

UCH-FCC
MAG-B
S 422
C. 1



**EXPRESIÓN DEL POLIMORFISMO ESTILAR DEL
CLADO *OREOPOLUS-CRUCKSHANKSIA* (RUBIACEAE)
EN UN CONTEXTO FILOGENÉTICO**

Tesis

Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad de Ciencias

Por

Claudia Paz Scognamillo Bahamonde

Enero, 2015

Director de Tesis Dra.: Mary Kalin Hurley
Co-Director de Tesis Dra.: Paola Jara Arancio

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER**

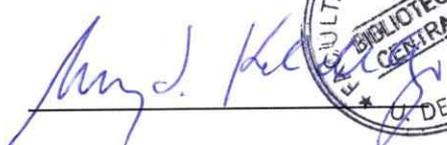
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata

Claudia Paz Scognamillo Bahamonde

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 16 de diciembre de 2014.

Director de Tesis:

Dra. Mary Kalin Hurley




Co-Director de Tesis:

Dra. Paola Jara Arancio



Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Alejandra González Vásquez



Dra. María Fernanda Pérez Trautmann



*A la memoria de Cristina y Ezio que comenzaron
conmigo este proceso.*

*A ti nonna que creíste siempre e incondicionalmente
en mí, a pesar de muchas veces no entenderme.*

*Y a ti nonno por mostrarme la belleza de lo simple y
compartir conmigo el amor por la "natura".*



Soy Claudia Paz Scognamillo Bahamonde, nací el 29 de agosto de 1988 en la región de Valparaíso. Crecí en la ciudad de Santiago y mi escolaridad la cursé en el Liceo Experimental Manuel de Salas. Durante aquellos años desarrollé mi curiosidad e incursioné en variadas disciplinas generando un gran amor por las experiencias rodeadas de naturaleza, como también mucha afinidad por las actividades artísticas y científicas. Fue así como llegué a estudiar Licenciatura en Biología. Allí, descubrí con gusto los caminos de la botánica y la ecología, aprendizaje que me incentivó a profundizar en estas áreas continuando mis estudios de postgrado en Ciencias Biológicas en la Universidad de Chile.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primera instancia a quienes compartieron conmigo el día a día de este largo proceso, a mi familia: Carola, Claudio y Vincenzo y a mi compañero Daniel.

Indudablemente doy las gracias a mis tutoras. A Mary, por enseñarme, proponerme, discutirme y guiarme en la ciencia de las flores y por compartir conmigo la cordillera y el desierto. A Paola, que con paciencia, me escuchó y aterrizó impulsándome a avanzar.

Igualmente agradezco por sus constructivas conversaciones, constante compañía y agradables momentos de dispersión, a mis compañeros y amigos de la universidad: Constanza, Carolina, Fernanda, Benjamín, Josefina, Paula, Ítalo, Marcela, Romina, Don Juan, Francisca, Francy, Wladimir, Felipe, Camila, Alfonso, Pedro, Daniel, Moisés, Natalia y en especial a Diego por su apoyo en cada una de las etapas de esta tesis.

También agradezco a mis amigas de la vida: Amaranta, Manuela, Camila, Macarena Valentina, y Catalina, al resto de mi familia: Mónica, Consuelo, Alessandra, Josefina, Flavio y Corina y a la familia extendida: Alma, Jaime, Amapola, Margarita y Benito. A mis amigas por seguir creciendo conmigo y a todos por su apoyo y comprensión cuando me ausenté por andar de cerro en cerro, siendo incluso asistentes y aprendices en algún terreno.

Particularmente doy las gracias a Javiera Méndez por su gran aporte gráfico en el escrito y la presentación de la tesis, y por su valoración y motivación inspiradora de las flores.

Además, quiero agradecer a los profesores F. Pérez, M. Méndez, D. Véliz y A. González por atender mis dudas con la mejor disposición. Y también a mis profesores del colegio Alejandra y Mauricio por embárcame en el maravilloso mundo de la biología.

Por último, agradecer a G. Rojas, G. Arancio, A. Marticorena y J. Amaral de los herbarios del Museo Nacional de Historia Natural, de la Universidad de La Serena, de la Universidad de Concepción y del Jardín Botánico de Rio de Janeiro respectivamente, por proporcionarme amablemente muestras e información de mi grupo de estudio. Y a los académicos C. Taylor, V. Ferrero, C. Puff y S. Barrett, del Jardín Botánico de Missouri, la Universidad de Vigo, la Universidad de Viena y la Universidad de Toronto respectivamente por comentar atentamente mis consultas.

Esta tesis fue posible gracias al apoyo de la Beca de Magíster del Instituto de Ecología y Biodiversidad y al financiamiento de los proyectos: ICM P05-002, PFB-23, Fondecyt Regular: 1140541y Fondecyt de Iniciación: 11130299.

ÍNDICE DE MATERIAS

AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE MATERIAS	vi
LISTA DE TABLAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN	1
<i>Diferentes polimorfismos estilares</i>	2
<i>El clado Oreopolus-Cruckshanksia</i>	6
<i>Objetivos</i>	9
METODOLOGÍA	11
<i>Descripción del grupo de estudio</i>	11
<i>Reconstrucción filogenética</i>	15
<i>Sistema reproductivo en el clado Oreopolus-Cruckshanksia</i>	21
<i>Reconstrucción del sistema reproductivo</i>	32
RESULTADOS.....	35
<i>Reconstrucción filogenética</i>	35
<i>Sistema reproductivo en Oreopolus y Cruckshanksia</i>	40
<i>Reconstrucción del sistema reproductivo</i>	68
DISCUSIÓN.....	74
<i>Reconstrucción filogenética del clado Oreopolus-Cruckshanksia</i>	74
<i>Sistema de reproducción y su evolución</i>	76
<i>Consideraciones adicionales</i>	83
CONCLUSIONES	85
REFERENCIAS	86
APÉNDICE 1.	94
APÉNDICE 2.	96
APÉNDICE 3.	98
APÉNDICE 4.	102
APÉNDICE 5.	103

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Proporción de individuos L y B en poblaciones de las diferentes especies de *Cruckshanksia* y en *Oreopolus glacialis*.

Tabla 2. Rasgos florales. Se presenta la media de cada rasgo con su respectiva desviación estándar por morfo de cada población. Además, se indica el valor p de las comparaciones realizadas entre morfos para todos los rasgos.

Tabla 3. Índice de reciprocidad para cada población. Se señala tanto el valor total como el de cada nivel de verticilo (Sánchez et al. 2008, 2013). El valor cero indica la máxima reciprocidad.

Tabla 4. Porcentaje de superposición entre áreas de distribución de estructuras reproductivas. Se muestra la posibilidad (%) de cruce legítimo para los niveles superior e inferior y de cruce ilegítimo para los morfos L y B. Además se presenta el porcentaje de solapamiento entre anteras de ambos morfos para cada población.

Tabla 5. Resumen de resultados de hercogamia, reciprocidad y tipo de polimorfismo floral. El color de las celdas indica el grado de correspondencia entre estructuras complementarias de acuerdo a cada análisis realizado. Rojo, verde y azul; alta, intermedia y baja correspondencia respectivamente.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes polimorfismos estilares. Hercogamia de aproximación, dimorfismo estilar, hercogamia recíproca (diestilia), homoestilia, triestilia, hercogamia revertida, polimorfismo mixto (en sus distintas posibilidades), dimorfismo estilar relajado y dioecía. La sucesión de los tres primeros polimorfismos es parte de la vía evolutiva hacia la heterostilia propuesta por Lloyd & Webb (1992b).

Figura 2. Distribución de los géneros *Cruckshanksia* y *Oreopolus*. Los datos de ocurrencia provienen de bases de datos de herbarios (CONC, USL), colecta personal y proyecto "Flora Argentina".

Figura 3. Detalle del clado *Oreopolus-Cruckshanksia*. (1) *O. glacialis*, (2) *C. palmae*, (3) *C. macrantha*, (4) *C. hymenodon*, (5) *C. lithiophila*, (6) *C. pumila*, (7) *C. montiana*, (8) *C. verticillata*.

Figura 4. Rasgos florales medidos en flores de ambos morfos, (B) breviestilo y (L) longiestilo. (1) largó del tubo de la corola, (2) altura antera, (3) altura estigma, (4) tamaño antera, (5) tamaño estigma, (6) área pétalo, (7) perímetro pétalo y (8) ancho tubo.

Figura 5. Modelo de presentación secundaria de polen en un yema de *Cruckshanksia*. (1) estigma que elonga posterior a la antesis y (2) estigma que se endereza posterior a la antesis. (A) yema con anteras y estigma joven, (B-C) yema con anteras dehiscentes y polen adosado a la cara externa del estigma joven, (D-E) antesis floral, (F) flor presentando polen (G) flor madura con estigma receptivo.

Figura 6. Árbol filogenético de Inferencia Bayesiana basado en evidencia total para ocho especies de los géneros *Oreopolus* y *Cruckshanksia*. En los nodos se indican los valores de

credibilidad $\geq 0,50$. Los valores soportados ($\geq 0,95$) se muestra en rojo. El recuadro celeste señala al género *Oreopolus*, el amarillo al linaje I y el verde al linaje II del género *Cruckshanksia*.

Figura 7. Resumen de árbol filogenético de Inferencia Bayesiana basado en evidencia total junto con la información de distribución de los grupos. Se indica el valor de credibilidad solo para los nodos soportados ($\geq 0,95$). El recuadro celeste señala al género *Oreopolus*, el amarillo al linaje I y el verde al linaje II del género *Cruckshanksia*. Al costado derecho se indica el rango latitudinal y el piso vegetacional (Pliscoff & Luebert 2006) de los taxa.

Figura 8. Estimación de los tiempos de divergencia en el clado *Oreopolus-Cruckshanksia* mediante dos puntos de calibración. La estrella roja indica el fósil empleado y la estrella verde la calibración secundaria. El valor del nodo corresponde al tiempo estimado y las bandas azules al intervalo de credibilidad (95% HDP).

Figura 9. Diagrama de altura. De cada flor se grafica la altura de anteras y estigmas ordenadas según la altura del estigma para todas las poblaciones medidas. Los triángulos celestes indican la altura del estigma y los círculos rojos la altura de la antera.

Figura 10. Índice de reciprocidad para niveles de verticilo superior e inferior. Cada especie se señala por un mismo color. (\diamond) Especies de baja reciprocidad, (Δ) de reciprocidad variable y (\circ) de alta reciprocidad.

Figura 11. Índice de reciprocidad (Sánchez et al. 2008, 2013). Valor único para cada población ordenado de manera creciente. Cada especie se encuentra representada por un color.

Figura 12. Correspondencia espacial de órganos reproductivos para todas las especies y poblaciones. Cruce legítimo en solapamiento de las áreas rojo-verde (nivel superior) y azul-naranja (nivel inferior).

Figura 13. Dibujos a escala real basados en los valores promedio de la medición de rasgos florales. Se muestran todas las especies y poblaciones medidas.

Figura 14. Esquema del desarrollo de un yema de *Oreopolus-Cruckshanksia*. El estigma se muestra bifido desde el inicio y el estilo elonga hasta su altura máxima antes de la apertura de la flor. Las anteras liberan el polen después de la antesis.

Figura 15. Diagrama para evaluar la existencia de presentación secundaria de polen (PSP). Se indica el contacto entre estigma y anteras de la misma flor y la dehiscencia de las anteras.

Figura 16. Reconstrucción ancestral del índice de reciprocidad del clado *Oreopolus-Cruckshanksia* bajo el criterio de Máxima Verosimilitud sobre la topología de evidencia total reducida. La mayor reciprocidad (menor valor del índice), se indica con tonalidades cálidas (rojo) y la menor reciprocidad (mayor valor del índice), se indica con tonalidades frías (azul).

Figura 17. Reconstrucción ancestral del polimorfismo estilar en el clado *Oreopolus-Cruckshanksia* sobre la topología de evidencia total reducida. El clado *C. hymenodon-C. lithiophila* se categorizó según: A) diestilia (*C. hymenodon*) y B) polimorfismo mixto (*C. lithiophila*). Árbol con ramas hacia la derecha: Criterio de Parsimonia y árbol con ramas hacia la izquierda: Criterio de Máxima Verosimilitud. Estados del rasgo reconstruido: (Naranja) Diestilia, (Verde) Polimorfismo mixto, (Azul) Dimorfismo estilar, (Blanco) No estudiado.

Figura 18. Regresión lineal simple entre altitud y grado de reciprocidad. A) Correlación del índice de reciprocidad en función de la altitud de las poblaciones. B) Correlación de los contrastes filogenéticos del índice de reciprocidad en función de los contrastes de la altitud.

LISTA DE ABREVIATURAS

B:	Breviestilo
BM:	Modelo Browniano de evolución
CONC:	Herbario de la Universidad de Concepción
cpDNA:	DNA cloroplastidial
GB:	GenBank
HDP:	Mayor densidad posterior
Ind.:	Individuos
L:	Longiestilo
Ma:	Millones de años
NI:	Nivel de verticilos inferior
NS:	Nivel de verticilos superior
PCR:	Reacción de polimerasa en cadena
Pobs.	Poblaciones
PSP:	Presentación secundaria de polen
rDNA:	DNA nuclear ribosomal
TSP:	Transporte secundario de polen
USL:	Herbario de la Universidad de La Serena
UV:	Luz ultra violeta

RESUMEN

La diestilia ha sido concebida como un sistema de reproducción capaz de minimizar la autofecundación y propiciar la fecundación cruzada en algunos grupos de angiospermas. Es un polimorfismo estilar especializado que presenta dos morfos que difieren recíprocamente en la posición de sus órganos sexuales (hercogamia recíproca). Recientemente se han descrito polimorfismos estilares más sutiles, donde la hercogamia se vuelve menos recíproca, como son el dimorfismo estilar y el polimorfismo mixto. La familia Rubiaceae tiene la mayor representación de diestilia en angiospermas. *Cruckshanksia* Hook. & Arn. y *Oreopolus* Schlecht. (Rubiaceae, Rubioideae, Coussareeae) son géneros endémicos Chile y Argentina. Su biología reproductiva ha sido escasamente estudiada. Si bien, se reconoce la presencia de diestilia se desconoce la expresión del polimorfismo estilar en detalle. Además, se ha propuesto que podría manifestarse una presentación secundaria de polen (PSP), condición poco compatible con diestilia. Su circunscripción taxonómica ha sido ampliamente debatida. Las especies han formado parte solo de *Cruckshanksia* y también han sido consideradas como dos géneros distintos (*Oreopolus* y *Cruckshanksia*). En 1963 Ricardi propone que el género *Oreopolus* estaría compuesto por tres especies y en 1996 Taylor lo describe como monotípico para *O. glacialis* (Poepp.) Ricardi. En este estudio se evaluó la presencia de hercogamia recíproca y existencia de PSP a nivel poblacional en el clado *Oreopolus-Cruckshanksia*. Para analizar la tendencia evolutiva del sistema reproductivo encontrado, fue necesario dilucidar sus relaciones

filogenéticas previamente. Con este fin, se utilizaron herramientas moleculares, donde se amplificaron regiones de cpDNA y rDNA. Se colectaron, fijaron y secaron inflorescencias y material foliar de poblaciones de las especies involucradas. Se censó, midió y evaluó la reciprocidad de las muestras obtenidas y se estudió el desarrollo para evaluar la presencia de PSP. Los resultados filogenéticos se corresponden con lo determinado por Taylor (1996). *O. glacialis* aparece como grupo hermano de las demás especies de *Cruckshanksia*. Además, se sugiere que el género *Cruckshanksia* estaría conformado por dos principales linajes, uno de carácter costero y otro más cordillerano. En todas las poblaciones estudiadas se encontraron dos morfos estilares y se descartó la presencia de PSP. Se estableció que *O. glacialis* corresponde a una especie con dimorfismo estilar y que *Cruckshanksia* presenta especies con polimorfismo mixto y diestilia. Esta última, fue dominante en las especies costeras. La reciprocidad fue mayor en el nivel superior de los verticilos sexuales. Se encontró que hay una tendencia a la disminución del grado de reciprocidad con la altitud y se determinó que corresponde al efecto de una leve señal filogenética del grado de reciprocidad en el clado. Aun así, cabe destacar que el grado de reciprocidad demostró ser un rasgo altamente variable incluso a nivel intraespecífico.

ABSTRACT

STYLE POLIMORPHISM EXPRESSION OF *OREOPOLUS-CRUCKSHANKSIA* CLADE IN A PHYLOGENETIC CONTEXT

Distyly is a breeding system found in a small number of angiosperm families that is considered to reduce selfing and to increase outcrossing. It is a specialized stilar polymorphism in which the stamens and stigma are found in reciprocal positions (reciprocal herkogamy). Recently more subtle style polymorphisms such as mixed polymorphism and stigma-height dimorphism have been revealed in which the two floral morphs are not completely reciprocal. Rubiaceae is the angiosperm family characterized by the highest abundance of distylous species. *Cruckshanksia* Hook. & Arn. y *Oreopolus* Schlecht. (Rubiaceae, Rubioideae, Coussareeae) are endemic genera of Chile and Argentina. To date, their reproductive biology has been poorly studied. Distyly has been proposed for both genera, but stilar polymorphism expression has not been studied in detail. In addition, secondary pollen presentation (SPP) has been suggested. The taxonomic status and circumscription of *Oreopolus* y *Cruckshanksia* has been widely debated. All species have been included in *Cruckshanksia* as well as separated into two genera, but with different circumscriptions. In 1963 Ricardi recognized three species in *Oreopolus* whereas in 1996 Taylor recognized only one species in *Oreopolus* (*O. glacialis* (Poepp.) Ricardi). In this study, the occurrence and degree of reciprocal herkogamy and presence of SPP in *Oreopolus-Cruckshanksia* clade was evaluated at a population level. To test evolutionary trends in the clade, the first step involved clarifying the phylogenetic relationships of *Oreopolus-Cruckshanksia*. Phylogenetic reconstruction was undertaken, amplifying cpDNA

and rDNA sites principally using field-collected material. Style and anther heights were measured and the degree of reciprocal herkogamy quantified. Bud development was analyzed to assess SPP presence. The phylogenetic results support Taylor (1996) taxonomic circumscriptions. *O. glacialis* appears as sister group to all *Cruckshanksia* species. They also suggest that *Cruckshanksia* comprises two main lineages, one coastal and other of mountain distribution. In all populations studied two style morphs were found. The presence of SPP was not confirmed for any species in the clade. Three types of style polymorphisms were revealed: stigma-height dimorphism in *O. glacialis*; distyly and mixed polymorphism in *Cruckshanksia* species. Distyly was predominant in coastal species. In general, the upper whorls showed greater reciprocity than the lower floral whorls. Within the clade, style polymorphism expression showed weak phylogenetic signal, there being considerable variability at the intraspecific level in some species. Although reciprocal herkogamy was correlated with altitude, this relationship disappeared upon application of the comparative method.

INTRODUCCIÓN

Durante el proceso de diversificación los linajes adquieren variados rasgos morfológicos, fisiológicos y reproductivos que permiten su adaptación a las condiciones ambientales manifestadas a través del tiempo. Con respecto a la reproducción, en angiospermas se han descrito numerosos sistemas que promueven la xenogamia, favoreciendo así la mantención de la diversidad genética y la capacidad de adecuarse a cambios en el tiempo y el espacio. Un sistema de reproducción particular que ha sido motivo de gran interés es la heterostilia.

La heterostilia es un polimorfismo estilar especializado que contempla hercogamia recíproca y se acompaña en muchos casos por un sistema de autoincompatibilidad y rasgos florales secundarios (Barrett 1992). La hercogamia es la separación espacial de estigmas y anteras. En ella destacan dos arquitecturas, la hercogamia de aproximación (morfo longiestilo) donde las anteras se encuentran sobre los estigmas y la hercogamia revertida (morfo breviestilo) donde ocurre el caso inverso (Webb & Lloyd 1986). La hercogamia recíproca se presenta dentro de una misma población donde individuos diferentes exhiben dos (diestilia) o tres (triestilia) morfos caracterizados por flores que difieren recíprocamente en la posición de sus órganos sexuales (Barrett 1992) (Fig. 1). La hercogamia ha sido concebida como una estrategia que minimiza la autofecundación al disminuir el contacto entre los órganos sexuales de la flor (Webb & Lloyd 1986; Barrett 2002a; Lloyd & Yates 2014). Con respecto a la hercogamia recíproca y la heterostilia, Darwin (1877) fue el primero en proponer que la

posición relativa y recíproca de estigmas y anteras representa un mecanismo beneficioso para las especies al asegurar el traspaso de polen de una forma a otra. Actualmente muchos autores apoyan esta postura existiendo evidencia que lo comprueba en taxa particulares (Ganders 1974; Barrett & Glover 1985; Kohn & Barrett 1992; Lloyd & Webb 1992a; Massinga et al. 2005; Baena-Díaz et al. 2012). La heterostilia es conocida únicamente en angiospermas, donde tiene un origen polifilético, apareciendo de manera independiente en al menos 28 familias (Barrett 2000). Su manifestación más común es la diestilia.

Diferentes polimorfismos estilares

Si bien el conocimiento de la heterostilia se remonta al siglo XVI (van Dijk 1943), luego del exhaustivo trabajo hecho por Darwin en 1877 han aparecido múltiples estudios de carácter cuantitativo que describen categorías más sutiles de polimorfismos estilares. Por ejemplo, existen especies que presentan dos morfos con dos niveles de estigma pero con un único nivel de antera ("*dimorfismo estilar*") (Lloyd & Webb 1992b; Barrett 2000), especies donde se encuentran los dos morfos característicos de la diestilia junto con flores homoestilas (sin hercogamia) (Lloyd & Webb 1992b), especies que presentan dos morfos con dos niveles de estigma pero con una gran variación en la altura de las anteras ("*dimorfismo estilar relajado*") (Ferrero et al. 2009, 2011), y especies donde existen dos morfos pero solo una de las estructuras sexuales de la flor se corresponde con la estructura recíproca del morfo opuesto ("*heteromorfismo anómalo*" (Barrett 1988; Barrett & Richards 1990) o "*polimorfismo mixto*" (Ferrero et al. 2011)) (Fig. 1). Junto a estas situaciones se han observado casos de poblaciones que muestran una variación continua en el tamaño de los órganos definitorios del polimorfismo (Faivre & McDade 2001; Sánchez et al. 2008; Ferrero et al. 2011) implicando una pérdida de la

hercogamia recíproca entre morfos y dificultando en gran medida la categorización del reciprocidad. Bajo la perspectiva de Lloyd & Webb (1992b), la vía evolutiva hacia la hercogamia recíproca perfecta comprende estados intermedios de polimorfismo estilar. En su modelo sobre el origen de la heterostilia proponen que la condición ancestral sería la hercogamia de aproximación, le seguiría el dimorfismo estilar, y finalmente se alcanzaría la hercogamia recíproca. El sistema de incompatibilidad genética y los caracteres secundarios serían incorporados posteriormente.

Además de las categorías mencionadas, se conocen especies donde se ha comprobado que las funciones sexuales se potencian de manera distinta en ambos morfos (Levin 1968; Ganders 1974; Lewis 1982; Bjorkman 1995; Lau & Bosque 2003; Hernandez & Ornelas 2007) llegando incluso a estados denominados "subdioecía" (Riveros et al. 1987) y "dioecía críptica". En esta última situación, las flores presentan dos morfos morfológicamente hermafroditas pero funcionalmente unisexuales (Li et al. 2010; Liu et al. 2012). La expresión máxima de este fenómeno es la conversión completa a dioecía desde un ancestro con heterostilia, evento conocido como "especialización de Gender" (Beach & Bawa 1980; Paillet et al. 1998; Barrett 2002b; Tippery et al. 2008). Todo ello indica que los polimorfismos estilares serían mucho más lábiles evolutivamente de lo que fueron concebidos originalmente.

Modelo de Lloyd y Webb (1992)

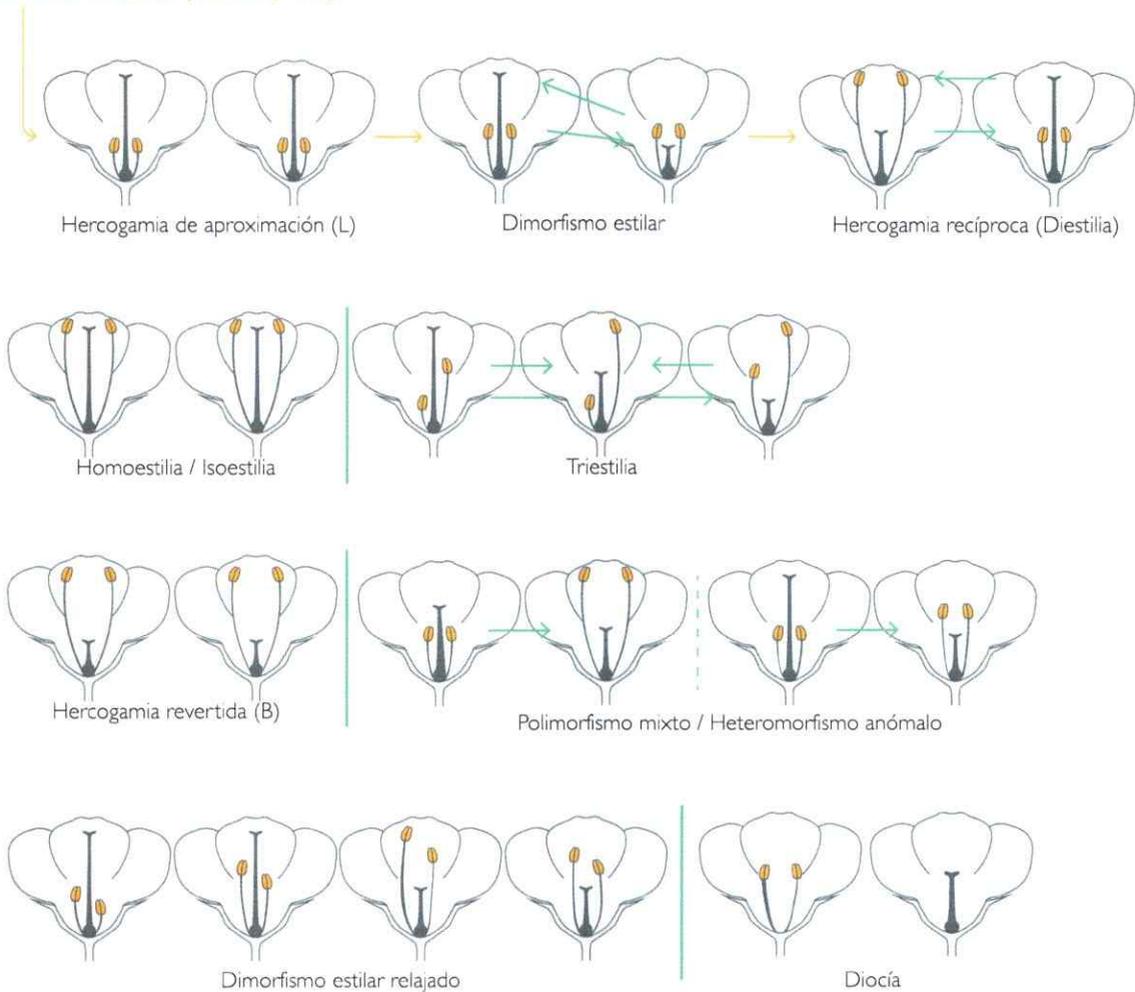


Figura 1. Diferentes polimorfismos estilares. Hermogamia de aproximación (L), dimorfismo estilar, hermogamia recíproca (diestilia), homoestilia, triestilia, hermogamia revertida (B), polimorfismo mixto (en sus distintas posibilidades), dimorfismo estilar relajado y dioecia. La sucesión de los tres primeros polimorfismos es parte de la vía evolutiva hacia la heterostilia propuesta por Lloyd & Webb (1992b).

Sistema reproductivo en la familia Rubiaceae

Rubiaceae es la familia con la mayor representación de géneros heterostilos conocida (Darwin 1877; Vuilleumier 1967). Sin embargo hasta la fecha, el grado de reciprocidad entre los órganos sexuales, información relevante para precisar la naturaleza del polimorfismo estilar y entender las transiciones evolutivas entre sus diferentes expresiones, solo ha sido estudiada en una fracción de las especies con esta condición y generalmente sin abarcar la totalidad de los géneros estudiados (Richards & Koptur 1993; Faivre & McDade 2001; Faria et al. 2011; Sampson & Krebs 2012). La familia Rubiaceae presenta una gran variedad de sistemas de reproducción que se asocian predominantemente a cada una de sus tres subfamilias (Bremer & Eriksson 2009). En Rubioideae es común la heterostilia, en Ixoroideae la presentación secundaria de polen (PSP) y en Cinchonoideae ambos sistemas (Robbrecht 1988). Se suele distinguir como mecanismo de polinización "ixoride" cuando se hace referencia a PSP en Rubiaceae (Bremekamp 1966; Nilsson & Rabakonandrianina 1990). Esto debido a que en esta familia el polen se caracteriza por recaer siempre en el extremo superior estilo o cara externa del estigma (presentador de polen en Rubiaceae). Las plantas que presentan esta condición por lo general son homostilas y protándricas (Puff & Robbrecht 1996). De esta forma, tanto el polen como el estigma se sitúan en la misma posición pero en momentos distintos (característica de la protandria), reduciendo la posibilidad de autopolinización, facilitando al mismo tiempo el contacto entre las anteras y el presentador de polen y optimizando la entrega y recepción de polen por parte del polinizador (Carolin 1960; Howell et al. 1993). La coocurrencia de polinización "ixoride" y hercogamia de aproximación se encuentra excepcionalmente en especies donde el estigma elonga de manera retrasada, posterior a la recepción del polen desde las anteras (Imbert & Richards 1993).

El clado Oreopolus-Cruckshanksia

Cruckshanksia Hook. & Arn. y *Oreopolus* Schlecht. son dos géneros endémicos de Chile y Argentina pertenecientes a la familia Rubiaceae, subfamilia Rubioideae y tribu Coussareeae (Bremer & Eriksson 2009). Coussareeae es una tribu neotropical propia de América que se distribuye principalmente en Sudamérica (Bremer & Manen 2000; Robbrecht & Manen 2006). En base a la información filogenética disponible hasta el momento se reconocen ocho géneros cuyas relaciones se encuentran parcialmente resueltas. Los clados "*Coussarea-Faramea*" y "*Oreopolus-Cruckshanksia*" son los únicos que se encuentran bien sustentados (Bremer & Eriksson 2009). El clado "*Oreopolus-Cruckshanksia*", objeto de estudio de la presente tesis, está compuesto de ocho especies reconocidas según la última revisión taxonómica del grupo (Taylor 1996).

En el clado *Oreopolus-Cruckshanksia* se ha descrito de manera general la presencia de diestilia. Esta conclusión se fundamenta mayoritariamente en observaciones de herbario (Taylor 1996). La autora habla de formas longiestilas y breviestilas representadas en igual proporción, para especímenes de herbario de una misma colección en el caso del género *Oreopolus*. Además, afirma que los estigmas se encuentran exsertos en todas las flores longiestilo observadas. En *Cruckshanksia* asevera que vio ambas formas representadas en poblaciones de dos especies y que también fueron vistas en muestras herborizadas de las cinco especies restantes, pero a diferencia de *Oreopolus*, no aclara que hayan sido encontradas en la misma colección. En estudios previos, Ricardi & Quezada (1963) reportaron muestras de herbario con flores "macro y microstilos" en cuatro especies de *Cruckshanksia* y únicamente "microstilos" en las tres especies restantes. Basándose en estas observaciones afirman: "Con

seguridad debe ser general para todas las especies la existencia de individuos macro y microstilos quedando la comprobación definitiva para futuros estudios de poblaciones". Para las especies del género *Oreopolus*, Ricardi (1963) observa que la heterostilia es muy frecuente. Anterior a Ricardi & Quezada (1963), la única observación existente sobre este rasgo la realiza Reiche (1902), quien habla de "*Flores con órganos ♂ i ♀, pero probablemente unisexuales (o heterostilosas?)*".

Taylor (1996) también ha mencionado la presencia de PSP en *Cruckshanksia*, género de supuesto carácter diestílico. La propuesta se basa en el registro de granos de polen adosados a la pubescencia de la cara abaxial del lóbulo del estigma en muestras herborizadas. Además, a partir de flores adultas del morfo longiestilo que aparentemente no tendrían el estigma exserto, sugiere que el estilo en este morfo elongaría de manera retrasada, posterior a la antesis. A partir de ambas características Taylor (1996) sugiere que en flores longiestilas podría existir un mecanismo de polinización "ixoroide".

Es importante señalar que en su interior, el clado *Oreopolus-Cruckshanksia* ha sufrido inestabilidad taxonómica a lo largo de casi dos siglos, existiendo opiniones encontradas con respecto al reconocimiento de ambos. El género *Cruckshanksia* fue descrito el año 1833 por William J. Hooker y George Arnott W (Hooker 1833). Seguido por *Oreopolus* en 1856 por Diederich von Schlechtendal (Schlechtendal 1856). Los dos géneros han sido sinonimizados en dos ocasiones (Schumann 1891; Reiche 1902). En las últimas revisiones se acepta la existencia de ambos pero se difiere en la asignación de especies entre ellos. En la rehabilitación del género *Oreopolus*, Ricardi (1963) agrupa a las especies: *O. glacialis* Poepp. et Endl, *O. palma* (Clos) Ricardi y *O. macranthus* (Phil.) Ricardi. Y en *Cruckshanksia*, Ricardi y Quezada (1963)

reconocen siete especies. Con una opinión diferente, Taylor (1996) considera al género *Oreopolus* como monotípico, compuesto solo por *O. glacialis* y renombra dentro de las siete especies de *Cruckshanksia* (distintas a las de Ricardi y Quezada (1993)) a *O. palma* y *O. macranthus* como *C. palmae* Clos y *C. macrantha* Phil. Con respecto a la circunscripción de ambos géneros, Puff (1988) en un trabajo sobre la posición taxonómica del género *Carphalea*, realiza el siguiente comentario acerca de *Cruckshanksia* y *Oreopolus*: "De todos modos, los dos géneros están muy estrechamente relacionados, y es quizás un asunto de gusto personal el mantenerlos o no separados a nivel genérico" (traducción desde el inglés).

Los antecedentes de diestilia y PSP en el clado *Oreopolus-Cruckshanksia*, junto con la incertidumbre taxonómica del grupo, convierte a este clado en un interesante y desafiante grupo de estudio para indagar posibles transiciones entre diferentes expresiones de polimorfismo estilar. Surgen, entre otras, las siguientes preguntas: a) ¿Existe hercogamia recíproca perfecta en todas las especies?; b) En caso de manifestarse PSP en el clado ¿Cuán generalizada es?; c) ¿Hay una tendencia hacia la pérdida de hercogamia recíproca en especies con presunta PSP?; c) De haber diferentes expresiones de polimorfismo estilar en el grupo ¿Cuál sería el estado ancestral?

Para entender la evolución del sistema de reproducción del grupo, es imprescindible desentrañar las relaciones filogenéticas entre ambos géneros y revisar sus asignaciones a nivel específico, verificando la monofilia del clado. En base a lo anterior, cabe preguntarse de manera adicional: d) ¿Hay apoyo filogenético para mantener al clado *Oreopolus-Cruckshanksia* como géneros separados?; de ser así y considerando las posturas de Ricardi (1963); Ricardi & Quezada (1963) y Taylor (1996) ¿Cual circunscripción se sustenta filogenéticamente?

Objetivo general

Mediante un estudio detallado de la morfología floral y la reconstrucción filogenética molecular del clado *Oreopolus-Cruckshanksia*, estudiar la expresión del polimorfismo estilar, evaluar la presencia de presentación secundaria del polen y establecer posibles transiciones entre sus estados en el clado *Oreopolus-Cruckshanksia*. En forma complementaria, evaluar si hay sustento filogenético para la mantención de los dos géneros y la asignación de especies entre ellos, según Ricardi (1963) y Ricardi & Quezada (1963) en oposición a Taylor (1996).

Objetivos específicos

- Establecer las relaciones filogenéticas y tiempos de divergencia para el clado *Oreopolus-Cruckshanksia*.
- Verificar la presencia y expresión del polimorfismo estilar junto con el grado de isopletia (en el caso de encontrar más de un morfo) en poblaciones representativas de todas las especies del clado.
- Evaluar la existencia y distribución de presentación secundaria de polen en poblaciones representativas de todas las especies del clado.
- Trazar la evolución del sistema de reproducción sobre una hipótesis filogenética.

En esta tesis se pretende contestar las siguientes preguntas:

1. ¿Existe evidencia filogenética que apoye la mantención de *Oreopolus* y *Cruckshanksia* como géneros separados?
2. En relación a la pregunta anterior, ¿Son *C. palmae* y *C. macrantha* más cercanas a *O. glacialis* (Ricardi 1963), o a las demás especies de *Cruckshanksia* (Taylor 1996)?
3. ¿Existe variación en la expresión de polimorfismo estilar en los géneros estudiados?
4. ¿Existe coocurrencia de hercogamia y PSP en el clado *Oreopolus-Cruckshanksia*?
5. ¿Cuál es la tendencia evolutiva del sistema de reproducción en el clado?

METODOLOGÍA

Descripción del grupo de estudio

Las especies pertenecientes al clado *Oreopolus-Cruckshanksia* se distribuyen en los ecosistemas terrestres de: matorral desértico, matorral bajo de altitud, herbazal de altitud y estepas y pastizales (Pliscoff & Luebert 2006). Las especies de *Cruckshanksia* se encuentran entre las latitudes 23° y 34°S y la especie *O. glacialis* entre los 33° y 54°S (Fig. 2, Apéndice 1).

- *Cruckshanksia* Hook. & Arn (sensu Taylor 1996) está compuesto por cojines hemicriptófitos y hierbas anuales. Su distribución comprende el Desierto de Atacama y los Andes de la zona norte y el centro de Chile junto con sectores adyacentes en Argentina (Fig. 2, Apéndice 1). Se caracteriza por presentar hojas opuestas y estípulas que van desde triangulares a bilobuladas o erosas. Sus flores están dispuestas en cimas terminales y muestran dos morfos estilares. La corola es amarilla con un tubo largo y delgado. En varias especies el cáliz tiene un apéndice petaloide de color amarillo, rosado o blanco que al secarse es de aspecto similar a papel (Fig. 3). El fruto es una cápsula loculicida. La única especie anual, *C. pumila*, crece en regiones del Desierto de Atacama que solo reciben lluvia cada tres o cinco años, especialmente en presencia del "Niño". *C. hymenodon* es la especie tipo. Esta última es ampliamente distribuida y colectada (Taylor 1996).

- *Oreopolus* Schltdl (sensu Taylor 1996) es un género monotípico, constituido por la especie *Oreopolus glacialis*, un cojín hemicriptófito leñoso, de hojas suculentas con raíces gruesas y profundas. Se distribuye entre la Región Metropolitana de Chile y Tierra del Fuego a lo largo de la Cordillera de los Andes sobre los 3000 msnm. y en la Estepa Patagónica de Chile y Argentina (Fig. 2). Presenta hojas ternadas con estipulas triangulares interpeciolares. Las flores muestran dos morfos estilares, se presentan solitarias o agrupadas de a pocas en racimos axilares terminales. La corola es amarilla y tiene un tubo largo y delgado (Fig. 3). Su fruto es una cápsula loculicida (Taylor 1996).

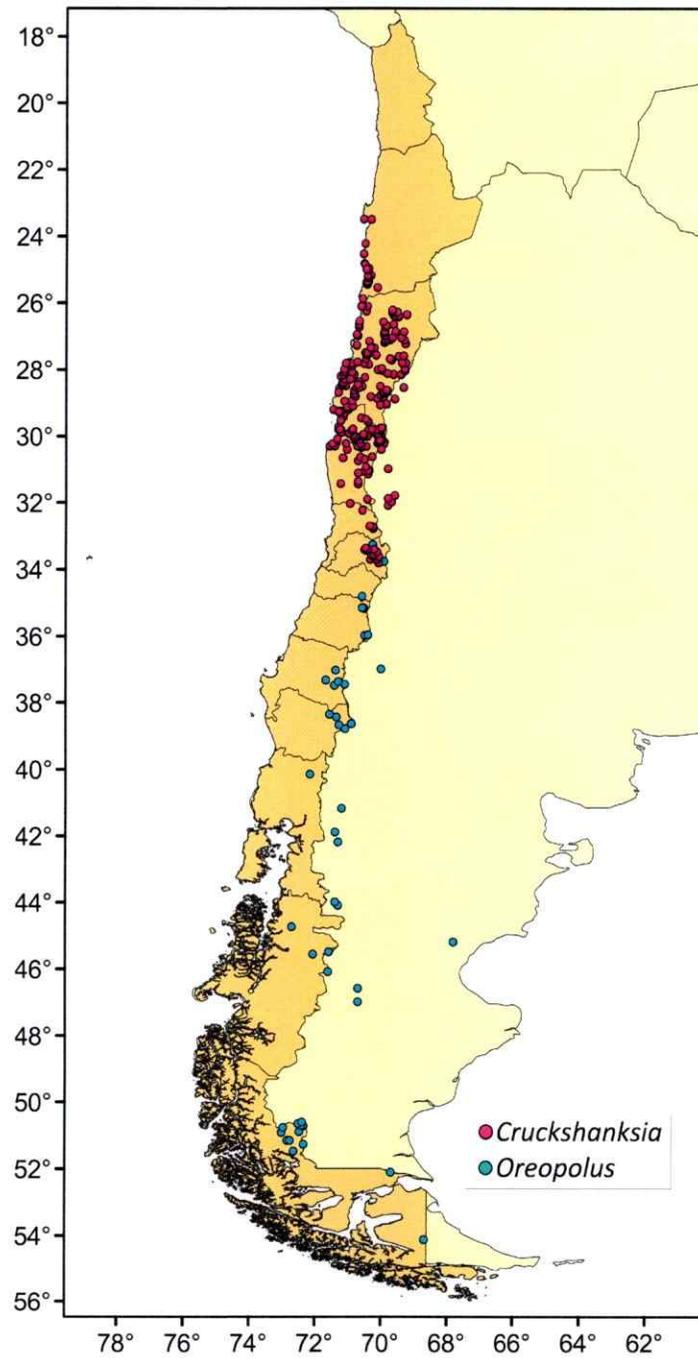


Figura 2. Distribución de los géneros *Cruckshanksia* y *Oreopolus*. Los datos de ocurrencia provienen de bases de datos de herbarios (CONC, USL), colecta personal y proyecto "Flora Argentina"¹.

¹ <http://www.floraargentina.edu.ar/>



Figura 3. Detalle del clado *Oreopolus-Cruckshanksia*. (1) *O. glacialis*, (2) *C. palmae*, (3) *C. macrantha*, (4) *C. hymenodon*, (5) *C. lithiophila*, (6) *C. pumila*, (7) *C. montiana*, (8) *C. verticillata*.

Reconstrucción filogenética

Obtención de muestras para extracción de DNA

Durante la temporada de primavera-verano del 2012-2013 se colectaron muestras de material foliar que fueron almacenadas en sílica. Adicionalmente, se trabajó con material herborizado de la Universidad de Concepción (CONC) y la Universidad de La Serena (ULS). A partir de ambas fuentes se obtuvo material de las ocho especies del clado *Oreopolus-Cruckshanksia* de acuerdo al tratamiento taxonómico de Taylor (1996), abarcando 36 poblaciones diferentes (Apéndice 2). A pesar de la sequía que rigió en el desierto los años 2012 y 2013, la única especie que no fue encontrada en terreno fue *C. pumila*.

Selección del grupo interno y externo

El grupo interno se conforma de las ocho especies del clado *Oreopolus-Cruckshanksia*: *C. palmae*, *C. macrantha*, *C. lithiophila*, *C. pumila*, *C. hymenodon*, *C. montiana*, *C. verticillata* y *O. glacialis* (Taylor 1996). Para el grupo externo se obtuvieron muestras tanto de herbario (CONC) como de GenBank² (GB). Los taxa seleccionados corresponden a los niveles de tribu y subfamilia del clado estudiado dentro de la familia Rubiaceae. De la tribu Coussareeae, se usaron las especies *Faramea crassifolia* (GB) y *Coussarea hydrageifolia* (GB) y de la subfamilia Rubioideae, se utilizó *Hedyotis salzmannii* (tribu Spermaceae; CONC) en representación de la alianza Psychotrieae-Spermaceae, perteneciente al grupo hermano de la tribu Coussareeae (Bremer & Eriksson 2009).

² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Extracción, amplificación y secuenciación de DNA

El DNA genómico fue extraído a partir de 40 mg. aproximadamente de tejido foliar. Se utilizó el set de extracción de DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen siguiendo el protocolo sugerido por el producto (JanBen 2006), y las modificaciones propuestas por (Drabkova et al. 2002). En la amplificación del DNA mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se utilizó la zona de DNA nuclear ribosomal (rDNA) ubicada en la región del espaciador transcriptor interno ITS, usando los partidores ITS-4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' e ITS-5: 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' (White et al. 1990). También se utilizaron las regiones espaciadoras de DNA plastidial (cpDNA) trnL-trnF y rpl32-trnLUAG (Taberlet et al. 1991), utilizando sus correspondientes partidores trnL: 5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3', trnF: 5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3' y rpl32: 5'-CAGTTCCAAAAAACGTAAGTTC-3', trnLUAG: 5'-CTGCTTCTAAGAGCAGCGT-3'. La reacción de PCR se llevó a cabo para un volumen total de 30 μ L que contuvieron: 50 ng de DNA (en algunas muestras de herbario se utilizaron 100ng); 1,8 pmoles de cada partidor; 2,4 nmoles de mezcla de dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato); 1,25 u de TaqDNA polimerasa³; 75 nmoles de MgCl₂; 24 μ g de albumina de suero bovino (BSA), y 6 μ L de Buffer Colorless GoTaq de Promega (para llevarlo a una concentración de 1x en el volumen final). La amplificación se ejecutó en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). Para los casos de ITS4-5 y trnL-F se utilizó el mismo programa de 35 ciclos que contempla: 45 s a 94 °C de desnaturalización inicial; 1 min a 60 °C⁴ de alineamiento y 1,5 min a 72°C de elongación. Antes de los ciclos se inicia el proceso con 5 min a 94 °C y una vez

³ Una u es definida como la cantidad de enzima requerida para catalizar la incorporación de 10 nmoles de dNTP.

⁴ La temperatura de alineamiento varió entre 56 y 62°C dependiendo de la muestra. En la mayoría de los casos se usó 60°C.

terminados los ciclos se finaliza con 7 min a 72 °C. Una vez terminado el PCR las muestras se conservaron a 4°C. Para el caso de rpl32-trnLUAG el programa fue de 30 ciclos que contemplaron: 1 min a 95 °C de desnaturalización inicial; 1 min a 60 °C de alineamiento⁵ y 5 min a 69 °C de elongación, donde el aumento de la temperatura para llegar a este paso se hizo con un gradiente de 0,3 °C/s. Antes de los ciclos se inició el proceso con 5 min a 95 °C y una vez terminados los ciclos se finalizó con 5 min a 65 °C. Una vez finalizado el PCR las muestras se conservaron a 4 °C. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 % (agarosa sólida diluida en buffer TAE al 1X (Tris, acetato y EDTA)), teñidos con GelRed (2 µL del producto para 50mL de agarosa líquida). La electroforesis se efectuó a 80 v durante 40 min. Luego se visualizaron los geles en un transiluminador UV (Electronic). En las muestras que mostraron dos amplificaciones distintas ("dos bandas"), la banda correcta fue escogida según la cantidad de pares de bases del correspondiente partidor, cortada y extraída del gel para ser posteriormente purificada con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Promega.⁶

Secuenciación, edición y alineamiento de secuencias

Las muestras de DNA amplificado fueron enviadas a secuenciar a Macrogen (Corea). Con el propósito de comprobar que las secuencias obtenidas como resultado a partir de electroferogramas correspondieran a taxa vegetales del grupo de estudio y no a la amplificación de contaminantes, se utilizó la aplicación de comparación de similitud BLAST

⁵ La temperatura de alineamiento varió entre 56 y 62°C dependiendo de la muestra. En la mayoría de los casos se usó 60°C.

⁶ Los geles para purificar se realizaron en agarosa al 2% y se dejaron correr en electroforesis por 4 hrs. aproximadamente para lograr una buena separación de las bandas.

(Basic Local Alignment Tool)⁷. Las secuencias en buen estado fueron editadas y alineadas en el programa BioEdit versión 7.0 (Hall 1999) mediante inspección visual y la herramienta ClustalW Multiple Alignment.

Análisis filogenético

A partir del DNA extraído de 116 individuos se seleccionaron 38 que presentaron las tres regiones de DNA amplificadas. Los análisis filogenéticos se realizaron mediante las aproximaciones algorítmicas de Parsimonia e Inferencia Bayesiana. Se usó la información de los tres marcadores de manera independiente y combinada para realizar en total cinco reconstrucciones: rDNA (ITS5) bajo las dos aproximaciones algorítmicas, cpDNA (trnL y rpl32 concatenados) bajo las dos aproximaciones algorítmicas y evidencia total (los tres marcadores concatenados) bajo la aproximación de Inferencia Bayesiana.

En la reconstrucción filogenética, no fueron considerados los "gaps" (nucleótidos faltantes en el alineamiento). A pesar de que sí mostraban similitudes entre las distintas secuencias, no resultaron ser informativos, ya que en la mayoría de los casos entregaban información redundante equivalente a los sitios polimórficos o correspondían a autapomorfías de cada especie.

Los análisis de Inferencia Bayesiana se realizaron en MrBayes v3.2.1 (Ronquist et al. 2012). Previamente, se evaluó el modelo más simple que se ajusta a cada set de datos utilizando jModelTest 2.1.3 (Darriba et al. 2012), en el cual se consideran los tipos de sustituciones nucleotídicas y se evalúa si corresponde medir la tasa de heterogeneidad de gamma (G) y la proporción de sitios invariantes (I) según el criterio de información de Akaike

⁷ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

corregido (AICc). Para construir los árboles, se usaron los algoritmos de Metrópolis y Montecarlo vía Cadenas de Markov (MC³) con dos análisis independientes de 10 millones de generaciones y cuatro cadenas de Markov (una fría y tres calientes), cada uno a partir de un árbol elegido al azar. Del mismo modo, los parámetros fueron muestreados cada 1000 generaciones y se desechó el 25 % de las primeras muestras. Se computó el consenso con todos los grupos compatibles del árbol, incluyendo componentes combinables e información sobre largo de las ramas, para todos los árboles muestreados posterior a la estacionalidad de las búsquedas. Para determinar el soporte de los nodos, se realizaron pruebas de probabilidad a posteriori, donde se consideró un nodo bien soportado aquel con un valor mínimo de 0,95 (Ronquist et al. 2012).

Con la finalidad de evaluar si los set de datos eran congruentes se realizó el test de homogeneidad (Farris et al. 1995) implementado en PAUP*4.0b10 (Swofford 2003). En el caso de cpDNA (trnL + rpl32) los datos fueron homogéneos ($P = 0,33$). Distinto ocurrió al evaluar los tres marcadores donde el resultado indicó que las particiones no debían ser concatenadas ($P < 0,01$); por esta razón no se realizó un análisis de evidencia total bajo el algoritmo de Parsimonia. Sin embargo, si se realizó en Inferencia Bayesiana ya que MrBayes es capaz de aplicar modelos independientes a cada partición sin necesidad de evaluar su compatibilidad.

El análisis de Parsimonia fue realizado en el programa PAUP*4.0b10 (Swofford 2003). Se excluyeron los caracteres no informativos. Los caracteres utilizados fueron tratados como no ordenados, asignándoles igual peso (Broughton et al. 2000). Se hizo una búsqueda heurística de los árboles más parsimoniosos, conducidas con el algoritmo de "barrido de ramas" (branch-swapping) por bisección y reconexión del árbol (tree-bisection-reconnection: TBR) con adición

aleatoria de taxa al árbol inicial (100 réplicas). Finalmente se determinó el soporte de los nodos mediante un bootstrap no paramétrico de 5000 iteraciones, donde se consideró un nodo bien soportado por sobre un 70% del valor de bootstrap (Hillis & Bull 1993).

Estimación de los tiempos de divergencia

Se utilizó la técnica de reloj molecular, la cual estima el tiempo transcurrido a partir de diferencias entre las secuencias de DNA. La calibración se realizó mediante dos puntos: (i) análisis moleculares previos, se dató en 65,4 Ma (Bremer & Eriksson 2009) el nodo correspondiente a la edad mínima de la tribu Coussareeae, vale decir, la edad corresponde al momento en el cual diverge de su grupo hermano (alianza Psychotriaceae-Spermacoceae) y (ii) información de polen fósil encontrado en Panamá del género *Faramea* reportado para el Eoceno tardío ~34–40 Ma (Graham 1985). Se dató en 37 Ma la edad mínima del nodo formado entre *Faramea* y su grupo hermano *Coussarea*. El análisis se realizó en el programa Beast versión 1.8 (Drummond et al. 2012) que estima la filogenia y los tiempo de divergencia simultáneamente. Se respetó la partición de los datos y los modelos de evolución de cada marcador. Se trabajó sobre 13 taxa debido a que en la hipótesis filogenética obtenida en MrBayes cada especie se encontraba sobrerrepresentada. El análisis se restringió mediante la asignación previa de grupos monofiléticos para conservar la misma topología de la hipótesis filogenética obtenida en el análisis previo. Se asumió un modelo de reloj molecular relajado, el cual considera que las tasas de sustitución no son constantes y para el modelo de especiación se utilizó "Birth-Death Process". Se corrieron 100 millones de iteraciones de las cuales se quemó el 25%. La convergencia del análisis fue verificada en el programa Tracer v.1.8 y el árbol final fue reconstituido con el programa TreeAnnotator v.1.8.

Con el objetivo de comparar los tiempos de divergencia arrojadas con distintos acercamientos, se realizó una segunda calibración utilizando datos de tasas de sustitución para taxa vegetales herbáceos de otros grupos. A ITS5 se le asignó una tasa de 3×10^{-9} y al trnL una de $8,24 \times 10^{-9}$ cambios por sitio por año (Richardson et al. 2001), el valor de rpl32 se dejó por defecto ya que no fue documentado. El resto de los parámetros fueron los mismos que se utilizaron en el análisis mediante puntos de calibración.

Sistema reproductivo en el clado Oreopolus-Cruckshanksia

Obtención y conservación de muestras

Durante los meses de septiembre del 2012 y enero del 2013 se realizó el trabajo de terreno a razón de la época de floración de cada especie según las fechas de colecta de herbario (CONC y ULS). El género *Oreopolus* fue abordado en la Cordillera de los Andes de la Región Metropolitana y el género *Cruckshanksia* entre las regiones de Antofagasta y Coquimbo. Se consiguió al menos una población para cada especie (en algunas especies se usó dos o tres) con la excepción de *C. pumila* que no fue localizada en terreno a pesar de revisar muchas localidades con registros previos. Esta especie es de carácter anual y se ve altamente afectada en los años de sequía.

En un total de 18 poblaciones representando siete especies, se colectó una inflorescencia de cada individuo para todas las plantas con presencia de flores en poblaciones pequeñas, y para una fracción representativa (200 a 1000 ind.) en poblaciones grandes a través de un muestreo aleatorio. Además, en una población de cada especie se procedió a coleccionar inflorescencias con flores en estado de yema intentando conseguir alrededor de 30 individuos

según la disponibilidad del estadio. El material colectado fue almacenado en alcohol 70% v/v para su posterior medición en el laboratorio.

Determinación de frecuencia de morfos florales

En cada población se verificó visualmente en terreno la presencia de dos morfos estilares. Las inflorescencias colectadas, antes de ser almacenadas, fueron contabilizadas y separadas por morfo para obtener la frecuencia de individuos longiestilo (L) y breviestilo (B). Las plantas L correspondieron a aquellas con flores donde el estigma mostraba una altura superior al nivel de las anteras y las B al caso inverso. En el clado *Oreopolus-Cruckshanksia* la determinación del morfo se puede realizar fácilmente incluso en estado de yema, ya que las flores L presentan un engrosamiento en la parte superior del tubo de la corola, lugar donde se alojan las anteras (Taylor 1996).

Medición de rasgos florales

Se realizaron mediciones en tres poblaciones de *C. montiana* (dos del sector sur de su distribución y una del norte) y *C. palmae*, dos poblaciones de *C. hymenodon*, *C. macrantha* y *O. glacialis* y una población de *C. verticillata* y *C. lithiophila*. A partir de las muestras almacenadas en alcohol, de cada inflorescencia se tomó al azar una flor adulta en buen estado para ser medida en representación de un individuo. Con la excepción P16 de *C. macrantha* donde solo se consiguieron 37 ind. en total, se midieron flores de al menos 60 individuos de cada población, 30 de cada morfo.

A partir de imágenes digitales se midieron ocho rasgos florales, entre ellos los definatorios de la hercogamia recíproca. Se montó una placa de Petri sobre una regla de un

centímetro de largo en una lupa Zeiss (Stemi 2000-C). Una cámara digital Canon Power Shot A610 fue adaptada y conectada simultáneamente a la lupa y a un computador con Windows XP. Desde el computador, a través de la herramienta Disparo Remoto de Canon se realizó una fotografía de cada flor. Las flores seleccionadas se manipularon dentro de la placa con alcohol 70% v/v para evitar la reducción de estructuras debido a desecación. Cada flor se disecó bajo la lupa a lo largo del tubo de la corola hasta dejar expuestas las anteras en ejemplares B. Posteriormente, a partir de las fotografías, se realizaron las mediciones en el programa de análisis y procesamiento de imágenes Image J (Abràmoff et al. 2004). Los rasgos medidos en flores adultas fueron: desde la base del ovario se registró (1) el largo del tubo de la corola, (2) la altura de una antera, y (3) la altura del estigma. La altura de anteras y estigmas fue definida hasta el punto medio de cada estructura, justo donde se inserta el filamento en el caso de las anteras y entre el punto de bifurcación y el extremo en el caso de los estigmas (estigma de tipo bífido). Además, se registró (4) el tamaño de una antera, y (5) el tamaño del estigma. Desde un lóbulo de la corola de cada flor se obtuvo (6) el área del pétalo y (7) el perímetro del pétalo. También fue medido (8) el ancho del tubo de la corola en su base (Fig. 4). A partir de estos datos se obtuvo la distancia estigma-antera (hercogamia) calculada como la sustracción de la altura del estigma y la altura de la antera de cada flor y la razón perímetro/área del pétalo, calculado como el cociente entre el perímetro y el área del lóbulo de la corola medido.

Tanto el largo del tubo de la corola como la altura de estigmas y anteras se midieron desde la base del ovario y no desde su ápice debido a que en algunas especies los lóbulos del cáliz no permitieron distinguir los límites superiores del ovario. De todos modos, con el objetivo de garantizar el criterio de medición, se comparó el tamaño de los ovarios entre morfos para

una población de cada especie (se utilizaron 30 individuos por morfo para P2, P5, P12, P15, P19 y P11. *C. palmae* no fue medida dado el gran impedimento de sus lóbulos).

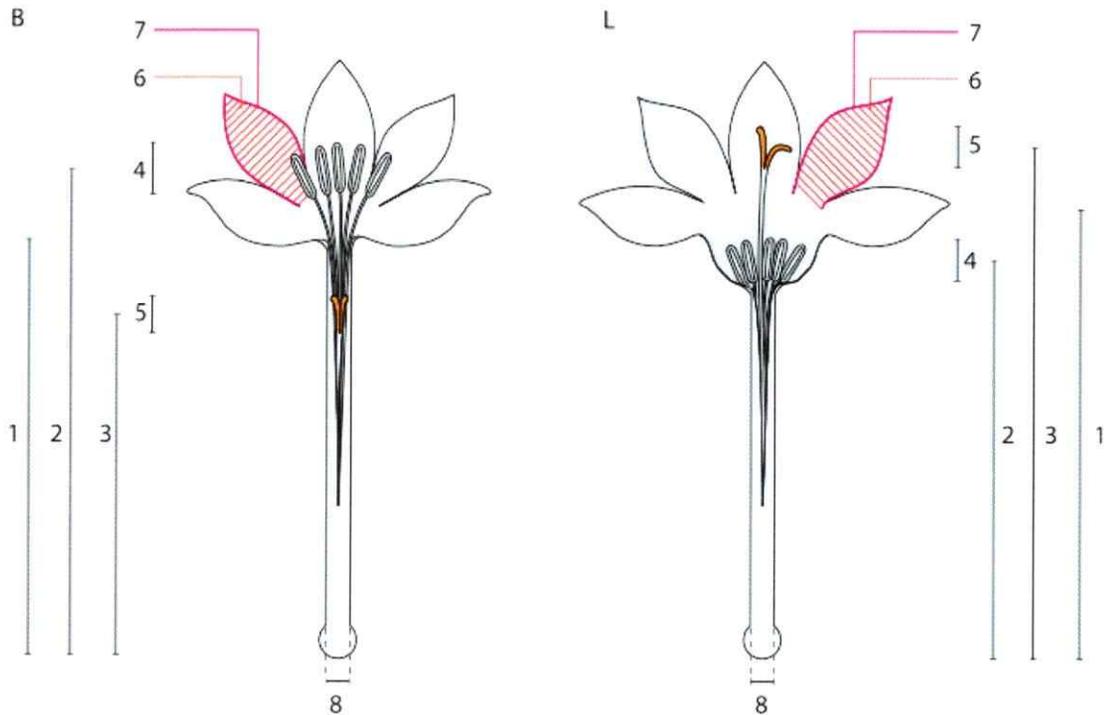


Figura 4. Rasgos florales medidos en flores de ambos morfos, (B) breviestilo y (L) longiestilo. (1) largo del tubo de la corola, (2) altura antera, (3) altura estigma, (4) tamaño antera, (5) tamaño estigma, (6) área pétalo, (7) perímetro pétalo y (8) ancho tubo.

Se graficó la altura del estigma y las anteras de cada individuo de manera creciente ordenado por la altura del estigma. El diagrama que se obtiene revela la existencia morfos y la magnitud de la distancia estigma-antera (hercogamia) en cada caso (Fig. 8).



Presentación secundaria de polen

Para que exista presentación secundaria de polen junto con hercogamia de aproximación, deben cumplirse dos condiciones durante el desarrollo de la flor: (1) En la fase de yema, el interior de las anteras debe encontrarse en estrecho contacto con la cara externa de los lóbulos del estigma o porción superior del estilo (estructuras equivalentes al receptáculo de polen de PSP en Rubiaceae) y (2) la apertura de las anteras (dehiscencia) se debe anteponer a la antesis de la flor. De esta forma, los granos de polen podrían ser depositados en la cara exterior del estigma en la etapa de yema y así luego de la antesis los estilos elongar o enderezarse llevando el polen sobre el nivel del tubo de la corola (Igersheim 1993). Esta es la única forma de que PSP coexista con el morfo L de una especie con heterostilia (Fig. 5).

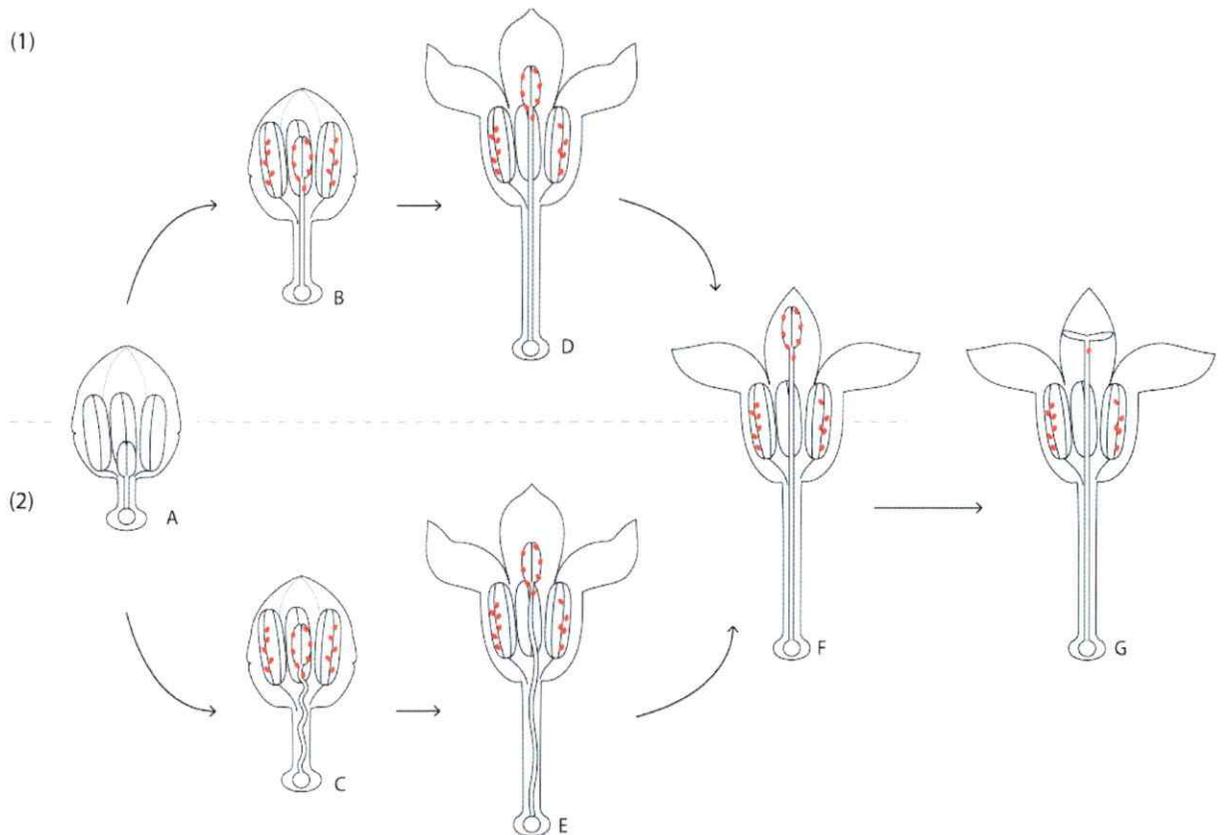


Figura 5. Modelo de presentación secundaria de polen en un yema de *Cruckshanksia*. (1) estigma que elonga posterior a la antesis y (2) estigma que se endereza posterior a la antesis. (A) yema con anteras y estigma joven, (B-C) yema con anteras dehiscentes y polen adosado a la cara externa del estigma joven, (D-E) antesis floral, (F) flor presentando polen (G) flor madura con estigma receptivo.

En una población de cada especie, a partir de las inflorescencias fijadas en estadio inmaduro, se midieron todas las yemas y flores abiertas con el objetivo de tener una sucesión de desarrollo para cada planta. La metodología fue la misma que se empleó en flores adultas con la única diferencia de que aquí se registraron solo tres rasgos. Desde la base del ovario se midió (1) el largo del tubo de la corola, (2) la altura de una antera y (3) la altura del estigma. El criterio de medición (en 2 y 3) fue el mismo que en flores adultas, ya que desde estadios muy

tempranos el estigma se mostró bifurcado (Fig. 4). A partir de estos datos se obtuvo la distancia estigma-antera (hercogamia). Junto con las mediciones, se registró el estado de la antera, es decir, si es que el polen había sido expulsado debido a la dehiscencia.

Análisis de Datos

Con el objetivo de describir, analizar y categorizar las formas estilares encontradas en las especies y poblaciones estudiadas, se procedió a evaluar la existencia de diferencias estadísticas entre las formas L y B para los rasgos medidos. Se probaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los datos mediante los test Shapiro-Wilks y F-Snedecor respectivamente, con el mismo fin se observaron histogramas, boxplot y gráficos de cuartil. En los grupos de datos que cumplieron los supuestos se hicieron comparaciones entre morfos dentro de cada población mediante la prueba T-Student y en los conjuntos de datos que violaron los supuestos fue usado el test de estadística no paramétrica U-Wilcoxon Mann-Whitney. Para estudiar desviaciones en la isoplethia se utilizó el test de χ^2 .

Los datos fueron trabajados en el software R versión 3.1 (R Development Core Team 2008) a través de la interfaz RStudio versión 0.98 (RStudio 2012). Junto con la aplicación Microsoft Excel de Office 2010.

Reciprocidad

Existen distintas aproximaciones para estudiar el grado de reciprocidad o hercogamia recíproca (Lloyd et al. 1990; Richards & Koptur 1993; Eckert & Barrett 1994; Lau & Bosque 2003; Sánchez et al. 2008, 2013). Se trabajó con dos de ellas que incorporan de mejor manera la variabilidad de la población.

1) *Índice de reciprocidad* (Sánchez et al. 2008, 2013): Señala el grado de reciprocidad para una población mediante un valor único que se ubica entre cero y uno (el cero indica reciprocidad perfecta). El índice reúne la información de los índices de reciprocidad relativos para cada nivel de verticilo donde el nivel superior corresponde a las anteras del morfo B con los estigmas del morfo L y el nivel inferior a las anteras del morfo L con los estigmas del morfo B. El índice de reciprocidad relativo corresponde al promedio de todos los valores de distancia estigma-antera posibles para un nivel, corregido por la media del tamaño de todos los estigmas y anteras de la población:

$$r_a = \frac{\sum_i^n \sum_j^m \left(\frac{|E_i - S_j|}{\bar{X}} \right)}{nm}$$

donde r_a es el índice de reciprocidad relativo para un nivel "a", E_i la altura de una antera, S_j la altura de un estigma, \bar{X} el promedio de la altura de todos los estigmas y anteras de la población, n el número de anteras del nivel y m el número de estigmas del nivel. La desviación estándar para la distancia estigma-antera de un nivel (sdr_a) es:

$$sdr_a = \sqrt{\frac{\sum_i^n \sum_j^m \left[\left(\frac{|E_i - S_j|}{\bar{X}} \right) - r_a \right]^2}{nm}}$$

La reciprocidad total de la población corresponde a la distancia euclídea de los índices de reciprocidad relativos:

$$r = \sqrt{[(r_s)^2 + (r_l)^2]}$$

donde r es la reciprocidad total de la población, r_s la reciprocidad relativa del nivel superior y r_i la reciprocidad relativa del nivel inferior. La desviación estándar total (sdr) corresponde al promedio de las desviaciones estándar relativas de cada nivel:

$$sdr = \frac{(sdr_s + sdr_i)}{2}$$

El índice de reciprocidad final de la población (R) considera la reciprocidad y la dispersión de los datos para ambos niveles de verticilo.

$$R = r \times sdr$$

En poblaciones diestílicas este índice puede ser presentado en un gráfico de dos dimensiones donde cada eje corresponde al índice de reciprocidad relativo de un nivel.

Este índice se basa en el índice de reciprocidad relativa propuesto por Richards & Koptur (1993), pero presenta algunas ventajas con respecto a este y a otros índices anteriores (Lloyd et al. 1990; Richards & Koptur 1993; Eckert & Barrett 1994; Lau & Bosque 2003). El índice de (Sánchez et al. 2008) compara la distancia entre estigmas y anteras para todos los cruces posibles de la población sin reducirlo al promedio y se obtiene un único valor que puede ser comparado entre especies y correlacionado con otras variables. Los cálculos fueron realizados a través de una macro de Microsoft Excel llamada RECIPRO⁸, programada y puesta a disposición por los mismos autores en la cual se ingresaron todos los datos de altura de estigmas y anteras de la población con su respectivo morfo. Para que los valores del índice de reciprocidad y de los índices de reciprocidad relativos por nivel mantuvieran la misma magnitud, se incorporó el criterio utilizado en las modificaciones de Sánchez et al. (2013) y se multiplicó por 10 el índice de reciprocidad final y se mantuvo el valor cero como máxima reciprocidad.

⁸ <http://webs.uvigo.es/plantecology/software.es.html>

2) *Correspondencia espacial* (Lau & Bosque 2003): en esta metodología se determina el porcentaje de superposición entre estructuras reproductivas de una población mediante gráficos de distribución de frecuencia de los órganos reproductivos a lo largo de la flor:

$$\text{Solapamiento}_{ij} = 100 \times \frac{A_{ij}}{A_i}$$

donde, A_{ij} es el área de intersección de la curva de distribución de los órganos i con j y A_i es el área total de la curva de distribución del órgano i . Para confeccionar las distribuciones se determinó la posición relativa de anteras y estigmas en cada población. Cada flor se dividió longitudinalmente en segmentos de 0,1 mm comenzando desde la base del ovario, en cada segmento se registró la presencia o ausencia de cualquier fragmento de antera o estigma. Este método toma en cuenta todo el rango de tamaño de la estructura reproductiva sin reducirla a un solo punto como lo hace el índice de reciprocidad.

Polimorfismo estilar

Con el objetivo de categorizar el polimorfismo estilar de las especies estudiadas, se analizó en detalle la información de las mediciones de hercogamia y reciprocidad utilizando el criterio de Ferrero et al. (2011). Los autores definen la *diestilia* (hercogamia recíproca) como el posicionamiento complementario de las estructuras sexuales opuestas entre morfos para ambos niveles de verticilo, el *dimorfismo estilar* como la pérdida de solapamiento en ambos niveles y el *polimorfismo mixto* como el posicionamiento complementario de las estructuras sexuales opuestas en un solo nivel de verticilo. Al igual que para el índice de reciprocidad según correspondencia espacial (Lau & Bosque 2003), en este caso se trabajó con el solapamiento de los órganos sexuales pero esta vez utilizando los valores promedio de altura y tamaño de los

órganos reproductivos. Se consideró sin solapamiento si es que la separación de estigmas y anteras correspondientes excedía la suma de la mitad del tamaño del estigma con la mitad del tamaño de la antera.

Presentación secundaria de polen

Cada individuo, ya sea en estadio de flor adulta⁹ o de yema, fue categorizado dicotómicamente bajo tres criterios: (i) B o L, (ii) con contacto o sin contacto y (iii) antera joven o antera dehiscente. Luego se realizaron las combinaciones de i, ii y iii resultando ocho categorías. La separación de flores B y L (i) se hizo como se describió en la sección de determinación de morfos. Los botones muy pequeños fueron clasificados en función del resto de las flores de su misma inflorescencia, ya que esta característica es uniforme en un mismo individuo. El contacto entre anteras y estigma (ii) lo definimos como posible cuando estigmas y anteras de una misma flor solaparon su posición en algún punto de su extensión. En cuanto al estado de la antera (iii), una antera joven fue aquella que no estaba abierta y una dehiscente aquella que estaba abierta y expulsaba polen. Se graficó la distancia estigma-antera (hercogamia) en función del largo del tubo (como variable sustitutiva del estadio floral) y se señalaron todas las categorías descritas. Finalmente se calculó el porcentaje de flores candidatas a presentar PSP, es decir, que cumplieron las condiciones: morfo L, posibilidad de contacto entre anteras y estigma, y anteras dehiscentes. El porcentaje se calculó con respecto a la totalidad de flores del morfo L. En la representación gráfica, la distancia estigma-antera (hercogamia) negativa corresponde a flores B positiva a flores L (Fig. 14).

⁹ Fueron incluidos los datos de la sección "Reciprocidad" en las poblaciones correspondientes.

Reconstrucción del sistema reproductivo

Índice de reciprocidad

Con el objetivo de trazar la trayectoria evolutiva de la hercogamia recíproca, en primer lugar se mapeó el índice de reciprocidad de Sánchez et al. (2008) sobre la hipótesis filogenética obtenida con inferencia bayesiana para evidencia total. Del el árbol total se podaron los taxa que no fueron medidos, entre ellos los grupos externos y el clado de *C. pumila*. El árbol remanente mantuvo la topología y sus 14 taxa conservaron el largo de rama del árbol original. Antes de trazar el índice de reciprocidad, se determinó el modelo de evolución que se ajustara mejor a los datos y la presencia o ausencia de señal filogenética, entendida como presente cuando las especies estrechamente relacionadas tienden a ser más similares entre sí de lo esperado por azar (Münkemüller et al. 2012). Con el programa R, mediante la función `fitContinuous` del paquete “*geiger*” (Harmon et al. 2008), se compararon de acuerdo al criterio de Akaike (AICc) los modelos de movimiento Browniano (BM), Ornstein-Uhlenbeck (OU) y evolución acelerada-desacelerada (ACDC). El primero representa una divergencia gradual del rasgo proporcional a la distancia filogenética, el segundo es un modelo de selección estabilizadora en el cual la divergencia del rasgo entre las especies es limitada y el tercero asume que la evolución del rasgo varía en el tiempo pudiendo presentar máximos de divergencia. La señal filogenética se evaluó mediante los estadísticos λ de Pagel (Pagel 1999) y K de Blomberg (Blomberg et al. 2003), con los paquetes de R “*geiger*” (Harmon et al. 2008) y “*picante*” (Kembel et al. 2010) respectivamente. En ambos se asume un modelo de evolución BM donde el valor “0” indica independencia filogenética y el valor “1” indica que los rasgos se distribuyen como se espera bajo el modelo BM. En el caso de λ se estima si es

significativamente distinto de "0" o de "1" mediante una prueba de razones de verosimilitud ($-2 \ln \text{verosimilitudnula} - \ln \text{verosimilitudalternativa}$) que contrasta las verosimilitudes del λ obtenido con λ_0 y λ_1 . En el caso de la K de Blomberg se obtiene un valor p basado en la varianza filogenética al permutar las puntas (1000 repeticiones). En la mayoría de los casos, el límite superior de λ de Pagel es cercano a 1, mientras que para la K de Blomberg puede tomar valores más altos indicando mayor similitud del rasgo entre especies relacionadas de lo esperado bajo BM (Blomberg et al. 2003). La estimación de los caracteres ancestrales se realizó mediante el paquete de R "ape" (Paradis et al. 2004) bajo modelo BM usando el método de máxima verosimilitud. Se estimó en cada nodo un valor de índice de reciprocidad con su incerteza asociada.

Polimorfismo estilar

De manera complementaria se quiso conocer el tipo de polimorfismo estilar ancestral del grupo y la presencia de señal filogenética del carácter. Se utilizaron las categorías de polimorfismo estilar obtenidas previamente (análisis de hercogamia, reciprocidad y solapamiento). Desde el árbol de Inferencia Bayesiana se podaron los taxa dejando solo un representante de cada especie. El árbol remanente mantuvo la topología y el largo de rama de la hipótesis filogenética. El trazado evolutivo del carácter se hizo bajo los análisis de Parsimonia y Máxima Verosimilitud utilizando el programa Mesquite versión 2.75 (Maddison & Maddison 2009). En máxima verosimilitud se utilizó el criterio de Akaike para escoger entre tres modelos de transición (tasas iguales, simétrico y todas las tasas diferentes). La evaluación de la señal filogenética se hizo comparando la tasa de cambio observada con la tasa de cambio resultante de la permutación aleatoria (10^3 permutaciones) de los estados del carácter en las puntas del

árbol. Para descartar la hipótesis nula de inexistencia de señal filogenética, el valor p fue calculado como a fracción de los modelos permutados que tuvieron menor o igual tasa que los datos observados.

Evolución correlacionada entre el índice de reciprocidad y la altitud

Una ventaja del índice de reciprocidad (Sánchez et al. 2008) es que, al corresponder a un valor único para cada población, puede ser correlacionado con otras características del grupo que también muestren variación entre las poblaciones. En el contexto de distribución de *Oreopolus* y *Cruckshanksia* se quiso evaluar si es que existe una relación entre la altitud a la cual habita cada población, con su grado de reciprocidad. La altitud fue medida en cada población colectada mediante un GPS Garmin modelo eTrex 30 y el grado de reciprocidad fue contabilizado mediante el índice de reciprocidad (Sánchez et al. 2008). Se realizó una regresión lineal simple entre la altitud e índice de reciprocidad y también se calcularon los contrastes filogenéticos independientes para evaluar la correlación sin el efecto de las relaciones filogenéticas entre las poblaciones. Este último análisis se llevó a cabo en el programa Mesquite versión 2.75 (Maddison & Maddison 2009) mediante el paquete PDAP versión 1.16 (Midford et al. 2011). En primer lugar se evaluó el supuesto de independencia entre el contraste y los largos de ramas y luego se prosiguió a evaluar la evolución correlacionada entre ambos rasgos continuos mediante una regresión lineal simple de los contrastes estandarizados y positivizados para cada rasgo. En este análisis se utilizó el árbol de la hipótesis filogenética reducido generado para la reconstrucción del índice de reciprocidad.

RESULTADOS

Reconstrucción filogenética

Se obtuvieron 563, 954 y 684 caracteres nucleotídicos para las regiones de ITS5, trnL y rpl32 respectivamente. En la aproximación de Parsimonia, el análisis realizado para rDNA (ITS5) se hizo a partir de 101 caracteres informativos donde fueron evaluados 208 árboles y retenidos 100 con el mismo valor de parsimonia. El índice de consistencia fue 0,68; el de homoplasia 0,32 y el de retención reescalado 0,53. Para el cpDNA (trnL+rpl32) se incluyeron 120 caracteres informativos, donde se evaluaron 152 de los mejores árboles y se retuvieron 9. El índice de consistencia fue 0,93; el de homoplasia 0,07 y el de retención reescalado 0,89. En los análisis de Inferencia Bayesiana los modelos utilizados fueron; GTR+I+G en ITS5, GTR+G en trnL y GTR+I en rpl32. Para los análisis conjuntos, de evidencia total y cpDNA todos los parámetros fueron estimados de manera independiente dentro de cada partición.

En los todos árboles obtenidos con Parsimonia e Inferencia Bayesiana, *Oreopolus* es grupo hermano del clado monofilético conformado por las siete especies de *Cruckshanksia* (Fig. 6; Apéndice 3). En el árbol de evidencia total, *Cruckshanksia* se compone de dos linajes principales. El primero de ellos (I) reúne a *C. verticillata*, *C. montiana*, y *C. pumila* y el segundo (II) a *C. palmae*, *C. macrantha*, *C. hymenodon* y *C. lithiophila*. El linaje I está fuertemente ligado al desierto costero (matorral desértico), mientras que el linaje II a la Cordillera de los Andes (herbazal y matorral de altitud) (Fig. 7). Dentro del linaje I hay evidencia de dos grupos de taxa. A pesar de que la separación de ambos no presenta soporte, cada grupo en su interior sí se

encuentra apoyado. El linaje IA contiene poblaciones de *C. montiana-norte* y *C. verticillata*, distribuidas al norte del Río Huasco (III Región) y el linaje IB agrupa a las poblaciones de *C. montiana-sur* ubicadas al sur del Río Huasco (III y IV región) junto con las poblaciones de *C. pumila*. La ubicación latitudinal del Río Huasco es entre los 28 y 29 °S (Figs. 6, 7).

En el linaje II se distinguen cuatro entidades apoyadas pero cuyas relaciones no se encuentran soportadas: *C. macrantha*, *C. palmae*, *C. hymenodon* (del norte del Río Huasco) y *C. lithiophila* junto con *C. hymenodon* (del sur del Río Huasco) (Fig. 6).

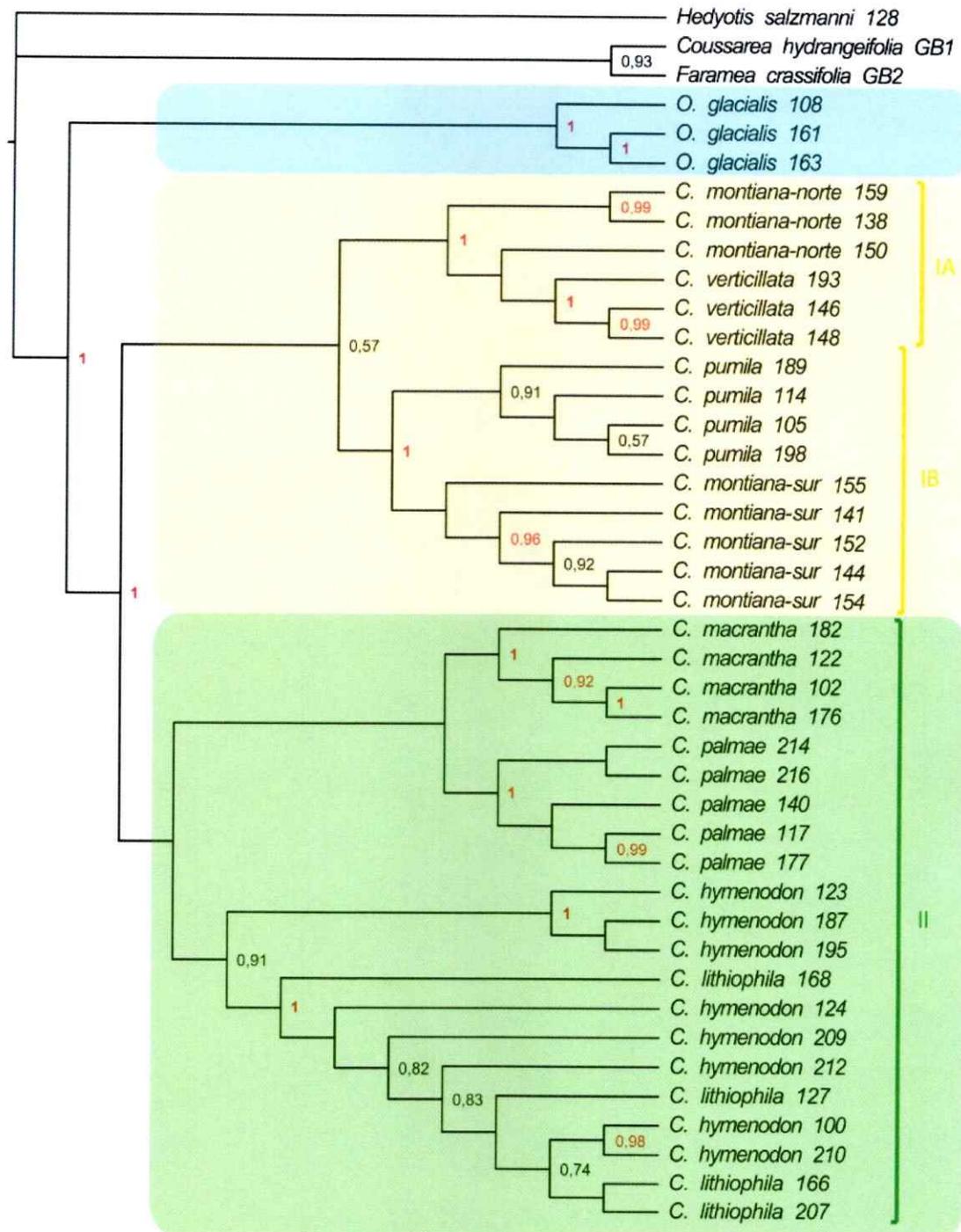


Figura 6. Árbol filogenético de Inferencia Bayesiana basado en evidencia total para ocho especies de los géneros *Oreopolus* y *Cruckshanksia*. En los nodos se indican los valores de credibilidad $\geq 0,50$. Los valores soportados ($\geq 0,95$) se muestra en rojo. El recuadro celeste señala al género *Oreopolus*, el amarillo al linaje I y el verde al linaje II del género *Cruckshanksia*.

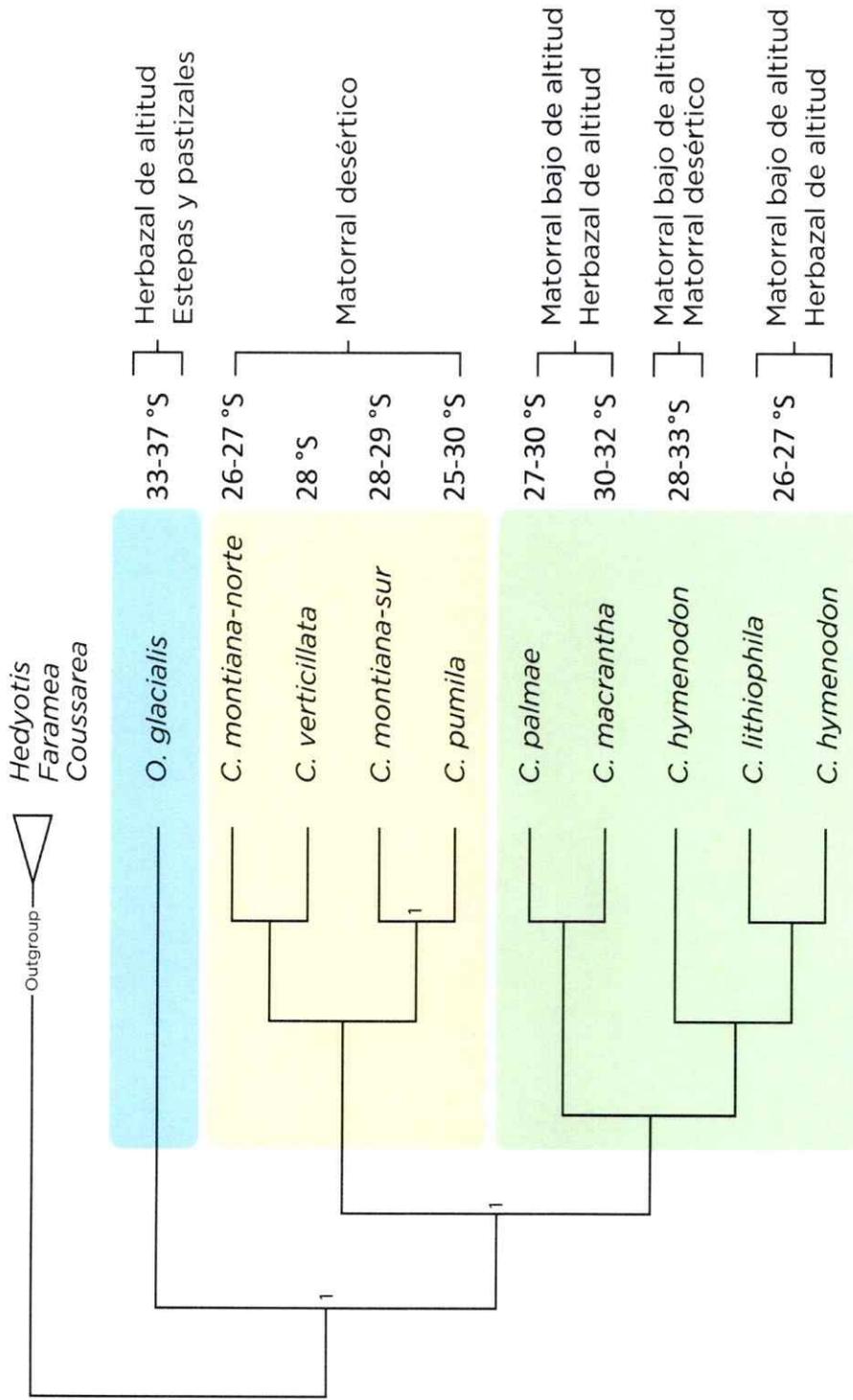


Figura 7. Resumen de árbol filogenético de Inferencia Bayesiana basado en evidencia total junto con la información de distribución de los grupos. Se indica el valor de credibilidad solo para los nodos soportados ($\geq 0,95$). El recuadro celeste señala al género *Oreopolus*, el amarillo al linaje I y el verde al linaje II del género *Cruckshanksia*. Al costado derecho se indica el rango latitudinal y el piso vegetacional (Plisicoff & Luebert 2006) de los taxa.

Estimación de los tiempos de divergencia

El análisis realizado mediante los dos puntos de calibración determinó que *Oreopolus* y *Cruckshanksia* divergieron en el Mioceno medio aproximadamente a los 14,43 [7,47-25]¹⁰ Ma y que la separación de los linajes I y II al interior de *Cruckshanksia* ocurrió en el límite entre el Mioceno y el Plioceno a rededor de 5,4 [2,97-9,21] Ma (Fig. 7). La separación entre los clados *Faramea-Coussarea* y *Oreopolus-Cruckshanksia* habría ocurrido en la primera mitad del Eoceno a los 47,61 [39,2-60,1] Ma. Esta fecha es coherente con la datación de un estudio realizado en otro género donde se utilizó *Cruckshanksia* (Huang et al. 2013), pero no es posible asumir que corresponda al origen del clado, ya que las relaciones al interior de la tribu Coussareeae aún no han sido descifradas (Bremer & Eriksson 2009).

Los tiempos de divergencia estimados a partir del análisis calibrado mediante tasas de sustitución son bastante congruentes con los estimados a partir de los dos puntos de calibración (Apéndice 4). La mayor diferencia se manifestó en los nodos que fueron utilizados para calibrar la divergencia de *Faramea* y *Coussarea* (24,88 [16,06-35,35] Ma) y la separación entre la tribu Coussareeae y su grupo hermano (85,92 [54,95-120,22] Ma)). Por el contrario, la divergencia de los clados *Faramea-Coussarea* y *Oreopolus-Cruckshanksia* (47,73 [33,03-64,66] Ma) junto con la división de los linajes I y II de *Cruckshanksia* (5,88 [3,35-7,1] Ma) fue prácticamente igual al primer análisis. Por su parte, la divergencia entre los géneros *Oreopolus* y *Cruckshanksia* (10,01 [6,53-14,49] Ma) resultó ligeramente inferior (cerca de 4,4 Ma más reciente) pero se mantuvo dentro de la misma época (Mioceno tardío) y sus intervalos de credibilidad sobreponen sus rangos de estimación.

¹⁰ El intervalo de tiempo correspondiente a cada datación se denomina 95 % HDP ("mayor densidad posterior"). Es un intervalo de credibilidad Bayesiana. Significa que la probabilidad posterior de que la fecha estimada se encuentre dentro del rango de tiempo señalado es del 95 %.

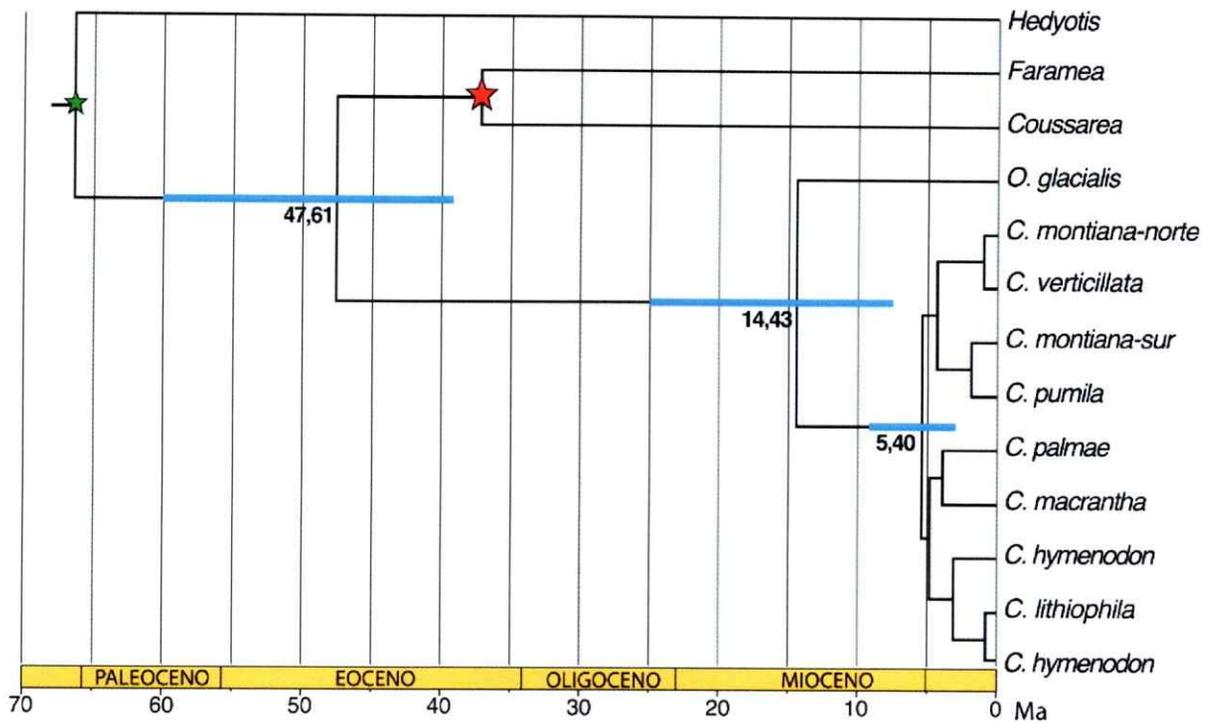


Figura 8. Estimación de los tiempos de divergencia en el clado *Oreopolus-Cruckshanksia* mediante dos puntos de calibración. La estrella roja indica el fósil empleado y la estrella verde la calibración secundaria. El valor del nodo corresponde al tiempo estimado y las bandas azules al intervalo de credibilidad (95% HDP).

Sistema reproductivo en Oreopolus y Cruckshanksia

Morfos florales e isoplezia

En todas las poblaciones estudiadas se encontraron morfos L y B (Fig. 8) y la mayoría de las poblaciones presentó isoplezia (Tabla 1). Hubo solo dos excepciones (pobs. anisopléticas), una población de *C. macrantha* (P16) y una de *O. glacialis* (P10). Ambas mostraron una desviación hacia el morfo L. Sin embargo, en las dos especies se cuenta con una segunda población isoplética, indicando que la desviación no es una característica general de estas

especies. Posiblemente el resultado en P16 de *C. macrantha* se deba a su pequeño tamaño poblacional.

Tabla 1. Proporción de individuos L y B en poblaciones de las diferentes especies de *Cruckshanksia* y en *Oreopolus glacialis*.

Especie	Población	Número total individuos	Proporción Morfo		Valor p
			Longiestilo	Breviestilo	
<i>C. montiana-sur</i>	P1	583	0,47	0,53	0,14
	P2	780	0,50	0,50	0,97
	P6 SM	426	0,48	0,52	0,53
	P7 SM	373	0,51	0,49	0,84
<i>C. montiana-norte</i>	P8	340	0,51	0,49	0,79
	P5	477	0,49	0,51	0,58
<i>C. verticillata</i>	P3	1009	0,52	0,48	0,13
	P4 SM	299	0,47	0,53	0,30
<i>C. lithiophila</i>	P12	98	0,54	0,46	0,48
<i>C. hymenodon</i>	P15	140	0,55	0,45	0,27
	P21	86	0,50	0,50	1
<i>C. palmae</i>	P17 SM	126	0,50	0,50	1
	P18	130	0,57	0,43	0,14
	P20	264	0,50	0,50	0,95
<i>C. macrantha</i>	P16	39	0,69	0,31	0,03*
	P19	69	0,52	0,48	0,81
<i>O. glacialis</i>	P10	227	0,57	0,43	0,03*
	P11	235	0,51	0,49	0,79

* $P < 0,05$ para test de χ^2 . Indica poblaciones que se desvían de la isopletería. SM indica las poblaciones que no fueron usadas en la medición de rasgos.

Al ordenar de manera creciente la altura de la antera y el estigma de cada uno de los individuos medidos en una población (Fig. 8) se puede apreciar que todas las poblaciones presentan los dos morfos florales, es decir, individuos con el estigma bajo el nivel de las anteras (B) e individuos con las anteras sobre el nivel del estigma (L). En la mayoría de los casos ambos

morfo se encuentran agrupados según la altura del estigma. Donde individuos de estigmas más pequeños corresponden al morfo breviestilo e individuos con estigmas de mayor tamaño al longiestilo. Sin embargo, este patrón no se cumple de manera perfecta en todos los casos. Por ejemplo, en ambas poblaciones de *C. macrantha* resulta evidente que no hay un rango de altura exclusivo para cada morfo. Además, se observa que la distancia estigma-antera no es equivalente entre morfos para todos los casos. En las poblaciones P10, P20 y P12 (Fig. 8), se ve claramente que la distancia entre ambos órganos es mayor en el morfo B que en el morfo L.

Rasgos florales

Los rasgos que definen la hercogamia recíproca son la altura de las anteras y la altura del estigma de una flor. En las especies estudiadas ambos caracteres muestran diferencia estadística entre morfos para todas las poblaciones (Tabla 2), siendo más mayores las anteras en el morfo B y el estigma en el morfo L. La distancia estigma-antera (hercogamia) también mostro diferencia estadística en la mayoría de las poblaciones. Es decir, varias especies no presentan hercogamia recíproca perfecta. Las únicas excepciones fueron *C. verticillata* y las poblaciones P8 de *C. montiana-sur* y P5 de *C. montiana-norte*. Si bien la desviación de la hercogamia recíproca es bastante pequeña en algunos casos (*C. hymenodon* y P19 de *C. macrantha*), es muy notable en las poblaciones de *O. glacialis*, *C. lithophila* y *C. palmae* (Tabla 2).

La falta de hercogamia recíproca en todos los casos se debe a una mayor distancia estigma-antera en el morfo B que en el morfo L. Además, cuando hay ausencia de hercogamia recíproca perfecta, queda en evidencia (P10, P11 y P12) que la diferencia entre morfos en

cuanto a la altura de las anteras es menor que la diferencia entre morfos en cuanto a la altura de los estigmas (Tabla 2).

Con respecto a otros rasgos florales asociados con la hercogamia (Tabla 2), se observa que para el tamaño promedio de estigmas y anteras la tendencia general es que las anteras son más grandes en el morfo B para todas las poblaciones, por el contrario el estigma presenta un mayor tamaño en flores del morfo L. El tamaño de las anteras muestra diferencia significativa entre morfos en todas las especies, no así el tamaño del estigma donde no hubo diferencias significativas para las poblaciones de *O. glacialis*, *C. macrantha* y *C. lithiophila*. En cuanto al largo y ancho del tubo floral (Tabla 2) hubo diferencias estadísticas en algunos casos pero nunca en la totalidad de las poblaciones de una determinada especie. Para los rasgos asociados al lóbulo de la corola (área y relación perímetro/área del pétalo), se obtuvo diferencia estadística entre morfos en la mayoría de las especies a excepción de *O. glacialis* y *C. macrantha*. En todos los casos el área del pétalo resultó mayor en el morfo B y la relación perímetro/área en L. Es decir, que las flores del morfo B exhiben lóbulos del cáliz más grandes y redondeados que las flores del morfo L.

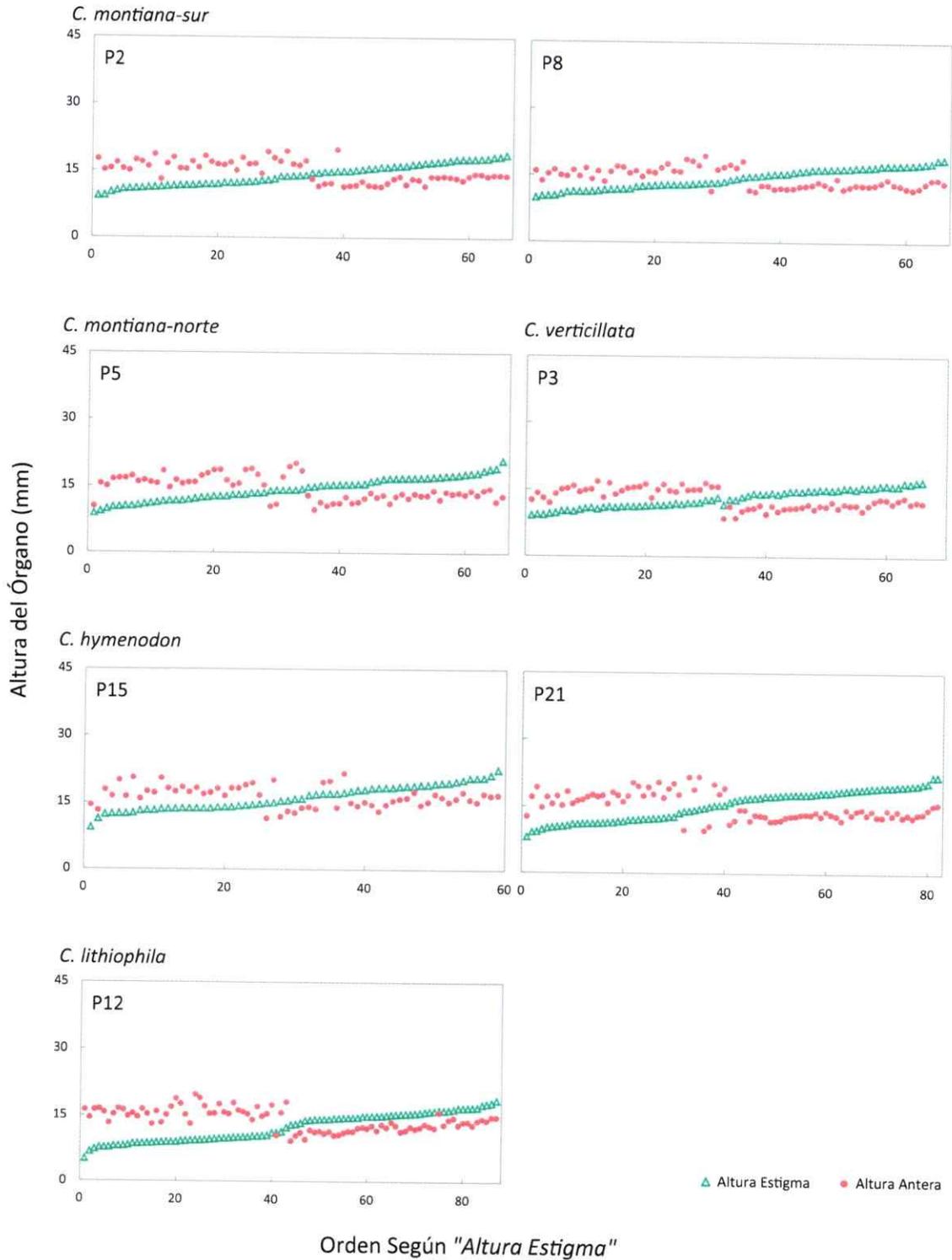


Figura 9. Diagrama de altura. De cada flor se grafica la altura de anteras y estigmas ordenadas según la altura del estigma para todas las poblaciones medidas. Los triángulos celestes indican la altura del estigma y los círculos rojos la altura de la antera.

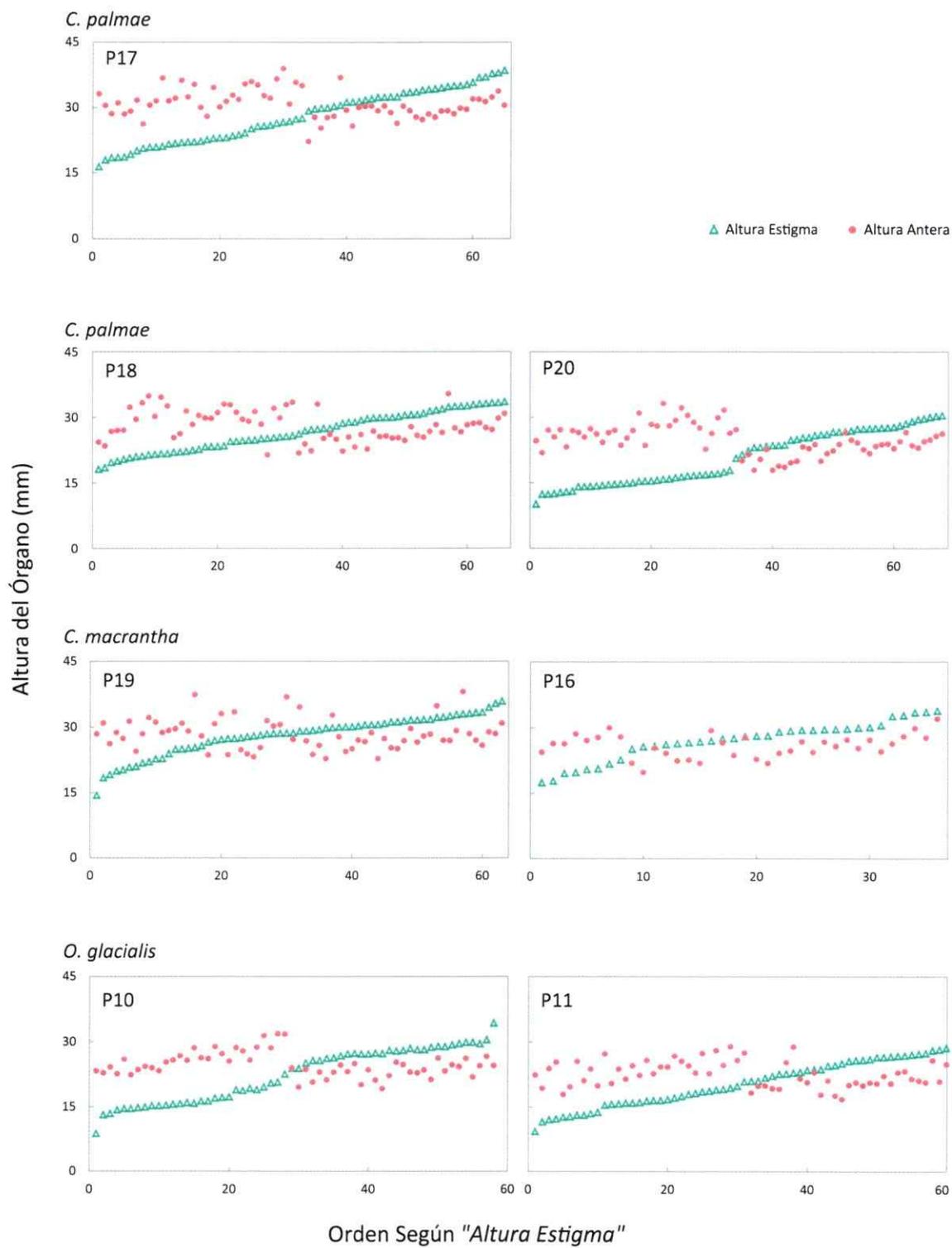


Figura 9. (Continuación).

Tabla 2. Rasgos florales. Se presenta la media de cada rasgo con su respectiva desviación estándar por morfo de cada población. Además, se indica el valor p de las comparaciones realizadas entre morfos para todos los rasgos.

	<i>C. montiana</i>		<i>C. verticillata</i>		<i>C. palmae</i>		<i>C. macrantha</i>		<i>C. hymenodon</i>		<i>C. lithiophila</i>		<i>Oreopolus</i>	
	P2sur	P8sur	P5norte	P3	P17	P18	P19	P16	P15	P21	P12	P11	P10	P10
	Media ± DE		Media ± DE		Media ± DE		Media ± DE		Media ± DE		Media ± DE		Media ± DE	
Estigma Altura	L	16,47 ± 1,27	16,62 ± 1,49	15,07 ± 1,25	33,53 ± 2,58	30,21 ± 2,28	26,35 ± 2,4	30,81 ± 2,24	29,09 ± 2,55	18,50 ± 1,88	15,46 ± 1,47	25,93 ± 2,64	27,12 ± 2	
	B	11,95 ± 1,29	12,12 ± 1,21	11,98 ± 1,54	11,02 ± 1,05	22,8 ± 3,24	23,02 ± 2,77	15,08 ± 1,99	24,77 ± 4,4	13,72 ± 1,63	9,3 ± 1,29	16,31 ± 3,21	15,78 ± 2,71	
	P	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}
Antera Altura	L	12,84 ± 1,02	12,62 ± 0,77	11,36 ± 1,13	29,08 ± 2,3	25,86 ± 2,28	22,5 ± 2,4	26,37 ± 2,08	25,26 ± 2,72	15,01 ± 1,62	12,44 ± 1,43	21,15 ± 2,18	22,33 ± 1,96	
	B	16,65 ± 1,46	16,12 ± 1,36	16,39 ± 2,16	14,91 ± 1,2	32,64 ± 3,02	30,28 ± 3,04	27,02 ± 2,7	31,06 ± 3,26	17,54 ± 1,71	17,98 ± 1,85	15,99 ± 1,54	24,07 ± 2,81	25,33 ± 2,7
	P	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	0,0073**	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}
Distancia estigma-antera (Hercogamia) Estig. Alt. - Ant. Alt.	L	3,63 ± 0,78	3,89 ± 0,92	4,17 ± 1,18	3,71 ± 0,74	4,46 ± 1,88	4,35 ± 1,28	3,85 ± 1,65	4,44 ± 1,74	3,49 ± 1,03	3,02 ± 0,82	4,78 ± 2,17	4,67 ± 2,12	
	B	-4,7 ± 1,54	-4,01 ± 1,16	-4,41 ± 2,25	-3,89 ± 1,09	-9,84 ± 2,9	-7,26 ± 2,73	-11,94 ± 2,61	-6,29 ± 3,33	-7,27 ± 2,04	-4,27 ± 1,46	-6,69 ± 1,79	-7,76 ± 2,64	-9,85 ± 1,67
	P	0,0007**	0,6472	0,0948	0,4341	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	0,0108*	0,0221*	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}
Estigma Tamaño	L	1,39 ± 0,23	1,51 ± 0,24	1,57 ± 0,29	1,82 ± 0,34	2,36 ± 0,47	1,82 ± 0,47	1,94 ± 0,48	1,83 ± 0,48	1,54 ± 0,33	1,09 ± 0,21	1,53 ± 0,34	1,54 ± 0,43	
	B	1,2 ± 0,26	1,28 ± 0,24	1,37 ± 0,28	1,47 ± 0,23	1,9 ± 0,44	1,6 ± 0,34	1,65 ± 0,26	1,73 ± 0,31	1,44 ± 0,34	1,27 ± 0,25	1,47 ± 0,4	1,38 ± 0,36	
	P	0,0028**	0,0002**	0,0061**	< 0,01**	0,0002**	0,0337*	0,0032**	0,3241	0,0004**	0,0189*	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}
Antera Tamaño	L	1,38 ± 0,12	1,48 ± 0,09	1,53 ± 0,09	1,39 ± 0,18	2,94 ± 0,36	2,76 ± 0,23	2,39 ± 0,24	2,03 ± 0,17	1,97 ± 0,16	1,66 ± 0,16	1,75 ± 0,16	1,78 ± 0,17	
	B	1,70 ± 0,18	1,74 ± 0,15	1,77 ± 0,16	1,71 ± 0,16	3,37 ± 0,29	3,30 ± 0,27	2,79 ± 0,3	2,35 ± 0,17	2,48 ± 0,22	1,93 ± 0,15	1,82 ± 0,21	1,96 ± 0,19	
	P	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	0,0008**	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 10 ^{-5**}	< 0,01**

Tabla 2. (Continuación).

	<i>C. montiana</i>		<i>C. verticillata</i>		<i>C. palmae</i>			<i>C. macrantha</i>			<i>C. hymenodon</i>			<i>C. lithiophila</i>			<i>Oreopolus</i>		
	P2sur	P8sur	P5norte	P3	P17	P18	P20	P19	P16	P15	P21	P12	P11	P10	P12	P11	P10		
	Media ± DE		Media ± DE		Media ± DE			Media ± DE			Media ± DE			Media ± DE					
Tubo Corola Largo	L	15,13	14,24	14,52	13,37	30,44	26,88	24,22	27,34	26,96	16,42	15,86	22,31	23,47	14,35	22,31	23,47		
		± 1,25	± 0,82	± 1,3	± 1,26	± 2,45	± 2,48	± 2,56	± 2,05	± 2,74	± 1,75	± 1,48	± 2,26	± 2,02	± 1,49	± 2,26	± 2,02		
	B	15,51	13,84	15,1	13,18	30,75	28,49	25,33	28,03	23,27	16,39	16,31	21,44	22,54	14,69	21,44	22,54		
	± 1,23	± 1,19	± 1,75	± 1,12	± 3,11	± 3,06	± 2,61	± 3,27	± 4,17	± 1,83	± 1,97	± 2,65	± 2,62	± 1,4	± 2,65	± 2,62			
p	0,2265	0,1166	0,1310	0,4964	0,6571	0,0221*	0,0825	0,3373	0,0317*	0,9459	0,2596	0,2787	0,1575	0,1377	0,2787	0,1575	0,1377		
Tubo Corola Ancho	L	0,8	0,8	0,76	0,81	1,03	0,95	1,00	1,03	1,05	0,94	0,87	1,04	1,14	0,79	1,04	1,14		
		± 0,08	± 0,07	± 0,06	± 0,07	± 0,1	± 0,12	± 0,13	± 0,11	± 0,13	± 0,1	± 0,07	± 0,16	± 0,17	± 0,09	± 0,16	± 0,17		
	B	0,81	0,77	0,81	0,85	1,02	0,93	0,98	1,12	1,16	0,93	0,92	1,08	1,14	0,8	1,08	1,14		
	± 0,1	± 0,09	± 0,07	± 0,1	± 0,12	± 0,13	± 0,12	± 0,11	± 0,13	± 0,11	± 0,09	± 0,08	± 0,18	± 0,14	± 0,08	± 0,18	± 0,14		
p	0,7303	0,0835	0,0026**	0,1172	0,9166	0,6032	0,4455	0,0028**	0,0657	0,7178	0,0096**	0,4526	0,4254	0,9984	0,4526	0,4254	0,9984		
Pétalo Área	L	6,69	5,3	6,95	6,82	12,33	10,24	12,01	14,85	14,08	4,87	4,79	12,63	13,58	2,58	12,63	13,58		
		± 1,25	± 1,25	± 1,22	± 1,38	± 1,67	± 1,7	± 2,4	± 4,28	± 2,75	± 1,13	± 1,26	± 2,51	± 2,28	± 0,59	± 2,51	± 2,28		
	B	8,06	7,16	8,2	7,97	13,79	11,5	13,29	14,99	14,83	6,41	5,71	12,28	13,69	3,99	12,28	13,69		
	± 1,54	± 1,18	± 1,2	± 1,48	± 2,42	± 1,94	± 2,45	± 7,02	± 3,67	± 0,98	± 1,05	± 2,07	± 2,12	± 0,66	± 2,07	± 2,12			
p	0,0003**	< 10 ^{-5**}	0,0001**	0,0015**	0,0117*	0,0064**	0,0323*	0,9255	0,5876	< 10 ^{-5**}	0,0005**	< 10 ^{-5**}	0,5431	0,8568	< 10 ^{-5**}	0,5431	0,8568		
Pétalo Perímetro/Área	L	1,56	1,84	1,55	1,58	1,22	1,39	1,24	1,01	1,10	1,88	1,83	1,36	1,29	2,46	1,36	1,29		
		± 0,15	± 0,22	± 0,14	± 0,17	± 0,09	± 0,12	± 0,16	± 0,17	± 0,11	± 0,23	± 0,24	± 0,14	± 0,14	± 0,29	± 0,14	± 0,14		
	B	1,42	1,56	1,43	1,46	1,17	1,31	1,17	0,8	1,07	1,62	1,68	1,38	1,23	1,98	1,38	1,23		
	± 0,12	± 0,13	± 0,11	± 0,15	± 0,1	± 0,1	± 0,11	± 0,24	± 0,14	± 0,14	± 0,17	± 0,12	± 0,12	± 0,18	± 0,18	± 0,12	± 0,11		
p	0,0002**	< 10 ^{-5**}	0,0001**	0,0027**	0,0348*	0,005**	0,1028	0,0004**	0,6172	< 10 ^{-5**}	0,0008**	< 10 ^{-5**}	0,6724	0,1146	< 10 ^{-5**}	0,6724	0,1146		

*p < 0,05 y ** p < 0,01 para test de T-Student o U-Wilcoxon Mann-Whitney según corresponda al grupo de datos.

Reciprocidad

Al considerar el índice de reciprocidad para cada nivel de verticilo (Fig. 9; Tabla 3) se observa que la variación de la reciprocidad es notable en el nivel inferior, y reducida en el nivel superior. Existe una reciprocidad similar para ambos niveles en el grupo de poblaciones de *C. montiana-sur*, *C. verticillata* y *C. hymenodon*. Al analizar la reciprocidad mediante un valor único para cada población (Fig. 10; Tabla 3) se obtiene que *O. glacialis* y *C. lithiophila* son las especies menos reciprocas y *C. montiana* y *C. verticillata* las especies con mayor reciprocidad (valor del índice más cercano a cero). En un grado menor *C. hymenodon* y las poblaciones P18 y P19 de *C. macrantha* y *C. palmae* también serían altamente reciprocas. Con respecto a *C. palmae* y *C. macrantha* se observa que el parámetro varía a nivel intraespecífico ya que difiere entre poblaciones.

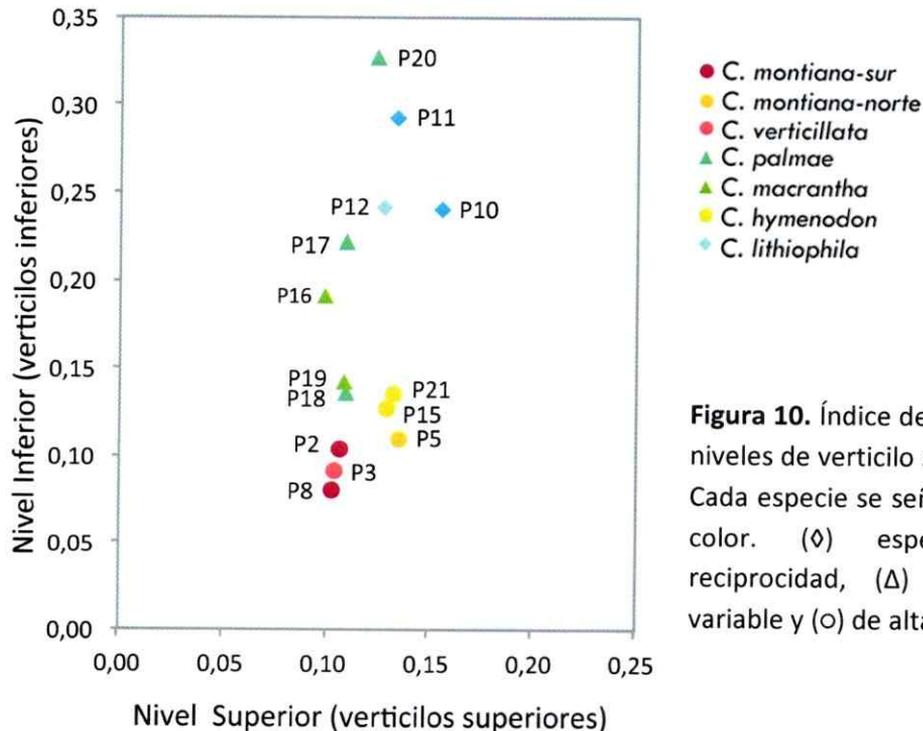


Figura 10. Índice de reciprocidad para niveles de verticilo superior e inferior. Cada especie se señala por un mismo color. (◇) especies de baja reciprocidad, (▲) de reciprocidad variable y (○) de alta reciprocidad.

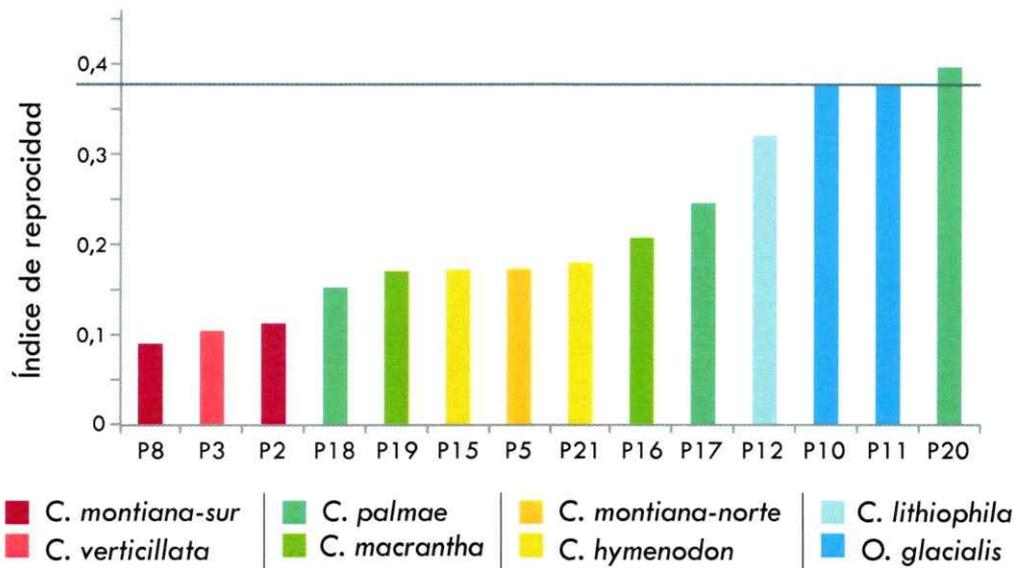


Figura 11. Índice de reciprocidad (Sánchez et al. 2008, 2013). Valor único para cada población ordenado de manera creciente. Cada especie se encuentra representada por un color.

Tabla 3. Índice de reciprocidad para cada población. Se señala tanto el valor total como el de cada nivel de verticilo (Sánchez et al. 2008, 2013). El valor cero indica la máxima reciprocidad.

Especie	Población	Índice Richards & Koptur (1993) modificado		Índice de Reciprocidad (Sánchez et al. 2008, 2013)
		Nivel Inferior	Nivel Superior	
<i>C. montiana-sur</i>	P2	0,103	0,106	0,11
	P8	0,084	0,102	0,09
<i>C. montiana-norte</i>	P5	0,110	0,135	0,17
<i>C. verticillata</i>	P3	0,093	0,103	0,11
<i>C. hymenodon</i>	P15	0,128	0,130	0,17
	P21	0,134	0,133	0,18
<i>C. lithiophila</i>	P12	0,241	0,129	0,32
	P17	0,221	0,110	0,25
<i>C. palmae</i>	P18	0,137	0,110	0,15
	P20	0,327	0,125	0,40
<i>C. macrantha</i>	P19	0,143	0,109	0,17
	P16	0,190	0,100	0,21
<i>Oreopolus</i>	P11	0,239	0,156	0,38
	P10	0,291	0,135	0,38

El análisis de reciprocidad mediante correspondencia espacial (Lau & Bosque 2003), permite indagar en la posible eficacia reproductiva de la distancia estigma-antera (hercogamia), a través de la posibilidad que tiene cada población de promover la transferencia de polen entre individuos de diferentes morfos considerando las distintas posibilidades de cruce. Cuando la transferencia de polen ocurre dentro del nivel inferior o dentro del nivel superior se habla de cruce legítimo, y cuando ocurre entre estructuras reproductivas del mismo morfo se habla de cruce ilegítimo (Darwin 1877).

El solapamiento entre estructuras reproductivas (Tabla 4) muestra que para el cruce legítimo dentro del nivel superior todas las poblaciones a excepción de P10 y P16 tienen más del 70% de las estructuras reproductivas involucradas en una posibilidad de cruce. En el nivel inferior no sucede lo mismo, los porcentajes son mayores al 70% solo en *C. verticillata* y *C. montiana-norte*. En *C. montiana-sur* y P19 de *C. macrantha* los valores también son altos, ya que se encuentran cercanos o sobre el 60%; para *C. hymenodon* los porcentajes se acercan al 50%. En el resto de las poblaciones los valores del nivel inferior disminuyen, siendo extremo en P20 de *C. palmae* donde menos del 10% de los órganos del nivel presentan algún grado de solapamiento. Al observar las áreas de distribución en los gráficos de las distintas poblaciones (Fig. 11), el nivel inferior muestra una tendencia a desacoplarse en muchos de los casos, a diferencia del nivel superior donde las áreas de las estructuras reproductivas reciprocas involucradas mantienen un grado de solapamiento en todas las poblaciones.

Con respecto al cruce ilegítimo, las poblaciones de *C. montiana* y *C. verticillata* no sobrepasan el 15% en ninguno de los dos morfos. En el resto de los casos se observa un aumento substancial para el solapamiento en el morfo L, superando incluso el 50% en P16 de *C.*

macrantha. En el morfo B no sucede lo mismo ya que solo en una población es mayor al 30% (P19 de *C. macrantha*).

Al comparar los cruces legítimo e ilegítimo encontramos que existen poblaciones donde el cruce ilegítimo para el morfo longiestilo alcanza niveles lo suficientemente altos como para igualar o superar el porcentaje de cruce legítimo de su correspondiente nivel inferior. Esto revela que en estas poblaciones el polen de las anteras del morfo L tendría más probabilidades, según su posición, de cruzarse con un estigma del mismo morfo que con estigmas del morfo opuesto. En estos casos, donde el desacople del nivel inferior es importante, se observa además, que el área de distribución del estigma del morfo B pierde las posibilidades de cruzarse tanto con su propio morfo como con su morfo opuesto (ej. P20; Fig. 11).

De manera anexa se evaluó el nivel de solapamiento entre las anteras de ambos morfos para analizar si hay poblaciones que muestren una tendencia al dimorfismo estilar (dos morfos con diferente nivel de estigma pero un mismo nivel de anteras (Lloyd & Webb 1992)). El solapamiento de las anteras en varias poblaciones supera el 40% y en *O. glacialis* se encuentra entorno al 50% (Tabla 4).

Tabla 4. Porcentaje de superposición entre áreas de distribución de estructuras reproductivas. Se muestra la posibilidad (%) de cruce legítimo para los niveles superior e inferior y de cruce ilegítimo para los morfos L y B. Además se presenta el porcentaje de solapamiento entre anteras de ambos morfos para cada población.

	<i>C. montiana</i>	<i>C. verticillata</i>	<i>C. hymenodon</i>	<i>C. lithiophila</i>	<i>C. palmae</i>	<i>C. macrantha</i>	<i>Oreopolus</i>							
	P2	P3	P5	P15	P21	P12	P17	P18	P19	P20	P16	P19	P10	P11
	<i>Porcentaje solapamiento - cruce Legítimo Nivel Superior</i>													
Estigma L	88,97	84,62	91,78	87,76	89,89	88,39	80,67	92,16	92,91	92,45	78,16	89,10	60,60	75,40
Antera B	73,85	72,85	75,25	76,91	79,93	78,58	73,71	80,72	78,46	79,51	64,52	79,50	55,19	68,22
	<i>Porcentaje solapamiento - cruce Legítimo Nivel Inferior</i>													
Estigma B	58,80	67,05	75,42	74,03	49,92	49,10	18,99	20,52	40,71	8,12	29,28	61,63	16,84	31,53
Antera L	71,98	78,35	91,31	85,47	56,31	54,87	20,55	23,38	48,61	9,49	35,07	69,27	18,52	34,89
	<i>Porcentaje solapamiento - cruce ilegítimo morfo Longiestilo</i>													
Estigma L	10,41	9,04	11,21	10,02	36,29	8,99	36,33	42,34	41,90	46,11	50,78	34,03	24,11	35,69
Antera L	10,48	9,00	11,15	10,06	36,35	8,97	36,19	42,16	42,22	46,38	50,87	34,08	24,16	35,63
	<i>Porcentaje solapamiento - cruce ilegítimo morfo Breviestilo</i>													
Estigma B	7,43	11,80	12,61	13,39	18,52	11,63	1,25	10,08	18,13	0,61	13,48	38,05	3,98	19,88
Antera B	7,50	11,92	12,59	13,50	18,55	11,58	1,24	10,11	18,14	0,61	13,30	38,10	3,98	19,94
	<i>Porcentaje solapamiento - Anteras L y B</i>													
Antera L	11,01	15,71	18,68	12,10	41,62	13,41	27,63	55,70	45,20	41,64	60,24	40,01	57,45	53,64
Antera B	9,08	13,58	15,40	10,57	36,95	11,95	25,34	49,00	37,89	35,60	49,64	35,65	52,23	48,62

Negrita: indica valores de porcentaje de solapamiento para poblaciones donde: cruce ilegítimo L > cruce legítimo nivel inferior.

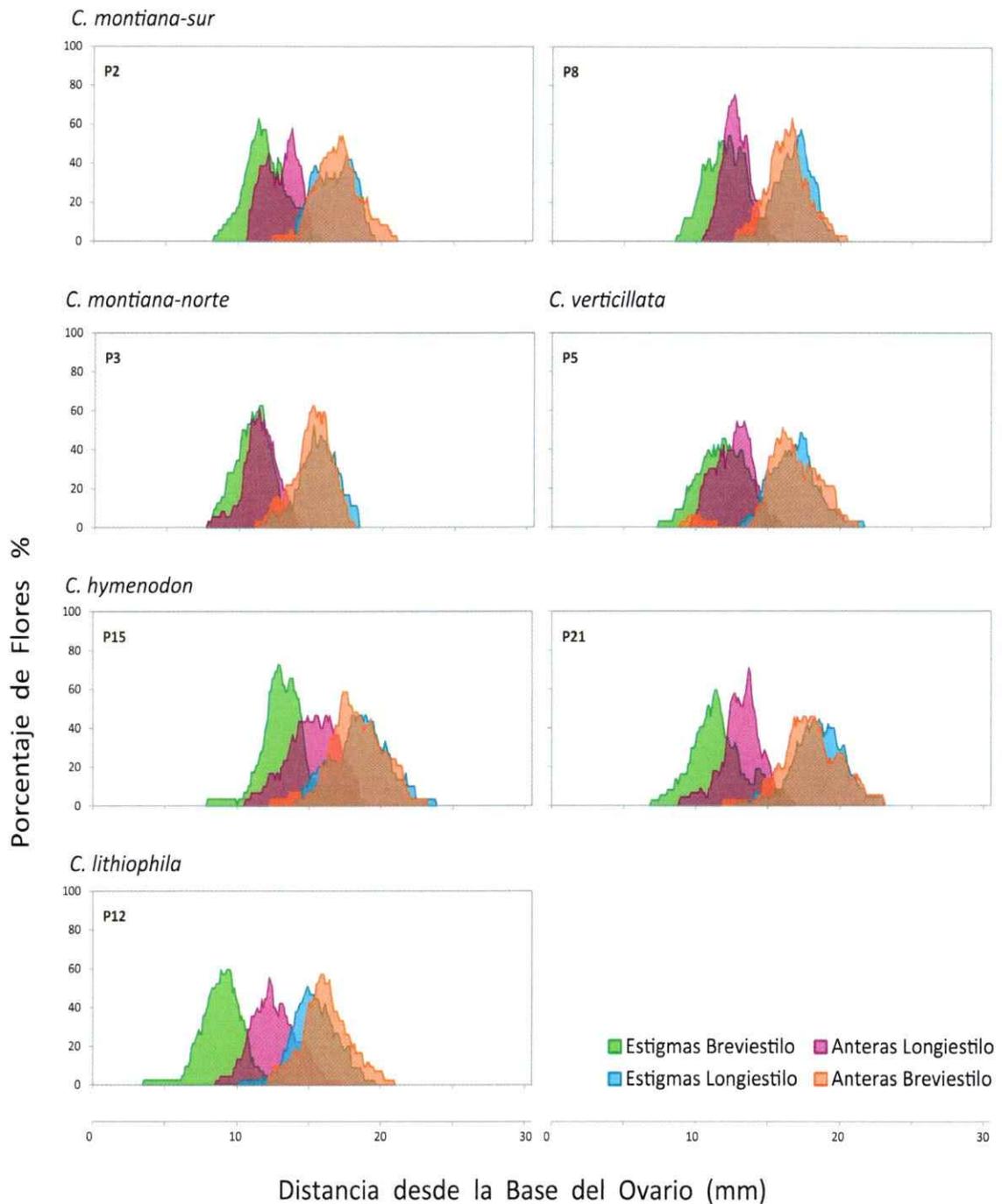


Figura 12. Correspondencia espacial de órganos reproductivos para todas las especies y poblaciones. Cruce legítimo en solapamiento de las áreas rojo-verde (nivel superior) y azul-naranja (nivel inferior).

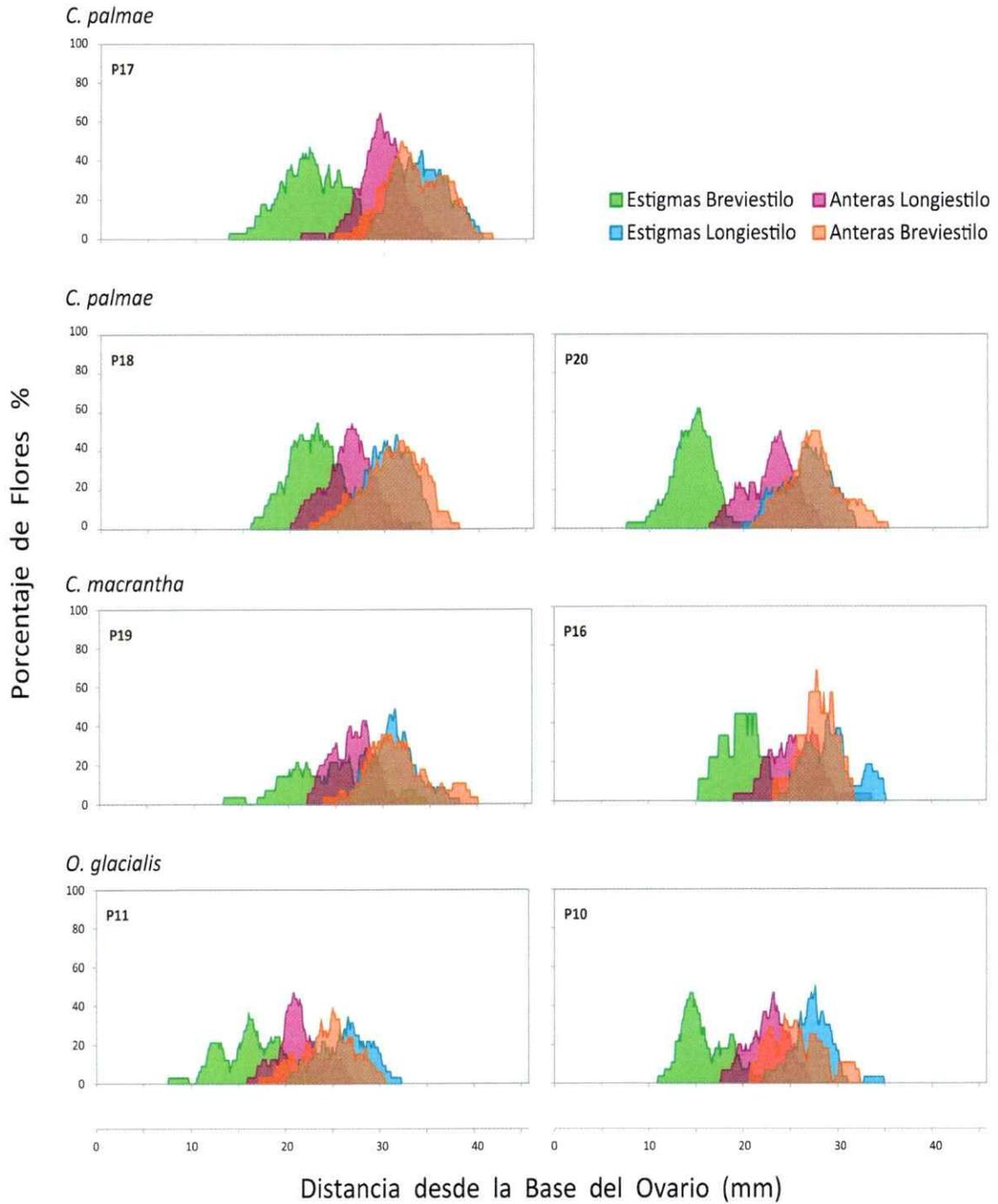


Figura 12. (Continuación).

Determinación del polimorfismo estilar

Con el fin de simplificar los resultados obtenidos en las mediciones de hercogamia y reciprocidad, se categorizó el polimorfismo estilar según el criterio de (Ferrero et al. 2011) (Tabla 5).

Es importante destacar que solo en las poblaciones P11, P19 y P12 se encontró diferencia significativa del tamaño del ovario entre morfos. La diferencia fue muy pequeña, del orden de 0,1 mm y reafirmo la categorización realizada.

- *Diestilia (hercogamia reciproca)*: *C. montiana* (sur y norte), *C. verticillata* y *C. hymenodon*. En estas especies el valor promedio de sus estructuras se solapó para ambos niveles de verticilo en todas sus poblaciones (Fig. 12). Además, las poblaciones presentan o se acercan bastante a la hercogamia reciproca perfecta (Tabla 2) junto con ser las especies con mayor reciprocidad según el índice (Figs. 9 y 10, Tabla 3).
- *Dimorfismo estilar*: *O. glacialis*. En ambas poblaciones el valor promedio de sus estructuras no se sobrepuso para ninguno de los niveles de verticilo (Fig. 12). Además, mostraron una alta diferencia de hercogamia (distancia estigma-antera) entre morfos (Tabla 2) junto con una baja reciprocidad (Figs. 9 y 10, Tabla 3), índices en el rango de dimorfismo estilar (Ferrero et al. 2009; Haddadchi 2012). A pesar de que se observa una pequeña diferencia entre anteras de ambos morfos¹¹, es radicalmente menor que la diferencia entre estigmas. Asimismo, el solapamiento de la distribución de anteras L y B es el más alto del grupo estudiado (Fig. 11).

¹¹ En la definición clásica de *dimorfismo estilar* se contempla un único nivel de anteras (Lloyd & Webb 1992)

- *Polimorfismo mixto*: *C. macrantha*, *C. palmae* y *C. lithiophila*. En estas especies el valor promedio de sus estructuras se sobrepuso solo para el nivel superior en todas sus poblaciones (excepto para P19, ver a continuación) (Fig. 12). Situación que es posible apreciar también en el solapamiento de sus distribuciones (Fig. 11). Con respecto a la hercogamia (distancia estigma-antera) y la reciprocidad, en *C. lithiophila* se observó una diferencia importante de hercogamia entre morfos (Tabla 2) y una baja reciprocidad, principalmente en el nivel inferior (Figs. 9 y 10, Tabla 3). Distinto a las demás especies, las poblaciones de *C. macrantha* y *C. palmae* presentan una hercogamia y reciprocidad variable entre ellas, situación que también justifica su categoría de polimorfismo mixto.

En el caso particular de *C. macrantha*, la población P19 queda dentro del criterio de diestilia al utilizar el análisis de sobreposición de estructuras con los valores promedio de sus medidas. Ante esta diferencia entre sus poblaciones, se consideró el resto de los análisis de reciprocidad y se decidió asignar a *C. macrantha* la categoría de polimorfismo mixto. En particular, en el análisis de correspondencia espacial (Fig. 12) se observa claramente que la distribución de sus estructuras es amplia y no precisa para ambos niveles como sucede en las especies con diestilia. Frente a la situación de variabilidad entre poblaciones de una misma especie, Ferrero et al. (2011) asigna a tal especie la categoría que se repita en la mayor cantidad de sus poblaciones. En nuestro caso no se pudo utilizar aquel criterio ya que solo hubo dos poblaciones de *C. macrantha*.

Tabla 5. Resumen de resultados de hercogamia, reciprocidad y tipo de polimorfismo floral. El color de las celdas indica el grado de correspondencia entre estructuras complementarias de acuerdo a cada análisis realizado. Rojo, verde y azul; alta, intermedia y baja correspondencia respectivamente.

	Reciprocidad	Hercogamia (mm)		Solapamiento	Solapamiento	Polimorfismo
	Índice	Morfo B	Morfo L	%	promedio	estilar
<i>C. montiana</i> (P8)	0,09	4.0 ± 1.2	= 3.9 ± 0.9	NB >> L	NA-NB	Diestilia
<i>C. verticillata</i> (P3)	0,11	3.9 ± 1.1	= 3.7 ± 0.7	NB >> L	NA-NB	Diestilia
<i>C. montiana</i> (P2)	0,11	4.7 ± 1.5	≠ 3.6 ± 0.8	NB >> L	NA-NB	Diestilia
<i>C. palmae</i> (P18)	0,15	7.3 ± 2.7	≠ 4.3 ± 1.3	NB ≥ L	NA	D. est. Int.
<i>C. verticillata</i> (P5)	0,17	4.4 ± 2.3	= 4.2 ± 1.2	NB >> L	NA-NB	Diestilia
<i>C. macrantha</i> (P19)	0,17	6.3 ± 3.3	≠ 4.4 ± 1.7	NB ≥ L	NA-NB	D. est. Int.
<i>C. hymenodon</i> (P15)	0,17	4.3 ± 1.5	≠ 3.5 ± 1.0	NB >> L	NA-NB	Diestilia
<i>C. hymenodon</i> (P21)	0,18	6.0 ± 1.6	≠ 5.3 ± 1.1	NB > L	NA-NB	Diestilia
<i>C. macrantha</i> (P16)	0,21	7.3 ± 2.0	≠ 3.6 ± 1.7	NB < L	NA	D. est. Int.
<i>C. palmae</i> (P17)	0,25	9.8 ± 2.9	≠ 4.5 ± 1.9	NB < L	NA	D. est. Int.
<i>C. lihiophila</i> (P12)	0,32	6.7 ± 1.8	≠ 3.0 ± 0.8	NB < L	NA	D. est. Int.
<i>O. glacialis</i> (P10)	0,38	9.9 ± 1.7	≠ 4.7 ± 2.1	NB < L	NO	D. estilar
<i>O. glacialis</i> (P11)	0,38	7.8 ± 2.6	≠ 4.8 ± 2.2	NB ≥ L	NO	D. estilar
<i>C. palmae</i> (P20)	0,40	11.9 ± 2.6	≠ 3.9 ± 1.7	NB << L	NA	D. est. Int.

Hercogamia: (•) $p \geq 0,05$; (•) $p \geq 0,01$; (•) $p < 0,01$. % **Solapamiento** (Lau & Bosque 2003): (•) cruce legítimo del nivel inferior supera al cruce ilegítimo del morfo L; (•) cruce legítimo del nivel inferior supera o iguala al cruce ilegítimo del morfo L; (•) cruce ilegítimo del morfo L supera al cruce legítimo del nivel inferior. **Índice de reciprocidad** (Sánchez et al. 2008, 2013): (•) Rep. < 0,2; (•) $0,2 < \text{Rep.} < 0,35$; (•) Rep. > 0,35. **Solapamiento promedio** (Ferrero et al. 2011): (•) sobreposición en ambos niveles de verticilo; (•) sobreposición en nivel superior, desacople en nivel inferior; (•) desacople en ambos niveles de verticilo. **Polimorfismo estilar:** (•) Diestilia; (•) Dimorfismo estilar; (•) Polimorfismo mixto.



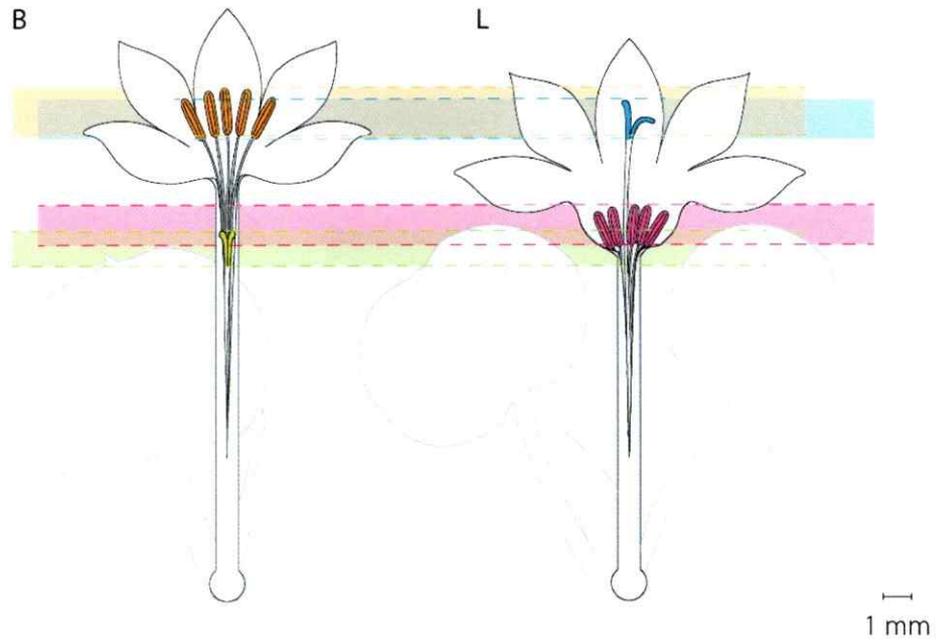
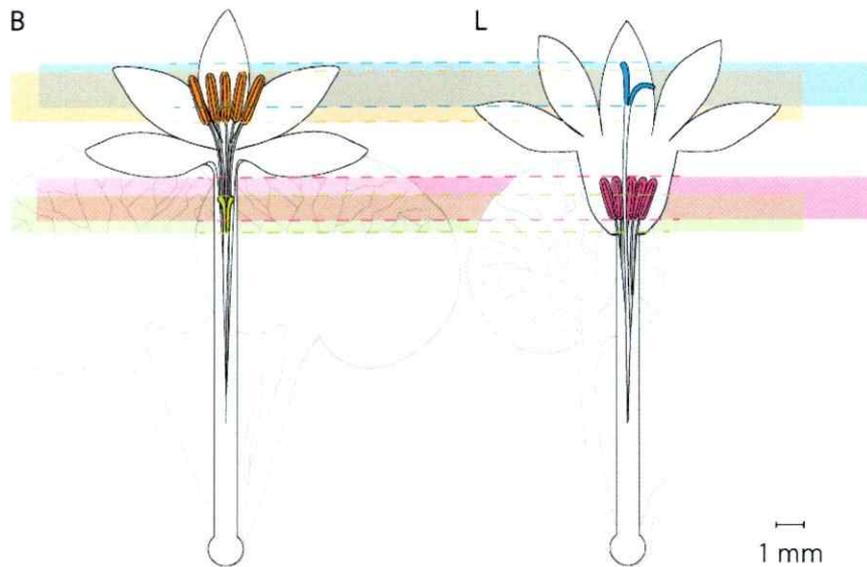
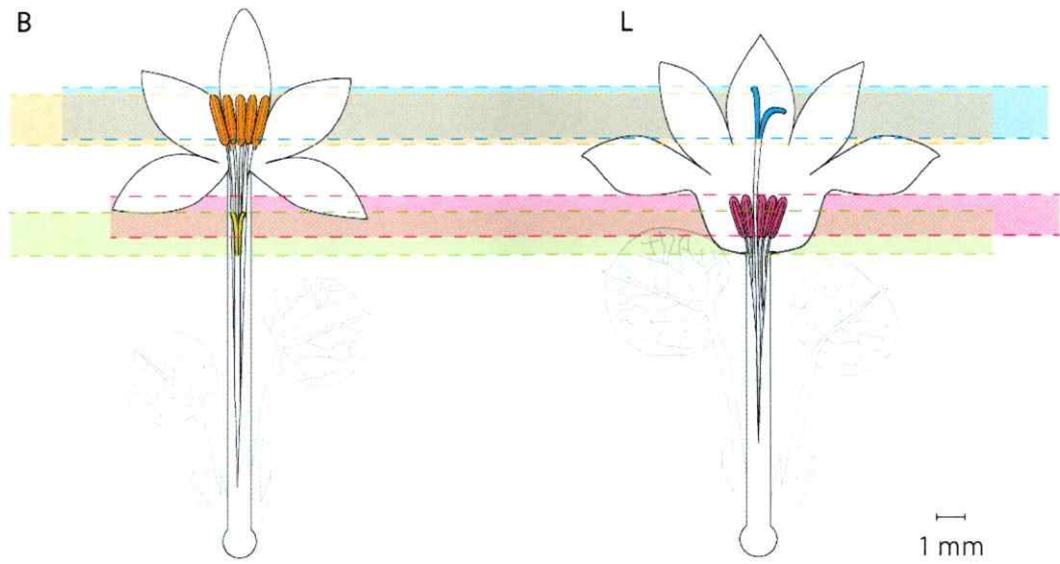
P2 *C. montiana-sur*P8 *C. montiana-sur*

Figura 13. Dibujos a escala real basados en los valores promedio de la medición de rasgos florales. Se muestran todas las especies y poblaciones medidas.

P3 *C. verticillata*



P5 *C. montiana-norte*

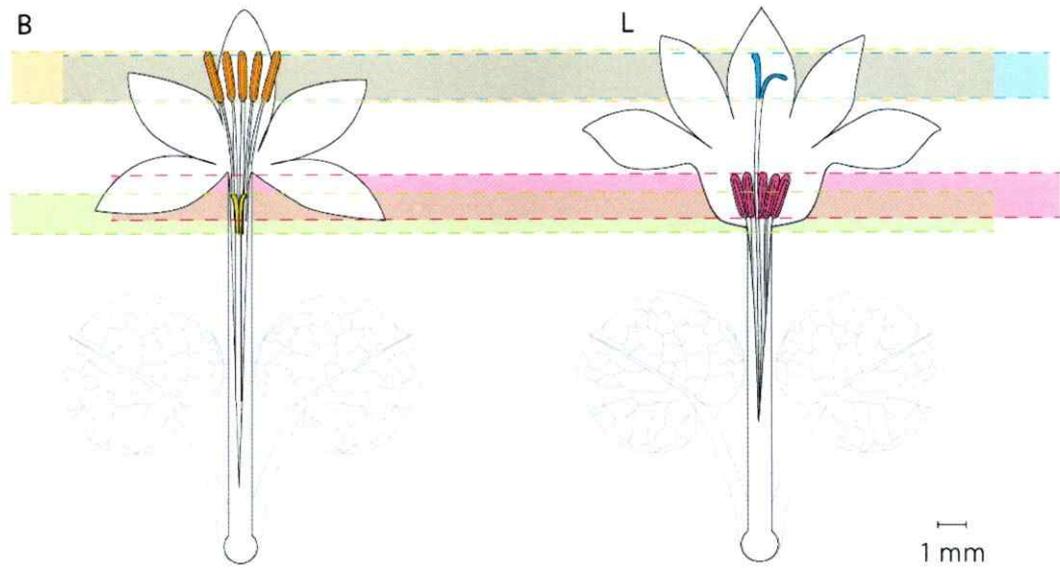


Figura 13. (Continuación).

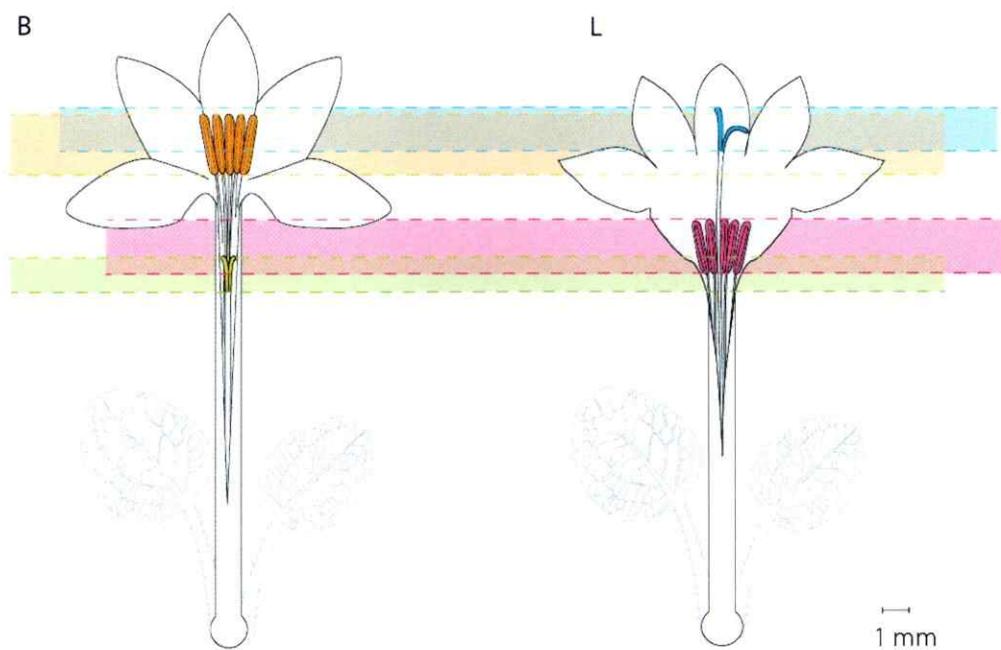
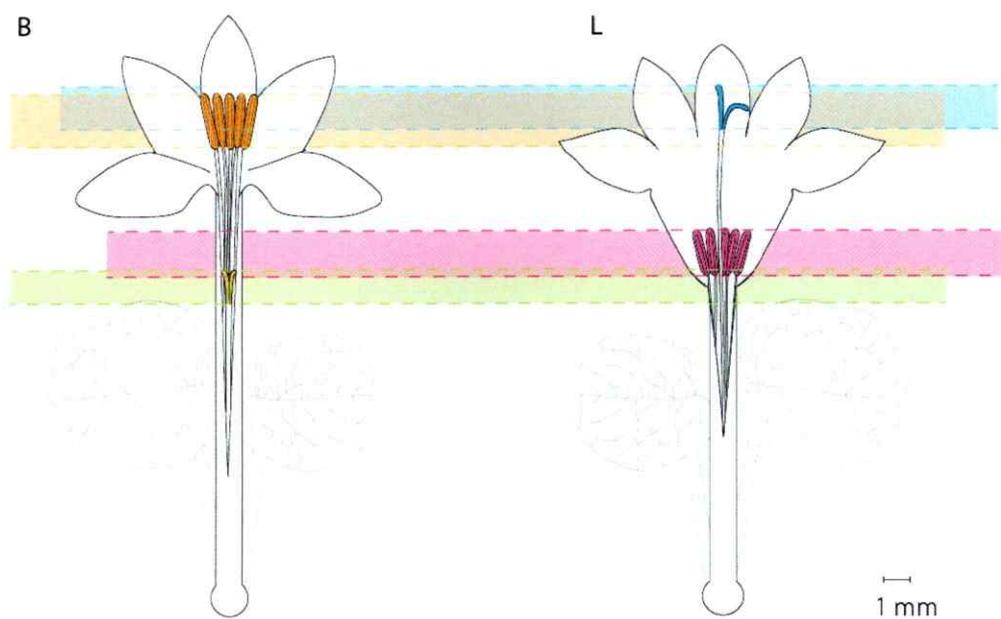
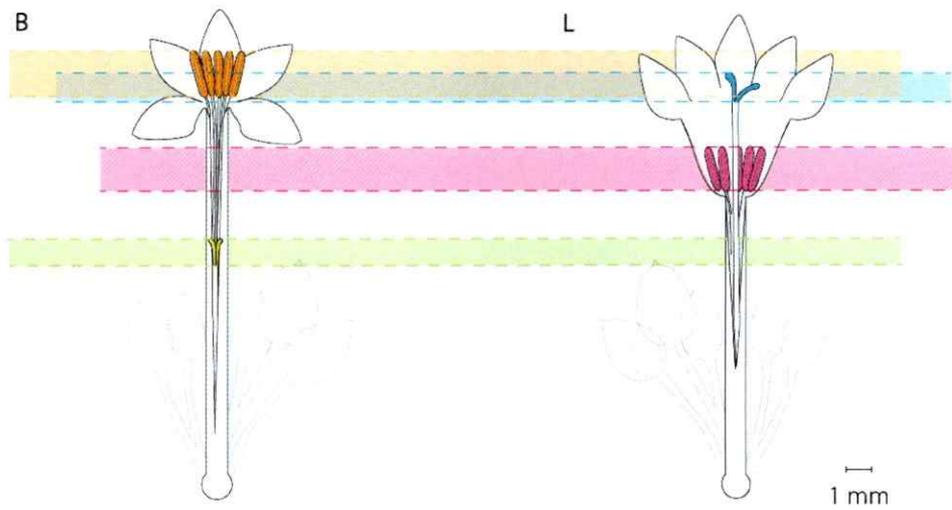
P15 *C. hymenodon*P21 *C. hymenodon*

Figura 13. (Continuación).

P12 *C. lithiophila*



P20 *C. palmae*

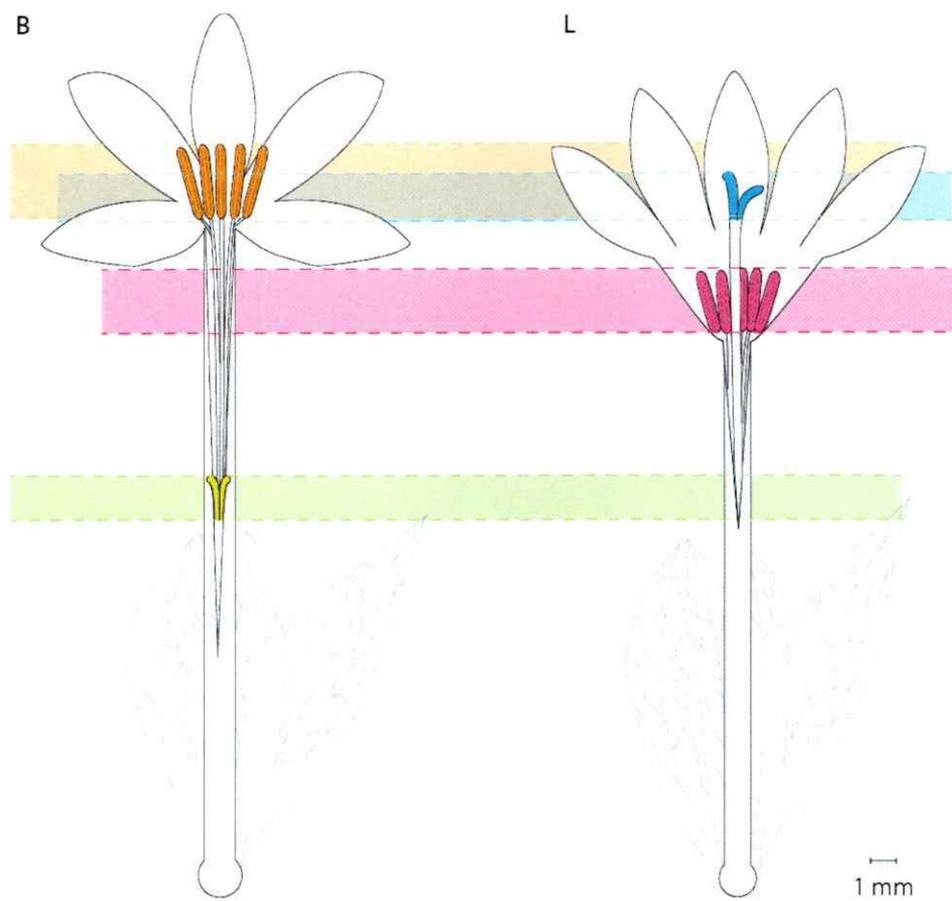


Figura 13. (Continuación).

P17 *C. palmae*



P18 *C. palmae*

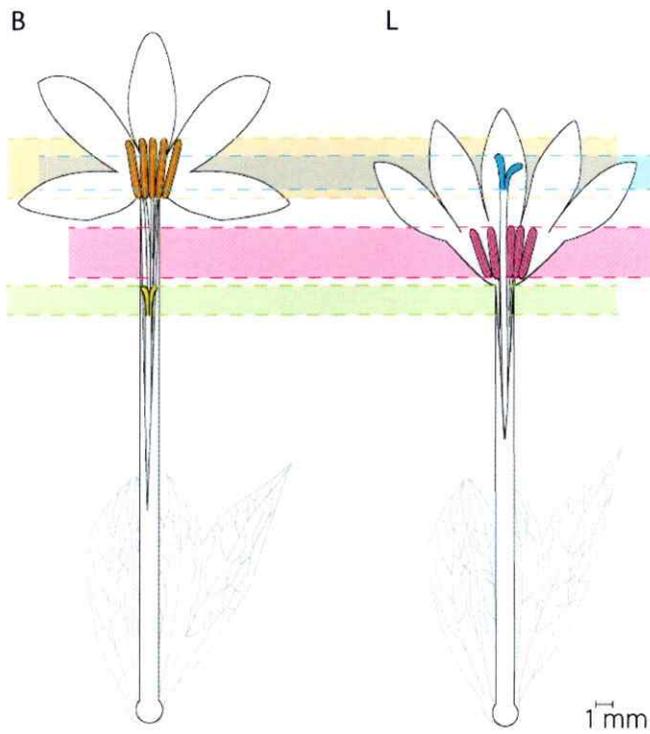
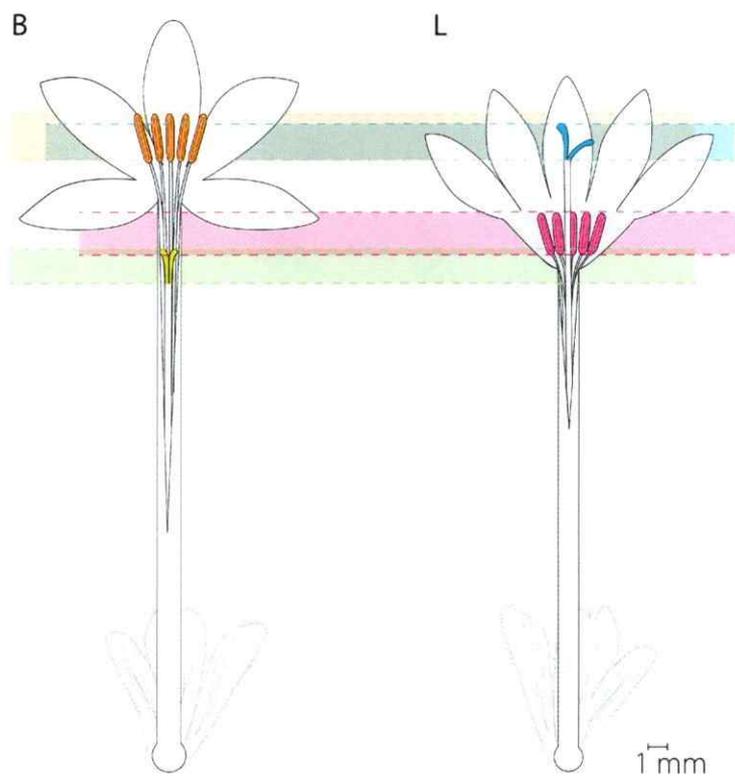


Figura 13. (Continuación).

P19 *C. macrantha*



P16 *C. macrantha*

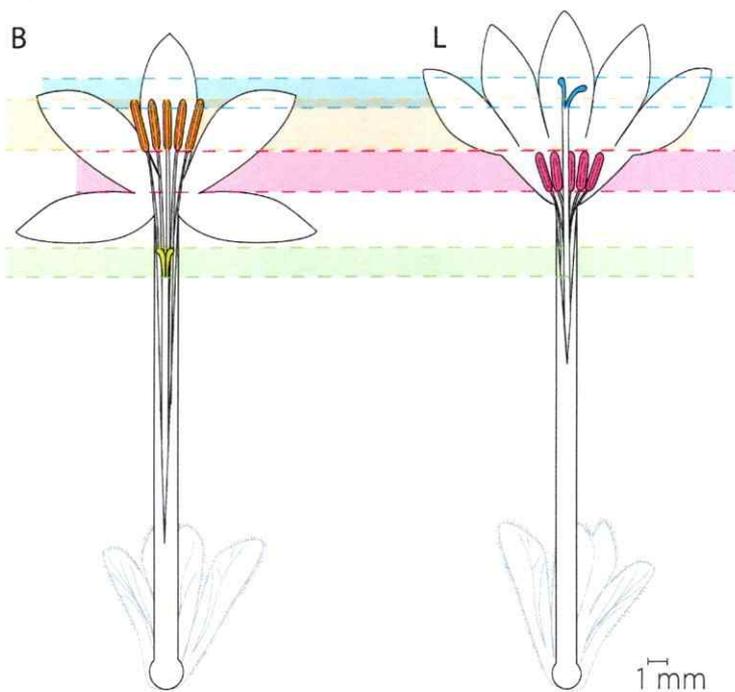


Figura 13. (Continuación).

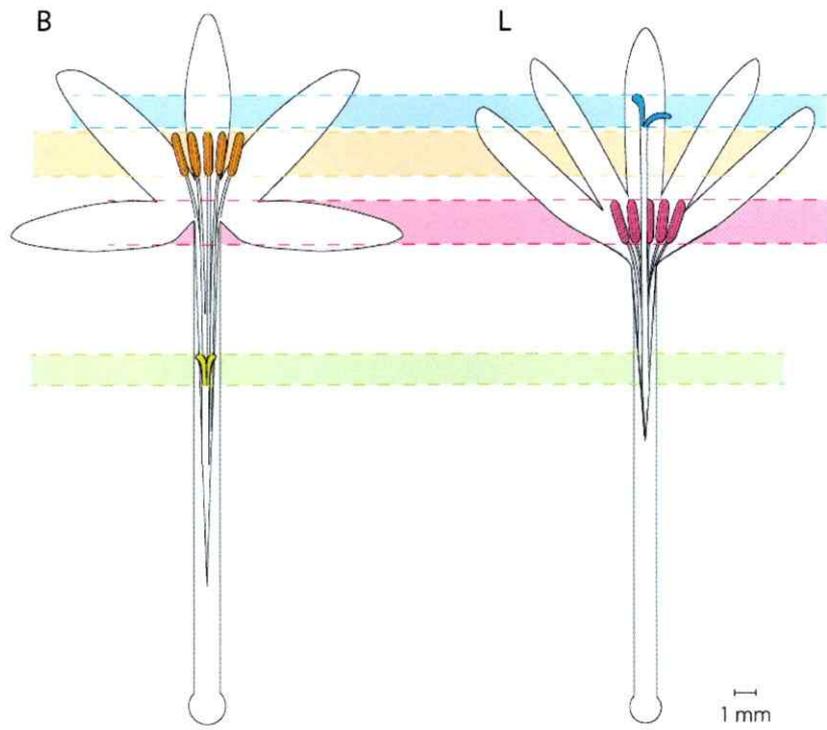
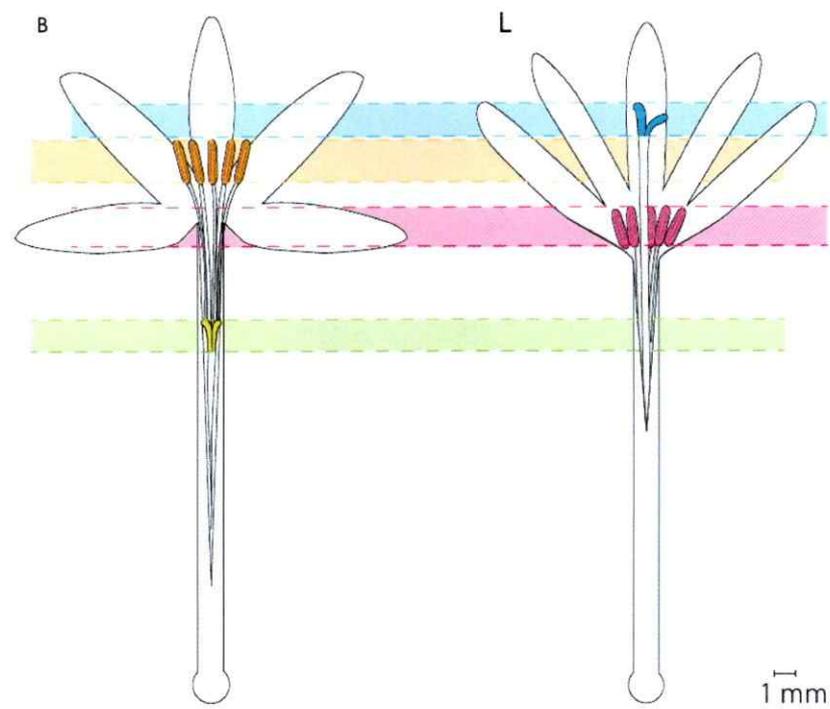
P10 *O. glacialis*P11 *O. glacialis*

Figura 13. (Continuación).

Presentación secundaria de polen

Con respecto a la elongación del estilo posterior a la antesis de la flor, en primera instancia, se constató que los estigmas de flores de antesis reciente se encontraban a una altura muy similar que estigmas de flores abiertas hace más tiempo. Además, al abrir botones maduros manualmente nos encontramos ya con una marcada distancia estigma-antera (hercogamia) (Fig. 13).

Los seguimientos de desarrollo floral a partir de inflorescencias fijadas permiten visualizar la probabilidad de contacto entre anteras y estigmas de manera sincrónica con la dehiscencia de las anteras (Fig. 14). Se observa que las estructuras sexuales dentro de la flor comienzan a distanciarse físicamente desde un estadio temprano, cuando el tubo de la corola ha alcanzado aproximadamente un tercio de su tamaño total. También se percibe que la hercogamia en el morfo L se establece más temprano que en el morfo B, incluso se observan varios casos donde flores B en estadios tempranos presentan una hercogamia positiva (P1, P3, P15 y P19), es decir que sus estigmas estarían sobrepasando las anteras a pesar de pertenecer a individuos B¹².

Debido a la tendencia de aumentar la hercogamia a medida que se desarrolla la flor, el contacto entre ambas estructuras reproductivas ocurre en botones muy pequeños, etapa donde las anteras aún no han liberado polen. No obstante, en algunas poblaciones se registró solapamiento entre anteras y estigmas dentro de una misma flor para flores grandes, en coincidencia con anteras que ya han liberado polen. Dichas flores pertenecen por lo general a individuos de poblaciones particulares donde se constató previamente una baja distancia

¹² En estos casos se recurrió a las fotos originales y se confirmó que los individuos de la inflorescencia completa presentan una hercogamia pequeña extendida en todas sus flores.

estigma-antera (hercogamia) en el morfo L (P19, P20, P12 y P10). Aún en estos casos, la mayor cantidad de registros corresponde a flores ya abiertas. Tomando en cuenta todas las situaciones, las flores candidatas a presentar PSP (es decir morfo longiestilo con contacto entre anteras dehiscentes y estigmas de la misma flor) se encontraron en cinco especies siempre en muy bajos porcentajes: *O. glacialis* (P10): 3,32%; *C. palmae* (P20): 2,09%; *C. macrantha* (P19): 1,17%; *C. hymenodon* (P15): 0,83% y *C. lithiophila* (P12): 0,71% (los porcentajes se calcularon respecto al total de flores longiestilo estudiadas). Comparando este resultado con el análisis de rasgos florales, se observa una clara asociación entre la posibilidad de PSP y la falta de hercogamia recíproca. De hecho las únicas especies que no mostraron ninguna flor candidata a PSP fueron justamente las que exhiben mayor reciprocidad en ambos niveles (*C. montiana* y *C. verticillata*).

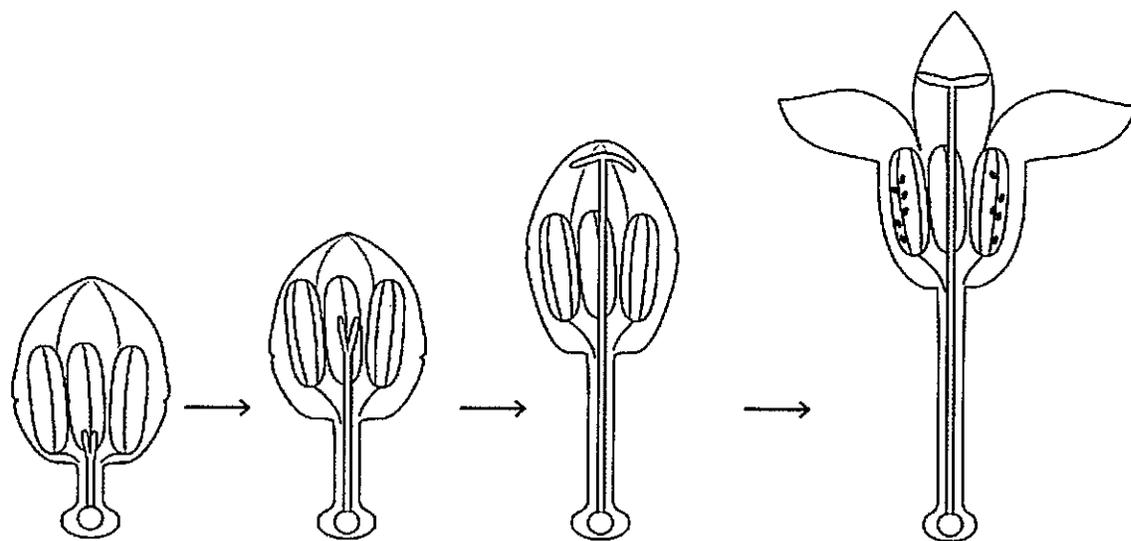


Figura 14. Esquema del desarrollo de un yema de *Oreopolus-Cruckshanksia*. El estigma se muestra bífido desde el inicio y el estilo elonga hasta su altura máxima antes de la apertura de la flor. Las anteras liberan el polen después de la antesis.

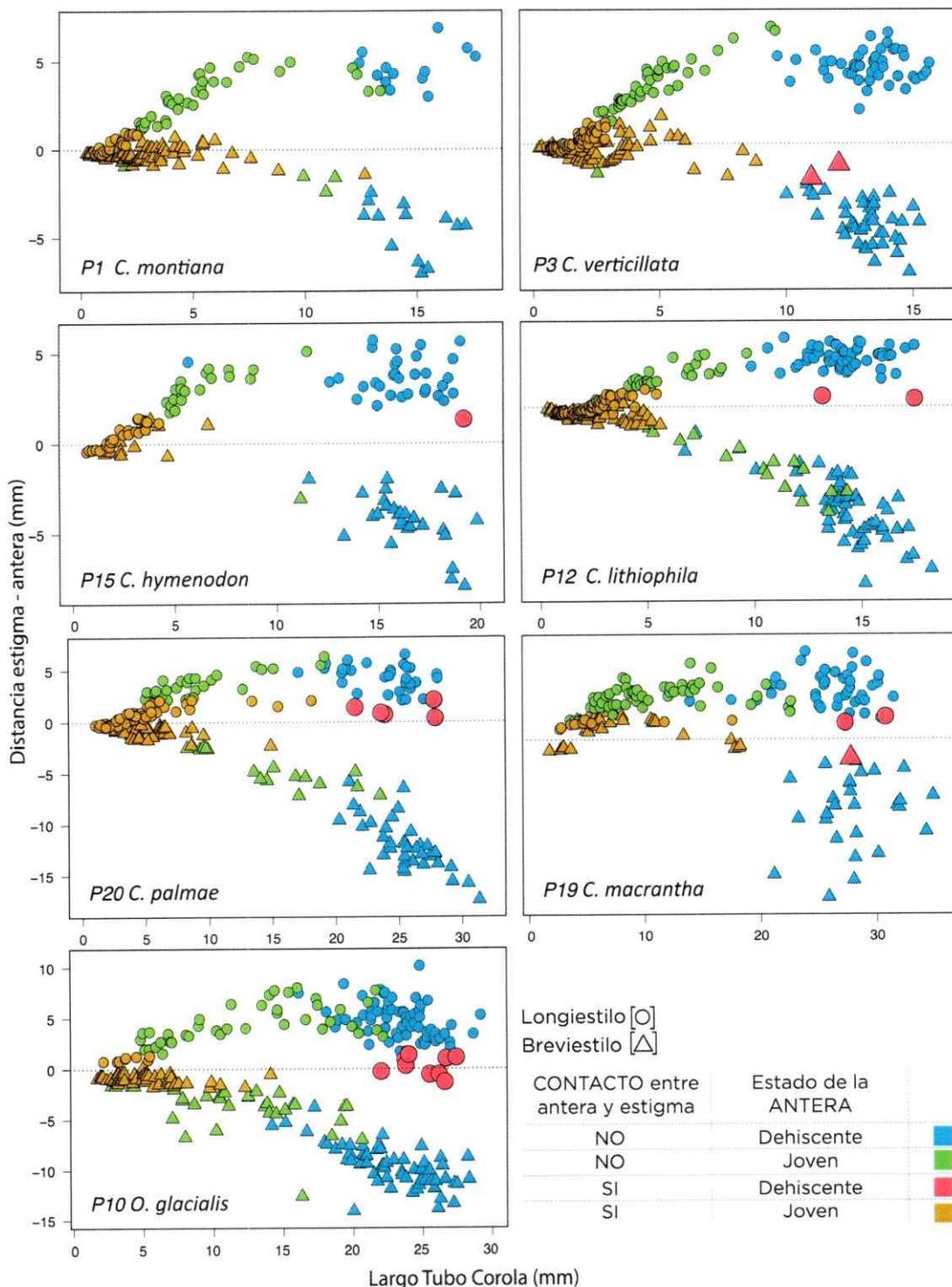


Figura 15. Diagrama para evaluar la existencia de presentación secundaria de polen (PSP). Se indica el contacto entre estigma y anteras de la misma flor y la dehiscencia de las anteras.

Reconstrucción del sistema reproductivo

Índice de reciprocidad

El modelo evolutivo que mejor se ajustó a los datos fue el de movimiento Browniano (BM). Es decir, que la variación del índice de reciprocidad encontrada entre los taxa muestra una tendencia a ser proporcional al largo de rama y constante en el tiempo. El valor de λ de Pagel fue 0,7 indicando algún grado de señal filogenética. Los valores p para la comparación de las verosimilitudes entre los distintos λ no mostraron diferencia significativa con λ_0 ($P = 0,12$) ni tampoco con λ_1 ($P = 0,7$). Este resultado podría deberse a la pérdida de poder estadístico asociado a filogenias con un bajo número de taxa (<30) (Freckleton et al. 2002). En base a lo anterior se midió la señal filogenética de manera adicional con la K de Blomberg, arrojando un valor de $K = 0,7$ ($p = 0,023$). Se concluye que hay una moderada señal filogenética, pero menor a la esperada según el modelo BM.

La reconstrucción del índice de reciprocidad muestra que el estado ancestral del grupo correspondería a un valor de reciprocidad intermedia-baja (0,25), similar a lo que se observa actualmente en P17 de *C. palmae*. En el clado I de *Cruckshanksia*, que agrupa a las especies costeras *C. montiana* y *C. verticillata*, se observa que desde el estado ancestral hay un aumento de la reciprocidad (menores valores del índice); esto sugiere que *C. pumila* (ausente en este análisis), podría ser también una especie recíproca. Por su parte la tendencia del género *Oreopolus* es hacia disminuir la reciprocidad. Distinto ocurre en el linaje II de *Cruckshanksia* donde se observa que el índice de reciprocidad muestra dos reversiones importantes en *C. lithiophila* y *C. palmae* observándose, además, variación entre las poblaciones de esta última especie (Fig. 15).

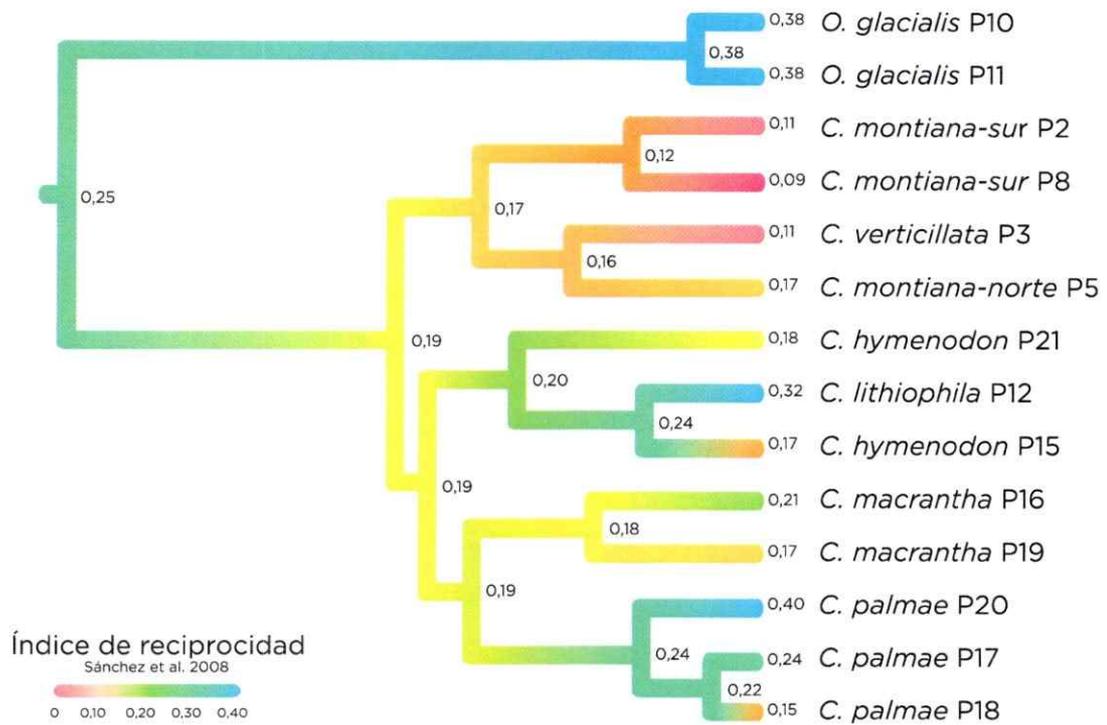


Figura 16. Reconstrucción ancestral del índice de reciprocidad del clado *Oreopolus-Cruckshanksia* bajo el criterio de Máxima Verosimilitud sobre la topología de evidencia total reducida. La mayor reciprocidad (menor valor del índice), se indica con tonalidades cálidas (rojo) y la menor reciprocidad (mayor valor del índice), se indica con tonalidades frías (azul).

Polimorfismo estilar

Se realizó el trazado evolutivo con las tres categorías de polimorfismo estilar establecidas sobre la topología de evidencia total resumida, tanto para Parsimonia como para Máxima Verosimilitud y variando la categoría del clado *C. hymenodon* - *C. lithiophila* (*diestilia* (*C. hymenodon*) o polimorfismo mixto (*C. lithiophila*)). El análisis de ambas aproximaciones determinó que el ancestro del clado *Oreopolus-Cruckshanksia* es ambiguo, es decir, podría haber presentado *diestilia*, *dimorfismo estilar* o *polimorfismo mixto*. El estado ancestral del linaje I sería *diestilia* y del linaje II *diestilia* o *polimorfismo mixto* dependiendo de la especie utilizada para la dupla *C. hymenodon* - *C. lithiophila* (Fig. 16). La evaluación de la señal filogenética en la reconstrucción de Máxima Verosimilitud bajo un modelo de un parámetro con tasas de transición iguales indicó que hay presencia de señal filogenética. Se encontró el mismo resultado tanto en la reconstrucción de *diestilia* ($P = 0,028$) como de polimorfismo mixto ($P = 0,014$) para el clado *C. hymenodon* - *C. lithiophila*.

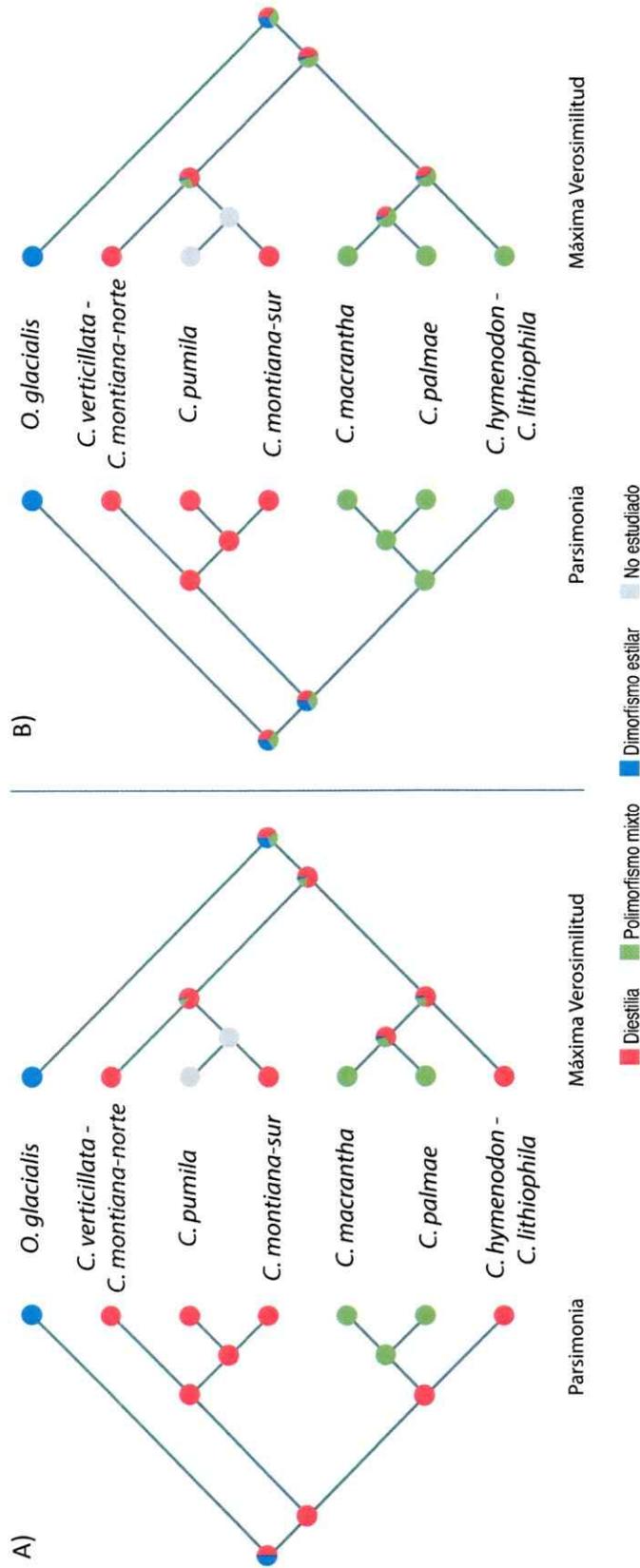


Figura 17. Reconstrucción ancestral del polimorfismo estilar en el clado *Oreopolus-Cruckshanksia* sobre la topología de evidencia total reducida. El clado *C. hymenodon - C. lithiophila* se categorizó según: A) diéstilia (*C. hymenodon*) y B) polimorfismo mixto (*C. lithiophila*). Árbol con ramas hacia la derecha: Criterio de Parsimonia y árbol con ramas hacia la izquierda: Criterio de Máxima Verosimilitud. Estados del rasgo reconstruido: (Naranja) Diéstilia, (Verde) Polimorfismo mixto, (Azul) Dimorfismo estilar, (Blanco) No estudiado.

Evolución correlacionada entre el índice de reciprocidad y la altitud

Se evaluó si cambios en el grado de reciprocidad se asocian a cambios de altitud entre poblaciones. La regresión lineal simple de los datos muestra una tendencia a que al aumentar la altitud también aumente el índice de reciprocidad (pendiente = $4 \cdot 10^{-5}$; $R^2 = 0,32$; $P = 0,035$), es decir, que las poblaciones más recíprocas se encuentran en tierras bajas y las menos recíprocas en la alta cordillera (Figura 15 A). Por el contrario, el análisis de contrastes independientes indica que no hay correlación entre la altitud y el grado de reciprocidad ($R^2 = 0,007$; $P = 0,78$) (Figura 15 B). Ambos resultados sugieren que los rasgos son filogenéticamente dependientes y que la correlación simple observada sería reflejo de la leve señal filogenética.

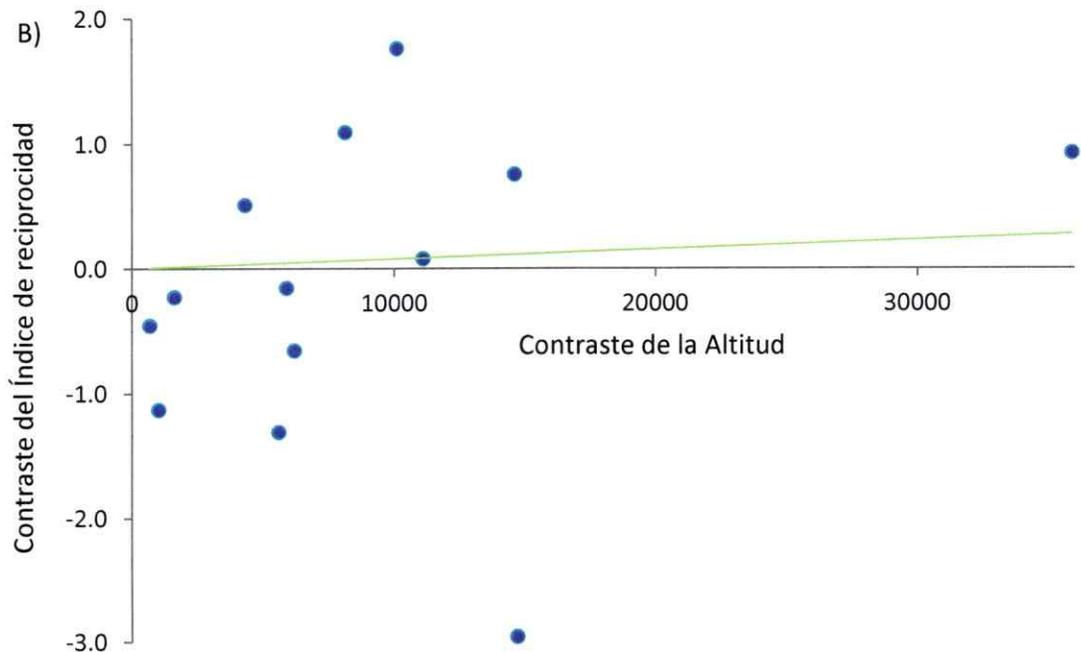
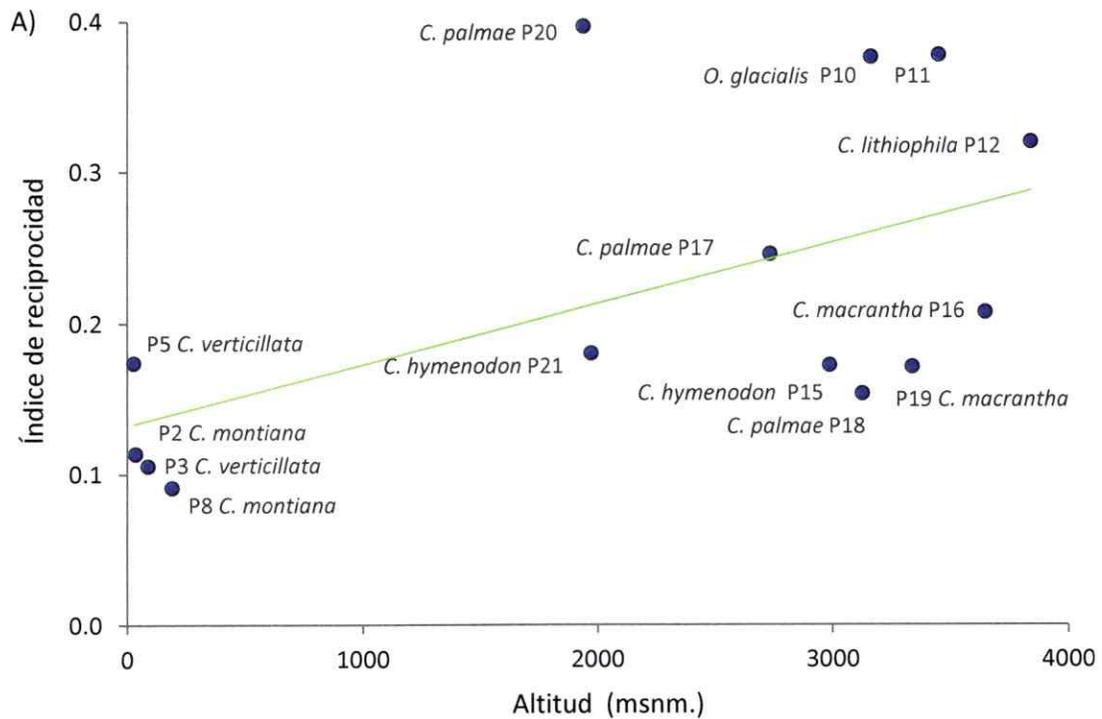


Figura 18. Regresión lineal simple entre altitud y grado de reciprocidad. A) Correlación del índice de reciprocidad en función de la altitud de las poblaciones. B) Correlación de los contrastes filogenéticos del índice de reciprocidad en función de los contrastes de la altitud.

DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta tesis fue indagar sobre la expresión del polimorfismo estilar en el clado *Oreopolus-Cruckshanksia* (Rubiaceae, Rubioideae y Coussareae), endémico de Chile y Argentina, y trazar su evolución en un contexto filogenético. Para llevar a cabo este objetivo, nos propusimos como meta previa esclarecer la relación evolutiva entre los géneros del clado junto con las afinidades de las especies dentro éste con el fin de establecer si es legítimo estudiar ambos géneros en conjunto.

Reconstrucción filogenética del clado Oreopolus-Cruckshanksia

Como se indicó en la introducción, el reconocimiento de *Cruckshanksia* y *Oreopolus* como géneros distintos ha sido ampliamente debatido por parte de los taxónomos durante casi dos siglos. Profundizando en esta problemática el género *Cruckshanksia* fue descrito el año 1833 por William J. Hooker y George Arnott W. en honor al botánico inglés Alejandro Cruckshanks (Hooker 1833; Gunckel 1982). Años después, en 1856, el botánico alemán Diederich von Schlechtendal crea al género *Oreopolus* compuesto por *O. citrinus* Schltdl. descrito a partir de una lámina de *C. glacialis* Poepp. et Endl. (Schlechtendal 1856). En 1873, Bentham y Hooker aceptan al género *Oreopolus* como monotípico para *C. glacialis*, sin hacer la sinonimia entre ambos (Bentham & Hooker 1873). Federico Philippi en el año 1881, conserva como sinónimos a *O. citrinus* y a *C. glacialis* (Philippi 1881). En 1891, Schumann los considera a ambos como un solo género, sumergiendo a *Oreopolus* en *Cruckshanksia* (Schumann 1891). Posteriormente Carlos Reiche en 1902, reconoce únicamente al género *Cruckshanksia* pero lo divide en dos

subgéneros, *Oreopolus* y *Eu-Cruckshanksia* cuya distinción es la presencia o ausencia de cáliz petaloide (apéndice del lóbulo del cáliz similar a un pétalo) (Reiche 1902). En 1963 Ricardi rehabilita al género *Oreopolus* para agrupar las tres especies andinas (*O. glacialis* Poepp, *O. palma* (Clos) Ricardi y *O. macranthus* (Phil.) Ricardi), basándose en el desarrollo del cáliz petaloide, estípulas, fruto y hábitat. El mismo año Ricardi & Quezada (1963) revisan el género *Cruckshanksia* reconociendo siete especies y una variedad (*C. lithiophila* Ricardi, *C. hymenodon* Hook. & Arn., *C. hymenodon* var. *Bustillosii* (Phil.) Ricardi et Quezada, *C. tripartita* Phil., *C. montiana* Clos, *C. capitata* Phil., *C. verticillata* Phil. y *C. pumila* Clos). Por último Taylor (1996) realiza la monografía vigente de los dos géneros, aceptando al igual que Ricardi (1963), la existencia de ambos, pero asignando las especies entre ellos de manera distinta. Considera al género *Oreopolus* como monotípico, compuesto solo por *O. glacialis* con el argumento de que el único carácter que tienen en común las tres especies de *Oreopolus* propuestas por Ricardi sería la ausencia del cáliz petaloide. Por su parte Taylor (1996) reconoce siete especies en *Cruckshanksia* (*C. palmae* Clos, *C. macrantha* Phil., *C. lithiophila*, *C. pumila*, *C. hymenodon*, *C. montiana* y *C. verticillata*), renombrando a *O. palma* y *O. macranthus*, y sinonimizando a algunas especies reconocidas previamente por Ricardi (1963).

Los resultados obtenidos a partir de la reconstrucción filogenética molecular basada en tres regiones de DNA, donde se incluyó información nuclear y plastidial, confirman que *O. glacialis* es grupo hermano de un clado monofilético conformado por todas las especies actualmente reconocidas en *Cruckshanksia*. De este modo, nuestros resultados apoyan fuertemente la tesis de Taylor (1996), al mostrar que *C. macrantha* y *C. palmae*, especies asignadas a *Oreopolus* por Ricardi (1963), son filogenéticamente más cercanas al resto de las especies de *Cruckshanksia* que a *O. glacialis*, reforzando por otro lado el carácter monotípico

de este último. En consecuencia, cuando se trata del cáliz, la sinapomorfía del género *Cruckshanksia* no correspondería a la presencia o ausencia de cáliz de tipo petaloide como propuso Ricardi (1963), sino que a lóbulos del cáliz acrecentados (Taylor 1996). Hay que destacar que la presencia de lóbulos en el cáliz es muy característico de la familia Rubiaceae, apareciendo en muchas de sus tribus y géneros. Se le ha otorgado cierto valor en la identificación de géneros y especies que lo presentan, destacando más que su forma, su presencia desigual en la flor (Verdcourt 1958). Al igual que en *Cruckshanksia*, los géneros *Mussaenda* y *Pentas* contienen especies con lóbulos iguales y desiguales, siendo una característica que puede variar incluso dentro de una misma inflorescencia (Puff 1988), como ha sido visto en *C. hymenodon* (Ricardi & Quezada 1963).

Para el propósito de nuestro estudio más que si son uno o dos géneros, lo relevante es que *Oreopolus* y *Cruckshanksia* son grupos hermanos y forman un grupo monofilético bien definido dentro de la tribu (ver Apéndice 5 para una discusión más profunda sobre las relaciones al interior del género *Cruckshanksia*).

Sistema de reproducción y su evolución

Taylor (1966) propuso que los estilos del morfo L elongan posterior a dehiscencia de las anteras, movilizándolo el polen hacia fuera del tubo de la corola a una posición expuesta y más accesible para ser recogido por polinizadores como ocurre mayoritariamente en el mecanismo de polinización "ixoroide" (PSP) de la subfamilia Ixoroideae, grupo que no se caracteriza por presentar diestilia. En la subfamilia Rubiodeae, a la cual pertenece el clado *Oreopolus-Cruckshanksia*, solo se ha descrito PSP en una especie perteneciente al género monotípico, *Phuopsis* (Yeo 1993). En esta especie los estilos elongan rápidamente luego de la antesis (Puff

& Robbrecht 1996). De esta manera los estigmas recogen el polen liberado con anterioridad. Si bien *P. stylosa* presenta hercogamia de aproximación en sus flores adultas, no es heterostílica.

Nuestros resultados permiten rechazar con bastante confianza la existencia de PSP en el clado *Oreopolus-Cruckshanksia*, al haber descartado la elongación del estilo posterior a la dehiscencia de las anteras y antesis en el morfo L. Tomando en cuenta a géneros diestílicos de la familia Rubiaceae, se ha descrito afinidad a PSP en los géneros *Tricalysia* (Ixoroideae) y *Pauridiantha* (Rubiodeae) (Robbrecht 1988; Yeo 1993; Puff & Robbrecht 1996). En *P. afzelii* se encontró que el extremo superior del estilo del morfo L recibía granos de polen en estado de yema (Puff & Robbrecht 1996). En *Tricalysia*, hay observaciones similares (Puff & Robbrecht 1996). Sin embargo, según Inouye et al. (1994) estos casos no corresponden a PSP en sentido estricto sino que a "transferencia secundaria de polen" (TSP). Se diferencia de PSP en que no es una adaptación que mejora el traspaso del polen al polinizador, si no que representaría una descarga de polen accidental desde las anteras a otro lugar de la flor. Usando la definición estricta de PSP, concluimos su ausencia en clado *Oreopolus-Cruckshanksia*. Por lo tanto, este clado no sería un ejemplo de polinización "ixoroide" asociada a diestilia como propuso Taylor (1996). A lo sumo, podríamos atribuir presencia de TSP en proporciones muy pequeñas de individuos L en algunas especies del clado. Con respecto a la propuesta inicial de Taylor (1996) de presencia de PSP en *Cruckshanksia*, inferimos que podría corresponder a la liberación precoz de polen desde las anteras al momento de prensar el material. Esto debido a que la propuesta de la autora se basa en observaciones de muestras herborizadas.

Con respecto a la expresión del polimorfismo estilar, el estudio cuantitativo que se realizó en la presente tesis reveló una sorprendente variación dentro del clado. Los resultados nos permitieron constatar la presencia de: *diestilia* (hercogamia recíproca), *polimorfismo mixto*

y *dimorfismo estilar*. Si bien algunas especies presentaron hercogamia recíproca perfecta, en otras la distancia estigma-antera fue considerablemente diferente entre morfos. Estas poblaciones se caracterizan por presentar una hercogamia menor en el morfo L que en el morfo B, una mayor diferencia en la altura de estigmas que anteras y una tendencia clara a mantener recíproco el nivel superior y desacoplar el nivel inferior. En *O. glacialis* también se alcanza a desacoplar estrechamente el nivel superior, razón por la cual es considerada la única especie del clado con dimorfismo estilar. Ejemplos similares al nuestro donde la reciprocidad se conserva en el nivel superior se han descrito en especies de *Primula* (Kálmán et al. 2007; Keller et al. 2012) y *Narsissus* (Baker et al. 2000a; Cesaro et al. 2004). También se conocen casos donde sucede lo contrario; el nivel inferior conserva la reciprocidad y el nivel superior se desacopla (Lau & Bosque 2003; Ferrero et al. 2011).

La reconstrucción de la reciprocidad en las poblaciones estudiadas del clado *Oreopolus-Cruckshanksia* muestra que es un rasgo reproductivo lábil, observándose incluso, diferencias importantes entre poblaciones de la misma especie (por ejemplo en *C. macrantha* y *C. palmae*) (Faire & McDade 2001; Ferrero et al. 2011). A pesar de ello, existe una leve señal filogenética, probablemente sustentada por el grupo de especies costeras (linaje I). Estas especies son categorizadas aquí como diestilicas y su linaje es de carácter recíproco. Las reconstrucciones, tanto de las diferentes expresiones del polimorfismo como de la reciprocidad, mostraron un ancestro ambiguo para el clado *Oreopolus-Cruckshanksia*. El valor estimado estuvo dentro del rango de lo que denominamos *polimorfismo mixto*, pero este carácter no apareció como estado ancestral en la reconstrucción por caracteres discretos. No se pudo evaluar el modelo de Lloyd & Webb (1992) ya que no se encontró hercogamia de aproximación en el clado.

Respecto a esta propuesta, podemos concluir que la vía evolutiva hacia la diestilia no correspondería al caso del clado *Oreopolus-Cruckshanksia*.

Existen numerosos casos de transiciones del sistema reproductivo en plantas con heterostilia. Sin embargo, la mayoría de ellos documentan transiciones solo entre homostilia, heterostilia y dioecia. Por ejemplo, en una reconstrucción realizada dentro de la familia Menyanthaceae se constató transición entre heterostilia y dioecia (Tippery et al. 2008). También se ha observado pérdida de diestilia hacia homostilia a nivel del género en *Amsinckia* (Boraginaceae) (Schoen et al. 1997). En *Nymphoides* la reconstrucción de carácter ancestral indica que las primeras especies fueron heterostilicas seguidas por cuatro transiciones independientes a homostilia y por cuatro subsecuentes reversiones a heterostilia (Tippery & Les 2011). Incluso se han visto transiciones entre homostilia y diestilia a nivel de variedades dentro de una especie, como es el caso de *Ophiorrhiza japonica* (Rubiaceae) (Nakamura et al. 2007). La relevancia de nuestros resultados radica en que indican labilidad en la expresión de polimorfismos estilares a una escala mucho más fina que la usualmente reportada. Se conocen escasos estudios previos sobre evolución de polimorfismos estilares para un género, que consideren el dimorfismo estilar; *Narcissus* (Graham & Barrett 2004; Barrett & Harder 2005) y *Lithodora* (Ferrero et al. 2009). Creemos que esta sutil variación podría aparecer en muchos otros grupos de plantas heterostilas al efectuar mediciones cuantitativas con el nivel de detalle que se utilizó en este trabajo. Ferrero et al. (2012) en un estudio de la pérdida de heterostilia en la familia Rubiaceae, concluyó que el ancestro de la tribu Coussareeae es de carácter heterostilo. A partir de la variación encontrada en la expresión del polimorfismo estilar del clado *Oreopolus-Cruckshanksia* sería atractivo revisar esta conclusión. Incluso, la misma autora del trabajo discute sobre la importancia de utilizar la información a nivel de especies y no reducirla solo a



los géneros. Un estudio más detallado sobre la condición del polimorfismo estilar en la tribu Coussareeae, se vuelve aún más interesante al revisar los datos de Richards & Koptur (1993) en su trabajo clásico del índice de reciprocidad. En él, encontramos que *Faramea suerrensis* es la especie con menor reciprocidad del grupo estudiado, mostrándose más recíproca para el nivel superior que el inferior. El género *Faramea* que es parte de la tribu Coussareeae, al igual que *Cruckshanksia* y *Oreopolus*, presenta diestilia en muchas de sus especies. Un estudio detallado de todos los géneros de Coussareeae, como se ha efectuado en esta tesis, sin duda ayudaría en resolver de manera mejor el estado ancestral del polimorfismo estilar en la tribu.

A partir de los resultados surge la pregunta: ¿Qué subyace a la variación en la expresión del polimorfismo estilar en el clado *Oreopolus-Cruckshanksia*? Una consecuencia esperable de la pérdida de hercogamia en el morfo L es el incremento potencial de la autofecundación autónoma en dicho morfo. Así se documentó en *Palicourea fendleri* para el caso de menor hercogamia en el morfo B (Lau & Bosque 2003). Si esto ocurriese, se esperaría también encontrar una desviación de la isoplethia hacia el morfo L, tal como ocurre en muchas especies de *Narcissus* con dimorfismo estilar (Barrett 2000). En este estudio encontramos la conjunción de ambas características en dos especies de la cordillera, *O. glacialis* y *C. macrantha* (una de dos poblaciones). La tendencia encontrada podría ser una respuesta a las bajas tasas de polinización en la alta cordillera (Arroyo et al. 1985). En este contexto destaca que la especie con menor reciprocidad en el morfo L y con una mayor posibilidad de autofecundación autónoma es *O. glacialis*. Esta especie, es la única del clado que llega a la zona alpina superior donde las condiciones son muy extremas para la polinización biótica. También habita en la estepa patagónica donde la polinización biótica es obstaculizada debido a los fuertes vientos. Por el contrario, las especies con hercogamia recíproca típica habitan a alturas menores en el

desierto donde las condiciones para la actividad de mariposas (los polinizadores principales del clado (Arroyo et al. 1982) y observación personal en *C. montiana*) si bien pueden ser variables en la franja costera debido a la neblina (Cereceda et al. 2008), suelen ser muy buenas en algunos días y horas del día. No obstante estas posibles relaciones ecológicas, la falta de relación entre la reciprocidad y altitud cuando se eliminó el efecto de las relaciones evolutivas, sugiere que factores históricos podrían estar involucrados. En el caso de que el dimorfismo estilar se encuentre en una vía evolutiva hacia la autogamia autónoma, surge la pregunta de por qué se observa entonces una mantención de ambos morfos. Bajo la lógica de Darwin (1877) y Lloyd & Webb (1992) los dos morfos se conservarían solo si (a pesar de la falta de reciprocidad) existe una mayor tasa de cruce legítimo que ilegítimo (Baker et al. 2000b). Cuando la transferencia de polen legítimo es efectiva solo en uno de los niveles, se propone que la mantención de ambos ocurre porque en un morfo se beneficia la función masculina y en el otro la femenina (Cesaro & Thompson 2004). En *Cruckshanksia* y *Oreopolus* el análisis de estructuras por solapamiento, estableció que si bien un estigma L tenía una alta posibilidad de recibir polen de anteras de su mismo morfo (cruce ilegítimo), la posibilidad de recibir polen de anteras B (cruce legítimo) es mayor. Situación que invita en un estudio posterior a comprobar si efectivamente el cruce legítimo del nivel superior compensa el cruce ilegítimo del morfo L. Con respecto a la disociación de las funciones femenina y masculina en cada morfo, es interesante destacar que alcanza su máxima expresión en casos de transiciones de diestilia a dioecia (Pailler et al. 1998), donde se favorece la fecundación cruzada sobre la autogamia autónoma. En *Quinchamalium chilense* se ha descrito una hercogamia recíproca imperfecta, similar a lo ocurrido en *O. glacialis*, junto con una condición de autocompatibilidad para ambos morfos, los autores lo han denominado como una condición de subdioecia sugiriendo que esta vía evolutiva

hacia la dioecia habría aparecido para contrarrestar los efectos negativos asociados a la autogamia (Riveros et al. 1987). Las múltiples expresiones del polimorfismo estilar que han ido apareciendo en estudios recientes junto con las transiciones documentadas en el clado *Oreopolus-Cruckshanksia* en un tiempo evolutivo relativamente corto, sugieren que se trata de un sistema de reproducción que puede responder rápidamente a selección por polinizadores.

En conclusión, nuestro estudio sobre la expresión del polimorfismo estilar en el clado *Oreopolus-Cruckshanksia* en un contexto filogenético, proporciona amplia evidencia de que este particular sistema de reproducción en plantas puede ser variable entre taxa cercanamente emparentados. No sería sorprendente encontrar también en el clado estudiado transiciones en el sistema de incompatibilidad genética (SI). Observaciones preliminares en *C. verticillata*, en donde se cuantificó el porcentaje de semillas formadas en plantas excluidas de polinizadores, mostraron que éstas produjeron un décimo de las semillas producidas en plantas expuestas a polinizadores. Esto quiere decir, que al parecer, nos encontramos frente a un grado de autocompatibilidad y autogamia autónoma, incluso en las especies con el mayor grado de hercogamia recíproca. Futuros estudios deben enfocarse sobre la incompatibilidad genética, los caracteres secundarios y la disponibilidad de polinizadores a lo largo de la amplia distribución latitudinal y altitudinal del clado, donde existe una gran diversidad de condiciones climáticas. Así mismo se requiere incorporar nuevos marcadores en la reconstrucción de la filogenia con el objetivo de mejorar el soporte de algunos de los nodos.

Consideraciones adicionales

Destacamos que las únicas especies representantes del clado *Oreopolus-Cruckshanksia* utilizadas en estudios filogenéticos previos han sido *O. glacialis* y *C. hymenodon*. La información generada en esta tesis junto con el trabajo llevado a cabo en Brasil que busca incorporar dos nuevos géneros a la tribu (Amaral de Oliveira 2012; Delprete & Jardim 2012) son un gran aporte hacia la comprensión de las relaciones evolutivas de la tribu Coussareeae.

Hasta el momento, existen numerosos taxa de gran diversidad en el Desierto de Atacama y los Andes que aún no presentan estudios filogenéticos, entre ellos *Atriplex*, *Cristaria*, *Cryptantha*, *Haageocereus*, *Lycium*, *Spergularia*, *Tillandsia* y *Cruckshanksia* (hasta ahora) (Luebert 2011). Con respecto a la filogeografía, solo se conoce el estudio realizado en dos especies de *Nolana* (Ossa et al. 2013). Al interior de *Cruckshanksia*, los resultados mostraron la existencia de dos linajes que son consistentes con la morfología y la distribución. El linaje I agrupa a las especies que presentan petaloides de color amarillo con distribución en el desierto costero y el desierto interior (solo *C. pumila*). Y el linaje II, a las especies cordilleranas junto con la ampliamente distribuida *C. hymenodon*, caracterizadas por tener por exhibir lóbulos del cáliz acrecentados o apéndice petaloide. Aunque no fue el propósito de esta tesis, los resultados filogenéticos destaparon interesantes problemáticas que se detallan en el Apéndice 5. Tomando los antecedentes expuestos (Apéndice 5) resulta evidente que los taxa del clado *Oreopolus-Cruckshanksia* son buenos candidatos para estudios de filogeografía. Se destaca que las especies del clado divergieron recientemente, alrededor de los 10 Ma, en concordancia con la hiperaridización del Desierto de Atacama y el último gran alzamiento de la Cordillera de los Andes (Gregory-Wodzicki 2000; Fariás 2007), de tal forma que se trata de un

caso de activa evolución tal como se ha observado en otros géneros (e.g. *Leucocoryne* (Jara-Arancio et al. 2014)). No sorprende entonces la dificultad encontrada al delimitar tanto morfológica como molecularmente a las especies del grupo. Por otra parte, los estudios filogenéticos vislumbran que *C. lithiophila*, de acotada distribución, podría considerarse como una variedad de la especie ampliamente distribuida *C. hymenodon* (ver Apéndice 5).

CONCLUSIONES

- Se confirmó que *O. glacialis* es grupo hermano de las especies de *Cruckshanksia*. La evidencia filogenética apoya la propuesta taxonómica de Taylor (1996) en cuanto a la pertenencia de especies en *Oreopolus* y *Cruckshanksia*.
- Las especies *C. palmae* y *C. macrantha* son más cercanas filogenéticamente al resto de las especies de *Cruckshanksia* que a *O. glacialis*, contrario a lo que propuso inicialmente (Ricardi 1963).
- Se constató variación en la expresión del polimorfismo estilar en los géneros estudiados incluso a nivel intraespecífico. Se encontraron tres condiciones: hercogamia recíproca, polimorfismo mixto y dimorfismo estilar entre las especies previamente descritas como diestílicas.
- En el clado *Oreopolus-Cruckshanksia* no se encontró presencia de presentación secundaria de polen (mecanismo de polinización "ixoroide").
- Se observó labilidad en el grado de reciprocidad. No se pudo establecer el polimorfismo estilar ancestral del grupo.
- Aunque existe una tendencia entre el grado de reciprocidad y la altitud, esta relación desaparece cuando se consideran las relaciones filogenéticas.

REFERENCIAS

- Abràmoff M, Magalhaes P, Ram S (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics international* 11: 36–42.
- Amaral de Oliveira J (2012) Filogenia e revisão taxonômica de *Bradea* Standl. e *Standleya* Brade (Rubiaceae). Thesis: Maestranda. *Escola Nacional de Botânica Tropical*. Rio de Janeiro, Brasil.
- Arroyo M, Armesto J, Primack RB (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, Armesto JJ (1982) Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of central Chile. I. Pollination mechanisms and altitudinal variation. *American Journal of Botany* 69: 82–97.
- Baena-Díaz F, Fornoni J, Sosenski P, Molina-Freaner FE, Weller SG, Pérez-Ishiwara R, Domínguez C a (2012) Changes in reciprocal herkogamy during the tristylly-distylly transition in *Oxalis alpina* increase efficiency in pollen transfer. *Journal of evolutionary biology* 25: 574–583.
- Baker AM, Thompson JD, Barrett SCH (2000a) Evolution and maintenance of stigma-height dimorphism in *Narcissus*. I. Floral variation and style-morph ratios. *Heredity* 84: 502–513.
- Baker A, Thompson J, Barrett SCH (2000b) Evolution and maintenance of stigma-height dimorphism in *Narcissus*. II. Fitness comparisons between style morphs. *Heredity* 84: 514–524.
- Barrett S (1988) The evolution, maintenance, and loss of self-incompatibility systems. In: Lovett Doust J, Lovett Doust L (Eds.), "*Plant reproductive ecology. Patterns and strategies*", Oxford University Press, United States of America, New York, p. 344.
- Barrett SCH (1992) *Evolution and function of heterostyly*. Springer-Verlag, Berlin.
- Barrett S (2000) The Evolution and Function of Styler Polymorphisms in Flowering Plants. *Annals of Botany* 85: 253–265.
- Barrett S (2002a) Sexual interference of the floral kind. *Heredity* 154–159.
- Barrett SCH (2002b) The evolution of plant sexual diversity. *Nature reviews. Genetics* 3: 274–284.
- Barrett S, Glover D (1985) On the Darwinian hypothesis of the adaptive significance of tristylly. *Evolution* 39: 766–774.

- Barrett SCH, Harder LD (2005) The evolution of polymorphic sexual systems in daffodils (*Narcissus*). *The New phytologist* 165: 45–53.
- Barrett S, Richards J (1990) Heterostyly in tropical plants. *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 35–61.
- Beach J, Bawa K (1980) Role of pollinators in the evolution of dioecy from distyly. *Evolution* 34: 1138–1142.
- Bentham G, Hooker JD (1873) *Genera plantarum: ad exemplaria imprimis in Herbariis Kewensibus servata definita*. Printed by Spottiswoode and Co., London, England.
- Bjorkman T (1995) The effectiveness of heterostyly in preventing illegitimate pollination in dish-shaped flowers. *Sexual Plant Reproduction* 8: 143–146.
- Blomberg SP, Garland T, Ives AR (2003) Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution; international journal of organic evolution* 57: 717–745.
- Bremekamp CEB (1966) Remarks on the position, the delimitation and the subdivision of the Rubiaceae. *Acta Botanica Neerlandica* 15: 1–33.
- Bremer B, Eriksson T (2009) Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. *International Journal of Plant Sciences* 170: 766–793.
- Bremer B, Manen J-F (2000) Phylogeny and classification of the subfamily Rubioideae (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 225: 43–72.
- Broughton R, Stanley SE, Durrett RT (2000) Quantification of homoplasy for nucleotide transitions and transversions and a reexamination of assumptions in weighted phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 49: 617–627.
- Carolin RC (1960) The structure involved in the presentation of pollen to visiting insects in the Order Campanales. *Proceedings of the Linnean Society of New South Wales* 85: 197–207.
- Cereceda P, Larrain H, Osses P, Farías M, Egaña I (2008) The spatial and temporal variability of fog and its relation to fog oases in the Atacama Desert, Chile. *Atmospheric Research* 87: 312–323.
- Cesaro AC, Barrett SC, Maurice S, Vaissiere BE, Thompson JD (2004) An experimental evaluation of self-interference in *Narcissus assoanus*: functional and evolutionary implications. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 1367–1376.
- Cesaro AC, Thompson JD (2004) Darwin's cross-promotion hypothesis and the evolution of stylar polymorphism. *Ecology Letters* 7: 1209–1215.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods* 9: 772.

- Darwin C (1877)** *The different forms of flowers on plants of the same species*. John Murray, London, England.
- Delprete P, Jardim J (2012)** Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: an overview about the current status and future challenges. *Rodriguésia* 63: 101–128.
- Drabkova L, Kirschner J, Vlček Ć (2002)** Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of Juncaceae. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 161–175.
- Drummond AJ, Suchard M a, Xie D, Rambaut A (2012)** Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution* 29: 1969–1973.
- Eckert C, Barrett S (1994)** Tristyly, self-c compatibility and floral variation in *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 53: 1–30.
- Faivre A, McDade L (2001)** Population-level variation in the expression of heterostyly in three species of Rubiaceae: does reciprocal placement of anthers and stigmas characterize heterostyly?. *American Journal of Botany* 88: 841–853.
- Faria RR, Ferrero V, Navarro L, Araujo AC (2011)** Flexible mating system in distylous populations of *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae) in Brazilian Cerrado. *Plant Systematics and Evolution* 298: 619–627.
- Fariás MA (2007)** *Tectónica y erosión en la evolución del relieve de los Andes de Chile central durante el Neogeno*. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile.
- Farris J, Källersjö M, Kluge AG, Bult C (1995)** Constructing a significance test for incongruence. *Systematic Biology* 44: 570–572.
- Ferrero V, Arroyo J, Vargas P, Thompson JD, Navarro L (2009)** Evolutionary transitions of style polymorphisms in *Lithodora* (Boraginaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 11: 111–125.
- Ferrero V, Chapela I, Arroyo J, Navarro L (2011)** Reciprocal style polymorphisms are not easily categorised: the case of heterostyly in *Lithodora* and *Glandora* (Boraginaceae). *Plant biology (Stuttgart, Germany)* 13 Suppl 1: 7–18.
- Ferrero V, Rojas D, Vale a., Navarro L (2012)** Delving into the loss of heterostyly in Rubiaceae: Is there a similar trend in tropical and non-tropical climate zones?. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 14: 161–167.
- Freckleton RP, Harvey PH, Pagel M (2002)** Phylogenetic analysis and comparative data: a test and review of evidence. *The American naturalist* 160: 712–726.
- Ganders F (1974)** Disassortative pollination in the distylous plant *Jepsonia heterandra*. *Canadian Journal of Botany* 52: 2401–2406.

- Graham A (1985)** Studies in neotropical paleobotany. IV. The Eocene communities of Panama. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 72: 504–534.
- Graham SW, Barrett SCH (2004)** Phylogenetic reconstruction of the evolution of stylar polymorphisms in *Narcissus* (Amaryllidaceae). *American Journal of Botany* 91: 1007–1021.
- Gregory-Wodzicki KM (2000)** Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *Geological Society of America Bulletin* 112: 1091–1105.
- Gunckel H (1982)** Significado de nombres genéricos de algunas plantas de la flora chilena. *Academia Superior de Ciencias Pedagógicas* 4: 157–180.
- Haddadchi A (2012)** Stylar polymorphism, reciprocity and incompatibility systems in *Nymphoides montana* (Menyanthaceae) endemic to southeastern Australia. *Plant Systematics and Evolution* 299: 389–401.
- Hall T (1999)** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. *Nucleic Acids Symposium Series* 95–98.
- Harmon L, Weir JT, Brock CD, Glor RE, Challenger W (2008)** Geiger: investigating evolutionary radiations. *Bioinformatics* 24: 129–131.
- Hernandez A, Ornelas J (2007)** Disassortative pollen transfer in distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae), a hummingbird-pollinated shrub. *Ecoscience* 14: 8–16.
- Hillis DM, Bull JJ (1993)** An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42: 182–192.
- Hooker W (1833)** *Botanical miscellany*. London: John Murray, London, England.
- Howell GJ, Slater AT, Knox RB (1993)** Secondary pollen presentation in angiosperms and its biological significance. *Australian Journal of Botany* 41: 417–438.
- Huang W, Sun H, Deng T, Razafimandimbison SG, Nie Z-L, Wen J (2013)** Molecular phylogenetics and biogeography of the eastern Asian-eastern North American disjunct *Mitchella* and its close relative *Damnacanthus* (Rubiaceae, Mitchelleae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 171: 395–412.
- Igersheim A (1993)** Gynoecium development in Rubiaceae-Vanguerieae, with particular reference to the “stylar head”-complex and secondary pollen presentation. *Plant Systematics and Evolution* 187: 175–190.
- Imbert F, Richards J (1993)** Protandry, incompatibility, and secondary pollen presentation in *Cephalanthus occidentalis* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 80: 395–404.
- Inouye D, Gill D, Dudash M, Fenster C (1994)** A model and lexicon for pollen fate. *American Journal of Botany* 81: 1517–1530.
- JanBen (2006)** DNeasy Plant Mini Kit. Handbook for DNA Isolation from Plant Tissue. *QIAGEN Company*.

- Jara-Arancio P, Arroyo MTK, Guerrero PC, Hinojosa LF, Arancio G, Méndez M a. (2014) Phylogenetic perspectives on biome shifts in *Leucocoryne* (Alliaceae) in relation to climatic niche evolution in western South America (M Carine, Ed.). *Journal of Biogeography* 41: 328–338.
- Kálmán K, Medvegy A, Péntes Z, Mihalik E (2007) Morph-specific variation of floral traits associated with reciprocal herkogamy in natural populations of *Primula vulgaris* and *Primula veris*. *Plant Systematics and Evolution* 268: 15–27.
- Keller B, Vos JM de, Conti E (2012) Decrease of sexual organ reciprocity between heterostylous primrose species, with possible functional and evolutionary implications. *Annals of botany* 110: 1233–1244.
- Kembel SW, Cowanm PD, Helmus MR, Cornwell WK, Morlon H, Ackerly DD, Blomberg SP, Webb CO (2010) Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26: 1463–1464.
- Kohn J, Barrett S (1992) Experimental studies on the functional significance of heterostyly. *Evolution* 46: 43–55.
- Lau P, Bosque C (2003) Pollen flow in the distylous *Palicourea fendleri* (Rubiaceae): an experimental test of the Disassortative Pollen Flow Hypothesis. *Oecologia* 135: 593–600.
- Levin D (1968) The breeding system of *Lithospermum caroliniense*: adaptation and counteradaptation. *American Naturalist* 102: 427–441.
- Lewis D (1982) Incompatibility, stamen movement and pollen economy in a heterostyled tropical forest tree, *Cratogeomys formosum* (Guttiferae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 214: 273–283.
- Li A-M, Wu X-Q, Zhang D-X, Barrett SCH (2010) Cryptic dioecy in *Mussaenda pubescens* (Rubiaceae): a species with stigma-height dimorphism. *Annals of botany* 106: 521–531.
- Liu Y, Luo Z, Wu X, Bai X, Zhang D (2012) Functional dioecy in *Morinda parvifolia* (Rubiaceae), a species with stigma-height dimorphism. *Plant Systematics and Evolution* 298: 775–785.
- Lloyd D, Webb C (1992a) The selección of heterostyly. In: Barrett S (Ed.), "Evolution and function of heterostyly", Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 179–208.
- Lloyd D, Webb C (1992b) The evolution of heterostyly. In: Barrett S (Ed.), "Evolution and function of heterostyly", Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 151–175.
- Lloyd D, Webb C, Dulberger R (1990) Heterostyly in species of *Narcissus* (Amaryllidaceae) and *Hugonia* (Linaceae) and other disputed cases. *Plant Systematics and Evolution* 172: 215–227.
- Lloyd D, Yates JMA (2014) Intrasexual selection and the segregation of pollen and stigmas in hermaphrodite plants, exemplified by *Wahlenbergia albomarginata* (Campanulaceae). *Society for the Study of Evolution* 36: 903–913.
- Luebert F (2011) Hacia una fitogeografía histórica del desierto de Atacama. *Revista de Geografía Norte Grande* 133: 105–133.

- Maddison WP, Maddison DR (2009)** Mesquite: a modular system for evolutionary analysis.
- Massinga PH, Johnson SD, Harder LD (2005)** Heteromorphic incompatibility and efficiency of pollination in two distylous *Pentanisia* species (Rubiaceae). *Annals of botany* 95: 389–399.
- Midford PE, Garland TM, Maddison WP (2011)** PDAP:PDTREE: A translation of the PDTREE application of Garland et al.'s Phenotypic Diversity Analysis Programs.
- Münkemüller T, Lavergne S, Bzeznik B, Dray S, Jombart T, Schiffrers K, Thuiller W (2012)** How to measure and test phylogenetic signal. *Methods in Ecology and Evolution* 3: 743–756.
- Nakamura K, Denda T, Kameshima O, Yokota M (2007)** Breakdown of distyly in a tetraploid variety of *Ophiorrhiza japonica* (Rubiaceae) and its phylogenetic analysis. *Journal of Plant Research* 120: 501–509.
- Nilsson L, Rabakonandrianina E (1990)** "Ixoroid" secondary pollen presentation and pollination by small moths in the Malagasy treelet *Ixora platythyrsa* (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 170: 161–175.
- Ossa PG, Pérez F, Armesto JJ (2013)** Phylogeography of two closely related species of *Nolana* from the coastal Atacama Desert of Chile: post-glacial population expansions in response to climate fluctuations (L Katinas, Ed.). *Journal of Biogeography* 40: 2191–2203.
- Page M (1999)** Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* 401: 877–884.
- Paillet T, Humeau L, Figier J, Thompson J (1998)** Reproductive trait variation in the functionally dioecious and morphologically heterostylous island endemic *Chassalia corallioides* (Rubiaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 64: 297–313.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004)** APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289–290.
- Philippi F (1881)** *Catalogus plantarum vascularium Chilensium, adhuc descriptarum*. Imprenta Nacional, Santiago, Chile.
- Pliscoff P, Luebert F (2006)** Ecosistemas terrestres. In: Saball P, Arroyo MTK, Castilla JC, Estades C, Ladrón De Guevara JM, Larraín S, Moreno C, Rivas F, Rovira J, Sánchez A, Sierralta L (Eds.), "*Biodiversidad de Chile: Patrimonio y desafíos*", Comisión Nacional del Medio Ambiente (CONAMA), Santiago, Chile, pp. 74–87.
- Puff C (1988)** Observations on *Carphalea* Juss. (Rubiaceae, Hedyotideae), with particular reference to the Madagascan taxa and its taxonomic position. *Bulletin du Jardin botanique national de Belgique* 58: 271–323.
- Puff C, Robbrecht E (1996)** A survey of secondary pollen presentation in the Rubiaceae. *Proc. 2nd Intl. Rubiaceae Conf.* 402: 369–402.
- R DCT (2008)** R: A language and environment for statistical computing.

- Reiche C (1902) *Estudios críticos sobre la flora de Chile, tomo III*. Imprenta, litografía i encuadernación Barcelona, Santiago, Chile.
- Ricardi M (1963) Rehabilitación del género *Oreopolus* Schlecht. *Gayana Botánica* 6: 3–16.
- Ricardi M, Quezada M (1963) El género *Cruckshanksia* (Rubiaceae). *Gayana Botánica* 9: 3–36.
- Richards J, Koptur S (1993) Floral variation and distyly in *Guettarda scabra* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 80: 31–40.
- Richardson JE, Pennington RT, Pennington TD, Hollingsworth PM (2001) Rapid diversification of a species-rich genus of neotropical rain forest trees. *Science (New York, N.Y.)* 293: 2242–2245.
- Riveros M, Arroyo M, Humaña AM (1987) An unusual kind of distyly *Quinchamalium chilense* (Sanatalaceae) on Volcan Casablanca, southern Chile. *American Journal of Botany* 74: 313–320.
- Robbrecht E (1988) Tropical woody Rubiaceae. Characteristic features and progressions. Contributions to a new subfamilial classification. *Opera Botanica Belgica* 1: 1–271.
- Robbrecht E, Manen J (2006) Major evolutionary lineages of the coffee family (Rubiaceae, angiosperms). Combined analysis (nDNA and cpDNA) to infer the position of *Coptosapelta* and *Luculia*. *Systematics and Geography of Plants* 76: 85–145.
- Ronquist F, Teslenko M, Mark P van der, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard M a, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 61: 539–542.
- RStudio (2012) RStudio: Integrated development environment for R.
- Sampson D, Krebs R (2012) Quantitative evaluation of reciprocal herkogamy in the distylous species, *Hedyotis caerulea* (Rubiaceae). *Plant Systematics and Evolution* 298: 1361–1370.
- Sánchez JM, Ferrero V, Navarro L (2008) A new approach to the quantification of degree of reciprocity in distylous (sensu lato) plant populations. *Annals of botany* 102: 463–472.
- Sánchez JM, Ferrero V, Navarro L (2013) Quantifying reciprocity in distylous and tristylous plant populations (T Elzenga, Ed.). *Plant Biology* 15: 616–620.
- Schlechtendal DFL (1856) *Plantae Lechleriana*. *Linnaea* 28: 493 .
- Schoen DJ, Johnston MO, L'Heureux A-M, Marsolais J V (1997) Evolutionary history of the mating system in *Amsinckia* (Boraginaceae). *Evolution* 51: 1090–1099.
- Schumann K (1891) Rubiaceae. In: Prantl AE and K (Ed.), "*Die Natürlichen Pflanzenfamilien*", Engelmann, Leipzig, Germany, pp. 1–156.
- Swofford D (2003) PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.

- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991)** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Taylor CM (1996)** Taxonomic revision of *Cruckshanksia* and *Oreopolus* (Rubiaceae: Hedyotideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 83: 461–479.
- Tippery NP, Les DH (2011)** Phylogenetic relationships and morphological evolution in *Nymphoides* (Menyanthaceae). *Systematic Botany* 36: 1101–1113.
- Tippery NP, Les DH, Padgett DJ, Jacobs SWL (2008)** Generic circumscription in Menyanthaceae: a phylogenetic evaluation. *Systematic Botany* 33: 598–612.
- van Dijk W (1943)** La decouverte de l'heterostylie chez *Primula* pas Ch. de l'Ecluse et P. Reneaulme. *Nederlandsch Kruidkunding Archief* 53: 81–85.
- Verdcourt B (1958)** Remarks on the classification of the Rubiaceae. *Bulletin du Jardin botanique de l'Etat, Bruxelles* 28: 209–290.
- Vuilleumier B (1967)** The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. *Evolution* 21: 210–226.
- Webb C, Lloyd D (1986)** The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms II. Herkogamy. *New Zealand journal of botany* 24: 163–178.
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990)** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.), "*PCR protocols: a guide to methods and applications*", Academic Press, Inc., New York, United States of America, pp. 315–322.
- Yeo PF (1993)** *Secondary pollen presentation: form, function and evolution*. Springer Vienna, Vienna.

APÉNDICE 1.

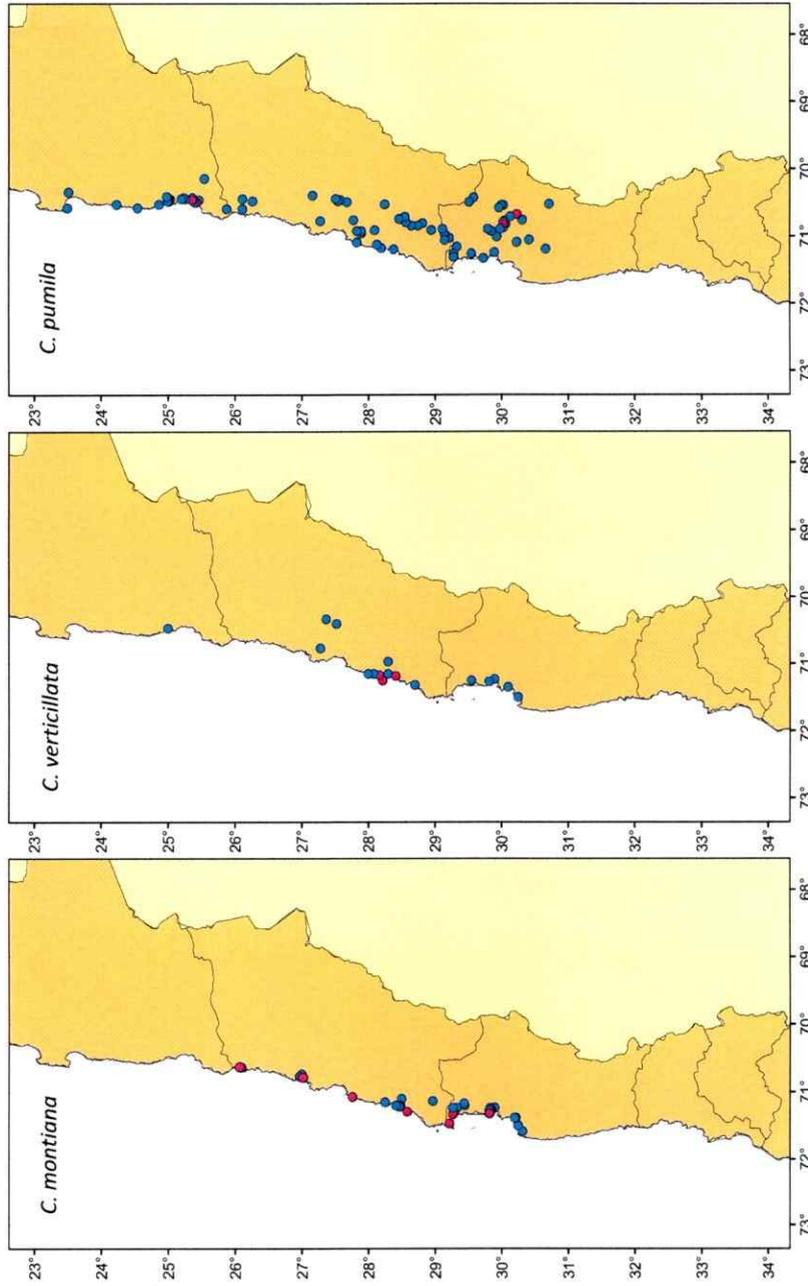


Figura 1. Distribución de las especies de *Cruckshanksia*. Las ocurrencias utilizadas corresponden a datos de herbario (CONC; USL) y colectas propias. Los puntos rosados indican las localidades utilizadas en el análisis filogenético.

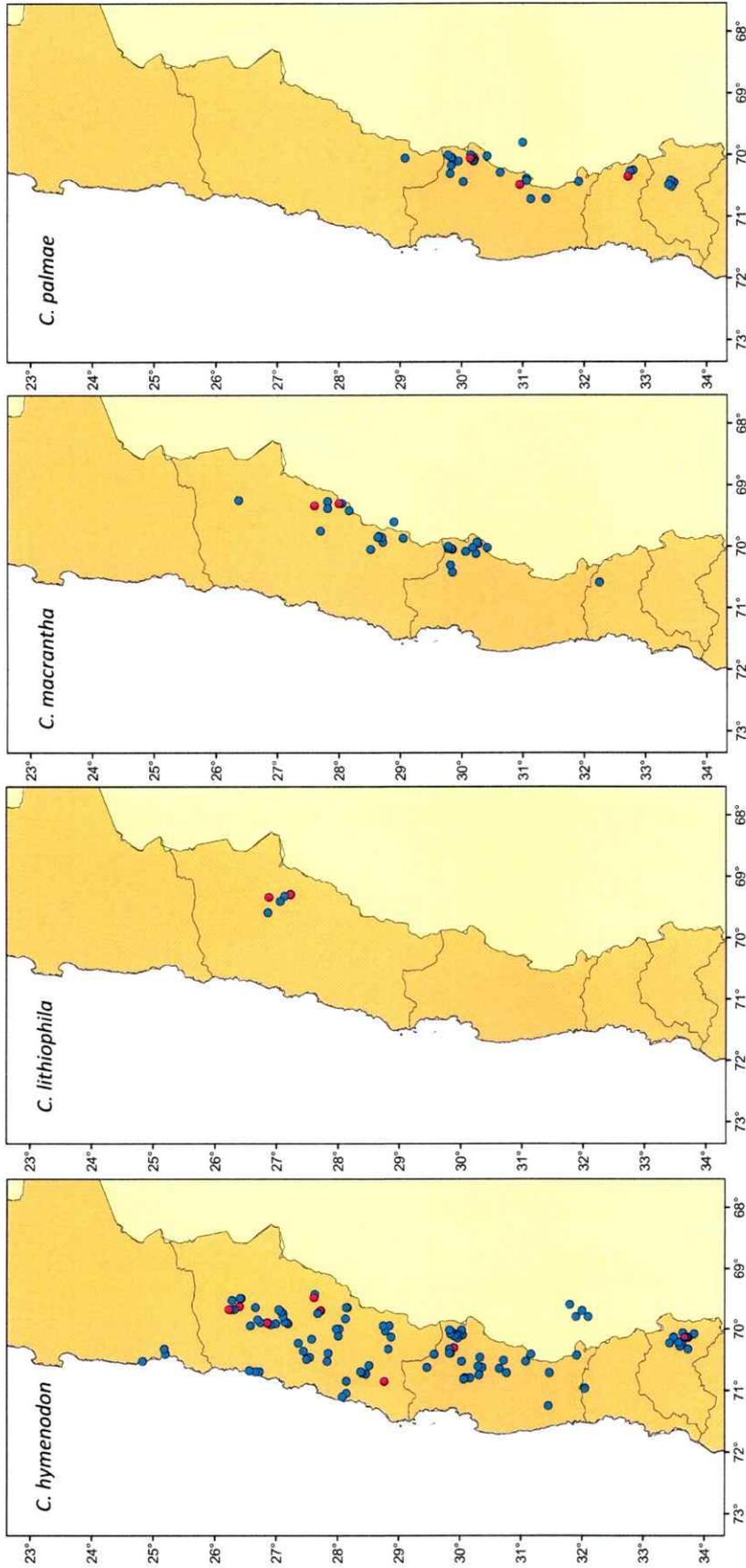


Figura 1. (Continuación).

APÉNDICE 2.

Tabla 1. Sitios de colecta y procedencia de muestras. Se incluye el voucher para muestras de herbario y el número de población para muestras aun no ingresadas. En el caso de los grupos externos provenientes de GenBank se entrega el código correspondiente de cada región de DNA.

Código	Herbario o Población	Especie	Latitud ° S	Longitud ° O	Altitud msnm.	Región	Provincia	Comuna	Localidad	Mes/Año Colecta
105	USL3437	<i>C. pumila</i>	-30,23	-70,67	1800	IV	Limarí	Río Hurtado	Quebrada del Atajo	10/99
114	CONC170806	<i>C. pumila</i>	-25,37	-70,45	20	II	Antofagasta	Taltal	Punta morada	12/02
189	USL1723	<i>C. pumila</i>	-30,03	-70,82	700	IV	Elqui	Vicuña	Quebradas Camino a Vicuña	—
198	CONC168979	<i>C. pumila</i>	-25,43	-70,48	170	II	Antofagasta	Taltal	Quebrada Changos	10/05
141	P1*	<i>C. montiana-sur</i>	-29,27	-71,33	55	IV	Elqui	La Higuera	Llanos de Choros	9/12
144	P2*	<i>C. montiana-sur</i>	-29,22	-71,47	36	IV	Elqui	La Higuera	Punta de Choros - Carrizalillo	9/12
152	P6	<i>C. montiana-sur</i>	-28,58	-71,29	104	III	Huasco	Freirina	La Aguada de Tongoy - Cta. los Bronces	9/12
154	P7	<i>C. montiana-sur</i>	-29,84	-71,27	11	IV	Elqui	La Serena	Club de Golf	12/12
155	P8*	<i>C. montiana-sur</i>	-29,83	-71,24	191	IV	Elqui	La Serena	Quebrada del Jardín	9/12
146	P3*	<i>C. verticillata</i>	-28,41	-71,18	89	III	Huasco	Huasco	Huasco Bajo (10 km al N)	9/12
148	P4	<i>C. verticillata</i>	-28,21	-71,25	40	III	Huasco	Huasco	P. N. Llanos de Challe	9/12
193	P23	<i>C. verticillata</i>	-28,17	-71,67	10	III	Huasco	Huasco	P. N. Llanos de Challe	9/13
150	P5*	<i>C. montiana-norte</i>	-27,82	-71,08	28	III	Huasco	Huasco	Caleta Totoral	9/12
138	CONC147937	<i>C. montiana-norte</i>	-27,00	-70,73	50	III	Atacama	Copiapó	Caldera, Playa Ramada	10/99
159	P9	<i>C. montiana-norte</i>	-26,12	-70,63	240	III	Antofagasta	Taltal	P. N. Pan de azúcar	11/12
100	USL11994	<i>C. hymenodon</i>	-26,23	-69,68	1906	III	Chañaral	Diego de Almagro	El Salvador, canal de relave	5/07
123	CONC157731	<i>C. hymenodon</i>	-29,91	-70,31	1500	IV	Elqui	Vicuña	Entre Llanos Huanta y Las Juntas	11/02
124	CONC157781	<i>C. hymenodon</i>	-26,40	-69,64	1900	III	Chañaral	Diego de Almagro	Entre Diego de Almagro y Potrerillos	10/02
187	P21*	<i>C. hymenodon</i>	-33,73	-70,14	1977	RM	Cordillera	San José de Maipo	Embalse el Yeso	1/13
195	P22	<i>C. hymenodon</i>	-28,76	-70,85	737	III	Huasco	Vallenar	Quebradas al SE de Vallenar	5/13
209	P13	<i>C. hymenodon</i>	-26,87	-69,91	1860	III	Copiapó	Copiapó	Diego de Almagro - Copiapó	12/12
210	P14*	<i>C. hymenodon</i>	-27,72	-69,70	2830	III	Copiapó	Tierra amarilla	Cuesta el Castaño	12/12
212	P15*	<i>C. hymenodon</i>	-27,62	-69,49	2987	III	Copiapó	Tierra amarilla	Camino a Laguna del Negro Francisco	12/12

Tabla 1. (Continuación).

Código	Herbario o Población	Especie	Latitud ° S	Longitud ° O	Altitud msnm.	Región	Provincia	Comuna	Localidad	Mes/Año Colecta
127	CONC71348	<i>C. lithiophila</i>	-26,88	-69,33	3300	III	Copiapó	Copiapó	Quebrada Codocedo	3/83
166	P12*	<i>C. lithiophila</i>	-27,23	-69,29	3839	III	Copiapó	Tierra amarilla	Quebrada las Vizcachas, El Volcán	12/12
168	P12*	<i>C. lithiophila</i>	-27,23	-69,29	3839	III	Copiapó	Tierra amarilla	Quebrada las Vizcachas, El Volcán	12/12
207	P12*	<i>C. lithiophila</i>	-27,23	-69,29	3839	III	Copiapó	Tierra amarilla	Quebrada las Vizcachas, El Volcán	12/12
102	USL11460	<i>C. macrantha</i>	-28,00	-69,30	4044	III	Copiapó	Tierra Amarilla	Paso Pircas Negras, Cuesta la Zeta	1/07
122	CONC116405	<i>C. macrantha</i>	-29,83	-70,03	3260	IV	Elqui	Vicuña	Baños del Toro	1/70
176	P16*	<i>C. macrantha</i>	-27,60	-69,34	3646	III	Copiapó	Tierra amarilla	Camino a Laguna del Negro Francisco	12/12
182	P19*	<i>C. macrantha</i>	-30,27	-69,96	3336	IV	Elqui	Vicuña	Paso Aguas Negras. Embalse La Laguna	12/12
117	CONC116402	<i>C. palmae</i>	-30,42	-70,35	3360	IV	Elqui	Vicuña	Paso Aguas Negras. Embalse la laguna	1/48
140	CONC172938	<i>C. palmae</i>	-32,72	-70,35	3090	V	Los Andes	Los Andes	Río Colorado, Estero del Maitén km 37.3	4/07
177	P17*	<i>C. palmae</i>	-30,14	-70,05	2733	IV	Elqui	Vicuña	Paso Aguas Negras. 20 Km de la aduana	12/12
214	P18*	<i>C. palmae</i>	-30,20	-70,04	3125	IV	Elqui	Vicuña	Interior de la reja del embalse la laguna	12/12
216	P20*	<i>C. palmae</i>	-30,95	-70,48	1939	IV	Limarí	Monte Patria	Camino a Termas del Gordito	12/12
108	CONC154681	<i>O. glacialis</i>	-37,47	-71,12	1950	VIII	Bío Bío	Antuco	Paso Pichachén	1/01
161	P10*	<i>O. glacialis</i>	-33,33	-70,27	3161	RM	Santiago	Lo Barnechea	La Parva	12/12
163	P11*	<i>O. glacialis</i>	-33,33	-70,25	3449	RM	Santiago	Lo Barnechea	Valle nevado, último andarivel	12/12
128	CONC151373	<i>Hedyotis salzmanni</i>	-37,90	-73,03	630	IX	Malleco	Los Sauces	San Ramón, camino a P. N. Nahuelbuta	12/97
GB1	GenBank	<i>Coussarea hydrangeifolia</i>			ITS: EU145360.1			trnL: EU145549.1	rpl32: JQ729915.1	
GB2	GenBank	<i>Faramaea crassifolia</i>			ITS: HM042456.1			trnL: HM042587.1	—	

* Señala las poblaciones utilizadas en los estudios de heterostilia y presentación secundaria de polen.

APÉNDICE 3.

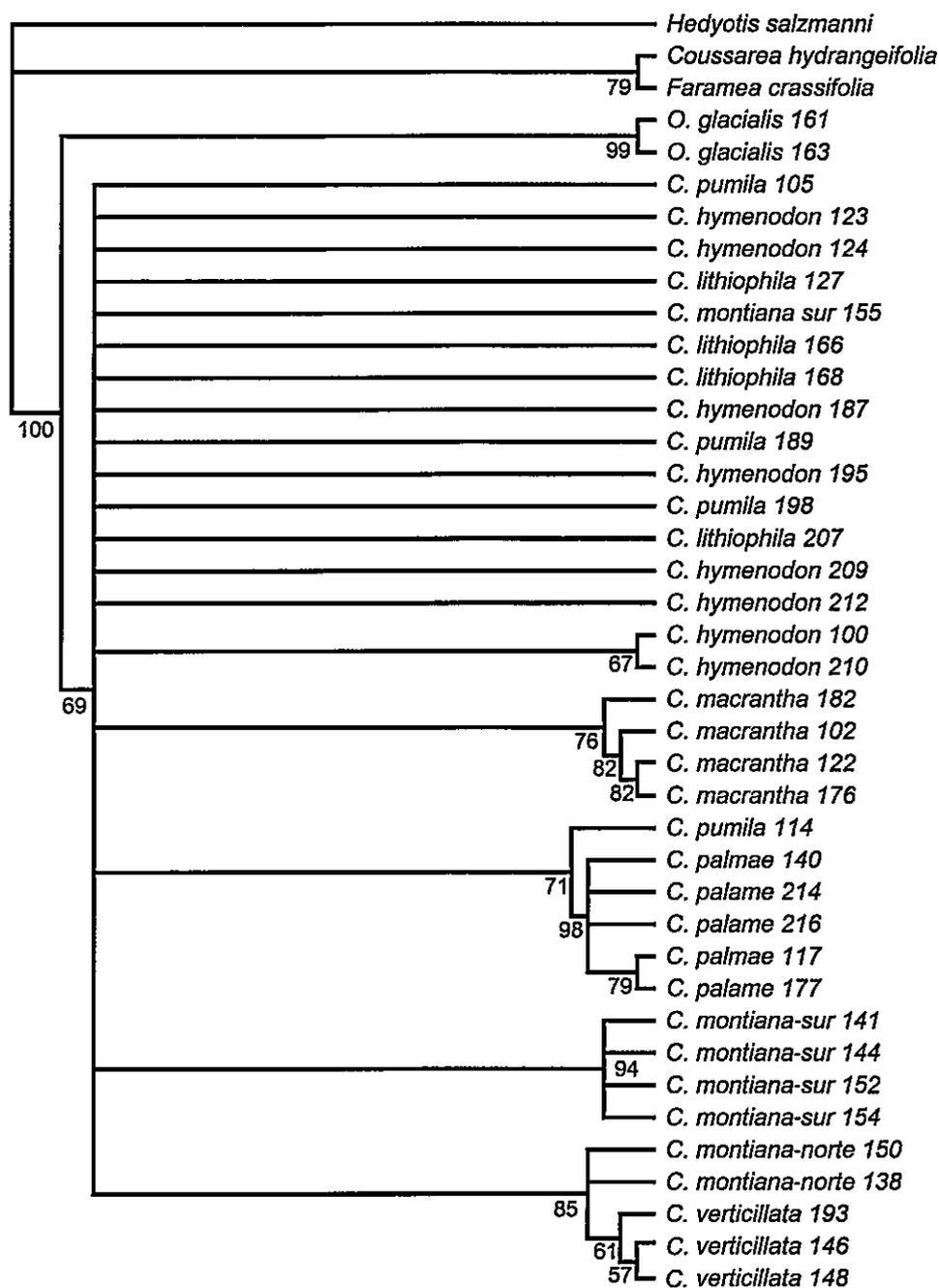


Figura 1. Árbol de consenso estricto para 100 árboles con el mismo valor de parsimonia, basado en secuencias de rDNA de la región ITS5, para ocho especies de los géneros *Oreopolus* y *Cruckshanksia*. En cada nodo se muestra el valor de bootstrap, valores < 50% forman politomías. Se consideran soportados los nodos con valores de credibilidad $\geq 70\%$.

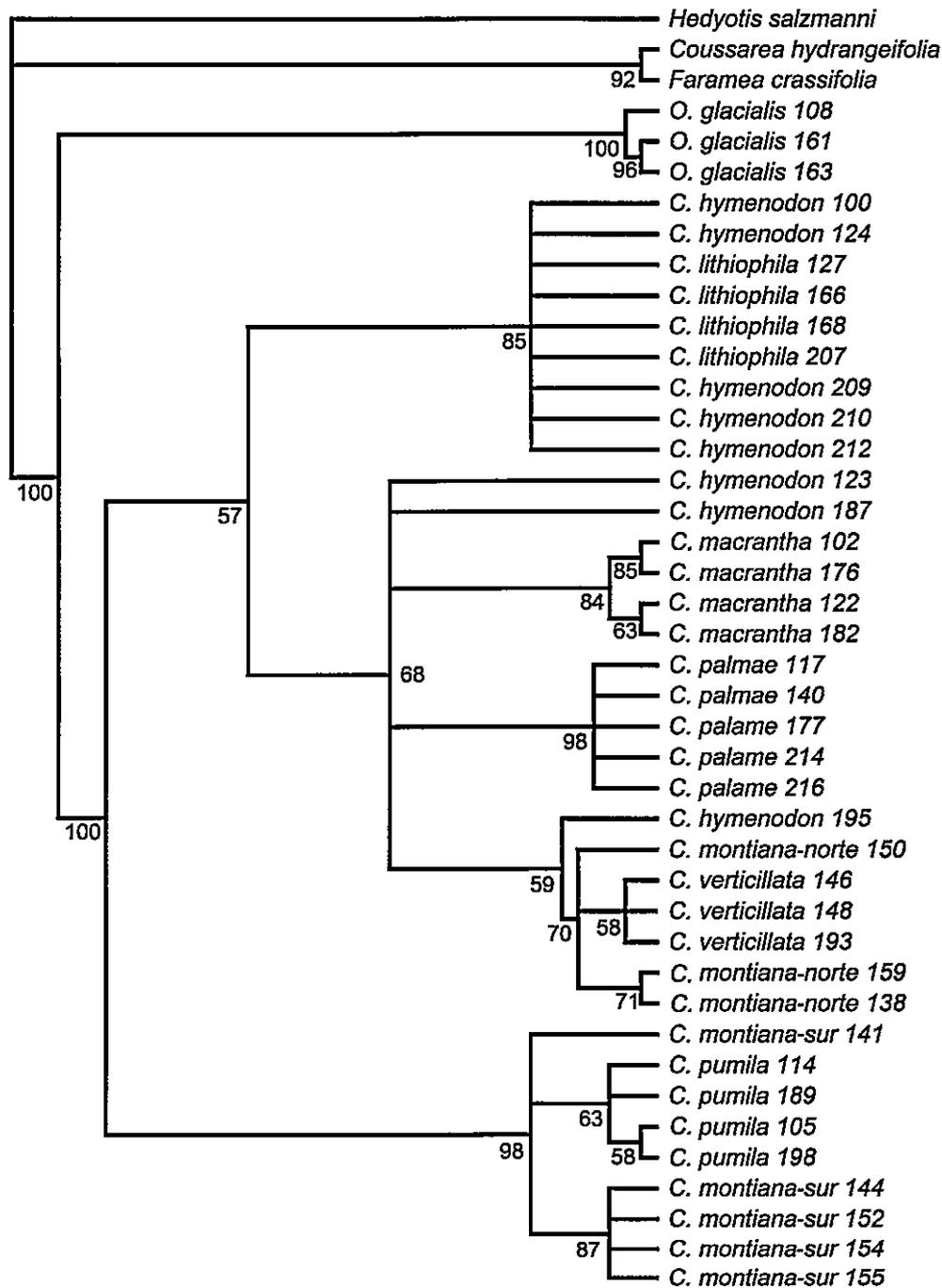


Figura 2. Árbol de consenso estricto para 9 árboles con el mismo valor de parsimonia, basado en secuencias de cpDNA conjunta de las regiones trnL y rpl32, para ocho especies de los géneros *Oreopolus* y *Cruckshanksia*. En cada nodo se muestra el valor de bootstrap, valores < 50% forman politomías. Se consideran soportados los nodos con valores de credibilidad $\geq 70\%$.

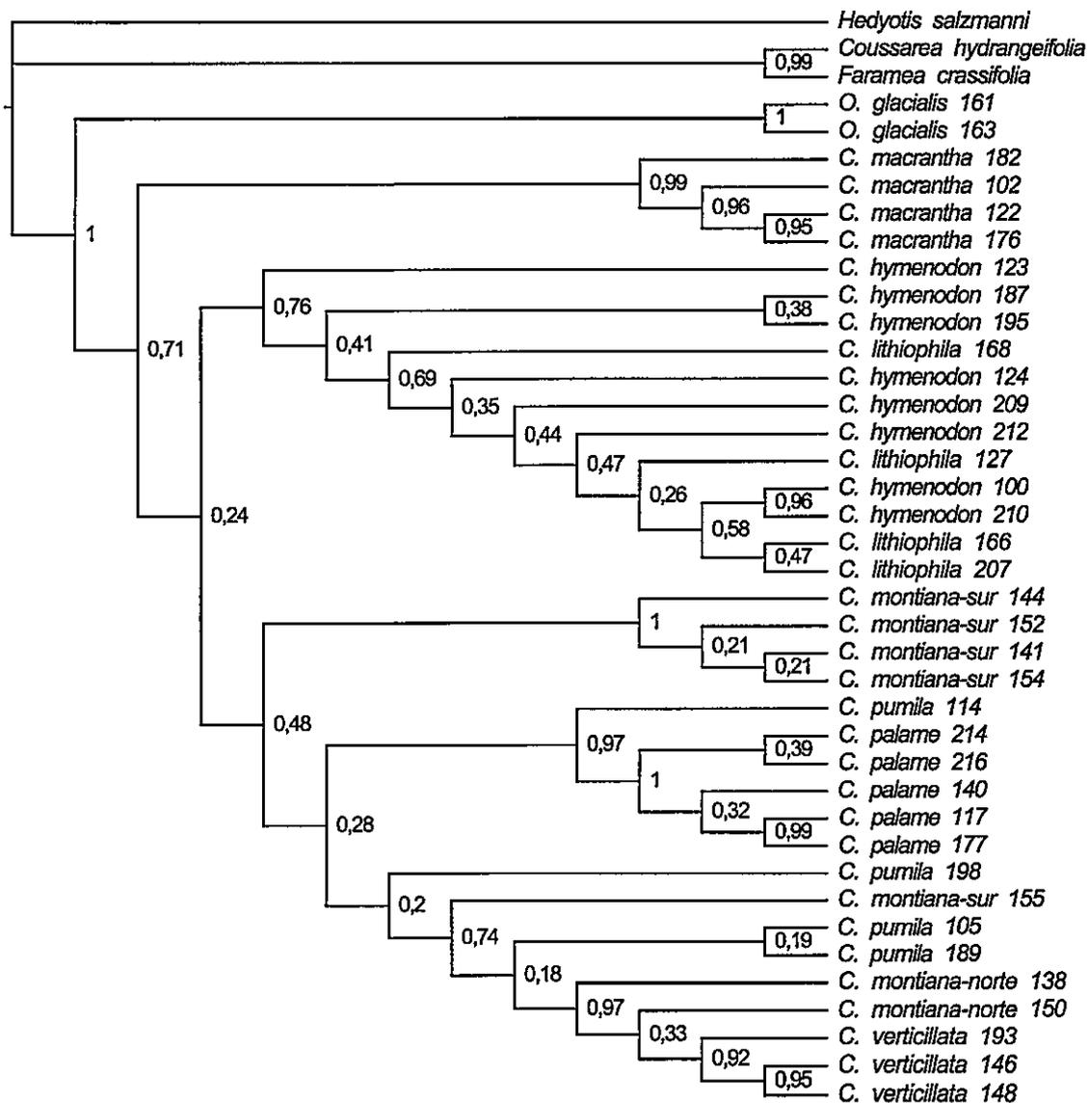


Figura 3. Árbol filogenético de Inferencia Bayesiana basado en secuencias de rDNA de la región ITS5 para ocho especies de los géneros *Oreopolus* y *Cruckshanksia*. En los nodos se indican los valores de credibilidad. Se consideran soportados los nodos con valores de credibilidad $\geq 0,95$.

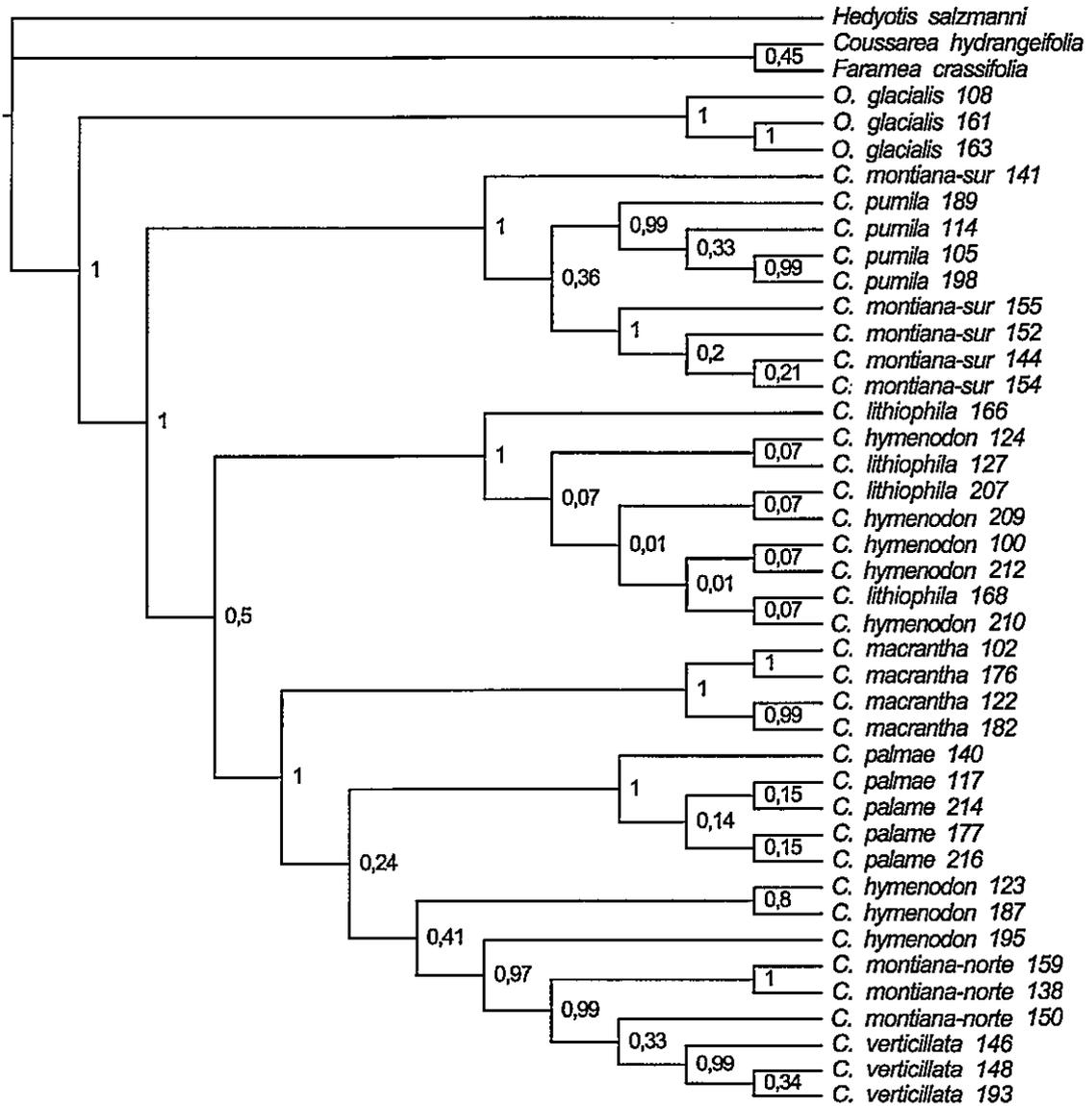


Figura 4. Árbol filogenético de Inferencia Bayesiana basado en secuencias de cpDNA conjunta de las regiones trnL y rpl32 para ocho especies de los géneros *Oreopolus* y *Cruckshanksia*. En los nodos se indican los valores de credibilidad. Se consideran soportados los nodos con valores de credibilidad $\geq 0,95$.

APÉNDICE 4.

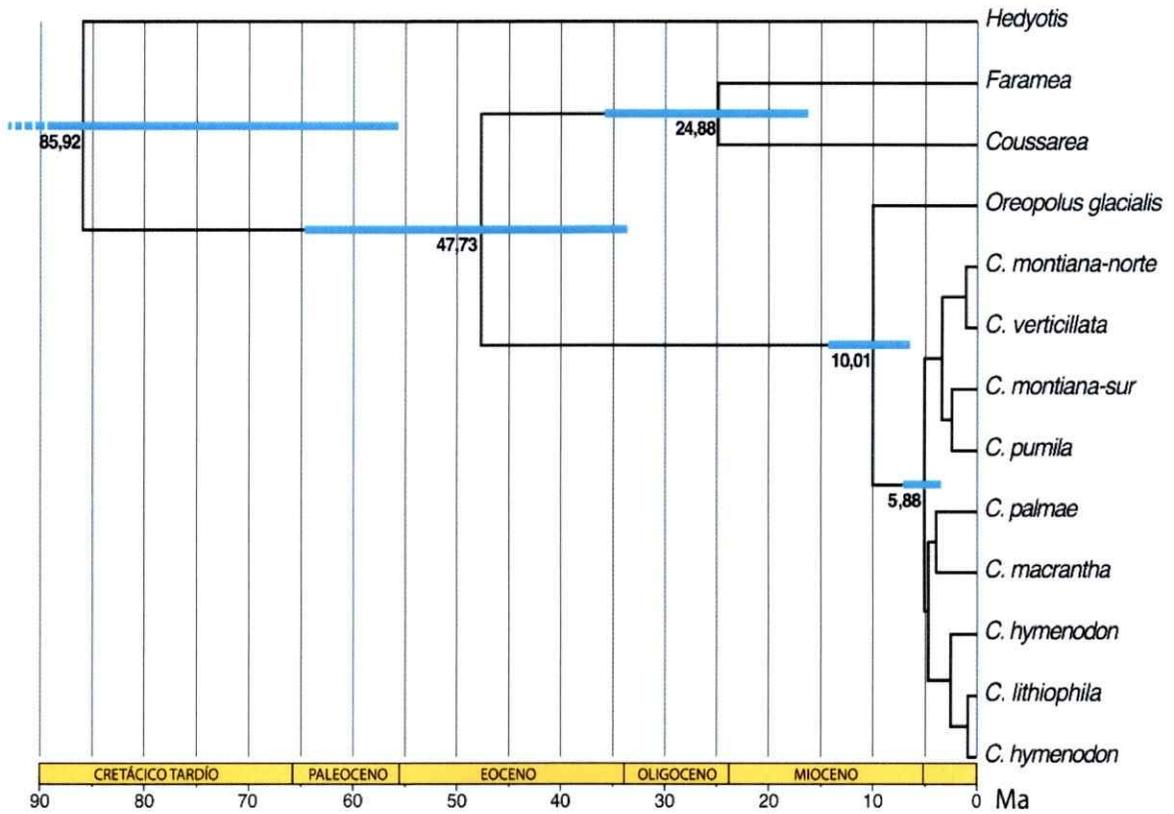


Figura 1. Estimación de los tiempos de divergencia del clado *Oreopolus-Cruckshanksia* mediante tasas de sustitución (ITS y trnL). El valor del nodo corresponde al tiempo estimado y las bandas azules al intervalo de credibilidad (95% HDP). El valor mínimo no mostrado que se extiende por la banda segmentada en la raíz es 120Ma.

APÉNDICE 5.

Discusión de las relaciones filogenéticas al interior del género Cruckshanksia

Taylor (1996) redujo las especies *C. montiana*, *C. capitata* y *C. verticillata* reconocidas por Ricardi (1963), a dos especies *C. montiana* y *C. verticillata*, incluyendo a *C. capitata* en *C. montiana*. Al mismo tiempo, Taylor (1996) renombra a *C. tripartita*, una especie perenne, en *C. pumila*, esta última de carácter exclusivamente anual bajo la concepción de Ricardi (1963). Dentro del primer linaje, en IA se encuentran todas las poblaciones de *Cruckshanksia* con petaloide amarillo de carácter perenne halladas al norte del Río Huasco (Figs. 6, 7). Las poblaciones de IA demarcan un gradiente genético, geográfico y morfológico, donde poblaciones identificadas como *C. verticillata* que presentan hojas caulinares trifidas y son cercanas geográficamente entre sí, son un grupo soportado que se relaciona con las poblaciones identificadas como *C. montiana-norte*. Estas últimas se ubican al norte de *C. verticillata* y paulatinamente pierden la presencia de hojas trifidas. Por ejemplo, en una población (P5 de Caleta Total, código 150 en el Apéndice 2) se encontraron de manera escasa algunas hojas con esta característica. Se cree que incluso, algunas de estas poblaciones identificadas como *C. montiana-norte*, debido su hábito perenne y a cercanía de la localidad tipo, podrían corresponder con lo que Ricardi y Quezada (1963) clasificaron como *C. tripartita*. Taylor (1996) argumenta que al usar la clave de Ricardi y Quezada (1963) basada en las estípulas para distinguir entre los individuos de carácter anual de *C. tripartita* y *C. pumila* tendríamos poblaciones con ambas especies. Comenta también que los individuos verdaderamente perennes de *C. pumila* (*C. tripartita* según Ricardi y Quezada (1963)) se encuentran restringidos al sector de Taltal. En este trabajo solo se obtuvo material genético de individuos de *C. pumila* anuales de la zona de Taltal, los cuales pertenecen al grupo IB. A pesar de que no se obtuvieron poblaciones perennes de la segunda región, nuestros resultados muestran claramente que existe un gradiente genético y morfológico asociado a la distribución latitudinal de las poblaciones costeras, de carácter perenne y de petaloide amarillo ubicadas al norte del Río Huasco. Por su parte IB agrupa y separa por especie a las poblaciones de *C. pumila*

y *C. montiana-sur*. Dentro de *C. montiana-sur* no se encontró distinción entre las poblaciones de *C. montiana-sur* de la localidad tipo (IV región) con las poblaciones que identificamos como posibles *C. capitata* (poblaciones de hoja curva del sur de la tercera región). Este resultado es consistente con la inclusión de *C. capitata* en *C. montiana* propuesta por Taylor (1996).

Dentro del linaje II, se reúnen las especies cordilleranas sin petaloide, *C. palmae* y *C. macrantha*, que habían sido clasificadas como parte de *Oreopolus* previamente por Ricardi (1963) con las especies con petaloide reconocidas morfológicamente como *C. hymenodon* y *C. lithiophila*. Las poblaciones de *C. hymenodon* distribuidas al norte del Río Huasco junto con *C. lithiophila* se comportan como un mismo clado separado del grupo de *C. hymenodon* distribuido al sur del Río Huasco. Cabe destacar que esta distinción no lleva relación con las variedades de *C. hymenodon* descritas por Ricardi y Quezada (1963). *C. lithiophila* es una especie endémica de los Andes de Copiapó que se distingue fácilmente por presentar siempre cinco petaloides. Ambos autores reconocen que por su hábito se asemeja a *C. macrantha* y Taylor (1996) incluso propone que podría ser una variedad de esta última. Ricardi (1963b) se inclina por una mayor cercanía a las especies con presencia de petaloide. En función de nuestros resultados se sugiere evaluar taxonómicamente a *C. lithiophila* como una variedad de *C. hymenodon*. Si nos guiamos por las dimensiones florales, *C. lithiophila*, claramente formaría parte del grupo de especies con petaloide. Importante a considerar, es que además de *C. lithiophila*, *C. hymenodon* es la única especie de *Cruckshanksia* que exhibe cinco petaloides en algunas flores. A pesar de que nuestros resultados son bastante consistentes, sobre todo al considerar que los individuos de *C. lithiophila* de la misma población se mezclan perfectamente con individuos de *C. hymenodon*, sería recomendable hacer pruebas con nuevos marcadores, idealmente un marcador nuclear adicional, utilizando más poblaciones e individuos donde se consideren todas localidades tipo sugeridas por Taylor (1996) y Ricardi (1963). Resolver estos problemas taxonómicos facilitará enormemente la interpretación de los rasgos reproductivos del clado *Oreopolus-Cruckshanksia* a nivel de especie.

Tabla 1. Localidades y caracteres utilizados en la distinción de las especies de *Cruckshanksia* del desierto costero y de petaloide amarillo. Se muestran los criterios de Ricardi & Quezada (1963), Taylor (1996) y la presente tesis. II, III y IV corresponden a las regiones de Antofagasta, Atacama y Coquimbo respectivamente.

Ricardi & Quezada (1963)					
	<i>C. montiana</i>	<i>C. capitata</i>	<i>C. verticillata</i>	<i>C. tripartita</i>	<i>C. pumila</i>
	hoja simple/ petaloides grandes	hoja simple de punta curva/ petaloides grandes	hoja trifida/ petaloides pequeños	anual-perenne	anual
II				COSTA Taltal, Paposo	COSTA Tocopilla, Taltal
III		COSTA Huasco	VALLE Copiapó	COSTA-VALLE Caldera, Vallenar	VALLE Vallenar
IV	COSTA La Serena			VALLE-INTERIOR Valle del Elqui	VALLE-INTERIOR Valle del Elqui

Taylor (1996)			
	<i>C. montiana</i>	<i>C. verticillata</i>	<i>C. pumila</i>
	hoja simple a veces trifida, petaloides grades	hoja trifida a veces simple/ petaloides pequeños	anual-perenne (pob. Taltal)
II		COSTA Taltal	COSTA Taltal - Paposo
III	COSTA Copiapo, Huasco, Carrizal	VALLE Copiapó	COSTA-VALLE Vallenar
IV	COSTA La Serena	VALLE Pajonales	VALLE-INTERIOR Valle del Elqui

Tesis				
	<i>C. montiana-sur</i>	<i>C. montiana-norte</i>	<i>C. verticillata</i>	<i>C. pumila</i>
	hoja simple con y sin punta curva/ petaloides grandes	hoja simple a veces trifida, petaloides chicos	hoja trifida/petaloides pequeños	anual
II				COSTA Taltal
III	COSTA Caleta los Bronces	COSTA Caldera-Pan de Azucar	COSTA Huasco	sin muestras
IV	COSTA La Serena, Pta. Choros			INTERIOR Valle del Elqui