XX_{SEM}	Fl	XX_{FR}	XX_{SEM}	p-FR	p-SEM	
<i>Hercógamas permanentes</i>									
ALP	32	14,3±5,7	1,5±0,6	36	91,4±18,4	8,5±1,5	p<0,001	p<0,001	0,17
HOO	48	2,0±2,0	0,6±0,6	39	54,5± 9,7	15,3±2,6	p<0,001	p<0,001	0,04
PIN	50	8,0±4,4	1,6±0,9	49	70,0±6,1	12,3±2,2	p=0,025	p<0,001	0,13
POR	19	13,0±3,8	2,2±0,9	18	84,3±4,8	12,6±1,7	p<0,001	p=0,003	0,17
TRI	45	8,9±4,8	1,2±2,7	37	85,0±10,5	15,1±2,7	p<0,001	p<0,001	0,08
INT	32	2,9±2,7	0,6±0,6	35	67,7±9,8	17,4±2,4	p<0,001	p<0,001	0,03
<i>Hercógamas temporales-</i>									
CAN	32	100±0	90,8±4,8	32	100±0	101,8±7,0	-	p=0,087 ns	0,89
GRA	50	100±0	33,8±2,4	50	100±0	28,3±2,6	-	p=0,062 ns	1,19
LAC	38	91,1±6,8	70,1±5,5	41	92,7±3,6	80,9±5,1	p=0,432 ns	p=0,076 ns	0,87

¹Valores corresponden al promedio por planta ± error estándar.

Trayectorias evolutivas de los sistemas reproductivos y del tamaño de la corola

La reconstrucción del sistema reproductivo con el criterio de máxima parsimonia sugiere que el ancestro del género era exógamo (Fig. 3.3A) y que la autogamia habría evolucionado al menos en dos ocasiones independientes en el género, una vez en el linaje de las especies del desierto y otra en el linaje de las especies altoandinas. La evolución de la autogamia ocurre en asociación al acercamiento de los órganos reproductivos, es decir, a la transición desde la hercogamia permanente a la hercogamia temporal (Fig.3.3B).

Respecto a la evolución del tamaño de la corola, los datos indican que el grado de autofertilización no evoluciona correlacionadamente con el tamaño floral. La bondad de ajuste del modelo que permite la evolución correlacionada entre estos caracteres ($\ln L_1 = 24,3$) no es significativamente mayor que la bondad de ajuste del modelo nulo que permite sólo la evolución independiente de los caracteres ($\ln L_0 = -25,8$; $p = 0,09$).

Consecuentemente, el tamaño de la corola de las especies autógamas no es menor que el de sus ancestros exógamos más recientes. En la Figura 3.3C, donde se muestra la reconstrucción de los estados ancestrales del tamaño de la corola con el criterio de parsimonia cuadrática ponderada, se puede apreciar que la corola de las especies autógamas *S. grahamii* y *S. candidus* es de mayor tamaño que la de sus ancestros exógamos más recientes (ver Fig. 3.3A, para reconstrucción de sistemas reproductivos). No así en el caso de *S. lacteus* donde el tamaño de la corola sí es menor que la de su ancestro más reciente.

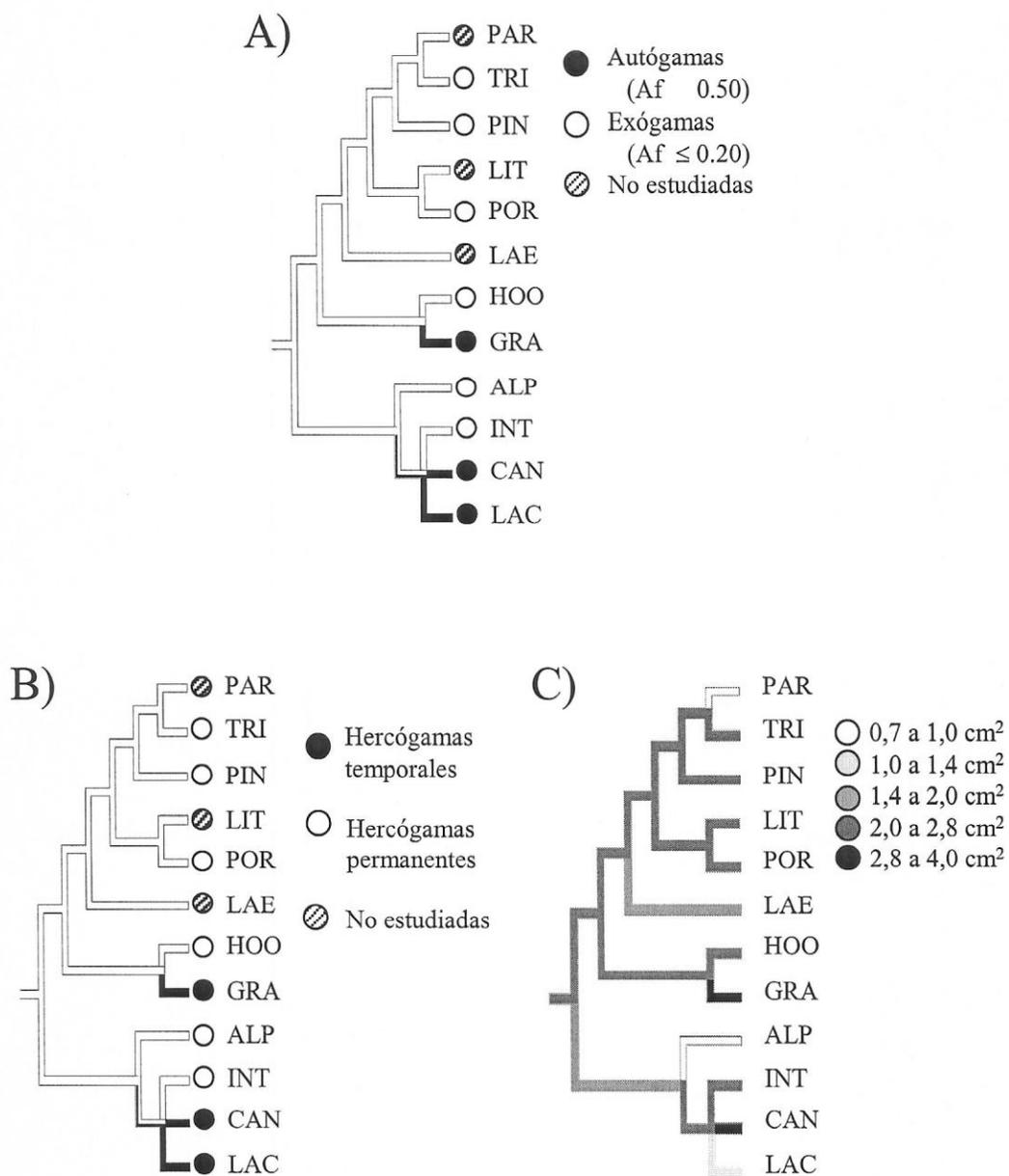


Fig. 3.3. Trayectorias evolutivas de los sistemas de reproducción y de caracteres florales asociados. A) Reconstrucción del estado ancestral del grado de autofertilización espontánea con el criterio de máxima parsimonia. B) Reconstrucción del estado ancestral del grado de hercogamia con el criterio de máxima parsimonia. C) Reconstrucción del tamaño de la corola con el criterio de máxima parsimonia cuadrática. Ver abreviatura de las especies en Tabla 3.1. Los árboles filogenéticos corresponden al árbol obtenido por inferencia bayesiana a partir de las secuencias de las regiones de ADN, *trnF/ndhJ*, *waxy* e ITS (Fig. 2.2, capítulo 2).

DISCUSIÓN

El seguimiento del desarrollo floral y las observaciones sobre la producción de frutos y semillas en ausencia de polinizadores en 9 especies de *Schizanthus*, indican que en el género hay al menos dos tipos de sistemas reproductivos; flores adaptadas a la exogamia y flores adaptadas a la autogamia. Ambas clases florales son protándricas y hercógamas en las primeras etapas del desarrollo floral. En ambas, el pistilo crece continuamente y la posición relativa de las anteras y del estigma cambia durante el desarrollo floral, pero mientras que en las especies adaptadas a la autogamia las anteras con polen entran en contacto con el estigma receptivo, en las especies adaptadas a la exogamia no lo hacen. En estas últimas, la producción de frutos disminuye significativamente al excluir los polinizadores, lo que resulta en bajas tasas de autofertilización espontánea. Aunque la compatibilidad genética de las especies de *Schizanthus* no fue estudiada en este trabajo, se conoce que la especie *S. hookeri* es autocompatible (Arroyo & Humaña, comunicación personal). Esto sugiere que la adaptación a la exogamia en *Schizanthus* no es producto de un sistema de incompatibilidad genética sino que probablemente de la separación temporal entre la fase masculina y femenina de las flores (dicogamia) y de la separación espacial entre las anteras y el estigma (hercogamia).

En las especies adaptadas a la autogamia, *S. candidus*, *S. grahamii* y *S. lacteus*, los estambres son relativamente cortos, las anteras tienen una dehiscencia introrsa y el estigma receptivo entra en contacto con las anteras antes que pierdan el polen. La producción de frutos y semillas en estas especies disminuye sólo parcialmente (*S. grahamii*), o no disminuye (*S. candidus* y *S. lacteus*) al excluir los polinizadores, lo que

resulta en la posibilidad de altas tasas de autofertilización espontánea. La dicogamia y la hercogamia inicial observada en estas flores sugiere que estas especies pueden tener una estrategia de reproducción mixta, donde la autopolinización es retardada hasta después que haya pasado la oportunidad de polinización cruzada (Lloyd 1992, Sakai 1995). En otras flores tubulares se ha observado que la autogamia retardada puede ser producida por un cambio en las posiciones relativas de las anteras y del estigma (*Hibiscus*: Klips & Snow 1997; *Campanula*: Faegri & Van der Pijl 1979). Por ejemplo, las flores de *Collinsia verna* (Escrofulariácea), al igual que las de *Schizanthus*, son protándricas e inicialmente hercógamas. Durante el desarrollo floral, el estigma se mueve hacia el frente de la quilla posicionándose cerca de las anteras y se vuelve receptivo cuando tres de las cuatro anteras presentes se han abierto, ocurriendo de esta manera autofertilización sólo al final del desarrollo floral (Kalisz et al. 1999).

Considerando nuestra estimación del estado ancestral del sistema reproductivo, la adaptación a la autogamia (o probablemente autogamia retardada) habría evolucionado en *Schizanthus* al menos en dos ocasiones distintas a partir de ancestros exógamos. Estos resultados son consistentes con otros estudios que indican que transiciones desde la exogamia hacia la autogamia son frecuentes en la naturaleza (Kohn et al. 1996, Schoen et al. 1997, Takebayashi & Morrell 2001, Barrett 2002). Se ha propuesto que la evolución de la autogamia podría ocurrir por selección automática o como una forma de asegurar la reproducción en ambientes con condiciones adversas para la polinización cruzada (Arroyo & Squeo 1990, Morgan et al. 1997, Kalisz & Vogle 2003), siendo el aseguramiento reproductivo especialmente importante en plantas anuales (Stebbins 1974, ver discusión en Morgan et al. 1997). Por otra parte, se ha propuesto que la

evolución de estrategias mixtas como la autogamia retardada (Schoen & Brown 1991) puede ocurrir en ambientes especialmente variables, donde la disponibilidad de insectos puede ser incierta. Nuestros resultados indican que en *Schizanthus* la adaptación a la autogamia (o probablemente a la autogamia retardada) evolucionó en forma independiente en la estepa altoandina y el desierto. Estudios comunitarios en Chile Central, muestran que la riqueza, abundancia (Arroyo et al. 1982), y tasa de visitas (Arroyo et al. 1985) de especies de insectos polinizadores disminuye con la altitud, particularmente de himenópteros, los principales visitantes de *Schizanthus*, que alcanza un máximo en el matorral subandino y después disminuye rápidamente (Arroyo et al. 1982).

En *Schizanthus*, no se observó que la evolución de la capacidad de autofertilización esté acompañada de una reducción en el tamaño de la corola como se ha observado en otros taxa donde han ocurrido transiciones a la autogamia (Arroyo 1973, Cruden 1977, Holstford & Ellstrand 1992, Stebbins 1974, Barrett 2004). Es más, las especies *S. grahamii* y *S. candidus*, a pesar sus altos índices de autofertilización, presentan las flores más grandes del género y producen néctar en cantidades suficientes como para repletar el tubo coralino (2 a 3 ul). Armbruster et al. (2002) mostraron que en el género *Collinsia*, las especies con autogamia retardada presentaban corolas de mayor tamaño que las especies autógamas, donde el contacto entre las anteras y el estigma ocurre tempranamente en la antesis. Estos datos refuerzan la idea que las especies *S. grahamii*, *S. candidus* y *S. lacteus* tienen una estrategia reproductiva mixta, aunque son necesarios experimentos adicionales y un seguimiento del desarrollo más fino para evaluar si el estigma puede recibir polen exógeno antes de que ocurra la autofertilización

y para evaluar la importancia de la polinización cruzada en la naturaleza. Sin embargo, es necesario destacar que la ausencia de evolución correlacionada entre el tamaño de la corola y la capacidad de autofertilización espontánea, también pueden indicar que los caracteres que permiten la autofertilización pueden evolucionar más rápido que caracteres asociados a la atracción y recompensa de polinizadores.

REFERENCIAS

- ARMBRUSTER WS, MULDER CPH, BG BALDWIN, KALISZ S, B WESSA & H NUTE 2002 Comparative analysis of late floral development and mating-system evolution in tribe *Collinsieae* (Scrophulariaceae s.l.). *American Journal of Botany* 89:37-49
- ARROYO MTK 1973 A taximetric study of intraspecific variation in autogamous *Limnanthes ffocosa* (Limnanthaceae). *Brittonia* 25:177-191
- ARROYO MTK, ARMESTO J, & R PRIMACK 1985 Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of Central Chile. II. Effect of temperature on visitation rates and pollination possibilities. *Plant Systematics and Evolution* 149:187-203
- ARROYO MTK, PRIMACK R & J ARMESTO 1982 Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of Central Chile. I. Pollination mechanism and altitudinal variation. *American Journal of Botany* 69:82-97
- ARROYO MTK & F SQUEO 1990 Relationship between plant breeding systems and pollination. En: Kawano (ed). *Biological approaches and evolutionary trends in plants*: 205-227. Academic Press, London
- BARRETT SCH 2002 The evolution of plant sexual diversity. *Nature Review of Genetics* 3:274-283

- BARRETT SCH 2004 Flower diversity and plant mating strategies. En: McGraw-Hill Yearbook of Science & Technology: 110-113. McGraw Hill Inc, New York
- CHARLESWORTH D & B CHARLESWORTH 1987 Inbreeding depression and its evolutionary consequences. Annual Review of Ecology and Systematics 18:237-268
- COCUCCI A 1989 El mecanismo floral de *Schizanthus*. Kurtziana 20:113-132
- CRUDEN WR 1977 Pollen-ovules ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. Evolution 31:32-46
- ECKHERT C & A SCHAEFER 1998 Does self-pollination provide reproductive assurance in *Aquilegia canadensis* (Ranunculaceae)? American Journal of Botany 77:919-924
- FÆGRI K & L VAN DER PIJL 1979 The principles of pollination ecology. Pergamon Press, New York
- GARLAND TM, MARTIN KLM & R DIAZ-URIARTE 1997 Reconstructing ancestral trait values using squared change parsimony: plasma osmolarity at the origin of amniotes. En: Sumida SS & KLM Martin (eds). Amniote origins: completing the transition to land: 425-502. Academic Press, San Diego
- GRAU J & E GRÖNBACH 1984 Untersuchungen zur Variabilität in der Gattung *Schizanthus* (Solanaceae). Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München 20:111-203
- HOLTSFORD TP & NC ELLSTRAND 1992 Genetic and environmental variation in floral traits affecting outcrossing rate in *Clarkia tembloriensis* (Onagraceae). Evolution 46:216-225
- KALISZ S, VOGLER DW, FAILS B, FINER M, SHEPARD E, HERMAN T & R GONZALES 1999 The mechanism of delayed selfing in *Collinsia verna* (Scrophulariaceae) American Journal of Botany 86:1239-1247
- KALISZ S & DW VOGLER 2003 Benefits of autonomous selfing under unpredictable pollinator environments. Ecology 84:2928-2942
- KEANS CA & DW INOUE 1993 Techniques for pollination biologists: 583. University of Colorado press, Boulder

- KLIPS RA & AA SNOW 1997 Delayed autonomous self-pollination in *Hibiscus laevis* (Malvaceae). *American Journal of Botany* 84:48–53
- KNAPP S 2002 Floral diversity and evolution in the Solanaceae. En: QCB Cronk, RM Bateman & JA Hawkins (eds). *Developmental genetics and plant evolution*. Taylor & Francis, London
- KOHN JR, GRAHAM SW, MORTON B, DOYLE JJ & SCH BARRETT 1996 Reconstruction of the evolution of reproductive characters in Pontederiaceae using phylogenetic evidence from chloroplast restriction site variation. *Evolution* 50:1454-1469
- LLOYD DG 1979 Some reproductive factors affecting the selection of self fertilization in plants. *International Journal of Plant Sciences* 153:358-369
- LLOYD DG & DJ SHOEN 1992 Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences* 153:358–369
- LYON DL 1992 Bee pollination of facultatively xenogamous *Sanguinaria canadensis* L. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 119:368-375
- MADISSON WP & DR MADISSON 2004 Mesquite version 1.02. Disponible en <http://mesquiteproject.org/mesquite/mesquite.html>
- MORGAN MTD, SHOEN DJ & TM BATAILLON 1997 The evolution of self fertilization in perennials. *The American Naturalist* 150:618-638
- ORNDUFF R 1969 Reproductive biology in relation to systematics. *Taxon* 18:121-123
- PAGEL M 1994 Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters. *Proceedings of the Royal Society of London (B)* 255:37-45
- PAGEL M 1997 Inferring evolutionary processes from phylogenies. *Zoologica Scripta* (Journal of the Royal Swedish Academy) 25th Anniversary Special Issue on Phylogenetics and Systematics 26:331-348
- PAGEL M 1999 Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* 10:877-884
- PAGEL M 2000 Continuous. Disponible en <http://sopc34.rdg.ac.uk/meade/Mark/>

- RATHKE B & L REAL 1993 Autogamy and inbreeding depression in mountain Laurel, *Kalmia latifolia* (Ericaceae). *American Journal of Botany* 80:143-146
- SAKAI S 1995 Evolutionary stable selfing rates of hermaphroditic plants with competing and delayed selfing modes with allocation to attractive structures. *Evolution* 49:557-564.
- SCHOEN DJ & AD BROWN 1991 Whole and part flower self-pollination in *Glycine clandestina* and *G. argyrea* and the evolution of autogamy. *Evolution* 45:1651-1664
- SCHOEN DJ, MORGAN MT & DT BATAILLON 1996 How does self-pollination evolve? inferences from floral ecology and molecular genetic variation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London (B)* 351:281-1290
- SCHOEN DJ, JOHNSTON MO, L'HEUREUX AM & JMV MARSOLAIS 1997 Evolutionary history of the mating system in *Amsinckia* (Boraginaceae). *Evolution* 51:1090-1097
- SIGMASCAN PRO version 5.0.0. SPSS Inc. Chicago
- STATISTICA 2001 version 6.0. Stat soft Inc.
- STEBBINS GL 1974 Flowering plants: evolution above the species level. Harvard University Press, Cambridge
- TAKEBAYASHI N & PL MORRELL 2001 Is self-fertilization an evolutionary dead end? Revisiting an old hypothesis with genetic theories and a macroevolutionary approach. *American Journal of Botany* 88:1143-1150
- UYENOYAMA MK, HOLSINGER KE & DM WALLER 1993 Ecological and genetic factors directing the evolution of self-fertilization. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* 9:327-381
- WALTERS D 1969 A Revision of the genus *Schizanthus* (Solanaceae). Ph. D. Thesis, Indiana University

**CAPÍTULO 4. EVOLUCIÓN DE LOS SISTEMAS DE POLINIZACIÓN DEL
GÉNERO *SCHIZANTHUS*: CONSECUENCIAS SOBRE LA EVOLUCIÓN
DE LA MORFOLOGÍA FLORAL**

RESUMEN

Se estudió la evolución de la morfología floral y de los sistemas de polinización en el género sudamericano *Schizanthus*, conformado por 12 especies que se caracterizan por una amplia variación en el color, tamaño y forma de la corola, y que permite reconocer tres síndromes de polinización: ornitofilia, melitofilia y falenofilia. Observaciones de polinizadores en 9 especies, realizadas para comprobar los síndromes de polinización, indican que hay sólo una correspondencia parcial entre el síndrome y el tipo de visitante observado, con una tendencia de las especies exógamas a ser más generalistas que lo predicho por el síndrome. Análisis basados en una filogenia molecular muestran que la melitofilia era el estado ancestral del género, y que la ornitofilia y la falenofilia habrían evolucionado una sola vez, en el linaje de las especies altoandinas y del desierto respectivamente, y en correspondencia con la adquisición de polinización por picaflores y por lepidópteros. Estas transiciones en los mecanismos de polinización ocurrirían sin la pérdida del polinizador ancestral, dando lugar así a estados más generalistas (donde las flores son visitadas por el polinizador nuevo y el ancestral). Los análisis de los patrones evolutivos del tamaño y forma de la corola, estimadas con métodos de morfometría geométrica, sugieren que los patrones de similitud entre las especies son

relativamente independientes de la filogenia, y que la transformación de la morfología floral ha seguido un patrón de cambio gradual acelerado, y no puntuado.

INTRODUCCIÓN

La diversificación en la forma de las flores de las angiospermas ha sido atribuida a cambios adaptativos de los caracteres florales con relación al tipo y disponibilidad de agentes polinizantes y particularmente, a la promoción de la polinización cruzada (Faegri & van der Pijl 1979, Ornduff 1969, Stebbins 1970, Barrett & Graham 1997, Barrett 2004). Esta premisa se apoya en estudios comparativos que muestran patrones de evolución convergente y la mantención de zonas adaptativas en las cuales múltiples caracteres florales están asociados a clases particulares de polinizadores (Stebbins 1974, Johnson et al. 1998, Goldblatt & Manning 2000). En algunos grupos de plantas se ha mostrado que combinaciones particulares de caracteres florales, conocidos como “síndromes de polinización” (Faegri & van der Pijl 1979) describen y sintetizan los modos de polinización (revisado por Fenster et al. 2004). Sin embargo, la clásica idea que las flores tenderían hacia la especialización por un tipo de polinizador animal ha sido criticada (revisado por Johnson & Steiner 2000, Gómez 2002), principalmente sobre crecientes evidencias de estudios ecológicos que muestran una tendencia en la naturaleza hacia la generalización y dinamismo de los sistemas de polinización (Ashman & Stanton 1991, Echart 1992, Waser et al. 1996, Ollerton 1996, Gómez & Zamora 1999, Sánchez-La Fuente 2002). Se ha argumentado, que esta baja especificidad podría contrarrestar o impedir las presiones selectivas potenciales de los polinizadores sobre la

morfología floral (Herrera 1996). Por otro lado, se ha resaltado la importancia que podrían tener una serie de factores intrínsecos en restringir la respuesta adaptativa de las plantas (Herrera 1993, 1996, Wilson & Thompson 1996). Estas restricciones se pueden manifestar en tendencias a la conservación evolutiva de la morfología floral y traducir en fuertes señales filogenéticas en la morfología floral.

Una manera de avanzar en este tema es a través del análisis de los patrones de cambio (o conservación) de los caracteres florales durante las transiciones entre sistemas de polinización en un linaje, de tal forma, de entender el compromiso entre evolución adaptativa e inercia filogenético en el fenotipo floral. Esta aproximación permite además evaluar cómo ocurre la transformación de la morfología floral en estas transiciones. Este aspecto de la evolución de la morfología floral ha sido escasamente estudiado y sigue siendo controversial. Varios estudios clásicos sugieren que las transiciones entre sistemas de polinización ocurren en forma gradual, vía estados intermedios (Baker 1973, Stebbins 1974 “principio de la transferencia de función vía un estado intermedio”). En esta línea, por ejemplo, Wilson et al. (2004b) en un estudio en *Penstemon*, sugirieron que las transiciones desde la polinización por insectos a la polinización por picaflores ocurre por un proceso de des-especialización y re-especialización de la flor vía estados intermedios. Este proceso se manifestaría en que las flores de las especies del género pueden ser arregladas a lo largo de un “gradiente de síndromes”. Sin embargos otros estudios sugieren que la transformación de la morfología floral puede seguir un patrón de cambio puntuado, sin estados intermedios. Por ejemplo, Beardsley et al. (2003) mostraron que en *Mimulus* sección *Erythrane*, en la transición desde la polinización por

insectos a la polinización por picaflores, la transformación floral siguen un patrón de cambio más puntuado que gradual.

El objetivo principal de este trabajo es caracterizar los patrones evolutivos de la morfología floral del género *Schizanthus* (Solanaceae) en relación a cambios en los sistemas de polinización, investigando tres preguntas: ¿Existen evidencias que la morfología floral del género *Schizanthus* haya sido modulada por selección mediada por polinizadores? ¿Cómo influye la filogenia en la morfología floral? ¿Qué modo o patrón de cambio siguen los caracteres florales en las transiciones entre sistemas?.

El género *Schizanthus*, intrigante por su inusual morfología floral para la familia Solanácea (Knapp 2002), presenta flores marcadamente zigomórficas, bilabiadas, con un mecanismo de liberación explosivo de polen convergente con el de las Papilionáceas (descrito por Cocucci 1989). Está conformado por 12 especies de plantas anuales y bianuales (Grau & Grönbach 1984) que se caracterizan por una amplia variación en la morfología floral reconociéndose dos síndromes de polinización; melitofilia o polinización por himenópteros, y falenofilia o polinización por lepidópteros nocturnos (Cocucci 1989). La melitofilia es asociada con flores violetas, con secciones laterales orientadas frontalmente, el labio inferior desarrollado y un sistema de liberación explosivo de polen (SLE). La falenofilia es asociada a flores blancas, con las secciones laterales orientadas hacia atrás, con un labio inferior reducido y sin SLE. Sin embargo, no se han realizado observaciones sistemáticas de estas especies en terreno para evaluar la validez de estos síndromes de polinización (pero ver Cocucci 1989), y de esta manera dar cuenta del grado de especialización de las flores.

Los objetivos de este estudio fueron: (1) caracterizar y cuantificar las variaciones en la morfología floral a través de mediciones lineales de caracteres florales y de métodos de morfometría geométrica; (2) examinar la predictibilidad de los síndromes de polinización a través de la observación de visitantes de las flores y de esta forma evaluar el grado de especialización de la morfología floral; (3) comparar las trayectorias evolutivas de los síndromes de polinización y de los visitantes observados en una filogenia molecular, y evaluar el cambio de los caracteres florales durante las transiciones entre sistemas de polinización; (4) evaluar la influencia de la filogenia en la morfología floral; (5) determinar si el tamaño y forma de la corola siguen un patrón de cambio gradual o puntuado a lo largo de la filogenia de *Schizanthus*.

MÉTODOS

Sitios de estudio

Se describió el síndrome de polinización de cada una de las doce especies descritas de *Schizanthus*. Sólo en nueve de ellas se pudieron observar los visitantes de las flores. Éstas pertenecen a las especies, *S. hookeri*, *S. grahamii*, *S. alpestris*, *S. pinnatus*, *S. tricolor*, *S. porringens*, *S. lacteus*, *S. candidus* y *S. integrifolius*. Las poblaciones son las mismas que las estudiadas en el capítulo anterior (Tabla 3.1, Capítulo 3)

Caracterización de la morfología floral

Mediciones lineales

Se colectaron 15 flores de 15 individuos distintos de cada especie. Las flores colectadas en terreno se guardaron en alcohol al 70%. En el laboratorio se disectaron bajo la lupa, separando el labio superior del labio inferior para poder aplanar completamente la flor (Fig. 4.1). Ambas partes fueron escaneadas. Sobre las imágenes obtenidas se cuantificó el área y perímetro del estandarte, de las secciones laterales, quilla y alas, y el largo de la corola (suma del largo del labio inferior y superior) mediante el programa SigmaScan Pro 5.0 (Fig. 4.1). A partir de estas medidas se calculó el valor de las siguientes variables: (1) tamaño de la corola, estimada como la suma del área de los 5 lóbulos de la corola; (2) complejidad de la corola, estimada como la razón entre el perímetro al cuadrado y el área de la corola; (3) tamaño relativo del labio inferior, estimada como los residuales de una regresión realizada entre el área del labio inferior y el tamaño de la corola incluyendo todas las especies; (4) largo relativo del tubo coralino, estimado como los residuales de una regresión realizada entre el largo promedio del tubo de cada especie y el largo de la corola con todas las especies. En todos los análisis estas variables fueron consideradas como continuas. La variable tamaño fue tratada con la transformación logarítmica. Además, en terreno se anotaron los siguientes aspectos florales: (5) orientación de las secciones laterales del labio superior, la que puede ser lateral o frontal (ver Fig. 4.2); (6) descripción simple del color de la corola donde se reconocieron solo tres categorías, blanco cuando la corola es completamente blanca, rosado-lila cuando alguno de los segmentos de la corola presenta estos colores, y rojo, cuando las secciones laterales presentan este color; (7) presencia o ausencia de un

sistema de liberación explosiva de polen (SLE, Cocucci 1989, ver descripción en Capítulo 3); (8) posición de los estambres respecto a la apertura del tubo coralino; (9) dehiscencia de las anteras. Las diferencias en la morfología floral de las especies se evaluaron mediante MANOVA en el caso de los caracteres continuos.

Morfometría geométrica

Las variaciones en la forma de la corola también se cuantificaron usando métodos de morfometría geométrica (MG) (Rohlf & Marcus 1993). A diferencia de los métodos anteriores, la morfometría geométrica no se basa en medidas de distancias o razones para cuantificar las variaciones de forma, sino en la posición relativa de varios puntos homólogos o “landmarks”, los cuales son elegidos para representar lo mejor posible la forma de la estructura. Las variables de forma son generadas a partir de variaciones en las coordenadas x,y del grupo de “landmarks” elegidos.

En las imágenes escaneadas del labio inferior y superior de la corola se distinguieron 4 y 6 “landmarks” respectivamente, elegidos para capturar la variación de forma de toda la corola. Como la corola presenta simetría bilateral, los “landmarks” fueron ubicados sólo en el lado derecho de la corola (Fig. 4.1). Como el labio superior e inferior de la corola son dos estructuras articuladas, para poder cuantificar las variaciones de la forma de la corola en su conjunto, se debió utilizar una de las aproximaciones de Adams (1999) para análisis de estructuras articuladas. Se generaron variables de forma de cada subgrupo de “landmarks” separadamente y se generó una variable adicional correspondiente a la razón de los tamaños entre los dos subgrupos de datos. Las coordenadas x e y de los “landmarks” de los 180 ejemplares se digitalizaron usando el programa TPSDIG32 (Rohlf 2001). Para remover la variación en las

configuraciones de “landmarks” no asociados a variaciones en forma, se alinearon los 180 ejemplares usando el método de superposición GPA (General Procrustes Analysis, Rohlf & Slice 1990). Este análisis remueve la variación no asociada a forma, es decir, diferencias de tamaño, ubicación y rotación, escalando los ejemplares a un tamaño unitario, trasladándolos a una posición común, y rotándolos para que los “landmarks” correspondientes de todos los ejemplares estén lo más cerca posible. A partir de los ejemplares alineados se extrajeron las variables de forma utilizando el análisis de “Thin Plate Splines” (Bookstein 1987, Rohlf 1998), implementado en el programa TPSRELW (Rohlf 1999). Esta aproximación estima una configuración consenso a partir de todos los ejemplares alineados y computa las diferencias de forma entre cada ejemplar y esta configuración como deformaciones continuas y no lineales de una grilla respecto a de la configuración de “landmarks” consenso. Estas deformaciones se expresan en función de variables de forma geoméricamente ortogonales llamadas “partial warps” (PW), ordenadas según el alcance de las deformaciones, desde las más globales, es decir, que involucran toda la estructura, a las más localizadas. De esta manera, para describir las variaciones en la forma uniformes (deformaciones globales) y no uniformes (deformaciones locales) de la corola se extrajeron los PW del labio inferior y superior de la corola, incluyéndose el componente uniforme de la variación a través de las ecuaciones de Bookstein (1996). En total se generaron 13 variables de forma: 8 PW (incluido componente uniforme) del labio superior, 4 PW del labio inferior (incluido componente uniforme) y una variable correspondiente a la razón de tamaños entre el labio superior e inferior. Para analizar las variaciones interespecíficas en la forma de la corola, se realizó un análisis canónico variado (CVA) sobre las

variables de forma (PW). Este análisis permite ordenar los ejemplares en un espacio morfométrico y obtener nuevas variables de forma que consideran la variación dentro de los grupos (en este caso las especies) y maximizar la razón entre la varianza entre los grupos y la varianza dentro de los grupos (ver aplicaciones en Kassam et al. 2003). Este análisis se realizó con el programa NTSYS –PC versión 2.1 (Rohlf 2000).

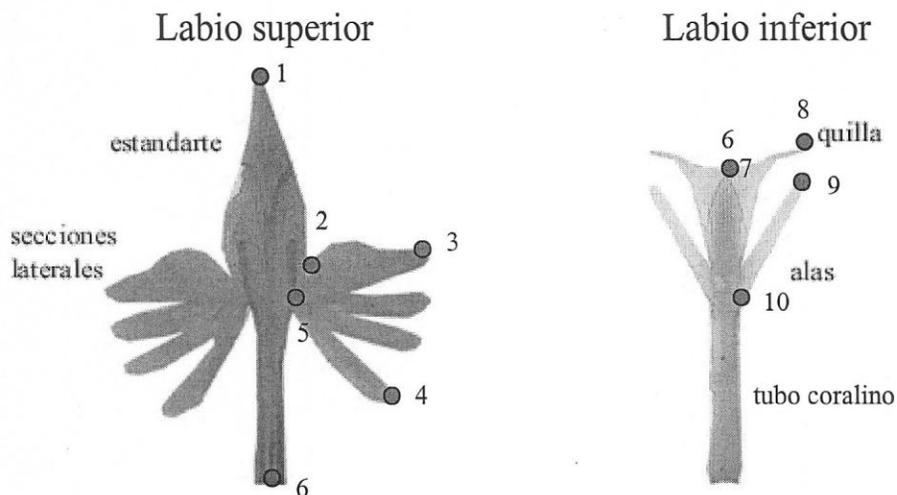


Fig. 4.1. Imágenes del labio superior e inferior de la flor de *Schizanthus hookeri* después de ser aplanados y escaneados, mostrando los caracteres florales y posición de los 10 “landmarks” considerados en el estudio. Los caracteres son: estandarte, secciones laterales, alas, quilla y tubo coralino. Los “landmarks” en el labio superior son: (1) extremo superior del estandarte, (2) punto de unión entre estandarte y secciones laterales, (3) punto superior de secciones laterales, (4) punto inferior de secciones laterales, (5) inserción del estandarte y secciones laterales en el tubo coralino y (6) extremo inferior del tubo coralino. Los “landmarks” en el labio inferior son: (7) extremo superior de quilla; (8) punta de la quilla, (9) extremo superior de la alas, (10) inserción de las alas en tubo coralino.

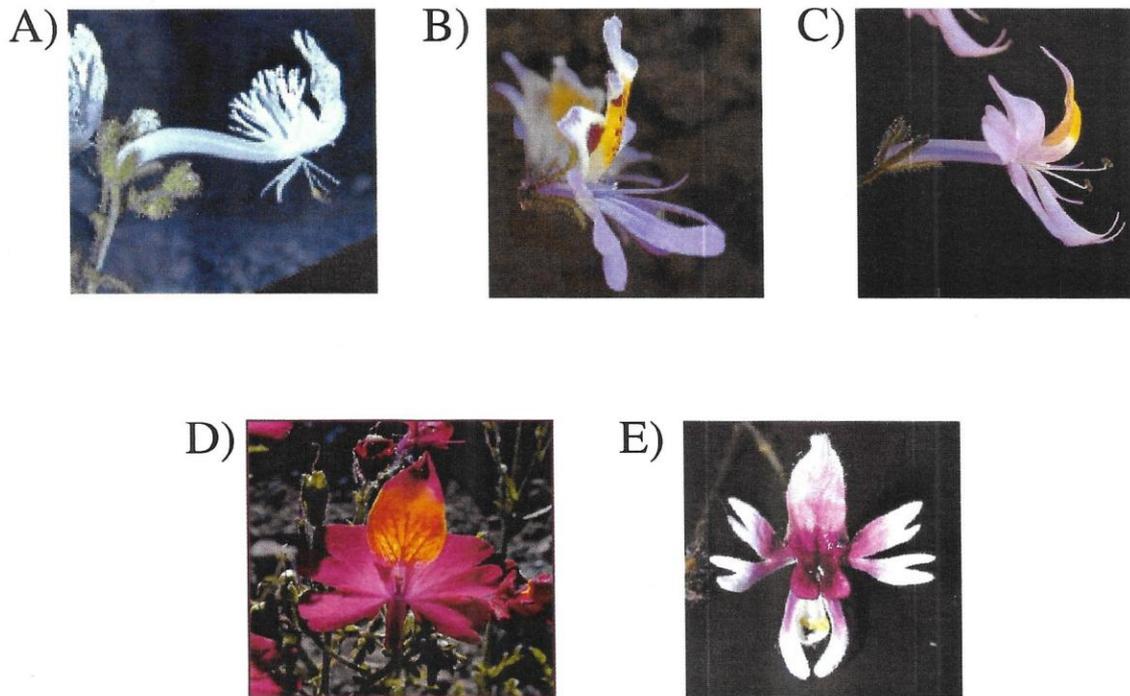


Fig. 4.2. Síndromes de polinización en el género *Schizanthus*. A) Falcofilia, representado por *S. integrifolius*, corresponde a flores blancas, con secciones laterales orientadas hacia atrás, labio inferior reducido y tubo coralino largo. B y C) Melitofilia, representado por *S. tricolor* y *S. hookeri*, corresponde a flores coloridas, secciones laterales orientadas frontalmente, labio inferior desarrollado, con mecanismo de liberación explosivo de polen, con tubo coralino corto o largo. D y E) Especies que no se corresponden con ninguno de los dos síndromes reconocidos por Cocucci (1989): (D) *S. grahamii* con flores rojas, tubo coralino largo, corola orientada frontalmente, labio inferior reducido, presumiblemente relacionadas con un síndrome de ornitofilia; (E) *S. parvulus*, especie con características semejantes a las especies melitofilas, pero con estandarte prolongado en una protuberancia donde se deposita el néctar.

Observación de los visitantes de las flores

Para determinar la validez de los síndromes de polinización se registraron las visitas de insectos y aves a las flores durante 3 a 6 días soleados en un parche de 2m² por períodos de 30 minutos por cada hora entre las 10 y las 23 hrs. Se contabilizó el número de flores en cada parche observado, el cual varió entre 400 y 980 flores. Las visitas de insectos fuera del parche también fueron registradas. Los visitantes fueron observados directamente o usando binoculares en el día, y una linterna con luz roja en la noche. Las visitas fueron contabilizadas como efectivas cuando el visitante gatillaba el mecanismo de liberación explosiva de polen o tocaba las anteras. Con una lupa se observó la presencia de polen en los visitantes atrapados. Esto se pudo hacer en la mayoría de los casos, excepto en los lepidópteros nocturnos y en picaflores. Los visitantes se agruparon según su orden taxonómico, y se reconocieron cuatro tipos de visitantes: himenópteros, dípteros, lepidópteros, y picaflores.. La tasa de visitas se estimó como el número de visitas por flor por hora (Arroyo et al. 1982). La importancia relativa de cada tipo de visitante se estimó según el porcentaje de visitas por flor.

Trayectorias evolutivas de los síndromes de polinización y de los tipos de visitante.

El tipo de visitante observado y el síndrome de polinización se mapearon en la hipótesis filogenética obtenida con el análisis de inferencia bayesiana de las secuencias ITS, waxy y trnF/ndhJ (Fig. 4.3B, Capítulo 1). El tipo de visitante se codificó como un carácter con cuatro estados posibles: (1) presencia de lepidópteros, (2) picaflores, (3) himenópteros/dípteros y (4) sin visitantes. En el caso de las especies visitadas por más de un tipo de polinizador se admitieron polimorfismos. El síndrome se codificó como un

único carácter discreto con tres estados posibles definidos después de revisar los síndromes de polinización en todas las especies del género (ver resultados): melitofilia, falenofilia y ornitofilia. Para reconstruir el estado ancestral tanto de los visitantes como del síndrome se utilizó el criterio de máxima parsimonia (MP). Para evaluar las trayectorias evolutivas de los caracteres florales (tamaño, forma de la corola, desarrollo del labio inferior, largo del tubo coralino) en estas transiciones, se mapearon los caracteres en la filogenia y se reconstruyeron sus estados ancestrales mediante el criterio de máxima verosimilitud (MV) bajo un modelo Browniano de evolución con un sólo parámetro (Schluter 1998) en el caso de caracteres discretos, y mediante el criterio de máxima parsimonia cuadrática ponderada por los largos de ramas (Garland et al. 1997) en el caso de los caracteres continuos (que es equivalente al modelo Browniano, Pagel 1999). Para ambos análisis se utilizó el programa Mesquite (Madisson & Madisson 2004)

Patrones evolutivos de los caracteres florales

Para analizar los patrones evolutivos de la morfología floral a lo largo de la filogenia se modeló la evolución de los distintos caracteres florales sobre la base de un modelo browniano, que incorpora dos parámetros escaladores relevantes para evaluar la relación con la filogenia y el modo de evolución de los caracteres, el parámetro “escalador de filogenia” (λ) y el parámetro “escalador de largo de ramas” (κ) (Pagel 1994, Pagel 2002). El parámetro λ estima el grado en que la filogenia predice correctamente los patrones de similitud entre los caracteres florales. Este parámetro puede tomar valores

que van desde 0,0 (cuando los parámetros de similitud de los caracteres entre las especies son independientes de la filogenia) a 1,0 (cuando los patrones de similitud de los caracteres son proporcionales a la filogenia). El parámetro κ escala la relación entre los largos de las ramas en la filogenia y la evolución de los caracteres. Este parámetro puede tomar valores que van desde 0,0 a 3,0. Cuando κ es 1,0, la evolución de los caracteres es directamente proporcional al largo de ramas y la evolución es gradual. Cuando κ es 0, la cantidad de evolución de un carácter por rama es independiente del largo de la rama y la evolución es puntuada, es decir, ocurre evolución rápida en el momento de la especiación seguida por largas épocas de estasis. Si κ es mayor que 1, las ramas más largas contribuyen proporcionalmente más a la evolución de los caracteres y la evolución es gradual acelerada.

Se estimaron los parámetros λ y κ de los modelos de evolución de los siguientes caracteres florales: tamaño de la corola, complejidad, tamaño relativo del labio inferior y forma de la corola. Los análisis se realizaron utilizando el valor promedio por especie de cada carácter. Para la descripción de la forma, se utilizaron los promedios de los dos primeros componentes del análisis de CVA sobre las variables de forma PW.

Para evaluar la influencia de la filogenia en la evolución de los caracteres florales, se realizó una prueba de razones de verosimilitud entre modelos de evolución con $\lambda=0$ y con el valor de λ estimado, y se consideró que no había influencia de la filogenia si λ no difería significativamente de 0. Para probar si los caracteres siguen un patrón de cambio puntuado, gradual o gradual acelerado se realizó una prueba de razones de verosimilitud entre modelos de evolución con el valor de κ estimado y con el valor de $\kappa = 0$ y de $\kappa =$

1. Se consideró que los caracteres seguían un modelo de evolución tipo puntuado si κ no difería significativamente de cero, un modelo gradual si no difería de 1.0 y un modelo gradual acelerado si $\kappa > 1$. Estos análisis se realizaron con el programa Continuous (Pagel 2000).

RESULTADOS

Caracterización de la morfología floral de Schizanthus

En la Tabla 4.1 se muestran las medidas y estados de los caracteres florales considerados en el estudio para las 12 especies de *Schizanthus*. Al revisar los síndromes de polinización se observó que la morfología floral de *S. grahamii* y *S. parvulus*, no se corresponde a ninguna de las categorías reconocidas por Cocucci (1989). *Schizanthus grahamii* presenta un labio inferior reducido y no tiene un SLE, pero a diferencia de las especies falenófilas, las secciones laterales están orientadas frontalmente y son de un color rojo intenso. Estas características, junto a su tamaño relativamente grande y su tubo coralino largo, la relacionan más bien con un síndrome de ornitofilia, aún cuando en esta especie los estambres son cortos y no exertos como se describe para el síndrome. Otro caso dudoso es *S. parvulus*. Esta especie presenta todas las características del síndrome de melitofilia (colorida, labio inferior desarrollado, presencia de SLE), pero además presenta una estructura nectarífera única en el género, que consiste en una prolongación inferior del estandarte donde se expone el néctar (Fig. 4.2).

Las especies difieren significativamente en la morfología floral, tanto si se consideran los caracteres continuos (MANOVA: Wilks $\lambda < 0,001$, $p < 0,001$) o si se sintetiza la forma de la corola en PW (MANOVA: Wilks $\lambda < 0,001$, $p < 0,001$). Las diferencias en la forma de la corola se evidencian en el análisis de CVA de los puntajes de PW (Fig. 4.3) y pueden ser visualizadas como deformaciones de una grilla respecto a la configuración consenso. El primer componente CV1 explica el 77% de la variación y está relacionado principalmente con el acortamiento del tubo coralino, el alargamiento de las alas del labio inferior y el aumento del tamaño del labio inferior respecto al labio superior. En el extremo inferior de este eje está *S. integrifolius*, con el tubo coralino más largo del género y las alas y el labio inferior muy reducidos, según lo muestra la reconstitución de la forma de la corola en relación a este eje realizada con análisis de regresión (ver métodos, TPSREGR). En el otro extremo está la especie *S. litoralis*, con el tubo muy corto y el labio inferior y sus alas muy desarrollados. El segundo componente, CV2, explica el 13 % de la varianza y está relacionado con el acortamiento de la quilla y la reducción del tamaño del labio inferior (Fig. 4.3). En el extremo inferior de este eje está *S. hookeri*, con la quilla muy desarrollada (pero no las alas), y en el extremo superior, *S. lacteus*, con la quilla y las alas reducidas.

Tabla 4.1. Síndromes de Polinización y caracteres florales continuos y discretos considerados en este estudio. COR: tamaño de la corola expresado en cm²; TR-LI: tamaño relativo del labio superior (residuales de la regresión entre el área del labio inferior y el tamaño de la corola); LR-TU: largo relativo del tubo coralino (residuales de la regresión entre el largo del tubo y el largo de la corola); COM: complejidad de la corola (razón entre perímetro y área de la corola); color: color de la corola; OR-SL: orientación de las secciones laterales; SLE: presencia(1) o ausencia (0) de un sistema de liberación explosivo de polen; LE: largo de los estambres; DH: dehiscencia de las anteras. Ver abreviatura de las especies en Tabla 3.1 (capítulo 3)

Especie	Síndrome	Caracteres Continuos				Caracteres Discretos				
		COR	TR-LI	LR-TU	COM	Color	OR-SL	SLE	LE	DH
CAN	falenofilia	3,57	-0.46	158,93	176,88	blanco	lateral	0	Cortos	introsa
INT	falenofilia	2,04	-0.14	220,72	236,17	blanco	lateral	0	Largos	extrosa
LAC	falenofilia	1,31	-0.18	67,29	121,22	blanco	lateral	0	Cortos	introsa
ALP	melitofilia	0,81	0.04	37,24	129,67	rosado-lila	frontal	1	Largos	extrosa
HOO	melitofilia	2,12	0.33	149,47	116,64	rosado-lila	frontal	1	Largos	extrosa
LAE	melitofilia	1,74	0.35	-83,95	56,10	rosado-lila	frontal	1	Largos	extrosa
LIT	melitofilia	3,61	0.14	-115,19	56,93	rosado-lila	frontal	1	Largos	extrosa
PIN	melitofilia	2,53	0.14	-87,23	90,30	rosado	frontal	1	Largos	extrosa
POR	melitofilia	1,90	0.11	-145,27	96,25	rosado-lila	frontal	1	Largos	extrosa
TRI	melitofilia	2,52	0.05	-102,88	92,38	rosado-lila	frontal	1	Largos	extrosa
PAR	melitofilia?	0,71	0.18	-61,60	78,32	rosado-lila	frontal	1	Largos	extrosa
GRA	ornitofilia?	3,67	-0.19	10,42	74,38	lila-rojo	frontal	0	Cortos	introsa

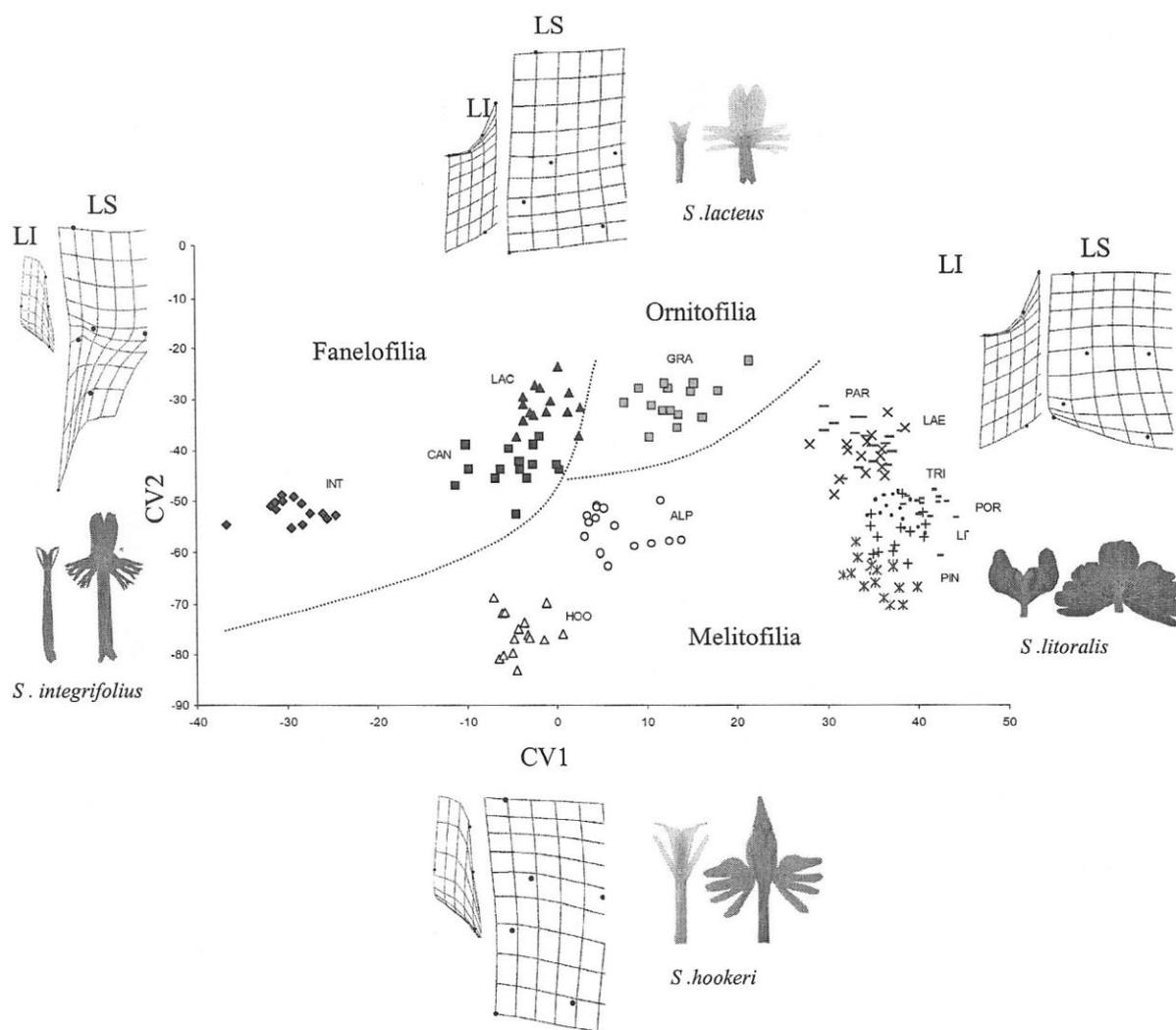


Fig.4.3. Ordenación de los 180 ejemplares muestreados de las 12 especies de *Schizanthus* a lo largo de los dos ejes canónicos de los "partial warps". Símbolos negros: especies falenófilas, ▲ *S. lacteus*, ■ *S. candidus*, ◆ *S. integrifolius*; símbolos grises: especies ornitófilas, ■ *S. grahamii*; símbolos blancos o abiertos: especies melitófilas, — *S. parvulus*, x *S. laetus*, + *S. litoralis*, • *S. tricolor*, - *S. porringens*. Las deformaciones en la forma del labio superior e inferior a lo largo de los ejes se representan a través de las grillas de curvamiento. El tamaño de la grillas del labio superior e inferior fue dibujado proporcional a la razón de tamaños de ambas estructuras. Además se muestran las imágenes escaneadas de la corola de 4 especies que representan extremos de los ejes canónicos. También se muestra el síndrome de polinización asignado a cada grupo de especies de acuerdo al criterio de Cocucci (1989). Ver abreviatura para las especies en Tabla 3.1 (Capítulo 3).

Visitantes de las flores y correspondencia con el síndrome de polinización

La tasa de visitas de polinizadores por flor varió entre las especies de *Schizanthus* (Tabla 4.2). Los valores más bajos se registraron en las especies adaptadas a la autogamia, *S. candidus* y *S. lacteus*, donde simplemente no se observó ningún visitante en todo el periodo de monitoreo. Las tasas más altas de visitas se registraron en las especies adaptadas a la exogamia, *S. tricolor* y *S. pinnatus*, con 0,31 y 0,34 visitas/flor*hr en promedio por especie, respectivamente.

Las 5 especies descritas como melitófilas según Cocucci (1989), *S. hookeri*, *S. alpestris*, *S. pinnatus*, *S. tricolor* y *S. porringens* fueron visitadas principalmente por himenópteros de la familia Apidae (más de un 70% de las visitas en todos los casos). Sin embargo, 3 de ellas (*S. hookeri*, *S. alpestris*, *S. pinnatus*) también fueron visitadas por dípteros. La especie altoandina, *S. hookeri*, fue visitada además por picaflores. A diferencia de las otras especies, en *S. hookeri*, las alas están muy reducidas y la quilla, más que las alas, es utilizada como plataforma de aterrizaje.

De las tres especies descritas como falenófilas, *S. integrifolius*, *S. candidus*, *S. lacteus*, sólo se observaron visitantes en la única especie exógama del grupo, *S. integrifolius*. Contrario a lo esperado, esta especie fue principalmente visitada por himenópteros de la familia Apidae (más de un 80% de las visitas), los que se posaban sobre los estambres exertos. También se observaron lepidópteros nocturnos y diurnos.

La única especie del género con una morfología floral relacionada al síndrome de ornitófila (este trabajo), *S. grahamii*, fue efectivamente visitada por picaflores. Sin embargo, en esta especie adaptada a la autogamia, se observó una tasa de visitas muy baja.

Tabla 4.2. Tasa de visitas y tipo de polinizador observado en las las poblaciones de *Schizanthus* estudiadas en relación al síndrome de polinización. Himen: himenópteros; Dipt: dípteros; Lepid: lepidópteros. Ver abreviaciones de las especies en Tabla 3.1 (Capítulo 3)

Especie	Min Obs.	Tasa de visitas*	Porcentaje y número de visitas				
			Himen. [#]	Dípt. [#]	Lepid. Diurn. [#]	Lepid. nocturn [#]	Picaf. [#]
Melitofila							
PIN	990	0,34 ± 0,10	92 (1609)	8 (140)	0	0	0
TRI	810	0,31 ± 0,08	99 (1760)	1 (18)	0	0	0
POR	810	0,11 ± 0,01	100 (503)	0	0	0	0
ALP	990	0,06 ± 0,002	100 (342)	0	0	0	0
HOO	1650	0,11 ± 0,03	91 (984)	2 (22)	0	0	7 (76)
Falenofilia							
CAN	2160	0	0	0	0	0	0
LAC	1440	0	0	0	0	0	0
INT	2160	0,0012 ±0,0008	81 (20)	0	13 (4)	6 (2)	0
Ornitofia							
GRA	990	0,0024±0,002	0	0	0	0	100 (18)

Trayectorias evolutivas de los sistemas de polinización y cambios morfológicos asociados

La reconstrucción del síndrome de polinización con el criterio de MP sugiere que la melitofilia es el estado ancestral (Fig. 4.4A). La falenofilia habría evolucionado una sola vez en el género en el linaje de las especies del desierto y la ornitofilia habría evolucionado también una vez en el linaje de las especies altoandinas. Los datos de visitas de polinizadores (aunque son limitados) sugieren que en correspondencia con la evolución de la falenofilia se habría adquirido la polinización por lepidópteros nocturnos y diurnos, pero sin la pérdida del polinizador ancestral (Fig. 4.4B, estado representado por *S. integrifolius*). En asociación a la evolución de la falenofilia también habría evolucionado la autogamia (estado representado por *S. candidus* y *S. lacteus*) con una reducción de los visitantes. Los datos de visitas de polinizadores también muestran que en correspondencia con la evolución de la ornitofilia, se habría adquirido la polinización por picaflor, con un estado intermedio representado por *S. hookeri*, donde las flores serían visitadas por el polinizador ancestral y el nuevo polinizador

Las reconstrucciones de los estados ancestrales de los caracteres florales (Fig. 4.5), indican que las flores ancestrales del género habrían presentado un mecanismo de liberación explosiva de polen, orientación frontal de las secciones laterales, color rosado-lila, labio inferior desarrollado y tubo coralino corto. En la Figura 4.5 se puede observar que los cambios morfológicos que ocurren en la evolución hacia la ornitofilia y hacia la falenofilia suceden en forma secuencial. En la evolución hacia la ornitofilia primero ocurre un alargamiento del tubo coralino, y luego ocurre un cambio de color (de lila a al rojo) y una pérdida del mecanismo de liberación explosiva de polen. En la

evolución hacia la falenofilia primero ocurre un alargamiento del tubo coralino y una reducción del labio inferior y luego ocurre un cambio de color y un cambio en la orientación de la corola.

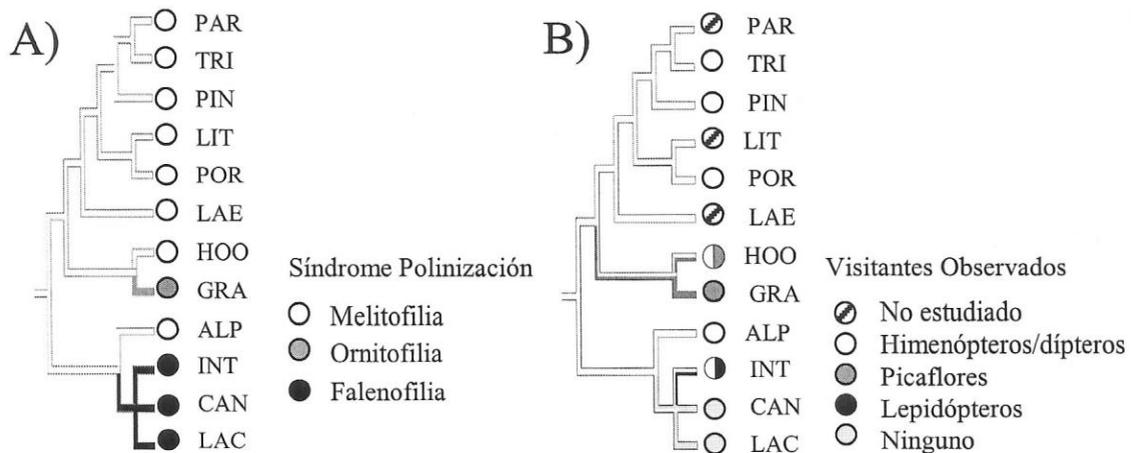


Fig. 4.4. Reconstrucción de los estados ancestrales de los síndromes de polinización y del tipo de visitante observado con el criterio de Máxima Parsimonia. Los árboles filogenéticos corresponden al árbol obtenido por inferencia bayesiana a partir de las secuencias de las regiones de ADN, trnF/ndhJ, waxy e ITS (Fig 2.2, capítulo 2). Ver abreviación de las especies en Tabla 2.1.

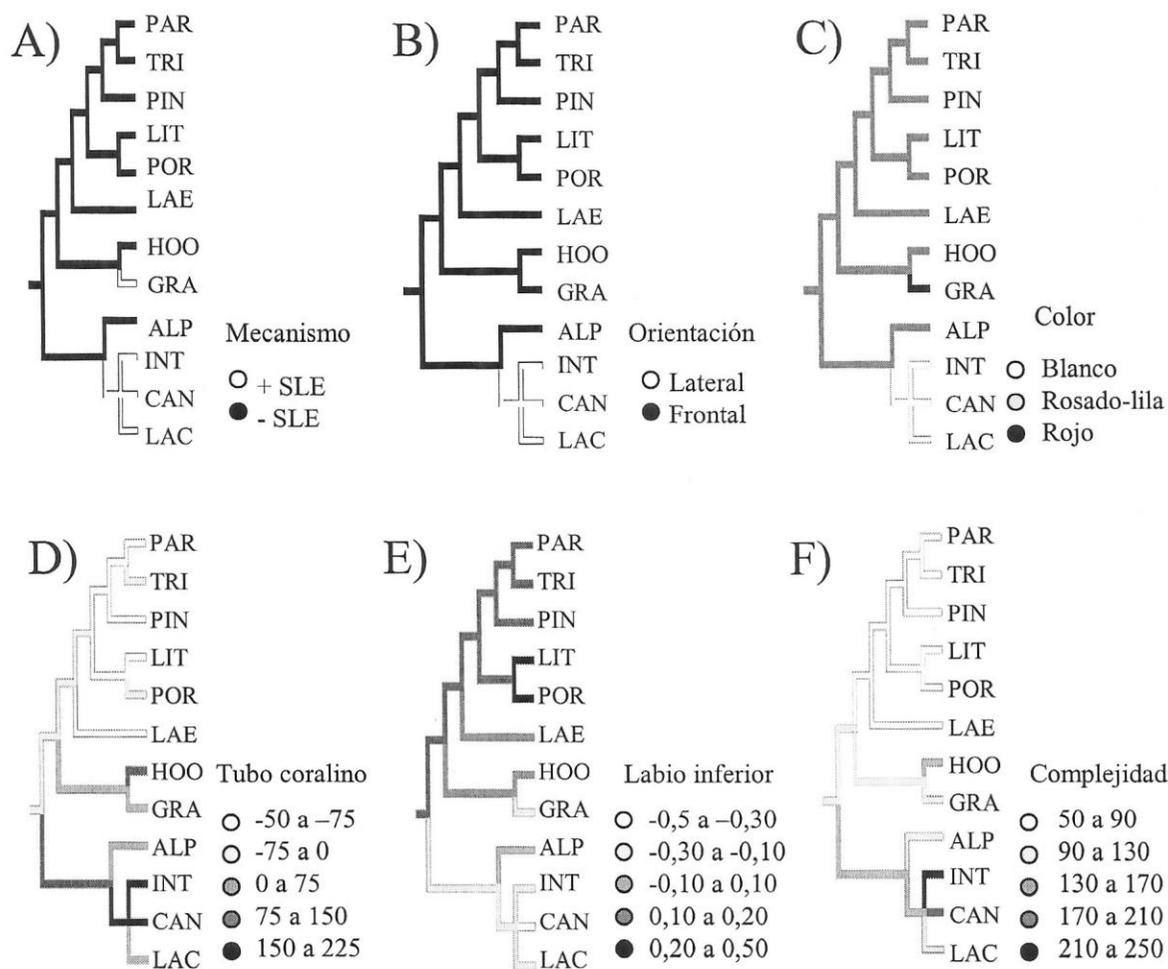


Fig. 4.5. Trayectorias evolutivas de los caracteres florales asociados a la polinización. A- C) Reconstrucción de los estados ancestrales de los caracteres discretos: (A) mecanismo floral, (B) orientación de las secciones laterales, (C) color de la corola. D-F) Reconstrucción de los estados ancestrales con criterio de MP cuadrática ponderada por el largo de ramas de los caracteres florales continuos: (D) largo relativo del tubo coralino, (E) tamaño relativo del labio inferior y (F) complejidad de la corola. Los árboles filogenéticos corresponden al árbol obtenido por inferencia bayesiana a partir de las secuencias de las regiones de ADN, *trnF/ndhJ*, *waxy* e ITS (Fig 2.2, capítulo 2). Ver abreviación de las especies en Tabla 3.1.

Patrones evolutivos de los caracteres florales

En la Tabla 4.3 se muestran los valores de los parámetros escalador de filogenia " λ " y escalador de largo de ramas " κ " del modelo de evolución aleatorio para el tamaño y las variables asociadas a la forma de la corola. A excepción del largo del tubo coralino, para todas las variables que describen el tamaño y forma de la corola, los valores de λ estimados toman valores significativamente menores que 1,0, pero no difieren significativamente de 0,0, sugiriendo que los patrones de similitud en la forma y tamaño de la corola son relativamente independientes de la filogenia. En el caso del largo relativo del tubo coralino, los valores estimados de λ no son significativamente menores que 1,0 pero difieren de 0,0, indicando que la filogenia tiene efecto sobre esta variable.

Todas las variables de forma consideradas en este estudio presentan valores de κ significativamente mayores que 1,0, indicando que la forma de la corola sigue un patrón de cambio gradual acelerado, es decir, los cambios morfológicos se aceleran en las ramas más largas de la filogenia. En el caso del tamaño de la corola, el valor estimado de κ no difirió significativamente ni de 0,0, ni de 1,0, por lo que no es posible sacar conclusiones claras su modo de evolución.



Tabla 4.3. Valores de los parámetros de los modelos de evolución estimados de los datos de tamaño y forma de la corola de *Schizanthus*, sintetizada en variables de forma (puntajes promedio de CVA sobre partial warps), o en variables individuales. En paréntesis se indican el intervalo de confianza al 95%.

	Valores estimados		Significancia Hipótesis*		
	λ^*	κ^*	$\lambda=0$	$\kappa=0$	$\kappa=1$
Forma					
PW	0,4 (0-0,8)	3,0 (1,5-3,0)	0,35	<0,001	0,008
Complejidad	0,4 (0-0,8)	2,7 (1,1-3,0)	0,13	0,02	0,04
TR labio inferior	0,2 (0-0,8)	3,0 (1,6-3,0)	0,34	0,002	0,009
LR tubo coralino	0,8 (0,2-1,0)	3,0 (1,2-3,0)	0,005	0,04	0,08
Tamaño	0 (0,0-0,6)	0,9 (0-2,5)	0,87	0,24	0,87

* Significancia estadística de la prueba de razones entre los puntajes de verosimilitud de los modelos con los parámetros estimados y de los modelos nulos

DISCUSIÓN

Al revisar los síndromes de polinización de las 12 especies de *Schizanthus* siguiendo el criterio de Cocucci (1989), se pudo reconocer un tercer síndrome, ornitofilia, además de los dos síndromes propuestos por este autor, melitofilia y falenofilia. Sin embargo, es importante destacar que al revisar los valores de los caracteres florales (tamaño, largo de tubo coralino, desarrollo del labio inferior, forma), se observa una distribución más bien continua, que no coincide o corresponde plenamente con estas categorizaciones. Por ejemplo, a pesar de que *S. alpestris* puede ser considerada una especie melitófila (siguiendo el criterio de Cocucci 1989), el tamaño

relativo del labio inferior y el largo relativo del tubo coralino presentan valores intermedios entre los de las especies falenófilas y los de las otras especies melitófilas. Asimismo, la ordenación de las especies en el espacio morfométrico generado a partir del análisis de morfometría geométrica, tampoco muestra una distribución que se corresponda con los síndromes.

Las observaciones de polinizadores en 9 especies de *Schizanthus* indican que éstas son visitadas principalmente por himenópteros, y en algunos casos también por dípteros, lepidópteros diurnos y nocturnos, y picaflores. Aunque, estudios detallados sobre la eficiencia de los polinizadores son necesarios para determinar el grado de especialización real de los sistemas de polinización, nuestros datos indican que en *Schizanthus* hubo una correspondencia parcial entre el síndrome y el tipo de visitante. En las especies autóгамas las tasas de visitas fueron nulas o muy bajas, en cambio en las especies exógamas, el espectro de visitantes observados fue más amplio que lo esperado por los síndromes. Como se explica más abajo, esta aparente generalización, puede deberse a la existencia de estados intermedios en la transición entre sistemas de polinización, donde el vector ancestral y el vector nuevo pueden polinizar la flor.

Considerando la estimación ancestral de los síndromes de polinización la ornitofilia habría evolucionado una vez en el género desde ancestros polinizados por himenópteros. Transiciones de la polinización por abejas a la polinización por picaflores son frecuentes en la naturaleza; por ejemplo, en *Penstemon* (Scrophulariaceae) han ocurrido transiciones en este sentido al menos en 14 linajes independientes (Wilson et al. 2004) y en *Mimulus* sección *Erythranthe* (Scrophulariaceae) en 2 linajes independientes (Beardsley et al. 2003). Se ha sugerido que las transiciones de la polinización por abejas

a la polinización por picaflores podrían ocurrir cuando disminuye la disponibilidad de abejas. Cruden (1972) sugiere que esta situación puede darse en las montañas, donde el frío de la mañana permitiría a las aves visitar a las plantas antes que las abejas se vuelvan activas. En *Schizanthus*, la evolución hacia la ornitofilia ocurre en el linaje de las especies altoandinas. En Chile Central, la riqueza de himenópteros disminuye con la altura (Arroyo et al. 1982).

En *Schizanthus* encontramos evidencia que la transición hacia la ornitofilia ocurre con un estado intermedio en que el nuevo vector y el vector ancestral son capaces de polinizar la flor. Aunque ciertamente son necesarios futuros estudios para medir la eficiencia de polinización y evaluar el verdadero grado de especialización de las especies; nuestros resultados son consistentes con el principio de transferencia de función, vía un estado intermedio de doble función postulado por Stebbins (1974). Este estado intermedio es representado por la especie *S. hookeri*, que es visitada por abejas y picaflores. La morfología de esta especie da cuenta de un proceso de des-especialización de la flor (Baker 1963, Wilson et al. 2004), pues conserva caracteres que permiten la polinización por abejas, como la presencia de un labio inferior desarrollado, pero ha adquirido caracteres que también permiten la polinización por picaflores, como el alargamiento del tubo coralino y la producción de grandes cantidades de néctar (datos no mostrados). La morfología floral de *S. grahamii*, en cambio, da cuenta de un proceso de reespecialización de la flor (Baker 1963, Wilson et al. 2004), con la adquisición de caracteres que pueden ser considerados como adaptaciones para la atracción de picaflores y desacoplamiento negativos para las abejas, como cambios de color del rosado-violeta al rojo y la reducción de labio inferior utilizado como plataforma de

aterrizaje (Castellanos et al. 2004). En *S. grahamii*, junto con estas modificaciones que dan cuenta de la pérdida o al menos disminución del vector ancestral, evoluciona la autogamia (Capítulo 3).

Nuestros datos muestran también que la falenofilia habría evolucionado una vez en *Schizanthus* desde ancestros polinizados por himenópteros en el linaje de las especies del desierto. En la evolución hacia la falenofilia, también se observa un estado generalista, representado por *S. integrifolius*, la única especie exógama con el síndrome de falenofilia. En esta especie se observan características convergentes con las de otros taxa polinizados por lepidópteros, como: cambio de color al blanco, aumento de la complejidad (Herrera 1993) y reflexión de los pétalos (Johnson et al. 2002). A pesar de su condición generalista, *S. integrifolius* evidencia cambios morfológicos que pueden ser considerados negativos para las abejas, como el cambio de color de rosado-violeta a blanco, la lateralización de la flor (que implicaría una disminución del tamaño de la corola visible por una abeja desde una visión frontal,) y la reducción del labio inferior (Castellano et al. 2004). En este sentido, el estado floral en *S. integrifolius* no corresponde a una des-especialización de la flor, como en el caso de *S. hookeri* en la evolución de la ornitofilia, sino más bien a una especialización de la flor hacia la polinización por lepidópteros. En todo caso, las características morfológicas de *S. alpestris* sugieren que la evolución hacia la falenofilia, al igual que la evolución de la ornitofilia, también fue un proceso gradual de des-especialización de la flor. Esta especie aunque no es visitada por lepidópteros, presenta características intermedias entre el estado ancestral de *Schizanthus* y la falenofilia, que pueden ser consideradas

preadaptaciones, como un tubo coralino relativamente largo, mayor producción de néctar y el labio inferior con alas reducidas (Johnson et al. 2002).

Nuestros resultados indican que no hay una fuerte relación entre la filogenia y la morfología floral, es decir, los patrones de similitud de los caracteres florales no son explicados completamente por la filogenia. Estos resultados son consistentes con otros estudios filogenéticos que muestran la labilidad de la morfología floral (Armbruster 1992, Prather 1999). El mapeo de los caracteres florales continuos y el análisis de los patrones evolutivos muestran que la transformación floral en las transiciones desde la polinización por himenópteros a picaflores o lepidópteros sigue un modo de cambio más gradual que puntuado. Estos resultados son contrarios a los de Beardsley et al. (2003), quienes encuentran que en *Mimulus*, la transformación floral sigue un patrón de cambio puntuado en la transición desde la polinización por insectos a la polinización por picaflores. A diferencia de nuestro trabajo, estos autores realizan el análisis sobre los síndromes y no sobre los caracteres. La clasificación de las flores en tipos marcadamente delimitados (como los síndromes) y la discretización *a priori* de los caracteres florales puede dificultar el reconocimiento de estados intermedios en los sistemas de polinización y/o de la morfología floral. En este contexto, adquiere relevancia el uso de variables morfométricas continuas como las variables obtenidas por morfometría geométrica para describir la forma de la corola.

La diversificación en la forma de las flores de *Schizanthus* puede ser atribuida, al menos parcialmente, a cambios en los sistemas de reproducción y de polinización. Esta asociación se evidencia en una correspondencia parcial entre los síndromes de

polinización (ornitofilia, falenofilia, y melitofilia) y los tipos de visitantes observados, y en la labilidad evolutiva de la morfología floral.

REFERENCIAS

- ADAMS DC 1999 Methods for shape analysis of landmark data from articulated structures. *Evolutionary Ecology Research* 1:959-970
- AIGNER PA 2001 Optimality modeling and fitness trade-offs: when should plants become pollinator specialists? *Oikos* 95:177-184
- ARMBRUSTER WS 1992 Phylogeny and the evolution of plant-animal interactions. *Bioscience* 42:12-20
- ARMBRUSTER WS 1993 Evolution of plant pollination systems: hypotheses and tests with the neotropical vine *Dalechampia*. *Evolution* 47:1480-1505
- ARROYO MTK, PRIMACK R & J ARMESTO 1982 Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of Central Chile. I. Pollination mechanism and altitudinal variation. *American Journal of Botany* 69:82-97
- ARROYO MTK, ARMESTO J, & R PRIMACK 1985 Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of Central Chile. II. Effect of temperature on visitation rates and pollination possibilities. *Plant Systematic and Evolution* 149:187-203
- ASHMAN TL & STANTON 1991 Seasonal variation in the pollination dynamics of sexually dimorphic *Sidalcea oregana* ssp. *spicata* (Malvaceae). *Ecology* 72:993-1003
- BAKER HG 1963 Evolutionary mechanisms in pollination biology. *Science* 139:877-883
- BARRETT SCH & SW GRAHAM 1997 Adaptive radiation in the aquatic plant family Pontederiaceae: insight from phylogenetic analysis. En: Givnish TJ, Sytsma KJ

- (eds). Molecular evolution and adaptive radiation: 225-258. Cambridge University Press, Cambridge
- BARRETT SCH 2004 Flower diversity and plant mating strategies. En: McGraw-Hill Yearbook of Science & Technology: 110-113. McGraw Hill Inc, New York, USA
- BEARDSLEY P, YEN A & OLMSTEAD R 2003 AFLP phylogeny of *Mimulus* section *Erythranthe* and the evolution of hummingbird pollination. *Evolution*:1397-1410
- BOOKSTEIN FL 1989 Principal warps: thin-plate splines and the decomposition of deformations. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 11:567-585
- BOOKSTEIN FL 1996 Standard formula for the uniform shape component in landmark data. En: Marcus LF, Corti M, Loy A, Naylor G & D Slice (eds). *Advances in morphometrics*: 153-168. Plenum Press, New York
- CASTELLANOS MC, WILSON P & JD THOMSON 2004 “Anti-bee” and “pro-bird” change during the evolution of hummingbird pollination in *Penstemon* flowers. *Journal of Evolutionary Biology* 17:876-884
- COCUCCI A 1989 El mecanismo floral de *Schizanthus*. *Kurtziana* 20:113-132
- CRUDEN RW 1972 Pollination in high elevation ecosystems: relative effectiveness of birds and bees. *Science* 176:1439-1440
- ECHART 1992 Spatio-temporal variation in abundance and variation in foraging behavior of the pollinators of gynodioecious *Phacelia linearis* (Hydrophyllaceae). *Oikos* 64:573-586
- FÆGRI K & L van der PIJL 1979. The principles of pollination ecology, 3rd ed. Pergamon Press, New York
- FENSTER CB, ARMBRUSTER WS, WILSON O, DUDASH MR & JD THOMPSON 2004 Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* (en prensa)
- GARLAND TM, MARTIN KLM & R DIAZ-URIARTE 1997 Reconstructing ancestral trait values using squared change parsimony: plasma osmolarity at the origin of amniotes. En: Sumida SS & KLM Martin (eds). *Amniote origins: completing the transition to land*: 425-502 Academic Press, San Diego

- GOLDBLATT P & JC MANNING 1996 Phylogeny and speciation in *Lapeirousia* subgenus *Lapeirousia* (Iridaceae: Ixioidae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 83:346–361
- GOLDBLATT P & JC MANNING 2000 The long-proboscid fly pollination system in southern Africa. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 138:146-170
- GÓMEZ JM 2002 Generalización en las interacciones entre plantas y animales. *Revista Chilena de Historia Natural* 75:105-116
- GÓMEZ JM & R ZAMORA 1999 Generalization vs. specialization in the pollination system of *Hormatophylla spinosa* (Cruciferae). *Ecology* 80:796-805
- GRAU J & E GRÖNBACH 1984 Untersuchungen zur Variabilität in der Gattung *Schizanthus* (Solanaceae). *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 20:111-203
- HERRERA CM 1993 Selection on complexity of floral outline in a hawkmoth-pollinated violet. *Evolutionary Trends in Plants* 7:9–13
- HERRERA CM 1996 Floral traits and plant adaptation to insect pollinators: a devil's advocate approach. En: Lloyd DG & SCH Barrett (eds). *Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants: 65-87*. Chapman and Hall, New York
- JOHNSON SD, LINDER HP & KE STEINER 1998 Phylogeny and radiation of pollination systems in *Disa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 85:402–411
- JOHNSON SD & KE STEINER 2000 Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology and Evolution* 15:140–143
- JOHNSON SD, EDWARDS TJ, CARBUTT C & C POTGIETER 2002 Specialization for hawkmoth and long-proboscid fly pollination in *Zaluzianskya* section *Nycterinia* (Scrophulariaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 138:17–27
- KASSAM DD, ADAMS DC, HORI M, & H YAMAOKA 2003 Morphometric analysis on ecomorphologically equivalent cichlid species from Lakes Malawi and Tanganyika. *Journal of Zoology London* 260:153-157

- KNAPP S 2002 Floral diversity and evolution in the Solanaceae. En: QCB Cronk, RM Bateman & JA Hawkins (eds). Developmental genetics and plant evolution. Taylor & Francis, London
- MADISSON WP & DR MADISSON 2004 Mesquite version 1.02. Disponible en <http://mesquiteproject.org/mesquite/mesquite.html>
- OLLERTON J 1996 Reconciling ecological processes with phylogenetic patterns: the apparent paradox of plant-pollinator systems. *Journal of Ecology* 84:767–769
- ORNDUFF R 1969 Reproductive biology in relation to systematics. *Taxon* 18:121-123
- PAGEL M 1994 Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters. *Proceedings of the Royal Society (B)* 255:37-45
- PAGEL M 1999 Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* 10:877-884
- PAGEL M 2000 Continuous. Disponible en <http://sapc34.rdg.ac.uk/meade/Mark>
- PAGEL M 2003 Modelling the evolution of continuously varying characters on phylogenetic trees. En: MacLeod N & Forey P (eds). *Morphology, shape and phylogeny*: 269-286
- PRATHER LA 1999 The relative lability of floral vs. non-floral characters and a morphological phylogenetic analysis of *Cobaea* (Polemoniaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 131:433–450
- ROHLF FJ & DE SLICE 1990 Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of “landmarks”. *Systematic Zoology* 39:40-59
- ROHLF FJ & LF MARCUS 1993 A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution* 8:129-132
- ROHLF FJ 1999a TPSRELW version 1.20 Geometric Morphometric software for the PC. Disponible en <http://www.life.bio.sunysb.edu/morph/software.html>
- ROHLF FJ 1999b TPSREGR version 1.22 Geometric Morphometric software for the PC. Disponible en <http://www.life.bio.sunysb.edu/morph/software.html>
- ROHLF FJ 2000 NTSYS-PC Numerical taxonomy system for the PC. Exeter Software version 2.1. Applied Biostatistics, Setauket

- ROHLF FJ 2001 TPSDIG32 version 1.19 Geometric Morphometric software for the PC.
Disponibile en <http://www.life.bio.sunysb.edu/morph/software.html>
- SAKAI S, KATO M & T INOUE 1999 Three pollination guilds and variation in floral characteristics of Bornean gingers (Zingiberaceae and Costaceae). *American Journal of Botany* 86:646–658
- SÁNCHEZ-LAFUENTE 2002 Floral variation in the generalist herb *Paeonia* (Paeoniaceae): Differences between regions with different pollinator and herbivores. *American Journal of Botany* 89:1260-1269
- SIGMASCAN PRO version 5.0.0. SPSS Inc. Chicago
- STATISTICA 2001 version 6.0. Stat soft Inc.
- STEBBINS GL 1970 Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, 1: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1:307–326
- STEBBINS GL 1974 Flowerings plants: evolution above the species level. Harvard University Press, Cambridge
- WASER NM, CHITTKA L, PRICE M, WILLIAMS N & J OLLERTON 1996 Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* 77:1043–1060
- WELLER SG & AK SAKAI 1999 Using phylogenetic approaches for the analysis of plant breeding system evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30:67–199
- WILSON P & JD THOMSON 1996 How do flowers diverge? En: Lloyd DG & SCH Barrett (eds). *Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants*: 88-111. Chapman and Hall, New York
- WILSON P, CASTELLANOS MC, HOGUE JN, THOMPSON JD & WS ARMBRUSTER 2004 A multivariate search for pollination syndromes among Penstemons. *Oikos* 104:345-361
- WILSON P, CASTELLANOS MC, WOLFE A & JD THOMSON 2004 Shifts between bee and bird pollination among penstemons. En: Waser N & J Ollerton (eds). *Specialization and generalization in pollination systems*. University of Chicago Press, Chicago. En prensa.

**CAPÍTULO 5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS PATRONES DE
CORRELACIÓN FENOTÍPICA DE LA COROLA EN *SCHIZANTHUS*:
DILUCIDANDO EL PAPEL LOS POLINIZADORES EN LA INTEGRACIÓN
FLORAL**

RESUMEN

Se ha propuesto que la integración floral es consecuencia de la selección por polinizadores. En este escenario es esperable que el grado de integración floral disminuya al disminuir la dependencia funcional de las especies por sus polinizadores y que los patrones de integración cambien al variar las relaciones funcionales entre los caracteres florales durante la polinización. Realizamos un estudio comparativo entre los patrones de integración de la corola y los sistemas de reproducción y polinización en *Schizanthus*. Los resultados indican que el grado y los patrones de integración varían entre las especies de *Schizanthus* y que estas variaciones son independientes de la historia filogenética, pero están relacionadas con cambios en los sistemas de reproducción y polinización. En los dos linajes de *Schizanthus* donde ha evolucionado la autogamia a partir de ancestros exógamos, el grado de integración floral es mayor en las especies menos dependientes de polinizadores. Por otra parte, las especies exógamas, con distintos mecanismos de polinización, difieren en la estructura de los patrones de correlación, cuando los caracteres pierden su función en la polinización, tienden a desacoplarse de los otros caracteres de la corola. Estos resultados sugieren que en

Schizanthus la integración de la corola resulta de factores distintos a la selección por polinizadores, como efectos asociados al desarrollo, pero que éstos no constituyen restricciones suficientemente grandes como para prevenir la evolución independiente de los caracteres bajo un régimen de selección adecuado. En las especies exógamas, la selección por polinizadores puede modular los patrones de integración, promoviendo el desacoplamiento de los caracteres de la corola no asociados funcionalmente y de esta manera dando origen a fenotipos modulares.

INTRODUCCIÓN

La integración fenotípica se refiere a los patrones de covariación de los caracteres asociados funcionalmente en un organismo dado (Pigliucci 2003), y concierne la organización de los caracteres en módulos o subgrupos de caracteres que tienden a covariar y que se mantienen relativamente independientes unos de otros (Olson & Miller 1958, Magwene 2001). La importancia de la integración y de la modularidad en la evolución ha sido un tópico de discusión (Wagner & Altenberg 1996, Schwenk & Wagner 2001). Un aspecto fundamental de esta discusión, y aun controversial, es si la integración debiese ser considerada una restricción que limita y canaliza las futuras trayectorias evolutivas, o si debiese ser considerada un producto de la selección natural (Lande 1979, Price & Langen 1992, Armbruster 1996, Roff 2000, Marroig & Cheverud 2001, Stepan et al. 2002, Murren 2002, Pigliucci 2003). En el marco de esta discusión, se ha evaluado en varios grupos de organismos la labilidad de la integración fenotípica a

través del análisis filogenético de los patrones de correlación de los caracteres (Steppan 1997, Ackerly & Donoghue 1998, Pigliucci et al. 1999, Baker & Wilkinson 2003). En general, en este tipo de estudios se ha observado que los patrones de correlación pueden ser evolutivamente lábiles e independientes de la filogenia (revisado por Steppan et al. 2002), sin embargo las causas de la inestabilidad de los patrones de integración no pueden ser determinadas. En esta línea, se ha resaltado la importancia de realizar estudios que combinen información filogenética y ecológica, de tal forma de evaluar en forma conjunta el efecto de la selección natural y la historia evolutiva en los patrones de integración (Roff et al 2000, Murren 2002, Pigliucci 2003). Sin embargo, son relativamente pocos los estudios que han utilizado esta aproximación (Jernigan et al. 1994, Marroig & Cheverud 2001), particularmente en plantas (pero ver Murren et al. 2002).

Los estudios clásicos de integración fenotípica en plantas han tratado a los caracteres florales como un módulo funcional asociado a la reproducción (Murren 2002). Se ha propuesto que la selección natural mediada por polinizadores promovería la integración de caracteres florales asociados funcionalmente vía selección correlacional (Stebbins 1974, Galen & Stanton 1989, Conner & Via 1993, Conner 1997, Kudoh et al. 2001, Ushimaru et al. 2003). Esta visión nace con el trabajo de Berg (1960), quien propone que plantas con sistemas de polinización especializados debieran exhibir mayor integración entre caracteres florales, que entre caracteres florales y vegetativos. Aunque trabajos posteriores han documentado una relativa independencia entre caracteres florales y vegetativos (Conner & Sterling 1995, Armbruster et al. 1999), también se ha descrito que las correlaciones dentro del módulo floral pueden ser relativamente débiles

(Herrera 1990), pudiendo incluso generarse compromisos o correlaciones negativas entre caracteres florales masculinos y femeninos (Davis 2001). Por otra parte, tampoco se ha encontrado correlaciones entre el grado de integración floral y el nivel de especialización de los sistemas de polinización (Armbruster et al. 1999, Herrera et al. 2002). Estos resultados han llevado a proponer que la integración floral puede ser consecuencia de factores distintos a la selección por polinizadores (Herrera 2001, Herrera et al. 2002), como por ejemplo, factores asociados al desarrollo. Se ha propuesto que estos factores tenderían a estabilizar y restringir la variación en los patrones de correlación entre los caracteres (Delph et al 1996, pero ver Runions & Geber 2000), limitando también la trayectoria evolutiva de los caracteres.

El objetivo de este estudio es examinar los patrones evolutivos de la integración floral con relación a la dependencia funcional de polinizadores y a los modos de polinización. Si los polinizadores tienen una gran influencia en la integración floral es esperable que el grado de integración de caracteres florales que promueven la polinización por animales disminuya al reducirse la dependencia funcional de las plantas por sus polinizadores, y que la estructura de la integración cambie si cambian las relaciones funcionales entre los caracteres florales durante la polinización. Por el contrario, si la integración floral es consecuencia de factores distintos a la selección mediada por polinizadores, como por ejemplo factores asociados al desarrollo, es esperable que los patrones de integración permanezcan estables a lo largo de la filogenia, aún cuando disminuya la dependencia de las plantas por polinizadores o cambien las relaciones funcionales de los caracteres en la polinización.

Para evaluar estas hipótesis realizamos un estudio comparativo entre los patrones de integración de la corola y los sistemas de reproducción y polinización en el género sudamericano *Schizanthus*. Este género brinda condiciones apropiadas para evaluar estas hipótesis: sus flores zigomórficas y bilabiadas presentan un sistema especializado de presentación de polen (Coccuci et al. 1989, ver capítulos 3 y 4); las especies presentan distintos mecanismos de polinización, donde caracteres de la corola homólogos difieren en su función durante la polinización (ver capítulo 4); la autogamia ha evolucionado en dos oportunidades independientes a partir de ancestros exógamos (ver capítulo 3); no hay evidencias que los caracteres de la corola promuevan la autopolinización, pero sí que participen en la polinización cruzada; y se cuenta con una hipótesis filogenética con buena resolución basada en datos moleculares (ver capítulo 2).

Las preguntas que se espera contestar son: (1) ¿Son los patrones de integración de la corola similares entre las especies de *Schizanthus*?; (2) ¿Son los patrones de integración más similares entre taxa filogenéticamente más cercanos?; (3) ¿Disminuye el grado de integración de la corola al disminuir la dependencia funcional de las plantas por polinizadores en los dos linajes de *Schizanthus* donde ha evolucionado la autogamia a partir de ancestros exógamos?; (4) ¿Difiere la estructura de la integración de la corola entre las especies exógamas de *Schizanthus* con distintos mecanismos de polinización?; (5) de existir tales diferencias, ¿se corresponden con diferencias en el modo en que se organizan funcionalmente los caracteres florales?

MÉTODOS

Modelo de Estudio

El género *Schizanthus* (Ruiz & Pavón 1789) comprende 12 especies de plantas anuales y bianuales que se distribuyen principalmente en Chile (Grau & Grönbach 1984). Las relaciones filogenéticas entre las especies han sido estudiadas en base a las secuencias de la región ITS y waxy del ADN nuclear y de la región trnF-ndhJ del ADN de cloroplasto (Fig. 2.2). En el género se pueden reconocer especies adaptadas a la autogamia y especies adaptadas a la exogamia. Las primeras presentan altos índices de autopolinización automática y una baja tasa de visitas de polinizadores. Sus flores tienen los estambres cortos, lo que permite un contacto directo entre las anteras y el estigma (Fig. 5.1). Se sabe que por lo tanto estas especies presentan una baja dependencia de polinizadores. Las especies aquí llamadas exógamas presentan una baja tasa de autofertilización espontánea y un alto grado de hercogamia. Por lo tanto, se sabe que estas especies son fuertemente dependientes de polinizadores. Estudios filogenéticos muestran que la adaptación a la autogamia ha evolucionado en dos ocasiones en el género a partir de ancestros exógamos (ver capítulo 2). En el género también se observa variación en los mecanismos de polinización y en los tipos de polinizadores (ver capítulo 3). La mayoría de las especies son visitadas por himenópteros y dípteros y presentan un sistema de liberación explosivo de polen (de aquí en adelante SLE, descrito en detalle por Cocucci 1989). En estas especies los estambres están adheridos a la quilla en un estado de tensión. Cuando los insectos se posan sobre las alas, los estambres se separan de la quilla y el polen se libera en forma de cúmulo. Una de las especies exógamas, *S.*

hookeri, es visitada por himenópteros y picaflores, también presenta un SLE, pero en ella las alas están reducidas y los insectos se posan directamente sobre la quilla. Otra de las especies exógamas, *S. integrifolius*, es visitada por himenópteros y lepidópteros. En esta especie se ha perdido el SLE, las alas y la quilla están reducidas, y son los estambres los utilizados por las abejas como plataforma de aterrizaje.

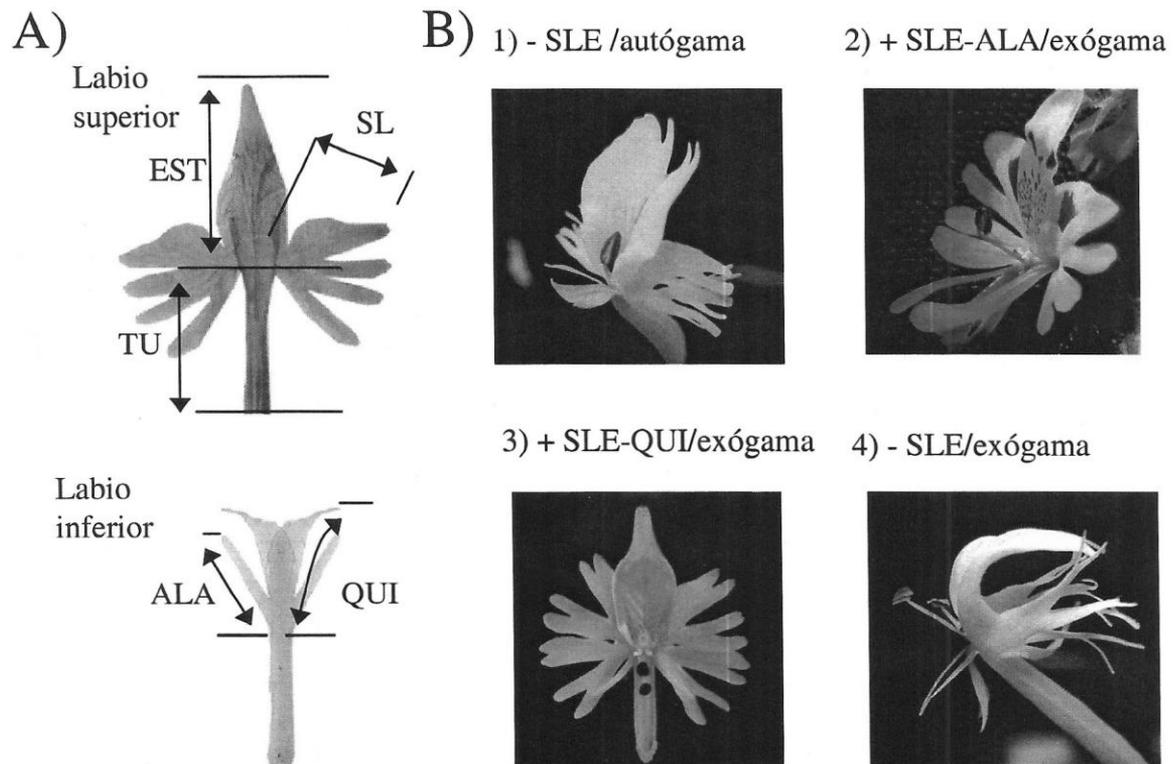


Fig. 5.1. Morfología floral y mecanismos de polinización en *Schizanthus*. A) Imágenes del labio superior e inferior de la flor de *S. hookeri* después de ser disectada y aplanada, mostrando los cinco caracteres medidos: largo de estandarte (EST), largo de secciones laterales (SL), largo de tubo coralino (TU), largo de la quilla (QUI) y largo de las alas (ALA). B) Sistemas de polinización y de reproducción presentes en el género *Schizanthus*: (1) flores autógamas sin sistema de liberación explosiva de polen (SLE), representado por *S. candidus*; (2) flores exógamas con SLE gatillado por presión en alas, representado por *S. tricolor*; (3) flores exógamas con SLE gatillado por presión en quilla, representado por *S. hookeri*; (4) flores exógamas sin SLE, representado por *S. integrifolius*.

Muestreo

Se estudió la morfología floral de 10 especies del género, para 8 de las cuales se cuenta con datos sobre el sistema reproductivo. Se seleccionó una localidad por especie (Tabla 5.1)

Tabla 5.1. Lista de taxa y sitios de estudio.

Especie	Abrv.	Localidad
<i>S. alpestris</i>	ALP	IV Región: Cuesta la Viñita, 820 msnm, 29°51'S-70°49'W
<i>S. candidus</i>	CAN	III Región: Huasco, Playa Arrayán, 40 msnm, 28°15'S-71°09'W
<i>S. grahamii</i>	GRA	Región Metropolitana: El Embalse del Yeso, 2500 msnm 33°57'S-70°17'W
<i>S. hookeri</i>	HOO	Región Metropolitana: Sector Farellones, 2450 msnm, 33°21'S- 70°16'W
<i>S. integrifolius</i>	INT	III Región: Alto del Carmen, 710 msnm, 28°45'S-70°29'W
<i>S. lacteus</i>	LAC	II Región: Paposo, Quebrada de Matancilla, 144 msnm, 25°06'S - 70°27'W
<i>S. parvulus</i>	PAR	IV Región: Reserva Nacional Las Chinchillas, 580 msnm, 31°29'S-71°05'W
<i>S. pinnatus</i>	PIN	Región Metropolitana: Reserva Nacional Río Clarillo, 800 msnm 33°43'S - 70°56'W
<i>S. porringens</i>	POR	IV Región: Hornitos, 110 msnm 29°38'S - 71°17'W
<i>S. tricolor</i>	TRI	IV Región: Papudo, 130 msnm, 32°31'S - 71°28'W

Se colectaron 40 a 50 flores de distintos individuos (una flor por planta), separados al menos por 2 metros, y con el estigma receptivo. Las flores se guardaron en alcohol al 70%. En el laboratorio se disectaron bajo la lupa, se aplanaron y se escanearon con un scanner a una resolución de 300 dpi. Sobre las imágenes se midió el largo de 5 caracteres florales: estandarte (EST), sección lateral izquierda (SL), quilla izquierda (QUI), ala izquierda (ALA) del labio inferior, y tubo coralino (TU) (Fig. 5.1A). Todas las mediciones fueron realizadas por la misma persona para evitar diferencias de criterio.

Comparaciones interespecíficas en los patrones de integración de la corola

Para cada una de las 10 especies estudiadas se estimó el coeficiente de correlación de Pearson entre cada par de caracteres y se construyó una matriz de correlación (10 matrices de 5 x 5). A partir de estas matrices, se estimó el grado de integración (es decir, cuán integrados están los caracteres florales) y la estructura de la integración (es decir, cómo se organizan los caracteres florales) para cada especie.

El grado de integración de la corola (INT), se estimó como la varianza de los valores propios de la matriz de correlación de los caracteres florales (Wagner 1984). Los errores estándar y los límites de confianza fueron estimados mediante técnicas de remuestreo (Cheverud et al 1989, Herrera et al. 2002), en base a 1000 simulaciones. Ya que las correlaciones de cada especie fueron estimadas sobre la base de un número distinto de flores (40 a 50 flores), para poder compararlas entre especies se estimó un valor corregido de la integración (INT_C), el cual corresponde a la diferencia entre el valor de INT observado y el valor esperado (INT_E) bajo la hipótesis de covariación aleatoria entre caracteres florales (Wagner 1984, Herrera et al. 2002);

$$\text{INT} = \text{Var} (\lambda_{1, \dots, i, \dots, 5}), \text{ donde } i \text{ es cada carácter}$$

$$\text{INT}_E = (\text{número de caracteres} - 1) / \text{número de flores}$$

$$\text{INT}_C = \text{INT} - \text{INT}_E$$

La estructura de la integración de la corola se caracterizó de acuerdo a los patrones de correlación entre los caracteres (Murren et al. 2002). La red de correlaciones significativas entre los caracteres se ilustró mediante un diagrama de correlación (Murren et al. 2002). Para comparar la estructura de la integración entre las especies se realizaron comparaciones pareadas entre las matrices de correlación fenotípica ($10 \times 9 / 2 = 45$ comparaciones) utilizando la prueba de Mantel (1967) (para aplicaciones ver Cheverud et al. 1989, Baker & Wilkinson 2003). Este método calcula un coeficiente de correlación entre los elementos correspondientes de dos matrices y contrasta el valor observado con una distribución nula de coeficientes generada aleatoriamente a través de la permutación de una de las matrices. Para la generación de las distribuciones se usaron 1000 simulaciones. La probabilidad de independencia entre las matrices se estimó como la proporción de coeficientes de correlación aleatorios que exceden el valor del coeficiente observado. Con este método, se construyó una matriz de similitud de la estructura de la integración entre las especies (MS, 1 matriz de 10×10), donde cada elemento corresponde al coeficiente de correlación entre las matrices de correlación de cada par de especies. Para los análisis de remuestreo y las comparaciones entre matrices se utilizó el programa Pop Tools versión 2.6.2 (Hood 2002).

Influencia de la historia filogenética sobre los patrones de integración

Se construyó una matriz de distancias filogenéticas entre las especies (MF, 1 matriz de 10 x 10), donde cada elemento de la matriz corresponde a la longitud total de las ramas que separa cada par de especies en la filogenia. Para analizar la influencia de la filogenia sobre el grado de integración se construyó una matriz de distancias de los grados de integración entre las especies (MG, 1 matriz de 10 x 10, donde cada elemento de la matriz corresponde a la distancia en los valores de INT_C de cada par de especies), y se comparó con la matriz de distancias filogenéticas utilizando la prueba de Mantel (1967). De la misma forma, para analizar la influencia de la filogenia sobre la estructura de la integración, se comparó la matriz de similitud en la estructura de la integración (MS) con la matriz de distancias filogenéticas (MF) (para aplicaciones ver Steppan 1997, Baker & Wilkinson 2003).

Relación entre el grado de integración floral y el sistema de reproducción

Para evaluar si el grado de integración se reduce al disminuir la dependencia de las plantas por polinizadores, se compararon los grados de integración de las especies autóгамas con el de la especie exógama más cercana en cada uno de los dos linajes de *Schizanthus* donde ha evolucionado la autogamia paralelamente. Se realizaron dos comparaciones; *S. hookeri* (exógama) versus *S. grahamii* (autógama); y *S. integrifolius* (exógama) versus *S. lacteus* y *S. candidus* (autógamas). Se espera que si la integración de la corola es consecuencia de la selección por polinizadores, el grado de integración de *S. hookeri* sea mayor que el de *S. grahamii*, y que el grado de integración de *S. integrifolius* sea mayor que el de *S. lacteus* y *S. candidus*. Alternativamente, si la

integración es consecuencia de otros factores, como factores asociados al desarrollo, se espera que el grado de integración permanezca estable aún cuando cambie el sistema reproductivo.

Relación entre la estructura de la integración floral y los mecanismos de polinización

Se compararon los patrones de integración de 5 especies exógamas con distintos mecanismos de polinización; *S. porringens*, *S. tricolor*, *S. pinnatus*, *S. hookeri* y *S. integrifolius*. Como puede notarse de la descripción anterior del modelo de estudio, la función de los caracteres florales varía entre estas especies, particularmente la función de la quilla y de las alas. En las especies exógamas *S. porringens*, *S. tricolor* y *S. pinnatus* las alas y la quilla están desarrolladas y las alas son utilizadas como plataforma de aterrizaje; en *S. hookeri* las alas están reducidas y es la quilla la utilizada como plataforma; en *S. integrifolius*, la quilla y las alas están reducidas y los estambres son los utilizados como plataforma. Si los patrones de integración son consecuencia de la selección por polinizadores, es esperable que éstos difieran entre las especies con distintos mecanismos de polinización, y que cuando los caracteres florales pierdan su función en la polinización (como plataforma de aterrizaje) éstos se desacoplen de los otros caracteres de la corola. Alternativamente, si otros factores son los responsables de la integración de la corola, como factores asociados al desarrollo, es esperable que todos los caracteres de la corola tiendan a covariar (por pertenecer al mismo verticilo), independiente de su función y del mecanismo de polinización.

Para evaluar esta predicción se compararon las matrices de correlación observadas de las especies con tres matrices teóricas que representan distintos modelos de

integración (Cheverud et al. 1989, Herrera et al. 2002). El primer modelo representa el acoplamiento entre todos los lóbulos de la corola, EST, SL, QUI y ALA , y está sintetizado en una matriz de correlación T_I , donde los coeficientes entre estos lóbulos son “1”, y los coeficientes entre cualquiera de estos lóbulos y el tubo son “0”. El segundo modelo representa el desacoplamiento de las alas y esta sintetizado en una matriz T_A , que difiere de T_I , en que los coeficientes de correlación entre el ALA y cualquiera de los otros lóbulos de la corola son “0”. El tercer modelo representa el desacoplamiento simultáneo de la quilla y de las alas de los otros lóbulos de la corola, y está sintetizado en una matriz T_{QA} , que difiere de T_I , en que los coeficientes de correlación entre la QUI y cualquiera de los otros lóbulos de la corola son “0”, al igual que los coeficientes de correlación entre las ALA y cualquiera de los otros lóbulos de la corola.

RESULTADOS

Comparaciones interespecíficas en el grado y estructura de integración de la corola

Existe una gran variación en la morfología de la corola de los taxa (Tabla 5.2), evidenciada por diferencias altamente significativas en la magnitud de los caracteres florales (MANOVA: Wilks $\lambda < 0,001$, $p < 0,001$).

Los cinco caracteres de la corola están significativamente integrados, el valor de la INT_C es significativamente mayor que cero en todas las especies (Tabla 5.3). Sin embargo, la fuerza de la integración floral varía entre las especies del género, con valores que van desde un 0,83 a un 2,4, lo cual representa entre un 16 a un 43% de la integración máxima posible, respectivamente.

Tabla 5.2. Valores promedio de los caracteres florales considerados en el estudio. Al lado de cada especie, se señala el mecanismo de polinización y el sistema de reproducción cuando es conocido, y el número de individuos medidos. Ver Tabla 5.1 para abreviaciones de las especies y Figura 5.1 para abreviaciones de los mecanismos de polinización, de los sistemas de reproducción y de los caracteres florales.

	Mec.	Sist.	N°	EST	SL	ALA	QUI	TU
	Polin.	Repr.	Ind					
TRI	+SLE-Ala	Exog.	40	1,50	1,17	0,98	1,27	0,28
PAR	+SLE-Ala	?	40	0,81	0,69	0,58	0,70	0,15
PIN	+SLE-Ala	Exog.	42	2,56	1,65	1,92	2,37	0,68
POR	+SLE-Ala	Exog.	43	1,48	1,05	0,93	1,27	0,22
LAE	+SLE-Ala	?	40	2,47	1,77	1,23	1,65	0,43
HOO	+SLE-Qui	Exog.	50	3,78	2,55	3,69	1,84	3,24
GRA	-SLE	Autog.	50	4,46	3,28	2,75	2,53	1,36
INT	-SLE	Exog.	42	3,64	2,44	1,54	1,22	5,37
CAN	-SLE	Autog.	43	3,98	2,83	1,70	1,75	3,08
LAC	-SLE	Autog.	41	2,78	1,89	1,16	0,50	1,70

Tabla 5.3. Variación en el grado de integración de la corola en *Schizanthus*. El grado de integración fue medido como la varianza de valores propios de las matrices de correlación corregida (INTc). El intervalo de confianza fue estimado por remuestreo a partir de 1000 simulaciones. Además se muestra el número de correlaciones significativas entre los cinco caracteres.

Especie	INTc	Intervalo de confianza (95%)	Nº correlaciones significativas
TRI	1,57	0,78 - 2,77	6
PAR	2,28	1,58 - 3,32	10
PIN	1,87	1,09 - 3,03	6
POR	1,83	0,96 - 2,77	6
LAE	2,09	1,08 - 2,86	6
HOO	0,92	0,65 - 1,75	3
GRA	1,91	1,09 - 2,60	6
INT	0,59	0,44 - 1,60	2
CAN	2,03	1,46 - 2,97	6
LAC	1,93	0,76 - 3,25	7

Las correlaciones fenotípicas entre los caracteres de la corola fueron generalmente positivas, no registrándose correlaciones negativas significativas que evidencien la existencia de compromisos entre los caracteres de la corola (Fig. 5.2). Una inspección visual de los diagramas de correlación reveló importantes diferencias entre los taxa y entre los caracteres (Fig. 5.2). Las correlaciones entre los caracteres del labio superior, SL-EST, fueron altas y significativas en todas las especies ($> 0,8$). En cambio, la magnitud de las correlaciones entre los caracteres del labio inferior, ALA-QUI fueron más variables entre los taxa. Las correlaciones entre caracteres del labio superior con caracteres del labio inferior (EST-QUI, EST-ALA, etc) también fueron

variables entre los taxa. En general, el tubo coralino (TU) estuvo desacoplado de los lóbulos de la corola, a excepción de *S. parvulus* y *S. lacteus*.

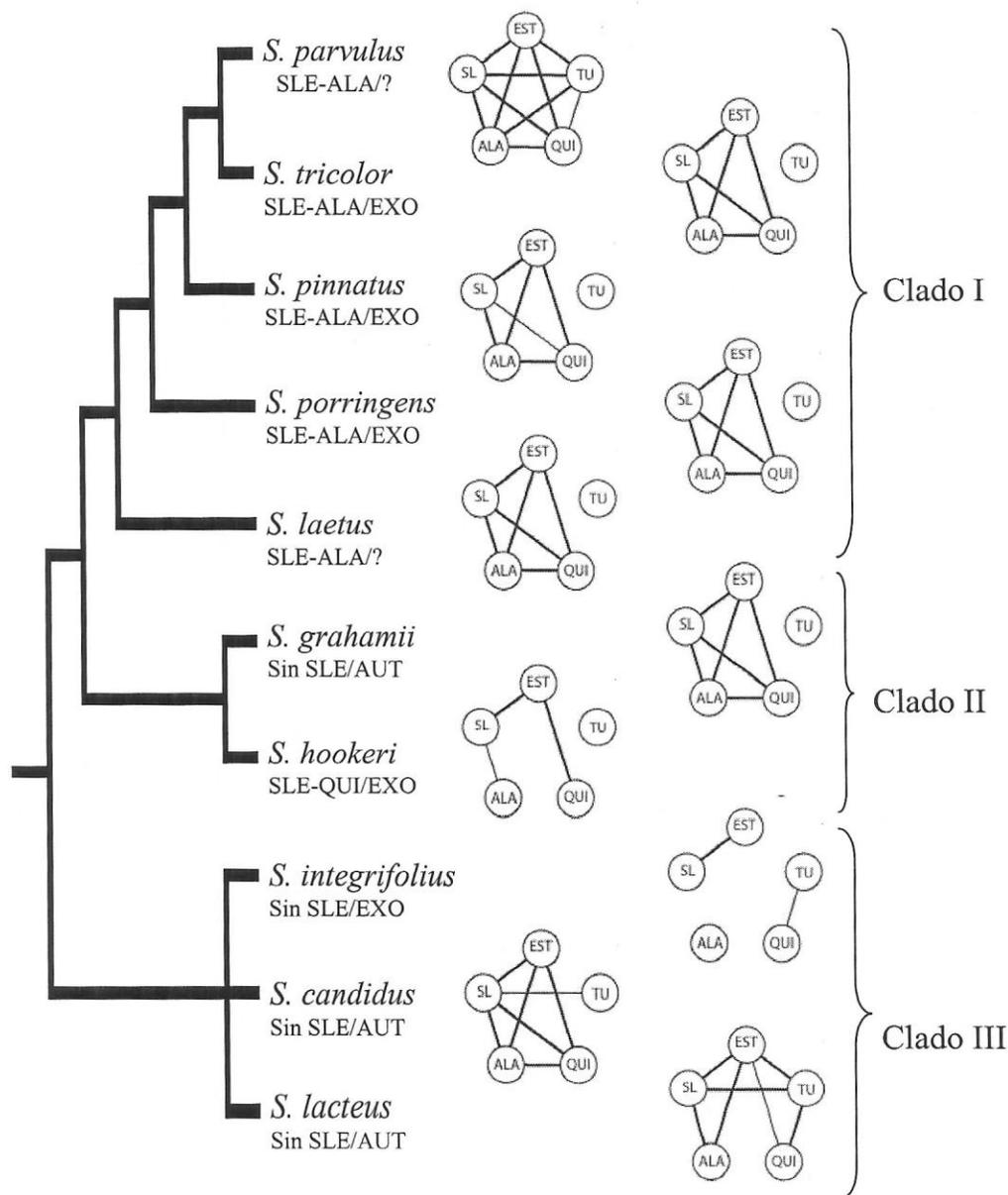


Fig.5.2. Trayectorias evolutivas de los patrones de integración de la corola de las especies de *Schizanthus*. Los modelos corresponden a las redes de correlaciones significativas entre los caracteres. Una línea gruesa conectando dos caracteres representa una correlación significativa superior a 0,6, una línea delgada una correlación significativa inferior a 0,6 y sin línea una correlación no significativa. Las topología es parte del árbol obtenido por inferencia bayesiana a partir de las secuencias de las regiones trnF/ndhJ, ITS y waxy (ver Fig. 2.2 en Capítulo 2). Debajo de cada especie se señala el mecanismo de polinización y el sistema de reproducción cuando es conocido (ver abreviaturas en Fig. 5.1).

Comparaciones pareadas entre las especies revelaron diferencias interespecíficas en la estructura de la integración floral. Como se muestra en la Tabla 5.4, sólo 18 de las 45 comparaciones posibles entre las matrices de correlación fenotípica mostraron índices de correlación significativos. Los valores de éstos índices variaron entre -0,16 y 0,97.

Tabla 5.4. Similitud en los patrones de integración de la corola entre las especies de *Schizanthus*. Los valores corresponden a los índices de similitud entre las matrices de correlación fenotípica de cada par de especies. Con letras se indica la significancia de los índices de similitud según prueba de Mantel. Ver Tabla 5.1 para abreviaciones de las especies.

	TRI	PIN	POR	LAE	HOO	GRA	INT	CAN	LAC
PAR	0,57	0,39	0,59	0,55	0,19	0,58	0,06	0,32	-0,16
TRI		0,95 ^{*C}	0,97 ^{*C}	0,98 ^{*C}	0,53	0,94 ^{*B}	0,27	0,86 ^{*B}	-0,03
PIN			0,90 ^{*B}	0,95 ^{*C}	0,57	0,89 ^{*A}	0,32	0,89 ^{*B}	-0,01
POR				0,97 ^{*C}	0,54	0,93 ^{*C}	0,29	0,86 ^{*B}	-0,03
LAE					0,60	0,96 ^{*B}	0,39	0,90 ^{*B}	-0,07
HOO						0,72 ^{*B}	0,62 ^{*B}	0,67 ^{*B}	0,07
GRA							0,37	0,85 ^{*B}	-0,08
INT								0,49 ^{*A}	-0,10
CAN									0,12

* Significancia estadística: A, $p < 0,05$; B, $p < 0,01$; C, $p < 0,001$

Influencia de la filogenia en la integración de la corola

Las diferencias interespecíficas en la magnitud y la estructura de la integración floral no pueden ser explicadas completamente por las relaciones filogenéticas entre las especies. La correlación entre la matriz de distancia del grado de integración floral y la matriz de distancia filogenética fue marginalmente significativa (MG vs MF, $r = 0,18$, $p = 0,095$), al igual que la correlación entre la matriz de similitud de las correlaciones fenotípicas y la matriz de distancia filogenética (MS vs MF, $r = -0,17$, $p = 0,066$). Sin embargo, una inspección visual de los diagramas de correlación (Fig. 5.2) reveló que los patrones de integración de la corola tienden a conservarse entre las especies del clado formado por *S. tricolor*, *S. parvulus*, *S. pinnatus*, *S. porringens* y *S. laetus*, que comparten el mismo mecanismo de polinización, pero no en los otros clados, donde las especies presentan diferencias en los sistemas reproductivos y/o en los mecanismos de polinización.

Relación entre el grado de integración de la corola y dependencia de polinizadores

El grado de integración aumentó al disminuir la dependencia por polinizadores en los dos linajes de *Schizanthus* donde ha evolucionado la autogamia (Fig. 5.3). En un clado, la especie autógena, *S. grahamii* (INT = 1,97) presentó un mayor nivel de integración floral que su especie hermana exógama, *S. hookeri* (INT = 1,08). Concordantemente, en el otro clado, las especies adaptadas a la autogamia, *S. candidus* (INT = 2,17) y *S. lacteus* (INT = 1,99) presentaron un mayor nivel de integración floral que el de su especie hermana exógama, *S. integrifolius* (INT = 0,83). Estos resultados, también fueron notorios cuando se compararon los diagramas de correlación (Fig. 5.3), donde el

número de correlaciones significativas entre los caracteres florales fue mayor en las especies autóгамas que en la especie exógama correspondiente.

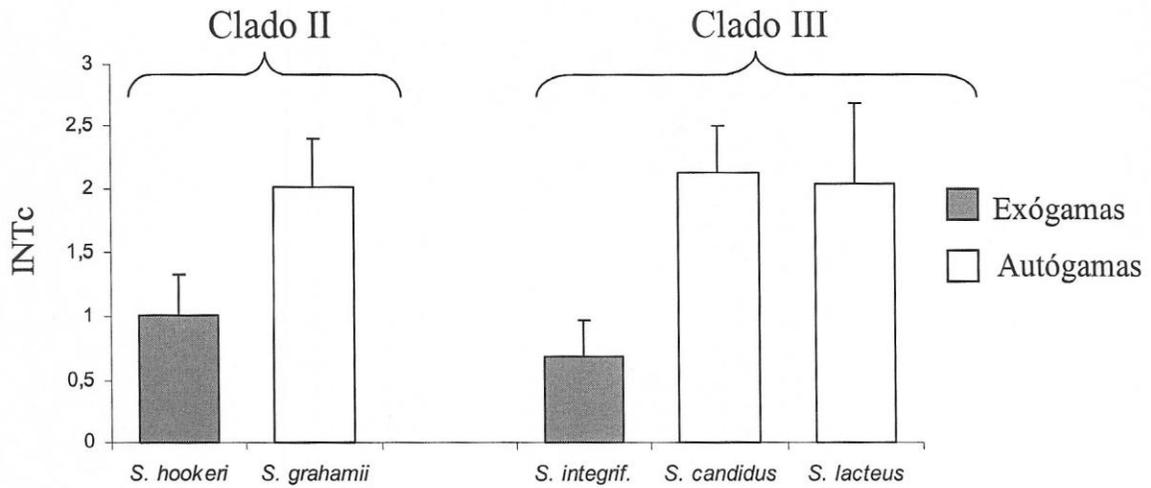


Fig. 5.3. Comparación del grado de integración floral (INTc) entre las especies exógamas (gris) y autóгамas (blanco) pertenecientes a los dos clados de *Schizanthus* donde ha evolucionado la autogamia. Las barras corresponden a las desviaciones estándar estimadas por remuestreo a partir de 1000 repeticiones.

Relación entre los patrones de integración de la corola y mecanismos de polinización

La estructura de la integración floral se relacionó con el mecanismo de polinización. Una inspección visual de los diagramas de correlación reveló que los patrones de integración se conservan entre las tres especies exógamas que comparten el mecanismo de polinización, pero difieren entre las especies exógamas con mecanismos distintos (Fig. 5.2). Este patrón se confirmó al realizar comparaciones pareadas de las matrices de correlación fenotípica (Tabla 5.4). Las tres especies que comparten el mecanismo de polinización, *S. tricolor*, *S. porringens* y *S. pinnatus*, presentaron índices de similitud significativos y superiores a 0,9. En cambio los índices de similitud entre cualquiera de estas tres especies y *S. hookeri* o *S. integrifolius* no fueron significativas, y fueron inferiores a 0,6. *Schizanthus hookeri* y *S. integrifolius*, a pesar de presentar mecanismos de polinización distintos, presentaron un índice de similitud significativo, aunque bajo ($r = 0,62$).

Para evaluar si estas diferencias son consistentes con diferencias en el modo que los caracteres florales se organizan funcionalmente, se compararon las matrices de correlación observadas de las especies exógamas con tres matrices teóricas, que representan el acoplamiento de todos los lóbulos de la corola o el desacoplamiento de las alas, o de la quilla y alas (Tabla 5.5). Los resultados indican que en las especies exógamas cuando el ALA o la QUI pierden su función como plataformas de aterrizaje, tienden a desacoplarse de los otros lóbulos de la corola.

En los diagramas de correlación de las tres especies con SLE gatillado por las alas (*S. tricolor*, *S. porringens* y *S. pinnatus*) se observó que todos los lóbulos de la corola estaban integrados (Fig. 5.2). Concordantemente, la matriz de correlación fenotípica

presentó un mayor índice de similitud con la matriz de acoplamiento total entre los lóbulos de la corola, T_I (rango $r = 0,88 - 0,92$, ver Tabla 5.5).

En el diagrama de correlación de *S. hookeri*, la especie con SLE donde las alas están reducidas y han perdido su función como plataforma, se observó que a diferencia de las especies anteriores, las ALA se desacoplaron del EST (Fig. 5.2). Concordantemente, la matriz de correlación fenotípica presentó un mayor índice de similitud justamente con la matriz que representa un desacoplamiento de las alas, T_A (rango $r = 0,80$, ver Tabla 5.5).

En el diagrama de correlación de *S. integrifolius*, la especie sin SLE donde las ALA y QUI están reducidas y han perdido su función como plataforma, se observó que tanto las ALA como la QUI estaban desacopladas del EST. Concordantemente, la matriz de correlación fenotípica presentó un mayor índice de similitud con la matriz que representa un desacoplamiento de las alas y de la quilla.

Tabla 5.5. Comparaciones entre las matrices de correlación observadas y cuatro matrices teóricas que representan el acoplamiento entre todos los lóbulos de la corola (T_I), el desacoplamiento de la quilla (T_Q), el desacoplamiento de las alas (T_A) y el desacoplamiento de las alas y la quilla (T_{QA}). Los valores corresponden a los coeficientes de correlación entre las matrices. La significancia estadística se estimó usando la prueba de Mantel. Ver Tabla 4.1 para abreviaciones de las especies.

Modelo	+SLE-ALA			+ SLE -QUI	- SLE
	TRI	POR	PIN	HOO	INT
T_I	0,92 *	0,90 *	0,88 *	0,71*	0,39 *
T_Q	0,63 *	0,49 ns	0,59 *	0,26 ns	0,43 *
T_A	0,39 ns	0,46 ns	0,36 ns	0,80 *	0,35 ns
T_{QA}	0,32 ns	0,40 ns	0,26 ns	0,35 ns	0,63 *

*Modelo con mayor significancia estadística

DISCUSIÓN

Comparaciones intraespecíficas en el grado y estructura de la integración de la corola revelaron importantes diferencias entre las especies de *Schizanthus*. Estos resultados son congruentes con otros estudios en plantas que dan cuenta de una relativa inestabilidad de los patrones de correlación de caracteres florales y que muestran diferencias significativas entre especies, poblaciones o entre tipos florales dentro de una especie (Kudoh et al. 2001, Herrera et al. 2002, Murren et al. 2002, Ushimaro et al. 2003, pero ver Herrera 1990).

Las diferencias interespecíficas en los patrones de integración de la corola en *Schizanthus* no pueden ser explicadas completamente por la historia filogenética. Aunque los patrones de integración se conservaron en el clado formado por *S. tricolor*, *S. pinnatus*, *S. porringens*, *S. parvulus*, *S. laetus*, esta estabilidad pudo deberse a que estas especies presentan el mismo mecanismo de polinización y no a un efecto filogenéticamente propiamente tal. Los patrones de integración no se conservaron en los otros dos clados del género, donde si se presentan diferencias en los sistemas reproductivos y de polinización. Esto puede explicar las correlaciones marginalmente significativas encontradas entre la matriz de distancia filogenética y las matrices de distancia de la estructura y magnitud de la integración. Estos resultados son consistentes con estudios previos en plantas y en animales que tampoco observan una señal filogenética en los patrones de correlación fenotípica (Riska 1985, Stepan 1997, Ackery & Donoghue 1998, Pigliucci et al. 1999, Marroig & Cheverud 2001, Murren et al. 2002, Baker & Wilkinson 2003, pero ver Goodin & Johnson 1992).

En *Schizanthus* los cambios en la estructura o en el grado de la integración fenotípica están asociados con cambios en el sistema de reproducción y en el mecanismo de polinización. Estos resultados son consistentes con algunos estudios previos que muestra una relación entre las similitudes en los patrones de integración y similitudes en la ecología de las especies (Marroig & Cheverud 2001, Nicotra et al. 1997). Aunque esta relación no es observada en otros estudios (Callahan & Waller 2000, Armbruster et al. 1999, Herrera et al. 2002, Murren et al. 2002).

Contrario a lo esperado en la primera predicción derivada de la hipótesis que la integración floral es consecuencia de la selección por polinizadores, nuestros resultados

indicaron que la integración de la corola aumenta, y no disminuye, al disminuir la dependencia funcional de las plantas por polinizadores en los dos linajes de *Schizanthus* donde ha evolucionado la autogamia a partir de ancestros exógamos. Estos resultados sugieren que la integración de la corola es consecuencia de factores distintos a la selección por polinizadores. Estos resultados son congruentes con los resultados de Armbruster et al. (1999), quienes encontraron que las correlaciones entre caracteres florales en especies con sistemas de polinización especializados son menores que en especies no especializadas o polinizadas por viento. También son congruentes con estudios previos de Herrera (2001), que mostró que la correlación entre el labio inferior y superior de la corola en *Lavandula latifolia* no es mantenida por selección correlacional mediada por polinizadores, sino que probablemente es consecuencia de otros factores. Entre estos factores pueden estar aquellos asociados al desarrollo (Herrera et al 2002), pues de ha sugerido que los caracteres de la corola deberían estar integrados por pertenecer a la misma unidad de desarrollo (Delph 1996).

Por otra parte, en acuerdo a la segunda predicción derivada de la hipótesis que la integración floral es consecuencia de la selección mediada por polinizadores, se encontró que existen diferencias en los patrones de integración entre las especies exógamas, y que estas diferencias son consistentes con diferencias en el mecanismo de polinización y en el modo con que los caracteres florales se organizan funcionalmente. En las especies exógamas de *Schizanthus* se observó que cuando la quilla y/o las alas se reducen de tamaño y pierden su función como pista de aterrizaje tienden a desacoplarse de los otros lóbulos de la corola. Esta tendencia al desacoplamiento no se observó en las especies autógamias, a pesar que en ellas también la quilla y las alas están reducidas.

Estos resultados son consistentes con los de otros estudios que han mostrado variaciones en los patrones de correlación entre tipos florales de una misma especie, donde caracteres homólogos presentan funciones diferentes (Kudoh et al. 2001, Ushimaro et al. 2003). Por ejemplo, Ushimaro et al. (2003) reportan que en la especie andromonoica, *Commelina communis*, la correlación entre el estigma y la antera del estambre largo es más fuerte en las flores perfectas que en las flores estaminadas, donde los órganos femeninos son vestigiales y raramente involucrados en la polinización.

Este último grupo de resultados indica que los patrones de integración de la corola son modulados por selección mediada por polinizadores. En principio, estos resultados parecen contradecirse con los anteriores (asociados a la primera predicción), que sugieren que la integración es consecuencia de factores distintos a la selección. Sin embargo, en su conjunto nuestros resultados muestran que a pesar que la integración de la corola puede ser el resultado de factores distintos a la selección por polinizadores, como factores ligados al desarrollo, éstos no constituyen una restricción a la variación en los patrones de integración como ha sido sugerido por otros estudios (Delph et al. 1996). En las especies exógamas, la selección puede modular los patrones de integración de la corola, pero de una forma inesperada: promoviendo la evolución independiente de los caracteres no asociados funcionalmente y generando un desacoplamiento funcional de los caracteres de la corola; y no promoviendo la integración de todos los caracteres florales como ha sido sugerido anteriormente (Berg 1960, Stebbins 1974). Esta inferencia es consistente con los resultados de Runions & Geber (2001) en *Clarkia*, que también muestran que las restricciones impuestas por el desarrollo no son tan fuertes

como para prevenir la evolución independiente de los caracteres florales bajo un régimen de selección apropiado.

El aporte más significativo de este trabajo a la comprensión de los patrones de integración floral es la demostración que la selección natural puede promover no sólo la integración de caracteres asociados funcionalmente (como han sugerido en diversos estudios, Galen & Stanton 1989, Conner & Via 1993, Conner & Sterling 1995, Conner 1997, Kudoh et al. 2001, Ushimaru et al. 2003), sino también la parcelación de caracteres no ligados funcionalmente, dando origen a fenotipos modulares. De esta manera, los resultados apuntan a que la modularidad de la corola en el género evoluciona como resultado de la parcelación de partes integradas (por factores genéticos o asociados al desarrollo) y no de la conexión de partes originalmente desintegradas.

La evolución de la modularidad explica una de las características más intrigantes de los organismos complejos, su simultánea flexibilidad y robustez: flexibilidad para que los distintos caracteres respondan independientemente a presiones selectivas específicas, y robustez, para asegurar la integración de múltiples funciones y su funcionamiento como un todo coherente (Klingenberg 2004). En el caso de los caracteres florales, es esta flexibilidad la que puede explicar, al menos en parte, su labilidad evolutiva y su potencial de cambio y respuesta a las presiones selectivas de los polinizadores.

REFERENCIAS

- ACKERLY DD & MJ DONOGHUE 1998 Leaf size, sapling allometry, and Corner's rules: phylogeny and correlated evolution in maples (*Acer*). *American Naturalist* 152:767-791
- ARMBRUSTER WS 1996 Causes of covariation of phenotypic traits among populations. *Journal of Evolutionary Biology* 9:261-276
- ARMBRUSTER WS, Di STILIO VS, TUXILL JD, FLORES TC & JL VELÁSQUEZ 1999 Covariance and decoupling of floral and vegetative traits in nine neotropical plants: a re-evaluation of Berg's correlation-pleiades concept. *American Journal of Botany* 86:39-55
- ARNOLD SJ & P PHILLIPS 1999 Hierarchical comparison of genetic variance-covariance matrices II. Coastal-inland divergence in the garter snake, *Thamnophis elegans*. *Evolution* 53:1516-1527
- BAKER RH & GS WILKINSON 2003 Phylogenetic analysis of correlation structure in stalk-eyed flies (*Diasemopsis*, Diopsidae). *Evolution* 5:87-103
- BERG RL 1960 The ecological significance of correlation pleiades. *Evolution* 17: 171-180
- CALLAHAN HS & DM WALLER 2000 Phenotypic integration and the plasticity of integration in an amphicarpic annual. *International Journal of Plant Sciences* 161:89-98
- CHERNOFF B & P MAGWENE 1999 Morphological integration: forty years later. En: Olson EC & Miller (eds). *Morphological Integration*: 319-353. University of Chicago Press, Chicago IL.
- CHEVERUD JM, WAGNER GP & MM DOW 1989 Methods for the comparative analysis of variation patterns. *Systematic Zoology* 38:201-213
- COCUCCI A 1989 El mecanismo floral de *Schizanthus*. *Kurtziana* 20:113-132
- CONNER JK & A STERLING 1995 Testing hypotheses of functional relationships: a comparative survey of correlation patterns among floral and vegetative traits in five insect-pollinated plants. *American Journal of Botany* 82:1399-1406

- CONNER JK & S VIA 1993 Patterns of phenotypic and genetic correlations among morphological and life-history traits in wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Evolution* 47:704-711
- CONNER JK 1997 Floral evolution in wild radish: the roles of pollinators, natural selection, and genetics correlations among traits. *International Journal of Plant Sciences* 158:S108-S120
- DAVIS SL 2001 Phenotypic and genetic correlations among floral traits in two species of *Thalictrum*. *The Journal of Heredity* 92:361-366
- DELPH LF 1996 Flower size dimorphism in plants with unisexual flowers. En: Lloyd DG & Barrett SCH (eds). *Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants*: 241-273. Chapman & Hall Press, New York
- GALEN C & ML STANTON 1989 Bumblebee pollination and floral morphology: factors influencing pollen dispersal in the alpine sky pilot, *Polemonium viscosum* (Polemoniaceae). *American Journal of Botany* 76:419-426
- GARLAND TM, MARTIN KLM & R DIAZ-URIARTE 1997 Reconstructing ancestral trait values using squared change parsimony: plasma osmolarity at the origin of amniotes. En: Sumida SS & KLM Martin (eds). *Amniote origins: completing the transition to land*: 425-502. Academic Press, San Diego
- GOODIN JT & MS JOHNSON 1992 Patterns of morphological covariation in *Partula*. *Systematic Biology* 41:292-304
- GRAU J & E GRÖNBACH 1984 Untersuchungen zur Variabilität in der Gattung *Schizanthus* (Solanaceae). *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung. München* 20:11-203
- HERRERA CM 1990 The adaptedness of the floral phenotype in a relict endemic, hawkmoth-pollinated violet. 2. Patterns of variation among disjunct populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 40:275-291
- HERRERA CM 1993 Selection on floral morphology and environmental determinants of fecundity in a hawkmoth-pollinated violet. *Ecological Monographs* 63: 251-275

- HERRERA CM 2001 Deconstructing a floral phenotype: do pollinators select for corolla integration in *Lavandula latifolia*? *Journal of Evolutionary Biology* 14:574-584
- HERRERA CM, CERDA X, GARCIA MB, GUITIAN J, MEDRANO M, REY PJ & AM SANCHEZ-LAFUENTE 2002 Floral integration, phenotypic covariance structure and pollinator variation in bumblebee-pollinated *Helloborus foetidus*. *Journal of Evolutionary Biology* 15:108-121
- HOOD GM 2004 PopTools version 2.6.2 Disponible en <http://www.cse.csio.au/poptools>
- JERNIGAN RW, CULVER DC & DW FONG 1994 The dual role of selection and evolutionary history as reflected in genetic correlations. *Evolution* 48:587-596
- KLINGENBERG CP 2004 Integration, modules and development: molecules to morphology to evolution. En: Pigliucci M & K Preston (eds) *Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes*. Oxford University Press, New York
- KUDOH H, SUGAWARA T, WU S & J MURATA 2001 Morph-specific correlations between floral traits in a distylous *Ophioriza napoensis* (Rubiaceae) population in southern China. *Journal of Tropical Ecology* 17:719-728
- LANDE R 1979 Quantitative genetic analysis of multivariate evolution, applied to brain: body size allometry. *Evolution* 33:402-416
- MANTEL N 1967 The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209-220
- MADISSON WP & DR MADISSON 2004 Mesquite version 1.02. Disponible en <http://mesquiteproject.org/mesquite/mesquite.html>
- MARROIG G & JM CHEVERUD 2001 A comparison of phenotypic variation and covariation patterns and the role of phylogeny, ecology, and ontogeny during cranial evolution of New World monkeys. *Evolution* 55:2576-2600
- MADISSON WP & DR MADISSON 2004 Mesquite version 1.02. Disponible en <http://mesquiteproject.org/mesquite/mesquite.html>
- MURREN CJ 2002 Phenotypic integration in plants. *Plant Species Biology* 17:89-99

- MURREN CJ, PENDLETON N & M PIGLIUCCI 2002 Evolution of phenotypic integration in *Brassica* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* 89:655-663
- NICOTRA AB, CHAZDON RL & CH SCHLICHTING 1997 Patterns of genotypic variation and phenotypic plasticity of light response in two tropical *Piper* species. *American Journal of Botany* 84:1542-1552
- OLSON E & R MILLER 1958 Morphological integration. University of Chicago Press, Chicago
- PIGLIUCCI M 2003 Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes. *Ecology Letters* 6:265-272
- PIGLIUCCI M, CAMEL K & J SCHMITT 1999 Evolution of phenotypic plasticity: a comparative approach in the phylogenetic neighbourhood of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Evolutionary Biology* 12:779-791
- PODOLSKY R, SHAW R & F SHAW 1997 Population structure of traits in *Clarkia dudleyana*. II Constancy of within-population genetic variance. *Evolution* 51:1785-1796
- PRICE T & T LANGEN 1992 Evolution of correlated characters. *Trends in Ecology and Evolution* 7:307-310
- RISKA B 1985 Group size factors and geographic variation of morphometric correlation. *Evolution*: 39:792-803
- ROFF DA 2000 The evolution of the G matrix: selection or drift? *Heredity* 84: 135-142
- ROFF DA, MOUSSEAU T & D HOWARD 1999 Variation in genetic architecture of calling song among populations of *Allonemobius socius*, *A. fasciatus* and a hybrid population: drift or selection? *Evolution* 53:216-224
- RUNIONS CJ & M GEBER 2000 Evolution of the self-pollinating flower in *Clarkia xantiana* (Onagraceae). I. Size and development of floral organs. *American Journal of Botany* 87:1439-1451
- SCHWENK K & GP WAGNER 2001 Function and the evolution of phenotypic stability: connecting pattern to process. *American Zoologist* 41:552-563
- STEBBINS GL 1974 Flowering plants: evolution above the species level. Harvard University Press, Cambridge

- STEPPAN SJ 1997 Phylogenetic analysis of phenotypic covariance structure II. Reconstructing matrix evolution. *Evolution* 51:587-594
- STEPPAN SJ, PHILLIPS P & D HOULE 2002 Comparative quantitative genetics: evolution of the G matrix. *Trends in Ecology and Evolution* 17:320-327
- USHIMARO A, ITAYAKI T & H ISHI 2003 Floral correlations in an andromonoecious species, *Commelina communis* (Commelinaceae). *Plant Species Biology* 18:103-106
- WAGNER 1984 On the eigenvalue distribution of genetic and phenotypic dispersion matrices: evidence for a non random organization of quantitative character variation. *Journal of Mathematical Biology* 21:77-95
- WAGNER & ALTENBERG 1996 Perspective: Complex Adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution* 50:967-976

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados de esta tesis permitieron explorar las relaciones filogenéticas entre las especies de *Schizanthus* y las trayectorias evolutivas de sus sistemas de reproducción y de polinización. Éstas sirvieron de base para entender cómo ha evolucionado la morfología floral y los patrones de integración de la corola en el género en respuesta a cambios en los sistemas de polinización y de reproducción; con el objetivo de vislumbrar cuál ha sido el papel de la selección mediada por polinizadores en la evolución de la morfología y de los patrones de integración floral. A continuación se enuncian las principales conclusiones de esta tesis.

- El género *Schizanthus* es un género aislado en la familia Solanaceae, según lo indica la alta divergencia de las regiones ITS y de la región waxy con otros miembros de la familia.
- Las especies xerofíticas del desierto *S. integrifolius*, *S. lacteus*, *S. candidus* y la especie cordillerana de la zona mediterránea árida, *S. alpestris*, forman un clado claramente aislado de las otras especies. Estas a la vez se separan dos clados, uno formado por las especies altoandinas *S. hookeri* y *S. grahamii*; y otro formado por la especie del desierto *S. laetus* y por las especies la zona mediterránea semiáridas y húmedas, *S. porringens*, *S. litoralis*, *S. tricolor*, *S. pinnatus* y *S. parvulus*.
- En *Schizanthus*, la autogamia retardada evolucionó en dos ocasiones independientes a partir de ancestros exógamos y en asociación al acercamiento de los órganos

reproductivos. En estas especies, el estigma receptivo y las anteras con polen entran en contacto sólo en las últimas etapas del desarrollo, lo que posibilita la autofertilización espontánea, pero a la vez da cabida a la polinización cruzada.

- En *Schizanthus*, la ornitofilia y la falenofilia habrían evolucionado una sola vez en el género a partir de ancestros polinizados por himenópteros y en correspondencia con la adquisición de polinización por picaflores y lepidópteros respectivamente.
- Las transiciones entre los tipos de polinizadores (himenópteros, lepidópteros y aves) ocurren sin la pérdida del polinizador ancestral, dando lugar a estados más generalistas (donde las flores son visitadas por el polinizador nuevo y el ancestral).
- La morfología floral del género es evolutivamente lábil. Las incongruencias entre los datos moleculares o morfológicos respecto a las afinidades de las especies *S. parvulus* y *S. alpestris*, dan cuenta de la labilidad evolutiva de la morfología floral, pues aunque estas especies presenten características morfológicas únicas dentro del género son genéticamente muy cercanas a otras especies de morfología floral muy diferente. Esta conclusión también se apoya en el análisis de los patrones evolutivos de la forma de la corola, que indican que los patrones de similitud en la morfología floral entre las especies de *Schizanthus* son independientes de la filogenia.
- La transformación de la morfología floral del género *Schizanthus* sigue un patrón de cambio más gradual que puntuado. Esta gradualidad se manifiesta en el reconocimiento de estados morfológicos intermedios en las transiciones desde la melitofilia hacia la ornitofilia o hacia la falenofilia, representados por *S. hookeri* y *S. alpestris* respectivamente. Esta conclusión se apoya además en el análisis de los patrones

evolutivos de la forma de la corola que indica que la transformación de esta sigue un patrón de cambio gradual.

- En *Schizanthus*, factores distintos a la deriva génica conducen la divergencia de los patrones de integración de la corola, puesto que las diferencias interespecíficas en los patrones de integración de la corola son independientes de la historia filogenética.
- En *Schizanthus*, la integración de la corola es el resultado de factores distintos a la selección mediada por polinizadores, presumiblemente factores ligados al desarrollo. Esta conclusión se apoya en el resultado inesperado que la integración de la corola aumenta al relajarse la selección por polinizadores en los dos linajes del género donde ha evolucionado la autogamia.
- En *Schizanthus*, las presiones selectivas de los polinizadores pueden promover la evolución de la modularidad, es decir, de la organización de los caracteres de la corola en unidades de covariación parcialmente autónomas, a través de la asociación sistemática de caracteres funcionalmente ligados y de la supresión de las restricciones asociadas al desarrollo (que originan la integración). Esta conclusión se apoya en la observación que los patrones de integración de la corola difieren entre las especies exógamas con distintos mecanismos de polinización en una forma consistente con variaciones en las funciones de los caracteres durante la polinización: cuando los caracteres pierden su función en la polinización tienden a desacoplarse de la corola

Uno de los aportes principales de esta tesis es haber mostrado evidencias que sugieren que en *Schizanthus* la adaptación al tipo y disponibilidad de agente polinizador juegan un papel importante en la evolución y diversificación de la morfología floral. En

primer lugar, la demostración que la morfología floral es evolutivamente lábil; y en segundo lugar la correspondencia, aunque parcial, encontrada entre los síndromes de polinización y los tipos de visitantes observados: sólo las flores exógamas con características asociadas a la falenofilia son visitadas por lepidópteros, y sólo las flores con características asociadas a la ornitofilia son visitadas por picaflores. Sin embargo, es necesario destacar que nuestros resultados indican que la evolución de la morfología floral sigue un patrón de cambio gradual, generando un gradiente en el espacio morfométrico donde el reconocimiento de síndromes de polinización como unidades discretas y limitadas pierde sentido.

En general, la discusión sobre la integración fenotípica, se ha centrado sobre si ésta debiese ser considerada una adaptación que puede responder a la selección natural u obedece a una restricción que limita el cambio evolutivo. Al alero de esta discusión se han examinado los factores que modulan los patrones de integración floral, planteándose a la selección natural mediada por polinizadores y a los factores ligados al desarrollo como hipótesis alternativas. Nuestros resultados, sin embargo, indican que ambos factores influyen en los patrones de integración de la corola de *Schizanthus* (Fig. 6.1). El mayor grado de integración de la corola observado en las especies menos dependientes de polinizadores, sugiere que en *Schizanthus* la integración de la corola resulta de factores distintos a la selección por polinizadores, que pueden ser factores asociados al desarrollo. Sin embargo, las diferencias en los patrones de integración encontradas entre las especies exógamas de *Schizanthus* con mecanismos de polinización distintos, sugieren que estos factores no constituyen restricciones a la evolución independiente de los caracteres de la corola bajo un régimen de selección adecuado. Al considerar estos

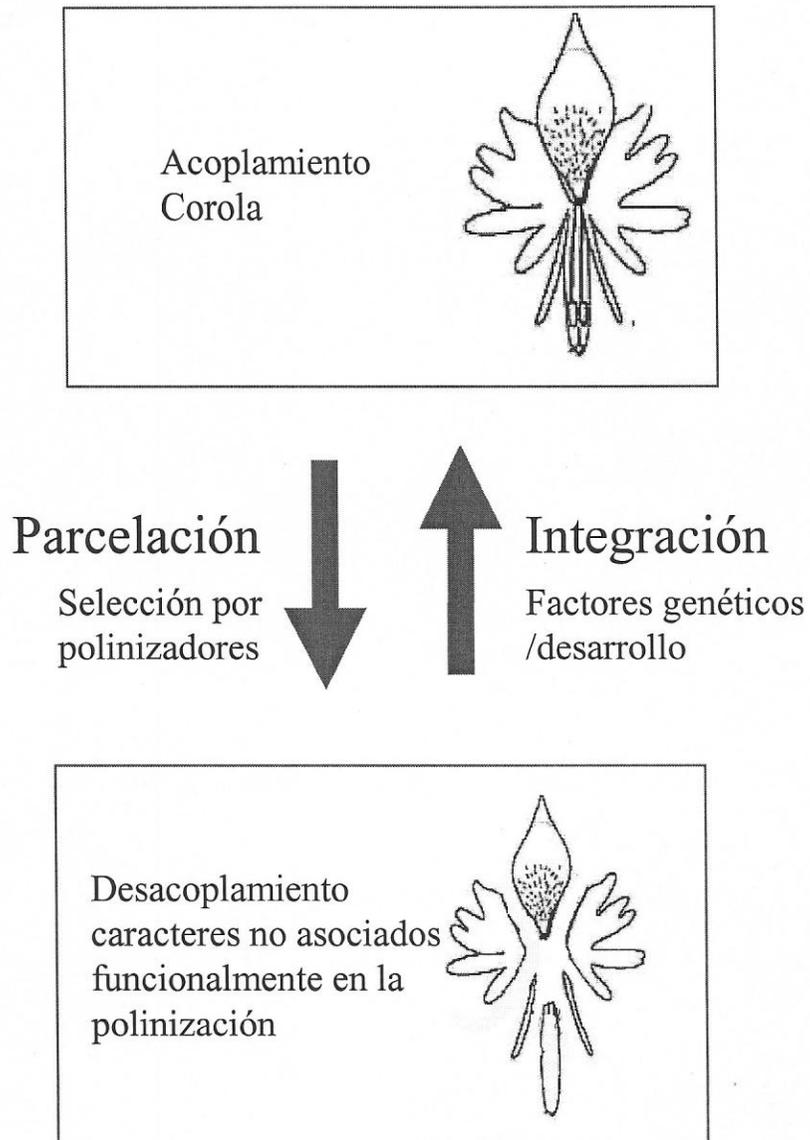


Fig. 6.1. Modelo de evolución de la integración floral

