

UCH - FC  
DOC - EBE  
R755  
c. 1

**EVOLUCIÓN DE CARACTERES FLORALES RELACIONADOS  
CON EL SISTEMA DE REPRODUCCIÓN EN EL GÉNERO  
*ALSTROEMERIA* L. (ALSTROEMERIACEAE) EN CHILE**

Tesis  
entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias  
por  
Denise Lisette Rougier Herrera  
Marzo, 2005

Tutor de Tesis:  
Dra. Mary Kalin Arroyo

Co-tutor de Tesis:  
Dr. Rodrigo Medel Contreras

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la escuela de Postgrado de la facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

DENISE LISETTE ROUGIER HERRERA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 19 de Enero de 2005

Director de Tesis:

Dra. Mary Kalin Arroyo

Sub Director de Tesis:

Dr. Rodrigo Medel

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Juan Armesto (Presidente)

Dr. Rodrigo Vásquez

Dr. Francisco Squeo

Dr. Alberto Veloso

*A mis padres, Lucía y Alfonso,  
por enseñarme el amor incondicional*

*A Dieguito,  
por existir*

## AGRADECIMIENTOS

Al final de este camino, siento la necesidad de expresar mi gratitud hacia muchas personas e instituciones que ayudaron en mi formación académica.

En la Universidad Católica, las profesoras Gloria Montenegro y Guacolda Ávila me hicieron descubrir el fascinante mundo de las plantas y reforzar mi amor por la docencia. Para ellas, una enorme gratitud por lo que aprendí.

En la Universidad de Chile, agradezco a todos los profesores que participaron en mi formación como Botánica, especialmente a mis tutores Mary Kalin y Rodrigo Medel, y a Juan Armesto y Ramiro Bustamante. Así también, mil gracias a mis compañeros del grupo de Botánica. De cada uno de ellos recibí, a lo menos, una sonrisa o una palabra de ánimo y, de la gran mayoría, muchísimo más que eso. Gracias por la estimulante convivencia intelectual que siempre sentí como constructiva y no como competitiva. Gracias por esos entretenidos almuerzos y reuniones sociales que están grabados en mi memoria. Gracias especialmente a Fernanda, compañera de angustias y alegrías; a Claudia y Toño por su preocupación; a Anita María y Carolina, por estar siempre dispuestas a ayudar; a Alejandro y a Felipe por su estímulo y asesoría en temas varios; a Carezza y Paola por su ayuda y, a la distancia, a Carmen. A Juan Valencia, por su bondad.

En el desarrollo de tesis, deseo agradecer muy profundamente a mi tutora, Mary Kalin, por brindarme muchas oportunidades de desarrollo en su laboratorio, por su rigurosidad y por esos inolvidables viajes a terreno en que conocí un poco más de la flora de Chile. A Rodrigo Medel, mi cotutor, por su rigurosidad intelectual, su paciencia y buena disposición. A la Comisión de Tesis, por el espíritu constructivo con que apoyaron el desarrollo de ésta. A Mark Hershkovitz, por permitirme desarrollar la filogenia molecular de *Alstroemeria* en su laboratorio,

poniendo toda su energía y experiencia al servicio de este trabajo. A Cristian Zavaleta, por su gran ayuda y paciencia en el trabajo de laboratorio. A aquellos que colectaron alstroemerias para mí (además de mis tutores, G. Arancio, R. Pinto, A. M. Humaña, M. Gómez, M. Hershkovitz, F. de la Barrera, M. Camargo de Assis). A la Universidad de Concepción y al Museo de Historia Natural de Santiago, por permitirme visitar sus herbarios y a la Sra, Mélica Muñoz, por compartir sus conocimientos y experiencias sobre este género. A Boris Fuenzalida, amigo y compañero de varios viajes de terreno, por ayudarme y brindarme su apoyo y buen humor en duras jornadas en el campo.

Agradezco a las instituciones que financiaron mis estudios: Beca Doctoral CONICYT, Proyecto FONDECYT N° 2010039, Fundación Mellon, Núcleo Milenio "Centro para Estudios Avanzados en Ecología y de Investigación en Biodiversidad" (CMEB, P99-103-F-ICM), Beca Milenio de Término de Tesis, Proyecto FONDECYT N° 1000909 (M. Hershkovitz). A la Corporación Nacional Forestal (CONAF) por permitirme visitar Parques y Reservas Nacionales en busca de material de estudio como así también a los guardaparques por su hospitalidad y por compartir sus conocimientos sobre la flora del lugar.

He dejado para el final los agradecimientos que siento como más importantes: hacia mi familia, mis amigos y mi círculo más cercano. Sin duda alguna, haber iniciado y terminado este proyecto no habría sido posible sin el soporte de todos ellos. A mi madre, le agradezco haberme contagiado su amor a la naturaleza y su capacidad de admiración. A mi padre, su constante estímulo para desarrollarme intelectualmente. A ambos, su incondicional apoyo en cada proyecto que he iniciado y el haber formado una familia tan hermosa de la que soy parte.

Mil gracias a mis queridos hermanos Paulette, Jacqueline, Alfonso y Michelle por entender, animar y respetar a esta hermana que a sus "treinta y tantos....." aún

estudiaba. Gracias por la preocupación, cariño y constante estímulo que me han dado en estos años. Al ya no estar mi madre presente, le agradezco profundamente a Olivia, esposa de mi padre, su alegría, optimismo y apoyo, y el facilitar que la familia siga unida. Agradezco también a todos mis queridos, grandes y pequeños, sobrinos Carolina, Cristina, Andrés, Ignacio, Florencia, Constanza, Paulette, Belén y Cristóbal por interesarse en el trabajo de su tía.

En mi círculo hogareño más cercano, un agradecimiento infinito a mi hermana Paulette. Con un amor a toda prueba, ella asumió amorosamente el cuidado de mi hijo Diego, en momentos en que no pude estar. La tranquilidad de saber que él estaba en las mejores manos me permitió continuar. Además, me apoyó y estimuló en todo momento. Gracias a Sergio, mi cuñado por su inmensa ayuda con Diego y por permitirme combinar mis estudios con sus ricos asados. A Carolita, mi sobrina, por sus palabras de ánimo y ayuda con Diego. A Dina, nana de Diego, por el amor puesto en su labor.

Muchas gracias a Caco, mi cuñado, a Monserrat, a Kiko, a Mario, a Alejandro y a mi tía Mafi por su interés en mi trabajo. A mi amiga Verito, compañera de largas tertulias, por su amistad a toda prueba. A Patricio, padre de Dieguito, por sus buenos consejos durante todo el desarrollo de mis estudios y su apoyo en momentos claves.

Finalmente, le doy gracias a mi hijo Diego por ser un niño precioso, que creció junto con esta tesis. Gracias por entender el trabajo de su mamá y por ayudarme entusiastamente en los viajes a terreno. Gracias por maravillarme con su curiosidad y su capacidad de observación. Gracias por regalarme día a día su alegría, amor y ternura. Ello ha sido un motor fundamental para la realización de esta tesis.....

**¡GRACIAS A TODOS!**

## ÍNDICE DE MATERIAS

Índice de Materias.....	vi
Lista de Tablas.....	viii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Símbolos, Abreviaturas o Nomenclatura.....	xiv
Resumen en español.....	xv
Resumen en inglés (Abstract).....	xviii
Introducción General.....	1
Hipótesis.....	10
Objetivo general y objetivos específicos.....	11
Modelo de estudio: género <i>Alstroemeria</i> .....	13
Capítulo 1. Relaciones filogenéticas entre las especies chilenas del género <i>Alstroemeria</i>	
Introducción.....	19
Materiales y Métodos.....	24
Resultados.....	48
Discusión.....	53

Capítulo 2. Razón polen-óvulo y sistema reproductivo en el género *Alstroemeria* de Chile.

Introducción.....	60
Materiales y Métodos.....	64
Resultados.....	70
Discusión.....	83

Capítulo 3. Evolución de caracteres florales y razón polen-óvulo en el género *Alstroemeria* de Chile.

Introducción.....	96
Materiales y Métodos.....	103
Resultados.....	110
Discusión.....	123

Discusión General.....128

Conclusiones.....134

Referencias.....136

ANEXO 1. Cálculo de la razón P/O.....166

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Taxa de *Alstroemeria* incluidos en este estudio y taxa de grupo externo. La localidad incluye país, región política, provincia y otros detalles. Se incluye las dos clasificaciones más recientes de las especies chilenas del género.....25

Tabla 2.1. Promedio de número de granos de polen por antera para 6 especies de *Alstroemeria* y ANDEVA de dos vías con comparaciones múltiples entre promedios de antera (Test de Tukey). Las letras del mismo tipo indican ausencia de diferencias significativas. A= comparación entre todas las anteras (ANDEVA de 2 vías), B= comparación entre los dos verticilos de anteras (ANDEVA anidado de 3 vías). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .....71

Tabla 2.2. Número de granos de polen, número de óvulos y razón polen-óvulo para taxa chilenos de *Alstroemeria*. Los valores corresponden a promedios  $\pm 2EE$ . La nomenclatura es la misma que en la Tabla 1.1.....73

Tabla 2.3. . Resultados de los cruzamientos controlados en 5 especies de *Alstroemeria*. Se muestran los resultados de los tratamientos de polinización cruzada manual,

autopolinización manual y autopolinización automática. El número de flores recuperadas disminuyó debido a herbivoría.....	77
Tabla 2.4. Índice de autofertilidad (IAF) para taxa de <i>Alstroemeria</i> .....	81
Tabla 3.1. Tamaño y factor de forma floral para 21 taxa chilenos de <i>Alstroemeria</i> . La nomenclatura es la misma que la contenida en la Tabla 1.1.....	111
Tabla 3.2. Valores del parámetro lamda para cada uno de los caracteres y test de razones de máxima verosimilitud que compara un modelo de ausencia de efecto filogenético en la evolución de caracteres ( $H_0$ ) con $\lambda=0$ con el modelo en que $\lambda$ se estima con máxima verosimilitud. * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ .....	114
Tabla 3.3. Test de razón de máxima verosimilitud que compara el modelo no direccional ( $H_0$ ) con el modelo direccional de cambio evolutivo ( $H_1$ ), con $\lambda$ estimados simultáneamente por máxima verosimilitud. * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ .....	114
Tabla 3.4. Correlaciones entre caracteres florales y reproductivos bajo un modelo de cambio evolutivo no direccional. Valores de p de los test de razones de máxima verosimilitud que compara el modelo de evolución independiente ( $H_0$ ) con el modelo de evolución correlacionada ( $H_1$ ), con $\lambda$ estimados simultáneamente por máxima verosimilitud. . * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,001$ .....	114

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 (Introducción General). a) Factores correlacionados al grado de autogamia y exogamia en las angiospermas. b) Caracteres florales asociados con diferentes grados de autogamia y exogamia.....2
- Figura 2 (Modelo de Estudio). Esquema de una flor tipo de *Alstroemeria*. Se indican los verticilos externo con sus tépalos A1, A2 y A3 y el verticilo interno, con sus tépalos I1, I2 y UL. ....15
- Figura 1.1. Sitios de colecta de los taxa chilenos de *Alstroemeria* incluidos en el presente estudio. . Los números corresponden a los taxa identificados en la Tabla 1.1 .....38
- Figura 1.2. Especies de *Alstroemeria* según Muñoz y Moreira (2003) incluidas en el presente estudio. Los números corresponden a los indicados en la Tabla 1.1.....39
- Figura 1.3. Posiciones de los partidores y secuencia usada en este estudio. Se muestran los partidores como flechas apuntando en la dirección de la polimerización que ellos llevan a cabo.....43

Figura 1.4. Filograma de uno de los 480 árboles más parsimoniosos resultantes del análisis de máxima parsimonia de las secuencias del espaciador *trnF-ndhJ*. Los árboles tienen 86 pasos y un índice de consistencia (CI) de 0,91 (0,88 excluyendo a los caracteres no informativos) y un índice de retención (RI) de 0,97. El número sobre las ramas es el valor de bootstrap mayor que 50% para 500 réplicas.....50

Figura 2.1. Promedio del número de semillas obtenidas por flor cruzada bajo tratamientos de polinización cruzada manual, autopolinización manual y autopolinización automática. Las letras del mismo tipo indican ausencia de diferencia significativa en test de Mann-Whitney aplicado en cada especie por separado, con la corrección de Bonferroni secuencial a un  $\alpha = 0,05$ . .....78

Figura 2.2. Regresión entre razón P/O e IAF en 9 especies chilenas de *Alstroemeria*. *A.angRC*= *A. angustifolia ssp. angustifolia* RC; *A.aur*= *A. aurea*; *A.exe*= *A. exerens*; *A.ligYL*= *A. ligtu ssp. simsii* YL; *A.pal*= *A. pallida* YL; *A.pat*= *A. patagonica*; *A.pul*= *A. pulchra ssp. pulchra*; *A.umb*= *A. umbellata*.....81

Figura 2.3. Esquema general del sistema reproductivo en las especies chilenas de *Alstroemeria* indicando los tres factores principales que lo determinan: nivel de autoincompatibilidad, autofertilidad y dicogamia.....87

Figura 2.4. Razones P/O y sistema reproductivo. a) Razón P/O para categorías de sistema reproductivo de Cruden (1977); b) Razón P/O para sistemas reproductivos

propuestos para *Alstroemeria*; I.= taxa cuyo sistema reproductivo fue evaluado a través de cruzamientos controlados mostrando las categorías reproductivas basadas en IAF, IAI y estimación de la protandria. E= exógama, M= mixta, A= autógena. II.= taxa en que sólo se conoce la razón P/O. Para dos especies la razón P/O indicada corresponde al promedio entre este estudio y otro previo (*A. aurea*; Aizen & Basilio, 1995 y *A. pallida* YL, Uslar, 1982).....93

Figura 3.1. Grado de disección del contorno floral. Se muestra la variación posible de contornos florales en *Alstroemeria* y sus valores de factor de forma asociados. a) contorno de corola semejante a un círculo con factor de forma igual a 1 y b) contorno de corola complejo con factor de forma cercano a 0.....104

Figura 3.2. Filograma de uno de los 9 árboles más parsimoniosos resultantes del análisis de máxima parsimonia de las secuencias del espaciador *trnF-ndhJ*, para los 21 taxa de *Alstroemeria* en los cuales se estudió la evolución de caracteres. El número sobre las ramas es el valor de bootstrap mayor que 50% para 500 réplicas.....106

Figura 3.3. Correlaciones entre caracteres florales y reproductivos.  $r$ = coeficiente de correlación producto-momento de Pearson.....116

a) tamaño de la corola y factor de forma floral.  $r = 0,25$   $p = 0,28$

b) tamaño de la corola y razón P/O.  $r = 0,34$   $p < 0,13$

c) factor de forma floral y razón P/O.  $r = -0,29$   $p < 0,20$

Figura 3.4. Reconstrucción de estados ancestrales del carácter tamaño de corola. La reconstrucción fue hecha con el criterio de parsimonia cuadrática implementada en el programa Mesquite. El patrón de ramificación dicotómico, a nivel de los nodos terminales, es arbitrario ( ver Fig. 3.2).....119

Figura 3.5. Reconstrucción de estados ancestrales del carácter factor de forma floral. La reconstrucción fue hecha con el criterio de parsimonia cuadrática implementada en el programa Mesquite. El patrón de ramificación dicotómico, a nivel de los nodos terminales, es arbitrario ( ver Fig. 3.2).....120

Figura 3.6. Reconstrucción de estados ancestrales del carácter razón polen-óvulo. La reconstrucción fue hecha con el criterio de parsimonia cuadrática implementada en el programa Mesquite. El patrón de ramificación dicotómico, a nivel de los nodos terminales, es arbitrario (ver Fig. 3.2).....122

# LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA

ADN	: ácido desoxirribonucleico
ANDEVA	: análisis de varianza
ARN	: ácido desoxirribonucleico
ca.	: aproximadamente
pb	: pares de bases nitrogenadas de ADN
y col.	: y colaboradores
° ' ' S	: grados, minutos, segundos, latitud sur
° ' ' O	: grados, minutos, segundos, longitud oeste
PCR	: reacción en cadena de la polimerasa (“polimerasa chain reaction”)

## RESUMEN

Existe una gran diversidad de sistemas de reproducción de las angiospermas y gimnospermas en las que se pueden distinguir desde individuos que requieren a otro para reproducirse hasta aquellos que son capaces de autofecundarse, determinando distintos grados de exogamia.

La flor constituye el órgano donde se lleva a cabo la reproducción sexual en las angiospermas y sus caracteres han sido interpretados, en numerosos casos, como respuesta a las presiones selectivas por parte de los polinizadores. En correspondencia con la estrecha relación que existe entre el sistema de reproducción y la morfología floral, se han documentado numerosas diferencias en los caracteres florales entre plantas exógamas y autógamias.

El presente estudio evaluó la relación entre la evolución del sistema de reproducción y la evolución de dos caracteres florales, tamaño y grado de complejidad del contorno de la corola, en el género *Alstroemeria* de Chile. Para ello, se construyó una hipótesis de las relaciones filogenéticas de 30 especies chilenas del género (de un total de 31; Bayer, 1987) basada en datos moleculares. Luego se determinó el sistema de reproducción para las especies chilenas de *Alstroemeria* basado en cruzamientos

controlados en el campo y además se usó la razón polen-óvulo como un indicador del sistema de reproducción en otras especies. Se evaluaron dos caracteres florales, tamaño floral y grado de complejidad del contorno de la corola, en individuos de 22 taxa. Finalmente, se trazó la trayectoria evolutiva de los caracteres florales y de la razón polen-óvulo y se evaluó la existencia de evolución correlacionada entre los caracteres florales y entre éstos y la razón polen-óvulo.

La hipótesis filogenética de las especies chilenas del género *Alstroemeria* revela la existencia de dos clados principales con una fuerte correspondencia geográfica. El sistema de reproducción en el género presenta una gran variabilidad, existiendo algunas especies exógamas, algunas autógamas y una gran mayoría con un sistema mixto. Los caracteres florales tamaño y grado de complejidad del contorno floral también presentan una gran variabilidad. Las trayectorias evolutivas del sistema de reproducción, reflejada en la evolución de la razón polen-óvulo muestra la evolución independiente en dos oportunidades, de la autogamia, asociada a especies que habitan en los márgenes de distribución del género en Chile. La trayectoria evolutiva de los caracteres florales muestra evolución tanto de corolas grandes como de corolas pequeñas a partir del ancestro y evolución de diferentes grados de complejidad del contorno de la corola a partir de un ancestro común con valor intermedio. En todos los casos, las trayectorias evolutivas de los caracteres, tanto florales como reproductivos, ponen en evidencia una gran labilidad o dinamicidad evolutiva. Finalmente, la ausencia de una correlación evolutiva significativa entre los caracteres florales y entre éstos y la razón polen-óvulo,

sugiere la existencia de otras fuerzas selectivas importantes, además de los polinizadores, en la evolución de esos caracteres.

## ABSTRACT

There is a great diversity of reproductive systems in angiosperms and gymnosperms from individuals that require others for reproduction to others that present self-fecundity, determining different degrees of exogamy.

The flower constitutes the organ where occurs the sexual reproduction in angiosperms and their characters have been interpreted, in many cases, as a response to the pollinator selective pressures. In correspondence with the close relation existing between reproductive system and floral morphology, many differences in floral characters have been reported in exogamous and autogamous plants.

The present study evaluated the evolutionary relation between the reproductive system and two floral characters, size and degree of complexity of the flower outline, in the genus *Alstroemeria* of Chile. For this purpose, we constructed a hypothesis of the phylogenetic relations of 30 Chilean species of the genus (from a total of 31; Bayer, 1987), based on molecular data. Then, we determined the reproductive system of the Chilean species of *Alstroemeria*, based on field controlled crossings experiments. The pollen-ovule ratio was also used as an indicator of the reproduction system in other species. Two floral characters, flower size and degree of complexity of the corolla

outline, were evaluated in individuals of 22 taxa. Finally, we trace the evolutionary trajectory of the floral characters and pollen-ovule ratio and we evaluated the correlated evolution among floral characters and between them and the pollen-ovule ratios.

The phylogenetic hypothesis of the Chilean species of *Alstroemeria* reveals the presence of two main clades with a strong geographic correspondence. The reproductive systems showed a great variability, being some species exogamous, some autogamous and the majority having a mixed system. The floral characters -size and degree of complexity of flower outline- were also highly variable. The evolutionary trajectory of the reproductive system, reflected in the pollen-ovule evolution, showed independent evolution in two opportunities of the autogamy, associated with species that live in the margin of distribution of the genus in Chile. The evolutionary trajectories of the floral characters showed evolution both of big and small corollas from a common ancestor with intermediate value. In all cases, the evolutionary trajectories of floral and reproductive characters give evidence of their high evolutionary lability. Finally, the absence of a significant evolutionary correlation among floral characters and between them and pollen-ovule ratios suggest the existence of other important selective pressures, besides pollinators, in the evolution of these characters.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

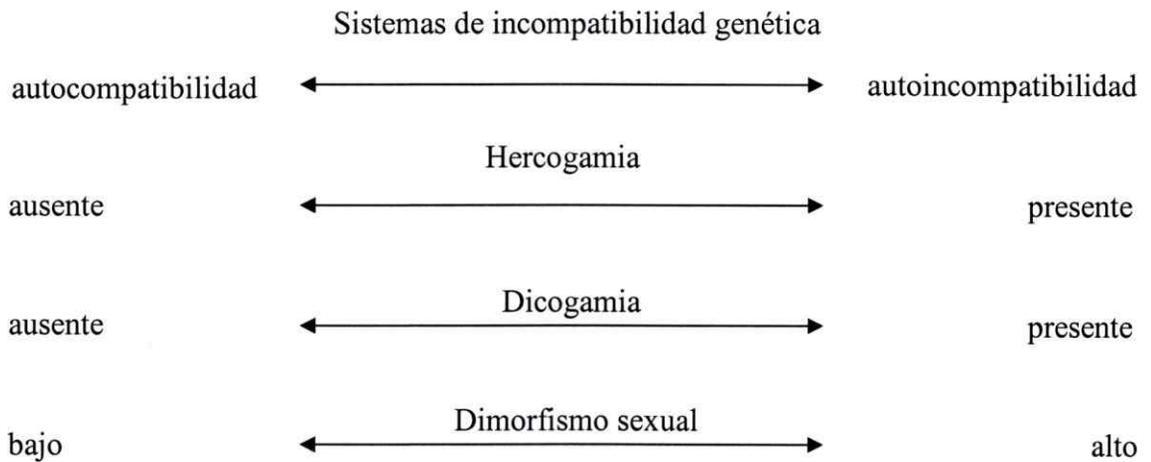
Las angiospermas y gimnospermas se caracterizan por una gran diversidad de sistemas de reproducción, los que van desde especies cuyos individuos obligatoriamente requieren de otro individuo para reproducirse, es decir, exógamas, hasta aquellas que se autofecundan habitualmente, es decir, autógamas (Richards, 1997). Entre estos dos extremos hay especies que mantienen sistemas mixtos en que ambos tipos de reproducción son factibles (Lande & Schemske, 1985).

El grado de exogamia/autogamia en las espermatófitas se regula mediante diversos mecanismos. Bien conocido es el sistema de autoincompatibilidad genética (Fig. 1a) que genera procesos de aceptación o rechazo de granos de polen provenientes de la misma planta, a nivel del estigma o pistilo. Existen diversos tipos de autoincompatibilidad como por ejemplo, la heteromórfica, en que la autoincompatibilidad está asociada a la posición relativa del estigma y las anteras dentro del mismo tipo de morfo floral presente en una población (Weller y col., 1995). La autoincompatibilidad homomórfica no está asociada con un morfo floral específico existiendo dos tipos de ella, la esporofítica y la gametofítica, según el tipo de control genético de la incompatibilidad del polen (de Nettancourt, 1977). Otro mecanismo importante que influye en el grado de exogamia/autogamia es la hercogamia (Fig. 1a), es decir, la separación espacial de

Figura 1. a) Factores correlacionados al grado de autogamia y exogamia en las angiospermas. b) Caracteres florales asociados con diferentes grados de autogamia y exogamia.

AUTOGAMIA  EXOGAMIA

a.



b.

**Caracteres florales**



estigmas y anteras, no pudiendo ocurrir autogamia o geitonogamia sin la participación de un insecto. Este rasgo es interpretado como un mecanismo secundario que promueve el cruzamiento entre individuos genéticamente distintos (Richards, 1997). Además de la separación espacial entre las funciones femeninas y masculinas en una flor, puede existir una separación temporal de la dehiscencia de las anteras y de la receptividad del estigma que se denomina dicogamia (Fig. 1a). Su función estaría asociada, por una parte, con reducir la autogamia en especies autocompatibles (Richards, 1997) la que conlleva una disminución en la adecuación biológica debido a la endogamia (Darwin, 1876; Husband & Schemske, 1996) y por otra, con reducir la interferencia entre las funciones femenina y masculina dentro de la misma flor o dentro del mismo individuo (Bertin, 1993; Barrett, 2002). Finalmente, el dimorfismo sexual (Fig. 1a) se constituye en un tipo de sistema reproductivo en el cual la función femenina y masculina están separadas dentro del mismo individuo o en individuos diferentes, siendo la dioecia el ejemplo extremo donde se asegura el cruce entre individuos diferentes (Richards, 1997).

Tradicionalmente la autoincompatibilidad y por ende, la exogamia se consideran basales en las angiospermas y la autogamia es considerada como una condición derivada (Stebbins, 1958, 1970; Short, 1981; Richards, 1997). Se ha planteado que el sentido evolutivo sería unidireccional desde la exogamia hacia la endogamia (Lewis, 1954; Stebbins, 1957), por lo tanto, si se consideran especies relacionadas, las autógamas serían derivadas de las exógamas (Lewis, 1954; Stebbins, 1957). En un estudio basado en variación en los sitios de restricción de cpDNA de *Amsinckia*, Schoen y col. (1997) encontraron que la adquisición de la autocompatibilidad es de origen reciente a partir de

ancestros exógamos. En Pontederiaceae (Kohn y col., 1996) un estudio revela que dentro de un linaje la aparición de la autogamia ha ocurrido múltiples veces, aunque algunos taxa autógamos pueden ser de larga existencia. Cambios en el mismo sentido se han encontrado en especies herbáceas (e.g. Onagraceae, Oxalidaceae, Polemoniaceae, Gramineae) donde el cambio hacia autogamia ha evolucionado en conjunto con ocupación de hábitat pioneros y temporales (Stebbins, 1957; Ornduff, 1972; Raven, 1979; Grant, & Grant, 1965). Algo similar ocurre en *Tarasa*, donde Tate y Simpson (2004) hallaron cambios desde exogamia hacia autogamia, asociados a ambientes de gran altura en los Andes. Finalmente, la reconstrucción filogenética de *Linanthus* (Goodwillie, 1999), basada en la región ITS del rDNA, revela pérdida de la autoincompatibilidad en cuatro ocasiones lo que revela que el sistema de reproducción es extraordinariamente dinámico. Sin embargo, no todas las investigaciones de la historia evolutiva de los sistemas de reproducción han mostrado el patrón de evolución unidireccional desde taxa exógamos hacia taxa autógamos. Armbruster (1993) en el género *Dalechampia* sugirió el origen de la exogamia a partir de especies autógamas. Cambios en el mismo sentido encontró Bena y col. (1998) usando secuencias ITS y ETS de rDNA en el género *Medicago*, en donde la autocompatibilidad sería la condición ancestral y la autoincompatibilidad habría evolucionado secundariamente en linajes perennes. También se han encontrado cambios en el sistema sexual en *Bencomia* en donde hay cambios desde dioecia a monoecia y viceversa (Helfgott y col., 2000). Finalmente, Weller y col. (1995), en un estudio que comprendió varias familias de angiospermas, mostraron que la autocompatibilidad fue probablemente ancestral en las angiospermas. Los antecedentes presentados sugieren la existencia de transiciones entre los sistemas de reproducción exógamos y autógamos, en

ambas direcciones, dentro de la historia evolutiva de un linaje. De este modo, tanto la dirección como la frecuencia de cambio en el sistema reproductivo constituyen una pregunta abierta de alto interés biológico.

El proceso reproductivo en la mayoría de las angiospermas está ligado a la existencia de agentes polinizadores. La flor es el órgano donde se lleva a cabo la reproducción sexual y presenta una variedad de caracteres que permiten atraer a los agentes polinizadores bióticos y actuar como claves para discriminar entre distintos tipos de flores (Dafni y col., 1997). Entre estos caracteres se cuentan color, fragancia, tamaño, órganos que producen néctar, forma, profundidad de la corola, orientación espacial y altura sobre el sustrato (Dafni y col., 1997). El tamaño floral ha mostrado tener una gran influencia en la tasa de visita (Galen & Newport 1987; Stanton & Preston, 1988; Galen, 1989; Young & Stanton, 1990; Ashman & Stanton, 1991; Moller, 1995), en la tasa de remoción de polen (Young & Stanton, 1990) y en los tiempos de búsqueda de polinizadores bióticos (Spaethe y col., 2001). La forma floral puede describirse de diferentes maneras siendo la más sencilla de ellas, la figura descrita por su perímetro. Es así como se habla de flores tubulares, con forma de campana, con forma de embudo o de plato (Faegri & van der Pijl, 1979; Appanah, 1990; Dayanandan y col., 1990; Dafni y col. 1997). Otro aspecto de la forma floral es la simetría. Básicamente, puede distinguirse entre simetría radial (actinomórfica), cuando la flor posee dos o más planos de simetría que pasan por el centro de ella, y bilateral (zigomórfica) cuando existe sólo un plano que divide a la flor en dos mitades iguales (Dafni y col., 1997). Numerosos estudios sobre preferencias, tiempos de manipulación y formas de percepción de la

simetría por parte de los polinizadores (Leppik, 1953; West & Laverty, 1998; Giurfa y col., 1996; Wolfe & Krstolic, 1999) revelan diferencias entre ambos tipos de flores. Menos atención ha recibido la forma del contorno de la corola, la que puede variar desde formas redondeadas, donde los pétalos se superponen mucho entre sí hasta aquellas donde esto no ocurre existiendo grandes hendiduras entre los pétalos (Herrera, 1993a). Este carácter poco estudiado hasta la fecha, ha mostrado ser importante en la preferencia de polinizadores (Hertz, 1935; Free, 1993; Herrera, 1993b; Kelber & Pfaff, 1997; Johnson & Dafni, 1998) y en la producción de frutos (Herrera, 1993a). En el presente estudio a este carácter se le denomina “grado de disección del contorno de la corola”.

La dependencia que una planta tiene de polinizadores bióticos varía según el sistema de reproducción, siendo mayor en plantas con exogamia obligada y menor en especies altamente autógamas (Cruden, 1977; Galen & Kevan, 1980). Dado que los caracteres florales modifican fuertemente la atracción y el comportamiento de los polinizadores (Waser, 1983), el forrajeo de un polinizador es una de las fuerzas selectivas más importantes en la evolución floral (Kevan, 1983; Waser 1983). Una pregunta fundamental en la biología de la reproducción en plantas es la relación entre el sistema de reproducción y la morfología floral (Fig. 1b). Concordante con lo anterior, muchos estudios han documentado grandes diferencias morfológicas en las flores entre plantas exógamas y autógamas (Ornduff, 1969). Estas diferencias pueden evidenciarse tanto en rasgos que influyen en la deposición del polen, como por ejemplo, el grado de separación entre anteras y estigmas (Arroyo, 1973; Holtsford & Ellstrand, 1992; Escaravage y col., 1997; Runions & Geber, 2000) y protrusión del estigma (Rick y col.,

1977; pero ver Shoen, 1982) como en el número de granos de polen producidos por una flor (Ornduff, 1969; Cruden, 1977; Short, 1981; Wyatt, 1984b; Vasek & Weng, 1988). Además, pueden existir diferencias en los caracteres asociados con la atracción de polinizadores y recompensa para polinizadores, como por ejemplo, el tamaño floral y cantidad y calidad de néctar (Ashman & Stanton, 1991; Cohen & Shimida, 1993). Estudios que abordan el tamaño floral (Fig. 1b) han encontrado reducción en el largo de la antera (Rick y col., 1977) y en el tamaño de pétalos, estambres y pistilos (Wyatt, 1984a) en taxa autógamos. Se han establecido correlaciones entre un indicador del sistema reproductivo, la razón polen óvulo, con el tamaño de la corola (Ritland & Ritland, 1989) la que no resultó significativa en *Solanum* (Mione & Anderson, 1992). Con relación a los parámetros de forma floral, las flores zigomórficas promoverían la constancia floral como resultado de un forajeo más eficiente por parte de polinizadores con un mejor nivel de coordinación sensorial y motora y mejor capacidad de manipulación (Leppik, 1972, 1977; Laverty, 1980). Esta constancia floral promovería, a su vez, una mayor exogamia (Darwin, 1876)(Fig. 1b). Con relación al grado de disección del contorno floral, Herrera (1993a) encontró una asociación con la producción de frutos y Dafni y Kevan (1997), en un estudio de 42 especies de la flora de Israel, encontraron una asociación con el tamaño floral, en que las flores más pequeñas poseían una mayor grado de disección del contorno de la corola. Esto produciría en el sistema visual del polinizador un efecto de "encendido y apagado" ("flicker") aumentando la posibilidad de la flor de ser detectada por un polinizador. Sin embargo, aún es una pregunta abierta si existe una asociación entre el grado de disección del contorno de la corola y el tipo de sistema de reproducción.

En el presente estudio se evalúa la relación entre caracteres florales y el sistema de reproducción en el género *Alstroemeria* en Chile, en un contexto evolutivo. Se eligió el género *Alstroemeria* para estudiar la evolución de caracteres florales asociados con el sistema de reproducción porque, en primer lugar, presenta una gran variación interespecífica en los caracteres florales (Bayer, 1987; obs. pers.). Segundo, presenta variación en su sistema de reproducción (Arroyo & Squeo, 1990; Arroyo & Uslar, 1993). Finalmente, el género *Alstroemeria* es monofilético (Aagesen & Sanso, 2003), requisito indispensable para poner a prueba hipótesis evolutivas. Se construyó una hipótesis filogenética, basada en caracteres moleculares, que permitió determinar las relaciones filogenéticas entre las especies y evaluar la trayectoria de los caracteres florales y del sistema reproductivo. Los caracteres florales a considerar son el tamaño de la corola y el grado de disección del contorno de ésta. Como indicador del sistema reproductivo se usó la razón polen óvulo (Cruden, 1977), previa corroboración de la relación entre éste y un índice reproductivo, obtenido a partir de cruzamientos experimentales, en un conjunto de especies.

Se exploran las siguientes preguntas en este trabajo: ¿existe evolución correlacionada entre el tamaño y el grado de disección de la corola? y, ¿existe evolución correlacionada entre estos caracteres florales y el sistema reproductivo?. Responder a estas preguntas tomando en cuenta las relaciones filogenéticas entre las especies, permite descartar el efecto de asociación entre caracteres por herencia a partir de un ancestro común (Mc Lennan, 1994; Martins & Hansen, 1997; Brown et al., 2000). Finalmente, y dada la evidencia creciente sobre labilidad en la evolución de caracteres, por ejemplo, del

sistema de reproducción, resulta interesante evaluar ¿cuál es la dirección de cambio en la evolución del sistema reproductivo y en la de los caracteres florales? Expresado de otra manera, ¿existe evolución de especies autógamas a partir de ancestros exógamos y, viceversa? o ¿pueden ancestros con flores de tamaño pequeño derivar a especies con flores de tamaño mayor o, ancestros con flores con alto grado de disección floral dar origen a especies con bajo grado de disección, o a la inversa?

Se espera que, si la fuerza selectiva de los polinizadores bióticos ha jugado un rol importante en la evolución del género *Alstroemeria*, un cambio de exogamia obligada a autogamia (y menor dependencia de polinizadores) se asocie con una pérdida de caracteres asociados con una mayor atracción hacia polinizadores bióticos, por ejemplo, disminución del tamaño floral y un menor grado de disección del contorno de la corola. Además, se espera que existan cambios en ambas direcciones tanto en el sistema de reproducción como en los caracteres florales. Si existe esta gran capacidad de cambio evolutivo, se espera que si existen cambios en el sistema de reproducción en ambas direcciones dentro de un linaje, los caracteres florales cambien correspondientemente. El estudio de la evolución de caracteres florales en un contexto filogenético, en especies de un mismo género con distintos niveles de dependencia de polinizadores constituye un medio rico para comprender la evolución floral.

## HIPÓTESIS

H1. El tamaño y grado de disección de la corola, estarían correlacionados evolutivamente con el grado de exogamia, en especies de *Alstroemeria*.

H2. El tamaño de la corola estaría correlacionado evolutivamente con el grado de disección de la corola, en especies de *Alstroemeria*.

H3. Durante el tiempo evolutivo, los caracteres florales tamaño y grado de disección de la corola y el grado de exogamia en *Alstroemeria* han experimentado cambios bidireccionales, es decir desde corolas grandes hacia pequeñas y viceversa, desde corolas con alto grado de disección hacia bajo grado de disección y desde la autogamia hacia la exogamia y viceversa.

La construcción de la hipótesis filogenética sobre la cual se basan todos los análisis posteriores se describe en el Capítulo 1. La determinación del sistema reproductivo se describe en el Capítulo 2 y la evaluación de los caracteres florales en el Capítulo 3. El análisis de correlación evolutiva y de direccionalidad del cambio evolutivo se describe en el Capítulo 3.

## OBJETIVO GENERAL

Evaluar la relación entre el tamaño y la forma de la corola con el sistema reproductivo, en *Alstroemeria*, en un contexto filogenético.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Construir una hipótesis filogenética, para las especies del género *Alstroemeria* en Chile, basada en datos moleculares.

(Capítulo 1. Relaciones filogenéticas entre las especies chilenas del género *Alstroemeria*)

2. Determinar la razón polen-óvulo para 22 taxa chilenos de *Alstroemeria* y determinar el sistema reproductivo en algunas especies, a través de cruzamientos en terreno, para establecer el rango de razón P/O de las distintas categorías reproductivas en este género.

(Capítulo 2. Razón polen-óvulo y sistema reproductivo en el género *Alstroemeria* de Chile).

3. Determinar el tamaño floral y grado de disección del contorno de la corola en 21 taxa chilenos de *Alstroemeria*.

(Capítulo 3. Evolución de caracteres florales y razón polen-óvulo en el género *Alstroemeria* de Chile)

4. Evaluar la existencia de evolución correlacionada entre caracteres florales y el sistema de reproducción y la dirección del cambio evolutivo en distintos linajes chilenos de *Alstroemeria*.

(Capítulo 3. Evolución de caracteres florales y razón polen-óvulo en el género *Alstroemeria* de Chile).

## MODELO DE ESTUDIO: GÉNERO *ALSTROEMERIA*

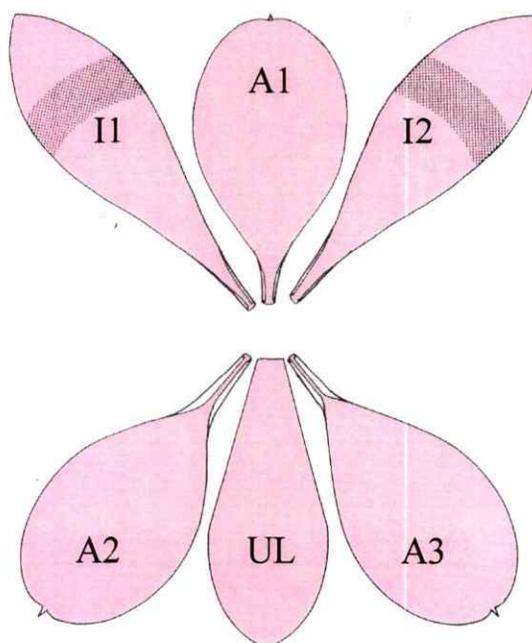
El género *Alstroemeria* es un género sudamericano de plantas herbáceas que en Chile comprende 31 especies (42 taxa) (Bayer, 1987) algunas de las cuales son compartidas con Argentina (Sanso, 1996) y con Perú (Brako y Zarucchi, 1993). El género en Chile se distribuye desde los 22° S en la I Región hasta los 51° S en la XII Región, siendo la zona central la que concentra un mayor número de especies (Bayer, 1987; Muñoz & Moreira, 2003). Los hábitats ocupados por especies del género son variados y van desde ambientes costeros, desierto, matorral mediterráneo, bosques templados hasta ambientes subandinos y andinos, cubriendo altitudes desde el nivel del mar hasta los 3000 msnm.

El género *Alstroemeria* está constituido mayoritariamente por hierbas perennes. Sólo dos especies, *A. graminea*, distribuida en la costa del desierto de Chile (Bayer, 1987) y *A. hygrophila* (Meerow y col., 1999), que vive en el centro de Brasil, presentan un hábito anual. Las especies perennes presentan órganos subterráneos reservantes, ya que sean raíces engrosadas o rizomas. Los individuos presentan generalmente dos tipos de tallos aéreos, uno estéril, que contiene frecuentemente muchas hojas y otro, fértil, que normalmente alcanza mayor altura y que contiene hojas de menor tamaño. Tanto las hojas del tallo estéril como del fértil pueden presentar o no resupinación, es decir, una

torsión cerca de la base o a lo largo de la lámina, que hace que la cara inferior de la hoja mire hacia arriba (Bayer, 1987; Muñoz & Moreira, 2003).

Las flores de *Alstroemeria* están dispuestas en una inflorescencia tipo umbela, simple o compuesta; raramente las flores son solitarias. Las flores están compuestas de dos verticilos cada uno con tres tépalos. El externo está constituido por los tépalos A1, A2 y A3, en general obtusos y más anchos y cortos que los internos y del mismo color (Fig. 2). El verticilo interno está constituido por tépalos (I1, I2 y UL), en general, más angostos e incluso agudos, con manchas o rayas rojo-púrpura-café, siendo los dos superiores los más largos y, a veces, con una banda amarilla ancha. La simetría floral es casi siempre zigomórfica, principalmente a causa de la posición de los pétalos internos superiores (Bayer, 1998) aunque se ha descrito, al menos una especie, argentina, cuya simetría no es "definidamente zigomorfa" (Sanso, 1996). Sin embargo, puede afirmarse que todas las especies chilenas son zigomorfas (Aagesen & Sanso, 2003; obs. pers.), aunque existe un gradiente de formas florales notorio al comparar distintas especies, que van desde aquellas más redondeadas, en donde los tépalos se superponen entre sí, a otras en que los tépalos están más separados, haciendo más evidente su zigomorfía. Las flores poseen 6 estambres pertenecientes a dos verticilos (Heywood, 1993), cuyas anteras son basifijas e introrsas, el estilo es filiforme y se separa en tres porciones cuando está receptivo. El ovario, inferior, es trilocular y forma una cápsula del mismo tipo, que presenta dehiscencia explosiva, con muchas semillas irregulares y con forma de globo en su interior (Uphof, 1952; Garaventa, 1971). El color de las flores puede variar entre

Fig. 2. Esquema de una flor tipo de *Alstroemeria*. Se indican los verticilos externo con sus tépalos A1, A2 y A3 y el verticilo interno, con sus tépalos I1, I2 y UL.



blanquecino, rosado, amarillo, naranja, rojo o púrpura, algunos de los cuales se deben a los pigmentos del tipo antocianinas presentes en los tépalos (Nørbaek y col., 1996). De los caracteres descritos, los de mayor importancia desde el punto de vista taxonómico son los florales, por ejemplo, el color básico de la flor y la ornamentación y la forma de los tépalos, especialmente los internos superiores. Caracteres no florales usados con el mismo fin son la presencia o ausencia de hojas resupinadas (Bayer, 1987).

Una característica importante presente en las flores de *Alstroemeria* es la dicogamia, es decir, la separación temporal de las funciones masculina y femenina, específicamente, protandria, es decir, la maduración de los estambres antes del pistilo (Bertin & Newman, 1993). Esta condición se ha constatado para diversas especies del género (Herbert, 1837; Uphof, 1940; Fryxel, 1957; Hunziker, 1991; Aizen & Basilio, 1995). Los estudios más profundos en este tema han sido llevados a cabo por Aizen y Basilio (1995), quienes describieron con detalle las etapas en el desarrollo secuencial de los estambres y pistilo, en *A. aurea*, y por Harder y Aizen (2004) quienes evaluaron, en la misma especie, las consecuencias de la protandria desde el punto de vista reproductivo.

Las especies de *Alstroemeria* son polinizadas especialmente por abejas. *Alstroemeria pallida* es visitada sólo por himenópteros en la zona andina (Arroyo y col., 1983) y por himenópteros, hemípteros y dípteros en el matorral montano (Uslar, 1982). *Alstroemeria aurea* es visitada en el sector del Parque Nacional Nahuel Huapi (Argentina) por *Bombus dahlbomii* quien es responsable de más del 90% de las visitas (Aizen & Basilio, 1998) y en Puyehue, por himenópteros y lepidópteros (Riveros, 1991). *Alstroemeria ligtu* spp. *simsii* es visitada por himenópteros y dípteros en el matorral de Chile central (Botto-Mahan & Camacho, 2000) y por himenópteros y coleópteros en el matorral montano (Uslar, 1982). Finalmente, *A. patagonica*, que habita en la estepa patagónica de Chile y Argentina es visitada sólo por dípteros (Squeo, 1991).

El género *Alstroemeria* representa un interesante sujeto de estudio para los objetivos de esta tesis. Presenta caracteres florales muy variables tales como el tamaño y la forma (Bayer, 1987; obs. pers). El grado de disección del contorno de la corola es un carácter que ha sido poco estudiado con relación al sistema de reproducción (Herrera, 1993a) y que ha demostrado ser de mucha importancia en la preferencia de polinizadores (Johnson & Dafni, 1998). Si bien los estudios de polinización en este género son escasos, la presencia de insectos, y específicamente himenópteros en este proceso, sugiere que los caracteres florales antes mencionados pueden ser relevantes en la interacción polinizador-planta. Con relación al sistema reproductivo algunos estudios muestran la existencia de distintas modalidades reproductivas, que van desde la autogamia hasta la exogamia (Arroyo & Squeo, 1990; Arroyo & Uslar, 1993; Aizen & Basilio, 1995). Además, la variación en el tamaño de las anteras entre distintas especies (Bayer, 1987) sugiere variabilidad en el número de granos de polen y esto, a su vez, puede estar relacionado con variabilidad en el sistema reproductivo (Wyatt, 1984b; Ritland & Ritland, 1989). El género en Chile está conformado sólo por especies herbáceas y, a excepción de una, *A. graminea*, son todas especies perennes. Esta condición resulta muy ventajosa pues un aspecto que tiende a confundir el entendimiento de los sistemas de reproducción es la relación que existe entre éste y la longevidad de los adultos (Arroyo & Squeo, 1990; Zhang, 2000; Morales & Galetto, 2003). Finalmente, es un género distribuido prácticamente en todos los ambientes latitudinales y altitudinales de nuestro país, en donde tanto las condiciones bióticas (e.g. polinizadores) como abióticas (e.g. temperatura, precipitaciones) varían. Esto sugiere fuertemente que las diferentes especies están

expuestas y adaptadas condiciones ecológicas diferentes generando patrones complejos de evolución de caracteres.

## CAPÍTULO 1. RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE LAS ESPECIES CHILENAS DEL GÉNERO *ALSTROEMERIA*.

### INTRODUCCIÓN

El género *Alstroemeria* es un género de plantas herbáceas que están distribuidas en Sudamérica en ambientes subtropicales y/o templados de Venezuela, Perú, Bolivia, Argentina, Paraguay, Uruguay y sus centros principales de diversidad se encuentran en Chile central y sudeste de Brasil (Aker & Healy, 1990; Sanso, 1996). El género contiene un número estimado de 74 especies, basado en los trabajos sobre *Alstroemeria* en Chile (Bayer, 1987; Muñoz, 2000; Muñoz & Moreira, 2003), en Brasil (Meerow et al., 1999; Assis, 2001, 2002, 2003; Assis & Mello-Silva, 2002), en Argentina (Sanso, 1996), en Perú (Brako & Zarucchi, 1993) y de una reseña general del género de Aker & Healy (1990).

*Alstroemeria* pertenece a la familia americana Alstroemeriaceae, establecida por Dumortier en 1829, la cual contiene otros dos géneros. *Bomarea* tiene aproximadamente 100 especies, distribuidas desde México a Sudamérica (Mabberley, 1997) y con tres representantes en Chile, *B. dulcis* (Hook.) Beauverd. y *B. involucrosa* (Herb.) Baker,

distribuidas en la zona norte del país y *B. salsilla* (L.) Mirb. en la zona central (Marticorena & Quezada, 1985; Hofreiter & Tillich, 2002). El género *Leontochir* es monotípico representado por *Leontochir ovallei*, especie endémica ubicada en la costa desértica del norte de Chile (Marticorena & Quezada, 1985).

La historia taxonómica del género se inicia con Louis Feuillée, quien fue el primero que describió especies ahora pertenecientes al género *Alstroemeria*. Primero las clasificó como *Hemerocallis*, pero luego Linnaeus se dio cuenta que no pertenecían a dicho género, estableciendo el género en 1762 sobre la base del tipo de una de las especies primeramente descritas, *A. peregrina* (Uphof, 1952). El nombre del género se debe a su amigo Klas Alströmer quien le llevaba semillas provenientes de Feuillée (Uphof, 1952). Estudios del género incluyen revisiones hechas en el pasado por Herbert (1837) quien menciona 29 especies (18 en Chile), Kunth (1850) quien reconoce 40 especies (26 en Chile) y Baker (1888) quien menciona 44 especies (23 en Chile). Más recientemente, Uphof (1952) incluye en su listado 62 especies para Sudamérica y 27 en Chile. En el estudio de las alstroemerias de Chile, han realizado importantes contribuciones Ruiz y Pavón (1802) quienes mencionaron 23 especies en Chile y Perú; Gay (1853) quien menciona 26 especies y R. A. Philippi quien describió 30 especies nuevas (1857, 1860, 1862, 1864, 1873, 1896). Más tarde, Garaventa (1971) realizó una revisión de las especies chilenas donde describe aquellas más representativas (19) y Bayer (1987) escribió la última monografía exhaustiva donde reconoce 31 especies y un total de 42 taxa. Recientemente, Muñoz (2000, 2003) agregó 3 especies y una variedad, reconociendo, finalmente, Muñoz y Moreira (2003) un total de 33 especies (49 taxa).

En el transcurso de esta historia taxonómica han existido ciertas controversias. Por una parte, aunque la familia Alstromeriaceae fue reconocida por primera vez por Dumortier en 1829 y apoyada por otros (Hutchinson, 1959), el género fue agrupado dentro de las Amaryllidaceae por Herbert (1837) y Baker (1888) y en las Liliaceae por Buxbaum (1954). Actualmente, la familia Alstroemeriaceae se ubica en el orden Liliales (Huber, 1969; Dahlgren et al., 1985). Por otra parte, han existido intercambios de especies entre los géneros *Alstroemeria* y *Bomarea* (Xifreda & Sanso, 1992), y sólo recientemente se ha establecido una buena delimitación entre ambos (Sanso & Xifreda, 2001). Finalmente, también ha habido intentos de separar ciertas especies en géneros nuevos. *A. graminea* Phil. fue segregada en el género monotípico *Taltalia* E. Bayer (Bayer, 1998) basado en el hábito anual. Sin embargo, un trabajo filogenético reciente la retiene dentro del género (Aagesen & Sanso, 2003). Otro caso es el de la especie andina, *A. pygmaea* Herb., distribuida en Argentina, Perú y Bolivia, que fue segregada en el género *Schickendantzia* Pax (Pax, 1890). Sin embargo, estudios filogenéticos, fenéticos, cromosómicos y de morfología del polen apoyan su permanencia *Alstroemeria* (Kosenko, 1994; Sanso, 1996; Sanso & Xifreda, 1999; Sanso, 2002; Aagesen & Sanso, 2003).

En Chile, el género *Alstroemeria* comprende 31 especies (42 taxa) según Bayer (1987) y 33 especies (49 taxa) según Muñoz y Moreira (2003). De las especies reconocidas por Bayer (1987) un 71% son endémicas, a excepción de las 5 especies compartidas con Argentina, *A. andina* ssp. *venustula*, *A. aurea*, *A. pseudospathulata*, *A. patagonica* y *A. presliana* Herb. (Sanso, 1996) y 4 especies compartidas con Perú, *A.*

*ligtu* L., *A. pelegrina*, *A. recumbens* Herb. y *A. violacea* (Brako & Zarucchi, 1993). Un estudio que abordó el estado de conservación de las especies presentes en la IV Región (Squeo y col., 2001) estableció que, de las 17 especies (Bayer, 1987) presentes, 3 de ellas, *A. hookeri*, *A. leporina* y *A. pelegrina* se encontrarían en la categoría de vulnerable. La distribución geográfica del género en Chile abarca desde los 22° S en la I Región a los 51° S en la XII Región, presentando la mayor concentración de especies en la zona central de Chile lo que coincide con el área con clima mediterráneo según di Castri y Hajek (1976). Sólo tres especies alcanzan el extremo norte del país (*A. lutea*, *A. violacea* y *A. graminea*) y sólo 4 se extienden más allá de los 37° S (*A. aurea*, *A. presliana* ssp. *australis*, *A. pulchra* ssp. *lavandulacea* y *A. patagonica*) [Muñoz y Moreira, 2003]. En contraste con la amplia distribución del género en Chile, la distribución de la mayoría de las especies es relativamente restringida, estando limitada a 1-2 grados o menos de extensión latitudinal (Muñoz & Moreira, 2003). Las pocas especies ampliamente distribuidas son *A. aurea*, la que se ubica entre la VII y XI Regiones de Chile (Bayer, 1987), *A. patagonica*, en la XII Región en Chile y más amplio aún en el lado argentino y *A. violacea*, desde la I a III Región de Chile y extendiéndose hacia el norte hasta Perú (Brako & Zarucchi, 1993; Muñoz y Moreira, 2003).

Los estudios filogenéticos con datos moleculares y morfológicos son escasos en la familia Alstroemeriaceae. Un estudio que abordó las relaciones filogenéticas dentro de Alstroemeriaceae, basado en secuencias de ADN del gen del cloroplasto *rps15* y en datos morfológicos, estableció que tanto la familia Alstroemeriaceae, como los géneros *Alstroemeria* y *Bomarea* eran monofiléticos (Aagesen & Sanso, 1998). La resolución

obtenida para *Alstroemeria* fue baja, debido al bajo número de especies utilizadas (17) y el tipo de secuencia utilizada. Sin embargo, para las especies chilenas se pudo distinguir dos clados concordantes con la ubicación geográfica, uno norte y otro con especies con distribución en la zona central y sur. En otro estudio, basado en el análisis de AFLP, Han et al. (2000) evaluaron la diversidad genética dentro del género. Encontraron una separación entre las especies chilenas y las de Brasil, sin embargo, la sustentación del dendrograma no fue buena. Además se han llevado a cabo estudios de relaciones genéticas basadas en RAPD, utilizándose principalmente variedades de cultivo y especies silvestres (Dubouzet et al. 1997, 1998) con el objetivo de identificar el origen de algunos cultivos. Sin embargo, la escasez de datos de especies silvestres limita el valor de dichos estudios en el contexto del presente trabajo.

La escasa información sugiere la necesidad de contar con una filogenia más robusta para las especies chilenas del género, que incluya un mayor número de especies y que utilice caracteres que permitan una mejor sustentación de los clados del árbol y una mejor resolución dentro de las particiones obtenidas. Una filogenia con estas características es fundamental para los objetivos de la presente tesis pues en ella se trazará la evolución de caracteres florales y reproductivos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### I. NOMENCLATURA

La taxonomía y nomenclatura de las especies sigue a Bayer (1987) aunque también se presentan los nombres otorgados por Muñoz y Moreira (2003).

### II. MUESTREO

Las muestras de ADN de las especies incluidas en el estudio se obtuvieron a partir de colectas de material en las poblaciones naturales de las especies. Se obtuvo material de un individuo de 30 especies (38 taxa) chilenas del género (Bayer, 1987). Para algunas especies, se estudiaron individuos de dos o tres poblaciones. En la mayoría de los casos, se utilizó tejido foliar. En aquellas especies en que las hojas se hallaban secas al momento de la colecta, se colectaron frutos con semillas o yemas florales. Las muestras se mantuvieron en sílica gel. Las especies del género *Alstroemeria* incluidas en el presente estudio como así también las especies utilizadas como grupo externo se dan a conocer en la Tabla 1.1. Las distribuciones geográficas de las poblaciones muestreadas se indican en la Fig. 1.1 y las fotografías de las flores de cada taxon en la Fig 1.2. Como grupo externo se utilizaron dos especies de géneros hermanos a *Alstroemeria* dentro de la familia Alstroemeriaceae, específicamente, *Leontochir ovallei* y *Bomarea salsilla* (Sanso & Xifreda, 1999). Se intentó usar como grupo externo especies brasileras del

Tabla 1.1. Taxa de *Alstroemeria* incluidos en este estudio y taxa de grupo externo. La localidad incluye país, región política, provincia y otros detalles. El acrónimo es la forma como se indicarán las especies en el texto, tablas o figuras del presente estudio y consiste en el nombre del taxon, seguido de 1 o 2 letras mayúsculas, que hacen referencia a la localidad, en aquellos taxa en que se colectó más de una población. Se incluyen las dos clasificaciones más recientes de las especies chilenas del género.

Grupo Interno	Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Bayer (1987)	Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Muñoz y Moreira (2003)	Acrónimo	Datos de la colecta
1	<i>A. andina</i> ssp. <i>andina</i> Phil.	<i>A. andina</i> Phil. var. <i>andina</i>	<i>andina andina</i>	CHILE. III Región, Huasco, camino entre Conay y el Nevado, km. 36, 29° 15' 30,96" S, 70° 5' 13,14" O, 3557 m, 08-II-2001, <i>Hershkovitz, M., 01-46.</i>
2	<i>A. andina</i> ssp. <i>venustula</i> (Phil.) Bayer	<i>A. andina</i> (Phil.) var. <i>venustula</i> M. Muñoz	<i>andina venustula</i>	CHILE. IV Región, Elqui, Baños del Toro, 29° 49' 50,20" S, 70° 0' 51,40" O, 3700 m, 21-I-2003, <i>Arroyo 25088.</i>
3	<i>A. angustifolia</i> ssp. <i>angustifolia</i> Herb.	<i>A. angustifolia</i> Herb. var. <i>angustifolia</i>	<i>angustifolia angustifolia</i> Q	CHILE. V Región, San Antonio, El Quisco, sector La Puntilla de Hanga Roa, 33° 24' S, 71° 42' 0,0" O, 50 m, 11-XI-2001, <i>Rougier, D., 17.</i>

Tabla 1.1. Continuación

Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Bayer (1987)	Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Muñoz y Moreira (2003)	Acronimo	Datos de la colecta
4 <i>A. angustifolia</i> ssp. <i>angustifolia</i> Herb.	<i>A. angustifolia</i> Herb. var. <i>angustifolia</i>	<i>angustifolia</i> <i>angustifolia</i> RC	CHILE. Región Metropolitana, Cordillera, Reserva Nacional Río Clarillo, camino a El Rodeo, 33° 42' 23,50" S, 70° 27' 53,30" O, 880 m, 04 XII-2001, <i>Rougier, D., 30.</i>
5 <i>A. angustifolia</i> ssp. <i>velutina</i> Bayer	<i>A. angustifolia</i> var. <i>velutina</i> (Bayer) M. Muñoz	<i>angustifolia velutina</i>	CHILE. IV Región, Choapa, Reserva Nacional Las Chinchillas, 31° 29' 50,20" S, 71° 5' 9,7" O, 580 m, 30-X-2002, <i>Rougier, D., 68.</i>
6 <i>A. aurea</i> Graham	Id.	<i>aurea</i> TC	CHILE. VIII Región, Ñuble, Termas de Chillán, sector Valle Hermoso, 36° 54' S, 71° 24' O, 13-I-2002, <i>Rougier, D., 42.</i>
7 <i>A. aurea</i> Graham	Id.	<i>aurea</i> PN	CHILE. IX Región, Malleco, Parque Nacional Nahuelbuta, 37° 48' 44,0" S, 73° 1' 7,50" O, 1000 m, <i>Rougier, D., 80.</i>
8 <i>A. crispata</i> Phil.	Id.	<i>crispata</i>	CHILE. IV Región, Elqui, Cordillera Doña Ana, 29° 49' 25,83" S, 70° 19' 9,84" O, 2970 m, 19-I-2001, <i>Hershkovitz, M. 01-14.</i>

Tabla 1.1. Continuación

Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Bayer (1987)	Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Muñoz y Moreira (2003)	Acronimo	Datos de la colecta
9 <i>A. diluta</i> ssp. <i>chrysantha</i> Bayer	Id.	<i>diluta chrysantha</i>	CHILE. IV Región, Choapa, Reserva Nacional Las Chinchillas, 31° 30' 2,7" S, 71° 5' 27,80" O, 610 m, 30-X-2002, Rougier, D., 67.
10 <i>A. exerens</i> Meyen	Id.	<i>exerens</i> VN	CHILE. Región Metropolitana, Cordillera, Cordillera, camino entre Farellones y Valle Nevado, 33° 21' 59,7" S, 70° 16' 34,30" O, 2450 m, 21-I-2002, Rougier, D., 48.
11 <i>A. cf. exserens</i>	Id.	cf. <i>exerens</i> PV	CHILE. VII Región, Curicó, Paso Vergara, 6 Km. Antes de la frontera con Argentina, 35° 11' 3,12" S, 70° 30' 11,04" O, 2800 m, 08-I-1999, Hershkovitz, M., 99-580.
12 <i>A. garavatae</i> Bayer	Id.	<i>garavatae</i>	CHILE. V Región, Quillota, Cerro El Roble, 32° 58' 35,20" S, 71° 0' 47,20" O, 2000 m, 08-I-2003, Rougier, D., 75.

Tabla 1.1. Continuación

Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Bayer (1987)	Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Muñoz y Moreira (2003)	Acronimo	Datos de la colecta
13 <i>A. graminea</i> Phil.	Id.	<i>A. graminea</i>	CHILE. II Región, Antofagasta, Quebr. Matancilla, en camino entre Taltal y Paposo, 25° 6' 44,40" S, 70° 27' 20,80" O, 145 m, 28-IX-2000, Rougier, D., 2.
14 <i>A. hookeri</i> ssp. <i>cummingiana</i> (Herb.) Bayer	<i>A. cummingiana</i> Herb.	<i>cummingiana</i>	CHILE. V Región, Petorca, Zapallar, Quebrada El Tigre, 32° 33' 24,0" S, 71° 27' 4,3" O, 100 m, 06-XII-2003, Rougier, D., 86.
15 <i>A. hookeri</i> Lodd. ssp. <i>hookeri</i>	Id.	<i>hookeri hookeri</i>	CHILE. VIII Región, Concepción, camino entre Concepción y Coronel, sector Estadio Italiano, 10-I-2002, Rougier, D., 40.
16 <i>A. hookeri</i> ssp. <i>maculata</i> Bayer	Id.	<i>hookeri maculata</i>	CHILE. IV Región, Choapa, Los Vilos, 7 km al norte de Los Vilos por carretera 5 Norte, 31° 48' 20,1" S 71° 29' 33,60" O, 140 m, 31-X-2002, Rougier, D., 69.

Tabla 1.1. Continuación

Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Bayer (1987)	Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Muñoz y Moreira (2003)	Acronimo	Datos de la colecta
17 <i>A. hookeri</i> ssp. <i>recumbens</i> (Herb.) Bayer	Id.	<i>hookeri recumbens</i>	CHILE. V Región, Valparaíso, Concón, dunas, 32° 56' 31,90" S, 71° 32' 38,6" O, 116 m, 05-XII-2003, Rougier, D., 84.
18 <i>A. kingii</i> Phil.	Id.	<i>kingii</i>	CHILE. III Región, Huasco, norte de Vallenar, 28° 32' 0,48" S, 70° 44' 50,04" O, 380 m, 24-X-2002, Gómez, M., 211.
19 <i>A. cf. leporina</i>	Id.	cf. <i>leporina</i> M	CHILE. IV Región, Elqui, a 67 km. al norte de Marquesa, antes de Viñita Baja, 03-X-2000, Hershkovitz, M., 00-225b.
20 <i>A. leporina</i> Bayer et. Grau	Id.	<i>leporina</i> CP	CHILE. III Región, Huasco, Cuesta Pajonales, 29° 8' 17,7" S, 70° 59' 13,5" O, 1150 m, 25-X-2002, Rougier, D., 66.
21 <i>A. ligtu</i> ssp. <i>incarnata</i> Bayer	Id.	<i>ligtu incarnata</i>	CHILE. VII Región, Curicó, camino a Los Queñes, 35° 1' 27,90" S, 70° 42' 40,90" O, 850 m, 17-X-2002, Humaña, A.M., 41.

Tabla 1.1. Continuación

Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Bayer (1987)	Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Muñoz y Moreira (2003)	Acronimo	Datos de la colecta
22 <i>A. ligtu</i> L. ssp. <i>ligtu</i>	Id.	<i>ligtu ligtu</i>	CHILE. VIII Región, Concepción, Hualpén, 03-I-2002, <i>Rougier, D.</i> , 37.
23 <i>A. ligtu</i> ssp. <i>simsii</i> RC (Sprengel) Bayer	Id.	<i>ligtu simsii</i> RC	CHILE. Región Metropolitana, Cordillera, Reserva Nacional Río Clarillo, sector Las Tinajas, 33° 43' 4,10" S, 70° 28' 27,30" O, 800 m, 04 XII-2001, <i>Rougier, D.</i> , 28.
24 -	<i>A. lutea</i> M. Muñoz	<i>lutea</i>	CHILE. I Región, Iquique, Punta Patache, 20° 49' S, 70° 9' O, 750 m, 20-XI-2001, muestra del mismo sitio que 143005 (SGO).
25 <i>A. magenta</i> Bayer	<i>A. magnifica</i> ssp. <i>magenta</i> (Bayer) M. Muñoz	<i>magenta</i>	CHILE. IV Región, Limari, Parque Nacional Fray Jorge, 16-IX-2001, <i>Rougier, D.</i> , 3.
26 <i>A. magnifica</i> Herb. ssp. <i>magnifica</i>	Id.	<i>magnifica magnifica</i> BA	CHILE. IV Región, Elqui, Cuesta Buenos Aires, 29° 33' 47,10" S, 71° 14' 34,10" O, 350 m, 23-X-2002, <i>Rougier, D.</i> , 59.

Tabla 1.1. Continuación

Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Bayer (1987)	Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Muñoz y Moreira (2003)	Acónimo	Datos de la colecta
27 <i>A. magnifica</i> Herb. ssp. <i>magnifica</i>	Id.	<i>magnifica magnifica</i> TN	CHILE. IV Región, Elqui, Totoralillo Norte, 29° 28' 57,10" S, 71° 18' 50,80" O, 30 m, 23-X-2002, <i>Rougier, D., 58.</i>
28 <i>A. magnifica</i> Herb. ssp. <i>magnifica</i>	<i>A. magnifica</i> var. <i>sierrae</i> (Muñoz) M. Muñoz	<i>magnifica</i> JS	CHILE. IV Región, Elqui, Puente Juan Soldado, 29° 39' 29,60" S, 71° 17' 49,40" O, 190 m, 06-XI-2003, <i>Rougier, D., 82.</i>
29 <i>A. magnifica</i> ssp. <i>maxima</i> (Phil.) Bayer	<i>A. pulchra</i> var. <i>maxima</i> Phil.	<i>magnifica maxima</i>	CHILE. V Región, Petorca, cuesta El Melón, 32° 35' 24,10" S, 71° 14' 18,30" O, 290 m, 29-X-2001, <i>Rougier, D., 13.</i>
30 <i>A. magnifica</i> Herb.	<i>A. magnifica</i> var. <i>tofoensis</i> M. Muñoz	<i>magnifica</i> TN	CHILE. IV Región, Elqui, Totoralillo Norte, 29° 28' 57,10" S, 71° 18' 50,80" O, 30 m, 24-X-2001, <i>Rougier, D., 6.</i>
31 <i>A. pallida</i> Graham	Id.	<i>pallida</i> YL	CHILE. Región Metropolitana, Cordillera, Reserva Nacional Yerba Loca. Sector Quebrada del Lunes, 33° 19' 54,90" S, 70° 19' 22,80" O, 1900 m, 02-I-2003, <i>Rougier, D., 74.</i>

Tabla 1.1. Continuación

Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Bayer (1987)	Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Muñoz y Moreira (2003)	Acónimo	Datos de la colecta
32 <i>A. cf. pallida</i>		<i>cf pallida</i> MP	CHILE. IV Región, Choapa, mina Los Pelambres, 3000 m, 20-XII-2001, <i>Rougier, D.</i> , 36.
33 <i>A. patagonica</i> Phil.	Id.	<i>patagonica</i>	CHILE. XII Región, Última Esperanza, Parque Nacional Torres del Paine, Portería Sarmiento, 51° 1' 27,4" S, 72° 46' 16,70" O, 350 m, 18-XII-2002, <i>Rougier, D.</i> , 72.
34 <i>A. pelegrina</i> L.	Id.	<i>pelegrina</i>	CHILE. IV Región, Choapa, Pichidanguí, playa rocosa, 29-X-2001, <i>Rougier, D.</i> , 10.
35 <i>A. philippii</i> Baker	<i>A. philippii</i> var. <i>albicans</i> M. Muñoz	<i>philippii</i> ID	CHILE. IV Región, Elqui, Isla Damas, roqueríos interiores, 29° 14' S, 71° 31' O, 30 m, 31-VIII-2002, <i>Arancio, G.</i> 14899.
36 <i>A. philippii</i> Baker	<i>A. philippii</i> Baker var. <i>philippii</i>	<i>philippii</i> PL	CHILE. III Región, Huasco, Punta Lobos, en camino entre Huasco y Carrizal Bajo, 0 m, 25-X-2001, <i>Rougier, D.</i> , 7.

Tabla 1.1. Continuación

Taxon de <i>Astroemeria</i> según Bayer (1987)	Taxon de <i>Astroemeria</i> según Muñoz y Moreira (2003)	Acónimo	Datos de la colecta
37 <i>A. philippii</i> Baker	<i>A. philippii</i> Baker var. <i>albicans</i> M. Muñoz	<i>philippii</i> CS	CHILE. III Región, Huasco, camino entre Domeyko y Caleta Sarco, 28° 52' 58,74" S, 71° 24' 14,10" O, 251 m, 30-IX-2002, <i>Herskovitz, M., 02-141.</i>
38 <i>A. polyphylla</i> Phil.	Id.	<i>polyphylla</i>	CHILE. III Región, Huasco, Alto del Carmen, 28° 45' 35,10" S, 70° 29' 7,10" O, 710 m, 24-X-2002, <i>Rougier, D., 63.</i>
39 <i>A. presliana</i> ssp. <i>australis</i> Bayer	Id.	<i>presliana australis</i>	CHILE. IX Región, Malleco, Parque Nacional Nahuelbuta, 37° 49' 33,30" S, 73° 0' 16,10" O, 700 m, 03-II-2003, <i>Rougier, D., 79.</i>
40 <i>A. presliana</i> Herb. ssp. <i>presliana</i>	Id.	<i>presliana presliana</i>	CHILE. VIII Región, Ñuble, Termas de Chillán, sector Valle Hermoso, 13-I-2002, <i>Rougier, D., 45.</i>
41 <i>A. pseudospathulata</i> Bayer	Id.	<i>pseudospathulata</i>	CHILE. VII Región, Talca, Cerro El Peine, 1870 m, 06-II-2003, <i>Rougier, D., 81.</i>

Tabla 1.1. Continuación

Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Bayer (1987)	Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Muñoz y Moreira (2003)	Acronimo	Datos de la colecta
42 <i>A. pulchra</i> Sims ssp <i>pulchra</i>	Id.	<i>pulchra pulchra</i>	CHILE. Región Metropolitana, Melipilla, Cuesta Lo Prado, 33° 28' 58,20" S, 70° 56' 23,60" O, 490 m, 13-XI-2001, <i>Rougier, D., 19.</i>
43 <i>A. revoluta</i> R. et Pav.	Id.	<i>revoluta</i>	CHILE. Región Metropolitana, Cordillera, camino a Farellones, curva 9, 33° 20' 32,6" S, 70° 21' 29,8" O, 1420 m, 21-I-2002, <i>Rougier, D., 47.</i>
44 <i>A. schizanthoides</i> Grau	<i>A. schizanthoides</i> Grau var. <i>schizanthoides</i>		CHILE. III Región, Huasco, Embalse Santa Juana, 01-X-2000, <i>Hershkovitz, M., 00-165.</i>
45 <i>A. schizanthoides</i> Grau	<i>A. schizanthoides</i> Grau var. <i>schizanthoides</i>	<i>schizanthoides</i> SJ	CHILE. III Región., Huasco, Embalse Santa Juana, 28° 40' 10" S, 70° 38' 2,6" O, 580 m, 23-X-2002, <i>Rougier, D., 62.</i>
46 <i>A. schizanthoides</i> Grau	<i>A. schizanthoides</i> Grau var. <i>schizanthoides</i>	cf. <i>schizanthoides</i> V	CHILE. IV Región, Elqui, camino entre Almendrillo y Vicuña, 29° 59' 4,40" S, 70° 53' 30,20" O, 28-IX-2002, <i>Humaña, A.M., 17.</i>

Tabla 1.1. Continuación

Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Bayer (1987)	Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Muñoz y Moreira (2003)	Acronimo	Datos de la colecta
47 <i>A. cf. schizanthoides</i>	Id.	<i>cf. schizanthoides</i> MO	CHILE. III Región, Huasco, Camino a Los Morteros, a 30 km. Saliendo desde Vallenar, 28° 34' 55,14" S, 70° 29' 16,56" O, 1722 m, 27-IX-2002, <i>Hershkovitz, M., 02-90.</i>
48 <i>A. spathulata</i> Presl	Id.	<i>spathulata</i>	CHILE. V Región, Los Andes, camino a Portillo, 32° 51' 43,0" S, 70° 9' 7,30" O, 2250 m, 28-I-2003, <i>Rougier, D., 76.</i>
49 <i>A. umbellata</i> Meyen	Id.	<i>umbellata</i> VN	CHILE. Región Metropolitana, Cordillera, camino a Valle Nevado, curva 4, 33° 21' 22,30" S, 70° 15' 25,80" O, 2830 m, <i>Rougier, D., 50.</i>
50 <i>A. umbellata</i> Meyen	Id.	<i>umbellata</i> EY	CHILE. Región Metropolitana, Cordillera, Embalse El Yeso, 07-II-2002, <i>Rougier, D., 53.</i>
51 <i>A. umbellata</i> Meyen	Id.	<i>umbellata</i> P	CHILE. V Región, Los Andes, camino a Portillo, 32° 51' 43,0" S, 70° 9' 7,30" O, 2250 m, 28-I-2003, <i>Rougier, D., 77.</i>

Tabla 1.1. Continuación

Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Bayer (1987)	Taxon de <i>Alstroemeria</i> según Muñoz y Moreira (2003)	Acónimo	Datos de la colecta
52 <i>A. versicolor</i> R. et Pav.	Id.	<i>versicolor</i>	CHILE. Región Metropolitana, Cordillera, Reserva Nacional Río Clarillo, sector Las Tinajas, 33° 43' 4,10" S, 70° 28' 27,30" O, 800 m, 13-XII-2002, <i>Rougier, D., 71.</i>
53 <i>A. paupercula</i> Phil.	<i>A. violacea</i> Phil.	<i>violacea</i>	CHILE. II Región, Antofagasta, Papos, 25° 0' 38,50" S, 70° 26' 34,90" O, 455 m, 27-IX-2000, <i>Rougier, D., 1.</i>
54 <i>A. werdermannii</i> Bayer	<i>A. werdermannii</i> var. <i>flavicans</i> M. Muñoz	<i>werdermannii</i> PC	CHILE. III Región, Huasco, Playa Carrizalillo, 29° 6' 39,90" S, 71° 28' 0,20" O, 5 m, 25-X-2002, <i>Rougier, D., 64.</i>
55 <i>A. werdermannii</i> Bayer	<i>A. werdermannii</i> Bayer var. <i>werdermannii</i>	<i>werdermannii</i> LC	CHILE. III Región, Huasco, Parque Nacional Llanos de Challe, camino entre Huasco y Carrizal bajo, 26-X-2001, <i>Rougier, D., 9.</i>
56 <i>A. zoellneri</i> Bayer	Id.	<i>zoellneri</i>	CHILE. V Región, Quillota, Parque Nacional La Campana, sector Granizo, bosque de robles, 32° 57' 10,9" S, 71° 7' 10,9" O, 71° 7' 18,60" O, 1250 m, 29-XI-2001, <i>Rougier, D., 24.</i>

Tabla 1.1. Continuación

Grupo externo	Acrónimo	Datos de la colecta
<i>Bomarea salsilla</i> (L.) Mirb.	<i>B. salsilla</i>	CHILE. VIII Región, Concepción, Hualpén, 03-I-2002, <i>Rougier, D.</i> , 38.
<i>Leontochir ovallei</i> Phil.	<i>L. ovallei</i>	CHILE. III Región, Huasco, norte de Vallenar, 28° 08' 12,6" S, 71° 4' 55,56" O, 92 m, 25-X-2002, <i>Gómez, M.</i> , 235.

Figura 1.1. Sitios de colecta de los taxa chilenos de *Alstroemeria* incluidos en el presente estudio. . Los números corresponden a los taxa identificados en la Tabla 1.1.

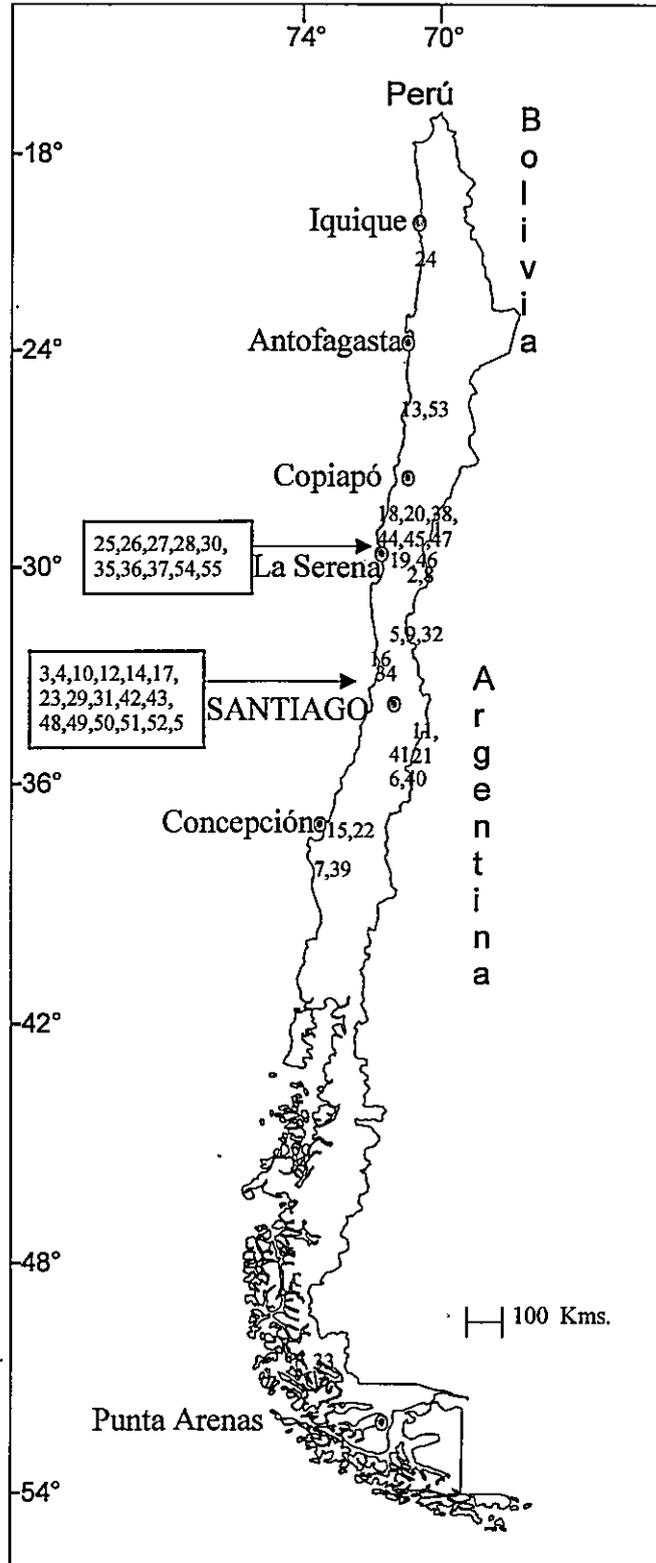
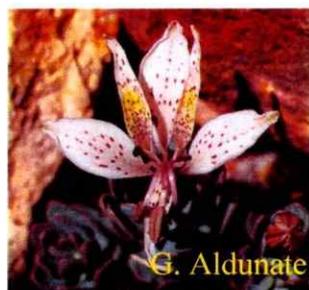


Figura 1.2. Especies de *Alstroemeria* según Muñoz y Moreira (2003) incluidas en el presente estudio. Los números corresponden a los indicados en la Tabla 1.1



1. *A. andina andina*



2. *A. andina venustula*



3. *A. angustifolia angustifolia*



4. *A. angustifolia angustifolia*



5. *A. angustifolia velutina*



6. *A. aurea*



7. *A. aurea*



8. *A. crispata*



9. *A. diluta chrysantha*



10. *A. exerens*



12. *A. garaventae*



13. *A. graminea*



14. *A. cummingiana*



15. *A. hookeri hookeri*



16. *A. hookeri maculata*



17. *A. hookeri recumbens*

Figura 1.2. Continuación

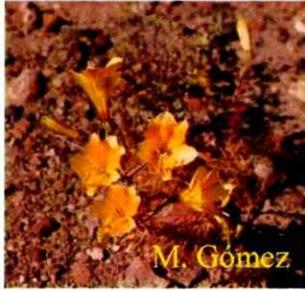
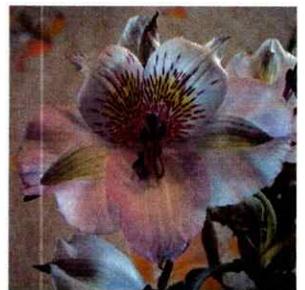
18. *A. kingii*20. *A. leporina*21. *A. ligtu incarnata*22. *A. ligtu ligtu*23. *A. ligtu simsii*24. *A. lutea*25. *A. magnifica magenta*27. *A. magnifica magnifica*28. *A. magnifica sierrae*29. *A. pulchra maxima*30. *A. magnifica tofoensis*31. *A. pallida*32. *A. cf. pallida*33. *A. patagonica*34. *A. pelegrina*35. *A. philippii albicans*

Figura 1.2. Continuación

36. *A. philippii philippii*38. *A. polyphylla*39. *A. presliana australis*40. *A. presliana presliana*41. *A. pseudospathulata*42. *A. pulchra pulchra*43. *A. revoluta*45. *A. schizanthoides schizanthoides*48. *A. spathulata*49. *A. umbellata*52. *A. versicolor*53. *A. violacea*54. *A. werdermannii flavicans*55. *A. werdermannii werdermannii*56. *A. zoellneri*

género *Alstroemeria*, sin embargo, no fue posible la extracción de su ADN, probablemente debido a la edad de las muestras de herbario

### III. EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIACIÓN DE ADN

Para la extracción del ADN genómico, el tejido fue homogenizado con la ayuda de una mini bagueta en un ambiente de baja temperatura proporcionado por nitrógeno líquido. Para la extracción del ADN se utilizó el DNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones: después de agregar el buffer AP2 se centrifugó 30 min a 30000 rcf y luego se agregó el buffer AP3/E.

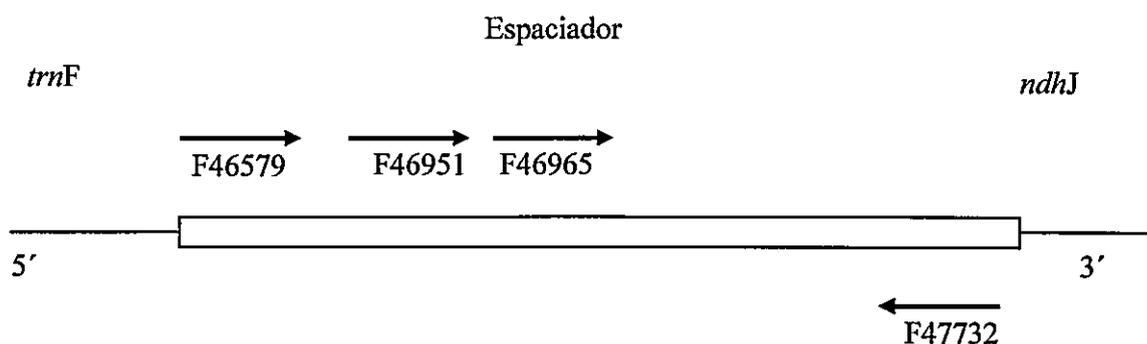
La región utilizada como marcador molecular es una zona del ADN de cloroplasto ubicada entre el gen *trnF*, que codifica para el ARN de transferencia correspondiente al aminoácido fenilalanina y el gen *ndhJ*, que codifica para la subunidad de 30kD de la NADH-deshidrogenasa, llamada región espaciadora *trnF-ndhJ*. La técnica usada para amplificar dicho fragmento fue PCR ("polimerasa chain reaction"), de acuerdo a la metodología de Hershkovitz y Zimmer (1987), siguiéndose dos estrategias para obtener los fragmentos de la región espaciadora *trnF-ndhJ*:

1. Se usaron los partidores 46951F (5'-GYTGGTAGAGCAGAGGACTG-3') y 47732R (5'-TGGATAGGATGGCCCTTAC-3') para obtener fragmentos de ADN de doble hebra e inmediatamente, se llevó a cabo una amplificación para obtener fragmentos de

ADN de PCR de una hebra, usando los partidores 46965F (5'-GGACTGAAAATCCTCGTGTC-3') y 47732R (Fig. 1.3).

2. Se llevaron a cabo dos amplificaciones sucesivas que originan ADN de doble hebra. La primera usó los partidores 46579F (5'-GGTTC AAGTCCCTCTATCCC-3') and 47732R y la segunda usó los partidores 46951F (5'-GYTGGTAGAGCAGAGGACTG-3') y 47732R (Fig. 1.3).

Figura 1.3. Posiciones relativas de los partidores usados en este estudio. Los partidores se muestran como flechas apuntando en la dirección de polimerización que ellos llevan a cabo.



Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf (Modelo 5331, Mastercycler Gradient). Las condiciones de PCR para el segmento de doble hebra cpADN *trnF-ndhJ* fueron las siguientes: una denaturación inicial a 97 °C

por 45 s seguida por 2 ciclos de denaturación a 96 °C por 30 s, apareamiento a 52 °C por 30 s y elongación a 72°C por 2 min; 2 ciclos de denaturación a 96 °C por 30 s, apareamiento a 50 °C por 30 s y elongación a 72 °C por 2 min; 26 ciclos de denaturación a 96 °C por 30 s, apareamiento a 48 °C por 30 s y elongación a 72 °C por 2 min; un paso de elongación final a 72 °C por 7 min seguidos por 4 °C indefinidos. Las condiciones de PCR para el segmento de hebra simple fueron las siguientes: denaturación inicial a 97 °C por 45 s, seguida por 21 ciclos de denaturación a 94 °C por 1 min, apareamiento a 48 °C por 1 min y una elongación a 72 °C por 2 min. En todas las reacciones de PCR se utilizaron una rampa de 1,5 °C/s.

Las reacciones se llevaron a cabo usando 5 unidades de Taq polimerasa (Fermenta y Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA) en reacciones de 20 o 50 µL con una concentración final de buffer 1x PCR, 1 mM/L MgCl<sub>2</sub>, 1 µM/L de cada partidor, 1 µM/L de dNTPs y 8% v:v DMSO. La mezcla de reacción incluyó 10-20 ng de ADN total.

Los productos de PCR de doble hebra se sometieron a electroforesis en gel al 1% de agarosa y los de hebra simple al 2% de agarosa, en 0,5X de buffer TBE, usando bromuro de etidio y luz ultravioleta. Se determinó el tamaño del fragmento obtenido usando el estándar ΦX174 BsuRI (Fermentas) a una concentración de 10 ng/µL. Se corrieron controles negativos para detectar contaminación. En cualquiera de las estrategias descritas anteriormente, en la segunda amplificación se usaron dos controles

negativos, uno con agua y el otro con el control negativo de la reacción de doble hebra. Los productos de PCR se limpiaron usando precipitación con 20% PEG 8000 (polietilenglicol, Sigma)/2,5 M NaCl y lavado con etanol.

Los partidores de secuencia utilizados fueron los mismos que los partidores de amplificación más internos, es decir, el F46965 y R47732. Las condiciones de PCR para la reacción de secuencia fueron las siguientes: una denaturación inicial a 96 °C por 30 s, seguida por 35 ciclos de denaturación a 96 °C por 10 s, apareamiento a 50 °C por 10 s y elongación a 60 °C por 4 min; seguidos por 4 °C indefinidos. Los productos de PCR se secuenciaron usando el ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit (Perkin-Elmer Applied Biosystems Foster City, CA, USA), usando 10 ng de ADN. Los productos de secuencia se precipitaron con etanol y acetato de sodio para remover el exceso de "dye terminator" antes de ser secuenciados en un Secuenciador de ADN ABI Prism 3100, de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. La mayoría de los taxa fueron secuenciados en ambas direcciones.

La secuenciación del espaciador de los genes *trnF-ndhJ* fue el tercer intento de obtener un marcador molecular para la construcción de la hipótesis filogenética. Primero se probó con los genes ITS (secuencia del transcrito interno) de los genes ribosomales nucleares, los que revelaron un alto polimorfismo intragenómico y, en segundo lugar, se probó con el gen *waxy* que codifica para la hidrólisis de amilopectina a amilosa, no lográndose su amplificación.

#### IV. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

La matriz de datos consistió en 56 secuencias correspondientes al grupo interno y 2 secuencias al grupo externo (Tabla 1.1). La edición de las secuencias de ADN, en ambas direcciones, se llevó a cabo en el programa Sequencer™ (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, USA). Las secuencias se alinearon, en primer término, usando la opción de ensamblaje en el programa Sequencer y en segundo término, manualmente usando el Programa BioEdit ver. 4.8.10 (Hall, 1999). Se excluyeron regiones al principio y al final de las secuencias para realizar una alineación más exacta.

Se llevó a cabo el análisis de máxima parsimonia en 58 secuencias usando el programa PAUP v.4.0 (Swofford, 2000). Se llevó a cabo una búsqueda heurística con adición de secuencias al azar con 100 réplicas y la reorganización de las ramas con la opción de disección/reconexión ("TBR branch swapping"). Todos los estados de los caracteres se consideraron como no ordenados e igualmente ponderados. Se agregó un conjunto adicional de caracteres a la matriz de datos para indicar la presencia o ausencia de inserciones o deleciones ("indels") informativas, con un máximo de 4 alternativas (modificado de Simmonds & Ochoterena, 2000). Estos caracteres adicionales también fueron igualmente ponderados. Los "gap" se trataron como datos perdidos. Se obtuvieron los árboles más parsimoniosos. Se calcularon las medidas estándares de homoplasia [Índice de Consistencia (CI) e Índice de Retención (RI)]. Se determinó el soporte para las ramas individuales con bootstrap. El análisis incluyó 500 réplicas. Se realizó una búsqueda heurística y la reorganización de las ramas con la opción de

disección/reconexión (“TBR branch swapping”) limitándose el número de árboles a 100 árboles por réplica y reteniendo 10 árboles en cada paso.

## RESULTADOS

### I. DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA Y DEL ALINEAMIENTO

Las secuencias alineadas de nucleótidos de 58 secuencias para la región espaciadora de los genes *trnF-ndhJ* correspondió a un total de 776 caracteres. La recodificación de inserciones y deleciones potencialmente informativas ("indels") produjo otros 15 caracteres, teniendo un total de 791 caracteres en la matriz de datos para cada taxon, de los cuales 72 corresponden a sitios variables y 51 a sitios informativos para parsimonia.

Dentro del grupo interno, la región espaciadora *trnF-ndhJ* va desde 484 pb en *A. crispata*, especie que presenta una gran deleción de aproximadamente 225 pb., hasta 726 pb en *A. magenta*. La longitud de la región espaciadora *trnF-ndhJ* entre el grupo externo varía desde 718 pb en *B. salsilla* hasta 731 pb en *L. ovallei*. Dentro del grupo interno, la comparación entre pares de secuencias del porcentaje de divergencia de la región espaciadora *trnF-ndhJ* varió desde 0 a 34,7% con un promedio de 3,61%.

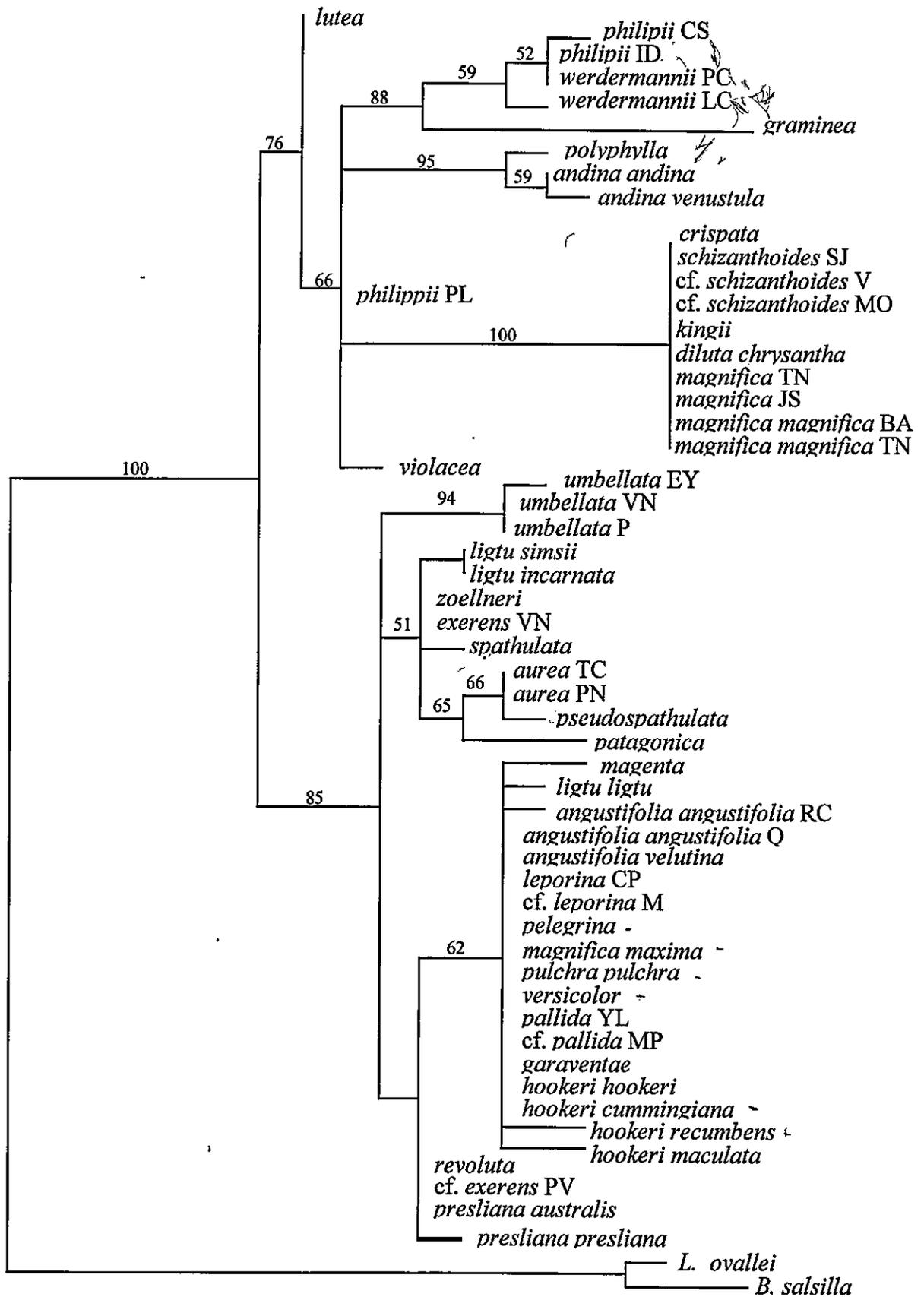
### II. ANÁLISIS DE MÁXIMA PARSIMONIA

El análisis de 51 caracteres informativos en los taxa dio como resultado 480 árboles más parsimoniosos, de 86 pasos cada uno, uno de los cuales se muestra en la Fig. 1.4.

Poseen un índice de consistencia de 0,91 (0,88 excluidos los caracteres no informativos) y un índice de retención de 0,97.

Los datos apoyan la división de las especies chilenas de *Alstroemeria* en dos clados (Fig. 1.4). Un clado está constituido por especies distribuidas desde los 32° S hacia el norte y otro, por especies distribuidas desde los 29° S hacia el sur con una superposición de 16 taxa según la clasificación y distribución de Moñoz y Moreira (2003). Ambos clados presentan un buen apoyo.

Figura 1.4. Filograma de uno de los 480 árboles más parsimoniosos resultantes del análisis de máxima parsimonia de las secuencias del espaciador *trnF-ndhJ*. Los árboles tienen 86 pasos y un índice de consistencia (CI) de 0,91 (0,88 excluyendo a los caracteres no informativos) y un índice de retención (RI) de 0,97. El número sobre las ramas es el valor de bootstrap mayor que 50% para 500 réplicas.



El primer clado, que se denominará clado norte, contiene 3 subclados (Fig. 1.4). El primero contiene especies ubicadas en la costa de la II Región tal como *A. graminea*, la única especie anual del género, y especies localizadas también en la costa, de la III Región, en una región limitada a 4 grados de latitud. La partición que incluye a *A. werdermannii* y *A. philippii*, queda definida por una delección y una sustitución y, aunque presenta un bajo apoyo, muestra una separación entre las poblaciones de *A. philippii* CS y *A. philippii* ID, esta última ubicada en una isla (Isla Damas, frente a la costa de la IV Región), y entre *A. werdermannii* PC y *A. werdermannii* LC. Las poblaciones de *A. philippii* ID y *A. werdermannii* PC poseen la misma secuencia. En el caso de *A. philippii*, existe una tercera población ubicada más al norte que las otras (*A. philippii* PL) que se separa claramente de las otras dos secuenciadas en este estudio. Un subclado muy bien sustentado es el que incluye a *A. polyphylla* y *A. andina* con sus dos subespecies: *A. andina* ssp. *andina* y *A. andina* ssp. *venustula*. Esta partición queda definida por la presencia de dos sustituciones y una inserción de 5 pb. *A. polyphylla* es una especie endémica de la precordillera de Los Andes y las subespecies de *A. andina* son taxa andinos de la III Región, siendo *A. andina* ssp. *venustula* compartida con Argentina. Su separación tiene un débil apoyo y está definido por una sustitución. Dos especies, *A. lutea*, la especie de más al norte en Chile y *A. violacea*, localizada en la II Región aparecen levemente diferenciadas del resto. Finalmente, existe un subclado con buen apoyo, pero con mala resolución dentro de él, definido por seis sustituciones, que incluye varias especies localizadas al sur de la III y en la IV Regiones, con una distribución este-oeste. Los 10 taxa incluidos en esta partición, más un clon de *A. schizanthoides* (dato no mostrado Tabla 1.1, N° 44) presentan secuencias idénticas,

generándose una politomía. *A. crispata* presenta una gran delección, que abarca desde la posición 112 a la 361 de la alineación.

El segundo clado, que se llamará clado centro-sur, presenta un buen apoyo y contiene tres subclados (Fig. 1.4). El primer subclado contiene tres poblaciones de *A. umbellata*, y está definido por una delección de 4 pb y una sustitución. Las tres poblaciones están localizadas equidistantes una de la otra en la zona central del país, específicamente en la zona andina, diferenciándose *A. umbellata* EY por una sustitución de 1 pb. El segundo subclado contiene especies andinas tales como *A. exerens* VN, *A. spathulata* y *A. pseudospathulata*, especies de altura de la Cordillera de la Costa tal como *A. zoellneri*, una especie de la Patagonia tal como *A. patagonica* y taxa precordilleranos o del valle central tal como *A. aurea* y *A. ligtu* ssp. *simsii* y *A. ligtu* ssp. *incarnata*. Este grupo incluye a las especies con la distribución más austral, *A. patagonica*, localizada en el extremo austral de Chile y *A. aurea* que alcanza hasta la región templada, al sur de los 38° S. El tercer subclado incluye una amplia variedad de especies con una distribución mediterránea y templada y otras, con una distribución semidesértica. Este grupo incluye tanto especies de la costa, como por ejemplo, *A. pelegrina*, *A. hookeri* ssp. *recumbens* y *A. hookeri* ssp. *cummingiana* como una especie andina, *A. pallida* VN.

## DISCUSIÓN

Este análisis de la región espaciadora de cloroplasto *trnf-ndhJ* es el primer análisis que incluye la mayoría (97%) de las especies chilenas de *Alstroemeria* (Bayer, 1987). Este estudio mostró que el espaciador *trnF-ndhJ* del cloroplasto es una fuente útil de caracteres para evaluar las relaciones filogenéticas en *Alstroemeria* aunque desafortunadamente no es suficientemente variable para resolver cabalmente todas las relaciones filogenéticas entre las especies. El resultado más destacable del estudio filogenético es el fuerte apoyo para la separación de las especies chilenas en dos grandes clados (Fig. 1.4) correspondientes con la distribución geográfica del género en Chile. Si bien los estudios filogenéticos con géneros endémicos o que incluyan un número importante de especies en Chile son escasos, se han encontrado correspondencias entre filogenia y distribución geográfica muy fuertes en *Malesherbia* (Gengler-Nowak, 2002) y en *Schizanthus* (Pérez et al., en preparación) y en algunos clados en *Tropaeolum* (Hershkovitz et al., 2005).

Dentro del clado norte, uno de los subclados con mejor apoyo es el que incluye a *A. graminea* and *A. werdermannii* como especies hermanas (Figs. 1.1 y 1.4), resultado que es consistente con el de Aagesen & Sanso (2003). *A. graminea* se encuentra en la zona del extremo más seco de la zona de lluvias de invierno, específicamente en la costa,

donde la sobrevivencia de las plantas depende de la humedad aportada por la neblina costera. Este escenario de condiciones poco predecibles parece haber favorecido la evolución de la forma de vida anual con lo que se logra un período vegetativo más corto y una aceleración de proceso de floración. La otra especie en este clado, *A. werdermannii*, distribuida un poco más al sur, probablemente depende de eventos El Niño, que proveen de abundante lluvia aproximadamente cada 5 años, lo que sumado a la presencia de raíces tuberosas, le permiten persistir en el tiempo. En 1998, Bayer segregó a *A. graminea* a un nuevo género, *Taltalia* (Bayer, 1998), debido a su hábito anual y a la falta de raíces almacenadoras. Sin embargo, nuestro trabajo, en forma similar al de Aagesen & Sanso (2003) muestra a *A. graminea* dentro de particiones junto a otras especies de *Alstroemeria*, entregando evidencia para retenerla dentro del género. Si se elevara a *A. graminea* al nivel de género (*Taltalia*) esto transformaría a *Alstroemeria* en un género parafilético (Fig. 1.4). El segundo clado con gran apoyo en este grupo es el de *A. andina* con sus dos subespecies y *A. polyphylla*, especies andinas o precordilleranas, respectivamente.

El marcador molecular usado en este trabajo posee un poder para segregar taxa cercanos que es variable. En algunos casos, permite la separación de poblaciones de la misma especie (*A. umbellata*), o de algunas subespecies y variedades, e.g. *A. ligtu*, *A. presliana*, *A. werdermannii* y *A. andina*. Sin embargo, en otros, es incapaz de segregar en particiones distintas a especies diferentes. Es el caso de *A. philippii* ID y *A. werdermannii* PC y de muchas especies contenidas en la politomía del clado norte como por ejemplo, *A. schizanthoides*, *A. kingii* y *A. diluta* ssp. *chrysantha*, que presentan una

morfología floral muy diferente. Sin embargo, también existen ejemplos donde la cercanía filogenética se asocia con una cercanía en cuanto a la morfología floral. Ejemplos de esta situación son *A. spathulata* y *A. pseudospathulata* (Garaventa, 1971), y *A. ligtu* ssp. *simsii* y *A. aurea* (Garaventa, 1971). Una situación similar presentan *A. umbellata* y *A. spathulata* (Garaventa, 1971), las que no pueden ser reconocidas en su estado vegetativo. Similitudes también presentan *A. polyphylla* y *A. andina* ssp. *venustula* como fue destacado por Garaventa (1971) y Bayer (1987), en que la primera podría ser una forma gigante de la segunda y, en último término, *A. angustifolia* y *A. hookeri* mencionadas por Bayer (1987) quien discute que serían un complejo de especies. Finalmente, existen similitudes morfológicas, mencionadas por algunos taxónomos, que no se ven reflejadas en la filogenia. Es el caso de *A. crispata* y *A. patagonica* (Garaventa, 1971) y, *A. magenta* y *A. magnifica* (Bayer, 1987). Grau y Bayer (1982) sugirieron que *A. leporina* podía ser una especie cercana a *A. schizanthoides* y a *A. crispata*, sin embargo, nuestros resultados segregan a la primera al clado sur-mediterráneo y a las otras dos al clado norte. De lo anterior se deduce que los cambios morfológicos sólo a veces se acompañan de cambios en la secuencia de ADN, lo que sería congruente con la ausencia de relación entre la tasa de evolución de caracteres moleculares y morfológicos, documentada en varias filogenias (Bromham et al., 2002).

Existen numerosas clasificaciones taxonómicas que se han reevaluado a la luz de hipótesis filogenéticas, basadas en datos moleculares, generadas con posterioridad (e.g. Swensen y col., 1998; Savolainen y col., 2000; Patterson & Givnish, 2002; Kimball y

col., 2003). Estos estudios se basan en la combinación de al menos dos o tres marcadores moleculares y en aquellos casos de clasificaciones de especies del mismo género, el estudio abarca varias poblaciones de la misma. El presente estudio, si bien puede entregar ciertas sugerencias respecto de la clasificación de *Alstroemeria*, no permite clarificar de manera cierta los problemas de clasificación existentes dentro del género. En primer lugar, se utilizó sólo un marcador y la situación ideal sería contar con un análisis combinado de dos o más de ellos que refleje un patrón más consistente. En segundo lugar, existe inconsistencia del marcador utilizado para separar especies que son reconocidas como diferentes (dada su evidente diferenciación a nivel floral). Finalmente, el escaso número de poblaciones utilizadas por especie, sumado al bajo número de cambios detectados en las secuencias ADN, no permite asegurar que dicho cambio corresponda a un patrón general y no a una mutación local.

Tomando en consideración lo anterior, el presente trabajo permite sólo hacer una sugerencia sobre las nuevas especies, subespecies y variedades que se han descrito desde la revisión taxonómica de Bayer (1987). Nuestros resultados apoyarían la creación de la nueva especie *A. lutea* (Muñoz, 2000) y nuevas variedades para *A. werdermannii*, *A. werdermannii* var. *werdermannii* y var. *flavicans* (Muñoz & Moreira, 2003). El cambio de *A. magnifica* ssp. *maxima* a *A. pulchra* var. *maxima*, propuesto por Muñoz & Moreira (2003) queda apoyado menos débilmente por cuanto este taxon aparece incluido en el mismo clado que *A. pulchra* ssp. *pulchra* y no en el que incluye a *A. magnifica*. La dificultad de los taxónomos para delimitar las especies *A. magnifica*/*A. magenta*, ha llevado a que se hayan descrito como especies diferentes (Bayer, 1987) o como

variedades dentro de la misma especie (Muñoz y Moreira, 2003). La inclusión de *A. magnifica* en el clado norte y *A. magenta* en el clado mediterráneo apoya su separación, en forma similar al caso anterior. Sin embargo, la delimitación dentro de *A. magnifica* parece menos clara. El reconocimiento de variedades tales como *A. magnifica* var. *tofoensis* (*A. magnifica* TN en la Fig. 1.4) y *A. magnifica* var. *sierrae* (*A. magnifica* JS en la Fig. 1.4) no aparece reflejada por el marcador utilizado en la construcción de la hipótesis filogenética.

El análisis filogenético de las secuencias del espaciador *trnF-ndhJ* muestra algunas relaciones que son congruentes con la filogenia basada en datos morfológicos y moleculares desarrollada por Aagesen & Sanso (2003), por ejemplo, la estrecha relación dentro del clado centro-sur entre *A. angustifolia*, *A. hookeri*, *A. pallida*, *A. versicolor* y dentro del clado norte, entre *A. graminea* y *A. werdermannii* (Fig. 1.4). La inclusión de pocas especies distribuidas en Chile en la filogenia de esas autoras, como así también la baja resolución dentro de algunos clados impide hallar más similitudes o desacuerdos entre ambas hipótesis filogenéticas. Han et al. (2000) en un análisis de AFLP encontraron que *A. aurea* estaba ubicada entre tres subgrupos diferenciados por ese análisis y esta situación, junto con su amplia distribución geográfica les hizo sugerir que esta especie podía ser el ancestro de otras especies chilenas o incluso de especies brasileras, debido a su ubicación en el lado oriental de Los Andes, en Argentina. Sin embargo, en nuestro trabajo, la posición de *A. aurea* es terminal dentro del clado no apoyando la misma afirmación (Fig. 1.4). De modo similar, el mismo trabajo (Han et al., 2000) muestra la estrecha relación genética entre *A. andina* y *A. angustifolia* ssp.

*angustifolia*, sin embargo, en nuestro trabajo ambas especies quedan incluidas en clados diferentes.

La baja resolución de la filogenia en los nodos cercanos a los extremos que impide la separación entre las especies podría deberse a diversos motivos, cuyo análisis va más allá del objetivo del presente estudio. Sin embargo, pueden mencionarse al menos dos aspectos. Algunos autores mencionan la ocurrencia de hibridización interespecífica en *Alstroemeria* (Hannibal, 1941; Stinson, 1942; Traub, 1943; Tsuchiya et al., 1987; pero ver Foster, 1952). Sin embargo, otros autores sostienen que ésta es limitada debido a barreras postfertilización que provocan el aborto de embriones (de Jeu & Garriga-Caldere, 1997). La obtención de híbridos se ha hecho por técnicas de rescate de embriones o cultivo de óvulos (Kristiansen et al., 1995; Buitendijk et al., 1995; de Jeu & Jacobsen, 1995; Ishikawa et al., 1997; Ishikawa et al., 2001). Estas evidencias sugieren que la hibridización no sería un factor frecuente en el ambiente natural y, por ello, sería poco importante en la evolución de *Alstroemeria*, a diferencia de lo que ocurriría en *Portulacaceae* (Hershkovitz, 2005) y en *Tropaeolum* (Hershkovitz et al., 2005). Otra posible causa de las politomías sería la separación reciente entre las especies la que impediría una suficiente divergencia para ser detectada por el marcador empleado. En otros grupos se ha encontrado que los genes no codificantes de cloroplasto como por ejemplo, *rps16* y *trnL-F*, presentan poca variación para resolver filogenias a un nivel infragenérico, al menos en grupos con divergencia reciente (Small et al., 1998). La presencia de politomías en los clados norte y sur sugiere que este proceso podría estar ocurriendo en todo el país. Futuros estudios que permitan discriminar entre éstos y otros

factores posibilitarán dar una explicación más robusta a la existencia de baja resolución en la hipótesis filogenética de este género.

## **CAPÍTULO 2. RAZÓN POLEN-ÓVULO Y SISTEMA REPRODUCTIVO EN EL GÉNERO *ALSTROEMERIA* EN CHILE**

### **INTRODUCCIÓN**

Las angiospermas poseen una amplia gama de modalidades reproductivas que van desde la reproducción asexual, sin la participación de gametos, hasta la sexual. Dentro de los mecanismos de reproducción asexual se incluyen la reproducción vegetativa y la agamosperma, es decir, la producción de semillas sin fusión de gametos (Richards, 1997). El espectro de la reproducción sexual abarca desde la fertilización que involucra óvulos y granos de polen provenientes de individuos genéticamente diferentes (exogamia) hasta la fertilización que ocurre dentro de un individuo genético ("genet") y puede producirse tanto en el caso que el polen provenga de la misma flor (autogamia) como de otra flor del mismo individuo (geitonogamia) [Richards, 1997].

El sistema reproductivo de las plantas se ha evaluado a través de diversos métodos (Kearns & Inouye, 1993). Estos incluyen análisis de morfología floral (Arroyo, 1973; Ornduff, 1969) y cruzamientos controlados (Ruiz & Arroyo, 1978; Sobrevila & Arroyo, 1982; Bawa y col., 1985; Arroyo & Squeo, 1990; Arroyo & Uslar, 1993). Estos

últimos han permitido evaluar el grado de autoincompatibilidad genética, índices de autogamia y de autofertilidad tanto a nivel interpoblacional (Gugerli, 1998) como comunitario (Ruiz & Arroyo, 1978; Sobrevila & Arroyo, 1982; Bawa y col., 1985; Arroyo & Squeo, 1990; Arroyo & Uslar, 1993). En las últimas décadas se han desarrollado técnicas basadas en marcadores genéticos, tales como las aloenzimas o microsatélites los que permiten evaluar la tasa de fertilización cruzada en poblaciones naturales (Schoen, 1982; Kearns & Inouye, 1993; Stewart y col., 1996; Alves y col., 2003). Estos métodos dan cuenta del sistema de reproducción con mayor precisión, sobre todo en las especies autocompatibles donde existe una amplia posibilidad de situaciones.

Dada la dificultad de obtener datos de autoincompatibilidad y tasa de fertilización en estudios que involucran un gran número de especies, se han buscado indicadores del sistema de reproducción. Uno de ellos es la razón polen-óvulo (P/O) que consiste en la relación entre el número de granos de polen y el número de óvulos producidos en una flor. Según Cruden (1977) esta razón reflejaría la eficiencia con que el estigma captura el polen para la fertilización de óvulos. Mientras mayor sea la eficiencia de la transferencia de polen menor sería la razón P/O (Cruden, 1977). Bajo la teoría de la asignación sexual, la razón polen-óvulo refleja la distribución relativa de recursos destinados a las funciones femenina o masculina, es decir, tanto el polen como las semillas serían formas de obtener adecuación biológica (Charnov, 1982). Ambas visiones se complementan pues, en especies con polinización ineficiente, un incremento

en la adecuación biológica masculina requiere mayor cantidad de polen que en una especie con un sistema de polinización más eficiente (Mione & Anderson, 1992).

En su trabajo clásico, Cruden (1977) analizó 85 especies de angiospermas derivadas de 60 géneros y 29 familias, llegando a la conclusión que la razón P/O es menor en especies autógamas que en exógamas. Estableció categorías del sistema de reproducción que iban desde la cleistogamia y autogamia obligada hasta la xenogamia con rangos correspondientes de razón polen-óvulo (P/O). Otros autores han comprobado asociaciones positivas entre la razón P/O y grado de exogamia tanto poblaciones de la misma especie (Schoen, 1977; Vasek & Weng, 1988; Wyatt, 1984b) entre especies del mismo género (Spira, 1980; Short, 1981; Philbrick & Anderson, 1987; Vasek & Weng, 1988; Ritland & Ritland, 1989; Mione & Anderson, 1992; Sharma y col., 1992) Gallardo y col., 1994), entre especies no relacionadas taxonómicamente (Cruden, 1977) como a niveles taxonómicos superiores (Preston, 1986; Jürgens y col. 2002).

Las hipótesis propuestas en esta tesis, tanto la que afirma la existencia de una correlación evolutiva entre sistema de reproducción y caracteres florales como la referida a la direccionalidad del cambio evolutivo, requieren del conocimiento del sistema reproductivo de las especies de *Alstroemeria*. Como ya se ha descrito, las especies están distribuidas a lo largo de Chile y frecuentemente con períodos de floración sobrepuestos (Muñoz y Moreira, 2003) lo que hace difícil su estudio conjunto. Por ello y dada la relación mostrada entre grado de exogamia y razón polen-óvulo (ver arriba), se optó por usar la razón P/O como indicador del sistema reproductivo

determinándose la razón P/O en 22 taxa (19 especies) de *Alstroemeria*. La determinación de la razón P/O, como indicador del sistema reproductivo, resulta posible en un gran número de especies, mientras que la determinación directa del sistema reproductivo demandaría un tiempo mucho mayor. Si bien existen pocos datos acerca de la razón polen-óvulo en especies de *Alstroemeria* [*A. aurea* (P/O= 4500; Aizen y Basilio, 1995), *A. ligtu* ssp. *simsii* (P/O= 4775; Uslar, 1982) y *A. pallida* (P/O= 3446; Uslar, 1982)], dada la relación positiva entre tamaño de estambre y cantidad de polen contenido (Wyatt, 1984b; Ritland & Ritland, 1989), es esperable encontrar variación en este rasgo en *Alstroemeria*, pues sus especies exhiben variedad en el tamaño de los estambres (Bayer, 1987).

Para determinar los valores de razón P/O en *Alstroemeria* asociados con diferentes categorías de sistema de reproductivo, paralelamente se llevaron a cabo cruzamientos controlados en 5 especies del género. Algunos estudios previos del sistema de incompatibilidad revelan la existencia de una especie autoincompatible, *A. ligtu* ssp. *simsii* (Índice de autoincompatibilidad, IAI= 0,197) [Arroyo y Uslar, 1993] y tres especies autocompatibles, *A. pallida* (IAI= 0,413) [Arroyo y Uslar, 1993], *A. aurea* (IAI= 0,82) [Aizen y Basilio, 1995] y *A. patagonica* (IAI= 0,920) [Arroyo y Squeo, 1990]. Estas evidencias también sugieren variabilidad en el sistema reproductivo en este género. Los valores de sistema reproductivo recopilados de la literatura sumados a los obtenidos en el presente trabajo, permitieron evaluar si la relación entre razón polen-óvulo y sistema reproductivo existe en *Alstroemeria*, con el objetivo de utilizar el primero como un indicador del segundo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### I. RAZÓN POLEN-ÓVULO

La evaluación de la razón polen-óvulo se llevó a cabo según Cruden (1977) y Kearns & Inouye (1993). Se colectó una yema floral en cada uno de los individuos muestreados de cada especie. La condición de yema floral aseguró que no hubo pérdida de polen por el proceso de polinización. Así mismo, se hizo una cuidadosa inspección de la yema para verificar que no presentara signos de herbivoría. Las yemas se guardaron en alcohol (70%) hasta su posterior análisis.

Debido a que existe evidencia de variaciones en el contenido de granos de polen entre las anteras de una flor (Wyatt, 1984b; Preston, 1986; Gallardo y col., 1994), a modo exploratorio se contaron los granos de polen de cada una de las 6 anteras, en 8 individuos, en cada una de 6 especies. Las 6 anteras en *Alstroemeria* pertenecen a dos verticilos, uno externo y otro interno (Heywood, 1993) y van madurando por parejas, en forma secuencial. Al comienzo los estambres se curvan hacia adelante y hacia arriba, ocupando la posición central dentro de la flor, se mantienen allí por aproximadamente un día. Luego se mueven hacia abajo y hacia fuera, quedando fuera del alcance de los polinizadores (Aizen & Basilio, 1995). No existe información acerca de cuáles anteras maduran primero y cuáles lo hacen al final. Luego de evaluar el grado de variabilidad en

el número de granos de polen entre anteras, se evaluó si también existía variación entre los dos verticilos. Como resultó ser de este modo (ver RESULTADOS), se eligió una antera de cada verticilo, pues éstos representaban grupos entre los cuales se encuentra variación y, por lo tanto, permiten describir eficazmente el número de granos de polen de una flor (Gallardo y col., 1994). Una vez establecida la metodología, para las restantes 15 especies, se eligieron dos anteras por flor, A2 e I2 (Fig. 2, Modelo de Estudio), pertenecientes los verticilos externo e interno de la flor, respectivamente.

Cada antera se suspendió en un volumen conocido de azul de lactofenol (Kearns & Inouye, 1993), que varió entre 0,2 y 0,4 ml. El volumen de dilución usado fue dependiente de la cantidad total de polen contenido en cada antera, usándose aquel que permitiera un conteo fácil de partículas. Las anteras se rompieron con la ayuda de una bureta de vidrio, liberándose los granos de polen. El líquido que contiene los granos de polen se agitó con vórtex y luego se tomó una alícuota contando el número de granos de polen con un hemocitómetro. Se contabilizaron los granos de polen contenidos en las 9 cuadrículas de éste. Para cada antera se contabilizaron 10 réplicas usando el promedio de estos en los análisis. Los cálculos realizados para la obtención de la razón polen-óvulo (P/O) se incluyen en el ANEXO 1.

## II. CRUZAMIENTOS

Se determinó el sistema reproductivo en 5 especies de *Alstroemeria*, a través de cruzamientos controlados en poblaciones en su hábitat natural, siguiendo la metodología de Ruiz & Arroyo (1978). Las especies en las cuales se llevaron a cabo cruzamientos

fueron: *A. angustifolia* ssp. *angustifolia* RC, *A. exerens* VN, *A. ligtu* ssp. *simsii* RC, *A. umbellata*, *A. pulchra* ssp. *pulchra* (Tabla 1.1). En caso de realizar cruzamientos manuales, se determinó la receptividad del estigma con el test de peroxidasa. Este consistió en sumergir el estigma en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% y observar la salida de burbujas del estigma lo cual es indicativo de receptividad del estigma (Kearns & Inoue, 1993). En el caso de *Alstroemeria*, el proceso de maduración del estigma va acompañado de la trifurcación del ápice del estigma. Los tratamientos realizados fueron los siguientes:

i. *Autopolinización manual*: Se aislaron 50 yemas florales con bolsas de polinización para excluir los polinizadores. Una vez que el estigma estuvo maduro se efectuó polinización la que puede ser de dos tipos: intrafloral o dentro de las flores de la misma planta. Debido a la protandria intrafloral, es decir, la maduración temprana de anteras y más tardía de estigmas dentro de una misma flor (Aizen & Basilio, 1995), en la mayoría de los casos el polen provino de otra flor de la misma planta (geitonogamia).

ii. *Polinización cruzada manual*: se aislaron 50 yemas florales, las que fueron emasculadas. Cuando el estigma estuvo receptivo, las flores fueron polinizadas manualmente con una mezcla de polen proveniente de otros individuos de la misma población. Debido a que *Alstroemeria* posee reproducción vegetativa (Bayer, 1987) se tomó la precaución de obtener polen de plantas ubicadas al menos a 10 m de distancia.

iii. *Autopolinización automática*: Se aislaron 50 yemas florales intactas las que no se sometieron a ninguna manipulación posterior.

En todas las especies, a excepción de *A. umbellata*, los tratamientos incluyeron, originalmente, 50 yemas provenientes de 50 plantas distintas. Después de aproximadamente 4 semanas, se registró para cada tratamiento el número de semillas producidas por cada flor cruzada o marcada. Para comprobar el desarrollo del embrión, se evaluó su viabilidad en aquellas que presentaban una morfología que hacía suponer aborto de éstas con el test de Tetrazolio (Kearns & Inouye, 1993). Sólo las semillas viables se contabilizaron.

Se calculó el índice de autofertilidad (IAF, Lloyd & Schoen, 1992) como la razón entre las semillas producidas por flor en autopolinización automática y aquellas producidas por polinización cruzada manual. Este índice mide la capacidad espontánea de las flores para autofecundarse en ausencia de polinizadores. El denominador del índice, es decir, las semillas producidas en el tratamiento de polinización cruzada manual proporciona el número máximo de semillas posible de ser producidas. El valor mínimo del índice de autofertilidad va desde 0, para aquellas especies que son incapaces de autopolinizarse automáticamente y por ende, dependen de un polinizador, hasta valores de 1, que indica una capacidad similar de formar semillas por autopolinización automática que por autopolinización manual.

Además se calculó el índice de autoincompatibilidad (IAI, Ruiz & Arroyo, 1978), como la razón entre las semillas producidas por flor en autopolinización manual y aquellas producidas por polinización cruzada manual. Este índice evalúa la capacidad fisiológica de llevar a cabo la autofecundación y su denominador permite corregir el éxito de la autopolinización en la producción de semillas, producción que puede ser afectada por variaciones en el vigor de la planta, limitaciones fisiológicas y la técnica o condiciones de polinización (Lloyd & Schoen, 1992). Sus valores representan un continuo que va de 0 a 1 en donde se consideran autoincompatibles (SI) las especies con un IAI entre 0 a 0,2 y, autocompatibles (SC) las especies con un ISI de 0,2 a 1,0 (Ruiz & Arroyo, 1978; Arroyo & Uslar, 1993). Valores mayores que 1 representan probablemente errores experimentales pues existen pocas posibilidades que la producción de semillas sea mayor bajo autofecundación que en fecundación cruzada (Lloyd & Schoen, 1992).

Para determinar la relación entre la razón P/O y el sistema reproductivo, se llevó a cabo una regresión entre el valor de razón polen-óvulo (P/O) y los valores de índice de autofertilidad y de índice de autoincompatibilidad. En la regresión se incluyeron las especies en que se hicieron cruzamientos controlados y aquellas para las que se dispone de datos de la literatura. Estas especies son: *A. aurea* (Aizen & Basilio, 1995), *A. ligtu* ssp. *simsii* YL (Arroyo & Uslar, 1993), *A. pallida* YL (Arroyo & Uslar, 1993), *A. patagonica* (Arroyo & Squeo, 1990). En dos de estas últimas especies, *A. aurea*, *A. pallida* YL, se promediaron los valores de razón polen-óvulo, dado por los autores citados, con los valores obtenidos en el presente estudio.

### III. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Previo al análisis de los datos, se probó la normalidad (Test Kolmogorov Smirnov) y homocedasticidad (Test Levine) de los datos. En caso de no cumplir con algunos de estos requisitos se usó estadística no paramétrica. Para detectar diferencias en el número de granos de polen entre las anteras de las flores se llevó a cabo un ANDEVA de dos vías (factores: individuos y anteras) en las 6 especies en que se contaron los granos de polen en todas las anteras. Para detectar diferencias entre los verticilos se llevó a cabo un ANDEVA anidado de 3 vías (factores: individuo, verticilo y antera anidado dentro de verticilo). Estos resultados permitieron tomar decisiones con respecto al tipo de anteras que se debía muestrear. En cada uno de los ANDEVA realizados, se realizaron pruebas de comparaciones múltiples *a posteriori* usando el test de Tukey HSD para muestras de tamaños iguales o desiguales, según el caso. Para detectar diferencias significativas en el número de granos de polen, en el número de óvulos y en la razón P/O entre los taxa estudiados se llevaron a cabo, para cada uno de ellos un ANDEVA de una vía.

Para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos de polinización se llevó a cabo un test de Kruskal-Wallis para cada una de las especies analizadas. Las diferencias entre pares de tratamientos se evaluaron con un test de Mann-Whitney, utilizando como valores críticos de  $p$ , aquel dado por un  $\alpha = 0,05$ , corregido por Bonferroni secuencial (Rice, 1989). Se eligió el modelo de ajuste que exhibía un mayor coeficiente de determinación,  $R^2$ .

En los análisis estadísticos se usó el programa STATISTICA.

## RESULTADOS

### I. RAZÓN POLEN-ÓVULO

La diferencia en el número de granos de polen entre las anteras de una flor resultó ser significativa en 5 de las 6 especies en que se midió el polen en la totalidad de las anteras (Tabla 2.1). Sólo en *A. graminea* no se presentaron diferencias. Las mayores diferencias en la cantidad de polen se hallan entre las anteras A1, A2 y A3, pertenecientes al verticilo externo, y las anteras I1, I2 y UL, correspondientes al verticilo interno. En forma correspondiente, existen diferencias significativas en el número de granos de polen entre los dos verticilos (Tabla 2.1). En todas las especies el verticilo interno, compuesto por las anteras I1, I2 y UL (en posición contraria a los tépalos del mismo nombre, Fig. 2 Modelo de Estudio) contiene más polen (Tabla 2.1). Este resultado permitió tomar la decisión de hacer un muestreo de 2 anteras por flor, una de cada verticilo (A2 e I2). El caso más diferente lo constituye *A. pelegrina*, la que presenta una gran variabilidad entre las anteras, sin embargo, mantiene la diferencia significativa entre verticilos lo que posibilita tomar una antera de cada uno de ellos.

Para evaluar la diferencia en el número de granos de polen entre los 22 taxa se utilizó, en las 6 especies en que se habían medido todas las anteras, sólo las anteras A2 e

Tabla 2.1. Promedio de número de granos de polen por antera para 6 especies de *Alstroemeria* y ANDEVA de dos vías con comparaciones múltiples entre promedios de antera (Test de Tukey). Las letras del mismo tipo indican ausencia de diferencias significativas. A= comparación entre todas las anteras (ANDEVA de 2 vías), B= comparación entre los dos verticilos de anteras (ANDEVA anidado de 3 vías). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Antera	<i>A. angustifolia</i> <i>angustifolia</i> Q	<i>A. angustifolia</i> <i>velutina</i>	<i>A. graminea</i>	<i>A. peregrina</i>	<i>A. presliana</i> <i>presliana</i>	<i>A. violacea</i>
1	17760,42 a	20129,63 a	1935,19 a	9103,009 a	15943,29 a	31843,75 a
2	19247,69 a	21185,19 a	2268,52 a	19021,99 b	18819,45 b	35697,92 b
3	19305,55 a	22166,67 ab	2000,00 a	11412,04 c	18877,31 b	36312,50 b
4	23379,63 b	23777,78 b	2291,67 a	29259,26 d	23263,89 c	40746,53 c
5	21631,95 b	23814,81 b	2263,89 a	25387,73 e	21620,37 c	40509,72 c
6	22407,41 b	24055,55 b	2347,22 a	29074,07 d	21828,70 c	40590,28 c
A	15,24***	8,34***	2,09	272,03***	25,63***	15,39***
B	66,32***	35,00***	5,78*	1138,31***	102,22***	63,17***

12 al igual como se había medido en las restantes 15 especies. Los valores de números de granos de polen fluctúan entre 13106, en *A. graminea* y 225631, en *A. violacea*, es decir, una diferencia de más de 17 veces (Tabla 2.2). Existen diferencias significativas en cuanto al número de granos de polen entre las especies estudiadas (ANDEVA 1 Vía, g.l.= 21, F = 41,41 p < 0,001).

El número promedio de óvulos presente en la flor varía desde 13 en *A. polyphylla* hasta 38 en *A. pulchra* ssp *pulchra*. El rango implica una diferencia de casi 3 veces entre valores extremos (Tabla 2.2). Además, el número de óvulos por flor varía significativamente entre los taxa (ANDEVA 1 Vía, g.l.= 21, F = 29,63 p < 0,001).

La razón polen-óvulo fluctúa desde 479 en *A. graminea* hasta 10254 en *A. polyphylla* (Tabla 2.2), lo que significa una diferencia de más de 21 veces, 7 veces mayor que el rango para el número de óvulos y un poco mayor que el rango para el número de granos de polen. La razón entre el número de granos de polen y el número de óvulos varía significativamente entre los taxa (ANDEVA 1 Vía, g.l.= 21, F = 32,86 p < 0,001).

Tabla 2.2. Número de granos de polen, número de óvulos y razón polen-óvulo (P/O) para taxa chilenos de *Astroemeria*. Los valores corresponden a promedios  $\pm$  2 EE. La nomenclatura es la misma que en la Tabla 1.1

Taxon	N° granos de polen $\pm$ 2 EE	N° óvulos $\pm$ 2 EE	P/O $\pm$ 2 EE
<i>A. angustifolia</i> ssp. <i>angustifolia</i> Q	123732,64 $\pm$ 19237,83	29,00 $\pm$ 2,59	4234,40 $\pm$ 372,84
<i>A. angustifolia</i> ssp. <i>angustifolia</i> RC	99973,33 $\pm$ 19297,46	27,40 $\pm$ 2,29	3749,47 $\pm$ 821,79
<i>A. angustifolia</i> ssp. <i>velutina</i>	135129,63 $\pm$ 17114,87	28,25 $\pm$ 2,50	4911,10 $\pm$ 989,09
<i>A. aurea</i> TC	123920,00 $\pm$ 9894,83	20,73 $\pm$ 1,19	5997,43 $\pm$ 446,43
<i>A. diluta</i> ssp. <i>chrysantha</i>	73875,56 $\pm$ 19807,83	25,73 $\pm$ 2,35	2817,95 $\pm$ 646,47
<i>A. exerens</i> VN	158666,67 $\pm$ 15341,72	29,93 $\pm$ 1,62	5332,47 $\pm$ 531,22
<i>A. graminea</i>	13106,48 $\pm$ 3139,01	29,13 $\pm$ 3,67	479,14 $\pm$ 164,28

Tabla 2.2. Continuación

Taxon	N° granos de polen ± 2EE	N° óvulos ± 2EE	P/O ± 2EE
<i>A. hookeri</i> ssp. <i>recumbens</i>	126142,22 ± 14978,24	24,80 ± 1,40	5129,89 ± 640,91
<i>A. ligtu</i> ssp. <i>simsii</i> RC	132613,33 ± 18517,20	35,27 ± 2,97	3923,93 ± 693,52
<i>A. magnifica</i> TN	167031,11 ± 17754,06	31,13 ± 2,12	5400,14 ± 568,00
<i>A. magnifica</i> ssp. <i>magnifica</i> BA	150088,89 ± 14741,85	26,33 ± 2,07	5786,91 ± 649,98
<i>A. pallida</i> YL	154408,89 ± 30684,97	33,47 ± 2,33	4624,20 ± 837,23
<i>A. patagonica</i>	31700,00 ± 5447,73	26,13 ± 2,06	1214,07 ± 182,58
<i>A. pelegrina</i>	123258,10 ± 13622,72	22,50 ± 2,90	5641,57 ± 913,75
<i>A. polyphylla</i>	134988,89 ± 14731,58	13,27 ± 0,82	10254,25 ± 1134,96

Tabla 2.2. Continuación

Taxon	N° granos de polen ± 2EE	N° óvulos ± 2EE	P/O ± 2EE
<i>A. prestiana</i> ssp. <i>prestiana</i>	120353,01 ± 14677,70	16,75 ± 0,91	7283,74 ± 1210,37
<i>A. pulchra</i> ssp. <i>pulchra</i>	150954,22 ± 21368,49	37,53 ± 3,78	4134,53 ± 653,10
<i>A. schizanthoides</i>	80693,33 ± 9200,29	21,00 ± 1,59	3902,82 ± 499,75
<i>A. umbellata</i>	78400,00 ± 13132,38	22,93 ± 1,76	3499,78 ± 637,84
<i>A. versicolor</i>	110444,44 ± 13653,82	29,33 ± 1,70	3782,95 ± 447,81
<i>A. violacea</i>	225700,69 ± 20397,57	34,25 ± 1,88	6624,19 ± 674,88
<i>A. zoellneri</i>	121555,56 ± 9560,54	23,20 ± 1,36	5307,96 ± 530,53

## II. CRUZAMIENTOS

Los sistemas reproductivos de las especies abarcan todo el espectro posible en cuanto al grado de autoincompatibilidad y autofertilidad., de acuerdo a los resultados de los cruzamientos (Tabla 2.3 y Fig. 1.1).

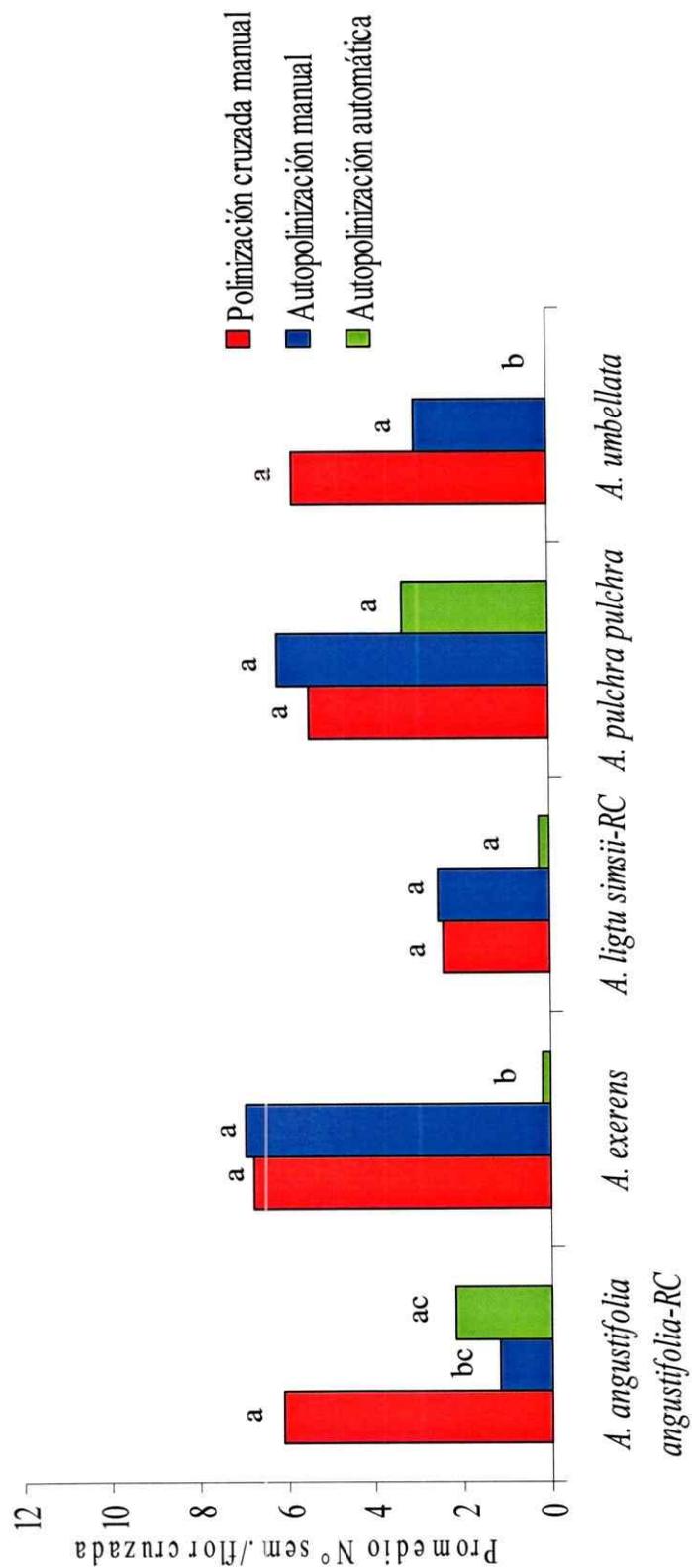
En un extremo de la autoincompatibilidad se halla *A. angustifolia* ssp. *angustifolia* RC, la que presenta una diferencia significativa en el número promedio de semillas por flor entre los tratamientos de fecundación cruzada manual, autofecundación manual y autofecundación automática (test Kruskal-Wallis,  $N= 40$ , g.l.= 2,  $H= 8,403$   $p < 0,05$ ) y específicamente, una producción de semillas significativamente mayor en el primer tratamiento que en el segundo (test Mann-Whitney,  $U= 20$ ,  $p < 0,01$ ) lo que determina un  $IAI= 0,19$ . Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre el tratamiento de autofecundación automática y el de fecundación cruzada manual (test Mann-Whitney,  $U= 43,5$ ,  $p= 0,03$  no significativo aplicando la corrección de Bonferroni secuencial) determinando un  $IAF= 0,36$  (Tabla 2.3). Tampoco hubo diferencia significativa entre los tratamientos de autopolinización automática y autopolinización manual (test Mann-Whitney,  $U= 85$ ,  $p= 0,18$ ) aunque la producción de semillas fue mayor en el primero de ellos. Esto puede deberse a una falla en el procedimiento de autopolinización manual (Fig. 2.1).

En el ámbito de las especies autocompatibles se encuentra *A. umbellata* en la que hubo un efecto significativo de los tratamientos efectuados (test Kruskal-Wallis,  $N= 250$ , g.l.= 2,  $H= 79,182$   $p < 0,001$ ) y en que el número promedio de semillas en

Tabla 2.3. Resultados de los cruzamientos controlados en 5 especies de *Alstroemeria*. Se muestran los resultados de los tratamientos de polinización cruzada manual, autopolinización manual y autopolinización automática. El número de flores recuperadas disminuyó debido a herbivoría.

Taxon	Polinización cruzada manual				Autopolinización manual				Autopolinización automática			
	Flores (plantas)	Semillas Totales	Promedio semillas/flor cruzada $\pm$ 2EE	Flores (plantas)	Semillas Totales	Promedio semillas/flor cruzada $\pm$ 2EE	Flores (plantas)	Semillas Totales	Promedio semillas/flor cruzada $\pm$ 2EE	Flores (plantas)	Semillas Totales	Promedio semillas/flor cruzada $\pm$ 2EE
<i>A. angustifolia</i> ssp. <i>angustifolia</i> RC	9(8)	55	6,11 $\pm$ 3,29	12(10)	14	1,17 $\pm$ 1,82	19(12)	42	2,21 $\pm$ 1,46			
<i>A. exerens</i>	23(19)	155	6,74 $\pm$ 2,86	26(21)	180	6,92 $\pm$ 2,74	15(14)	3	0,20 $\pm$ 0,40			
<i>A. ligtu</i> ssp. <i>simsii</i> RC	5(5)	12	2,40 $\pm$ 4,80	9(9)	23	2,56 $\pm$ 5,12	9(6)	2	0,22 $\pm$ 0,44			
<i>A. pulchra</i> ssp. <i>pulchra</i>	20(19)	109	5,45 $\pm$ 3,32	17(16)	104	6,12 $\pm$ 4,44	23(20)	76	3,30 $\pm$ 2,40			
<i>A. umbellata</i>	63(12)	364	5,78 $\pm$ 1,70	50(9)	151	3,02 $\pm$ 1,52	137(7)	0	0			

Figura 2.1. Promedio del número de semillas obtenidas por flor cruzada bajo tratamientos de polinización cruzada manual, autopolinización manual y autopolinización automática. Las letras del mismo tipo indican ausencia de diferencia significativa en test de Mann-Whitney aplicado en cada especie por separado, con la corrección de Bonferroni secuencial a un  $\alpha = 0,05$ .



el tratamiento de autopolinización automática es significativamente menor que en el tratamiento de polinización cruzada manual (test Mann-Whitney,  $U= 5,95$   $p < 0,001$ ) y que en el de autopolinización manual (test Mann-Whitney,  $U= 2,93$   $p < 0,001$ ) (Fig 2.1). Los resultados de los tratamientos de autopolinización manual y polinización cruzada manual permiten afirmar que es una especie autocompatible ( $IAI= 0,52$ ). Sin embargo, la ausencia absoluta de semillas en el tratamiento de autopolinización espontánea determina un IAF de 0 (Tabla 2.4 y Fig. 2.1) indicando total dependencia de polinizadores.

Con un grado de autocompatibilidad mayor se encuentra *A. exerens* VN ( $IAI= 1,03$ ) en la que, si bien hubo un efecto significativo de los tratamientos de polinización (test Kruskal-Wallis,  $N= 64$ , g.l.= 2,  $H= 12,614$   $p < 0,01$ ) no presenta diferencia significativa entre la polinización cruzada manual y la autopolinización manual (test Mann-Whitney,  $U= 296,5$   $p= 0,95$ ) determinando el IAI antes mencionado (Fig. 2.1). La producción de semillas en el tratamiento de autopolinización automática es significativamente menor que en la autopolinización manual (test Mann-Whitney,  $U= 88$   $p < 0,001$ ) y que en la polinización cruzada manual (test Mann-Whitney,  $U= 73$ ,  $p < 0,001$ ) lo que conlleva a un IAF de 0,03 (Tabla 2.4 y Fig. 2.1). Tal como en el caso anterior, *A. exerens* depende de polinizadores. En el extremo de la autocompatibilidad se encuentra *A. pulchra* ssp. *pulchra* ( $IAI= 1,12$ ), la que no presenta diferencias significativas entre tratamientos de polinización (test Kruskal-Wallis,  $N= 60$ , g.l.= 2,  $H= 1,583$   $p= 0,45$ ) y en que su IAF es de 0,61 (Tabla 2.4 y Fig. 2.1). En *A. ligtu* ssp. *simsii* RC no hubo diferencias significativas entre tratamientos de polinización (test Kruskal-

Wallis,  $N= 23$ ,  $g.l.= 2$ ,  $H= 0,273$   $p= 0,87$ ). La escasa presencia de semillas en el tratamiento de polinización cruzada, todas provenientes sólo de una flor (datos no mostrados) sugiere un error experimental. Por ello no es posible calcular el índice de autoincompatibilidad. El índice de autofertilidad calculado ( $IAF=0,22$ ) (Tabla 2.4, Fig. 2.1) consideró que el tratamiento de polinización cruzada manual rindió un 100% de semillas. Dado que lo anterior es improbable, el valor real del IAF sería mayor que 0,22 en esta especie.

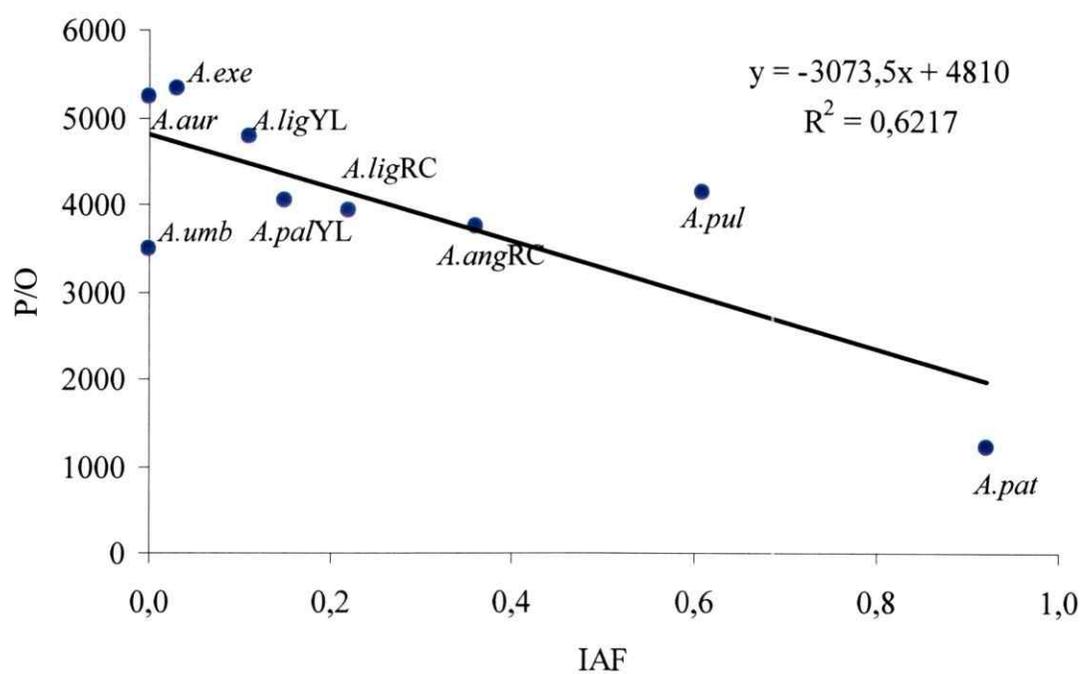
Los índices de autofertilidad espontánea obtenidos en los experimentos de cruzamientos controlados se complementaron con datos provenientes de la literatura, obteniendo valores para ese índice para un total de 9 taxa de *Alstroemeria* (Tabla 2.4). Dentro de los IAF obtenidos a partir de la literatura destaca *A. patagonica* que resulta tener el valor más alto de todas las especies, con 0,92 (Arroyo & Squeo, 1990) indicando que dicha especie tiene una alta capacidad para la autofertilización espontánea.

La regresión entre la razón polen-óvulo y el índice de autoincompatibilidad no es significativa ( $R^2= 0,0021$   $p > 0,05$ ) en el género *Alstroemeria*, no permitiendo su uso como indicador del sistema de reproducción. Por el contrario, en la Figura 2.2 se muestra la regresión entre la razón polen-óvulo y el índice de autofertilidad, la que revela que en este género existe una buena relación entre el índice de autofertilidad y la razón P/O ( $R^2= 0,62$   $p < 0,05$ ). Este hecho indica que el sistema de reproducción está altamente reflejado en la razón P/O permitiendo su uso como indicador del sistema de reproducción.

Tabla 2.4. Índice de autofertilidad (IAF) para taxa de *Alstroemeria*. Las especies están ordenadas de mayor a menor IAF.

Taxon	IAF	Referencia
<i>A. patagonica</i>	0,92	Arroyo & Squeo, 1990
<i>A. pulchra ssp. pulchra</i>	0,61	Este estudio
<i>A. angustigolia ssp. angustifolia</i> RC	0,36	Este estudio
<i>A. ligtu ssp. simsii</i> RC	0,22	Este estudio
<i>A. pallida</i> YL	0,15	Arroyo & Uslar, 1993
<i>A. ligtu ssp. simsii</i> YL	0,11	Arroyo & Uslar, 1993
<i>A. exerens</i> VN	0,03	Este estudio
<i>A. aurea</i>	0	Aizen & Basilio, 1995
<i>A. umbellata</i>	0	Este estudio

Figura 2.2. Regresión entre razón polen óvulo (P/O) e índice de autofertilidad (IAF) en 9 especies chilenas de *Alstroemeria*. *A.angRC*= *A. angustifolia* ssp. *angustifolia* RC; *A.aur*= *A. aurea*; *A.exe*= *A. exerens*; *A.ligYL*= *A.ligtu* ssp. *simsii* YL; *A.pal*= *A. pallida* YL; *A.pat*= *A. patagonica*; *A.pul*= *A. pulchra* ssp. *pulchra*; *A.umb*= *A. umbellata*.



## DISCUSIÓN

Esta discusión considera 4 aspectos. a) se realiza un análisis general del sistema reproductivo en las especies chilenas del género *Alstroemeria* basado en los resultados de cruzamientos, discutiendo los principales factores que lo modulan; b) se analiza el uso de la razón P/O como indicador del sistema de reproducción en *Alstroemeria*; c) se compara la correspondencia entre la razón P/O y categorías de sistemas de reproducción obtenidas en *Alstroemeria* y en otros taxa y d) se analizan algunas consideraciones metodológicas en la determinación de la razón P/O.

El aspecto más destacable del presente estudio es el reconocimiento de una amplia variedad de modalidades reproductivas en especies de *Alstroemeria*, lo cual se evidencia en los índices reproductivos medidos. La amplitud de valores del índice de autofertilidad espontánea revela un continuo de posibilidades, desde aquellas especies que son capaces de autofecundarse sin la participación de un polinizador, y que se consideran autógamas, hasta aquellas que no lo son y que determina diferentes grados de exogamia. También existe una amplitud considerable en los valores del índice de autoincompatibilidad, variando desde especies autoincompatibles hasta especies altamente autocompatibles, condición que también puede modular distintos grados de exogamia.

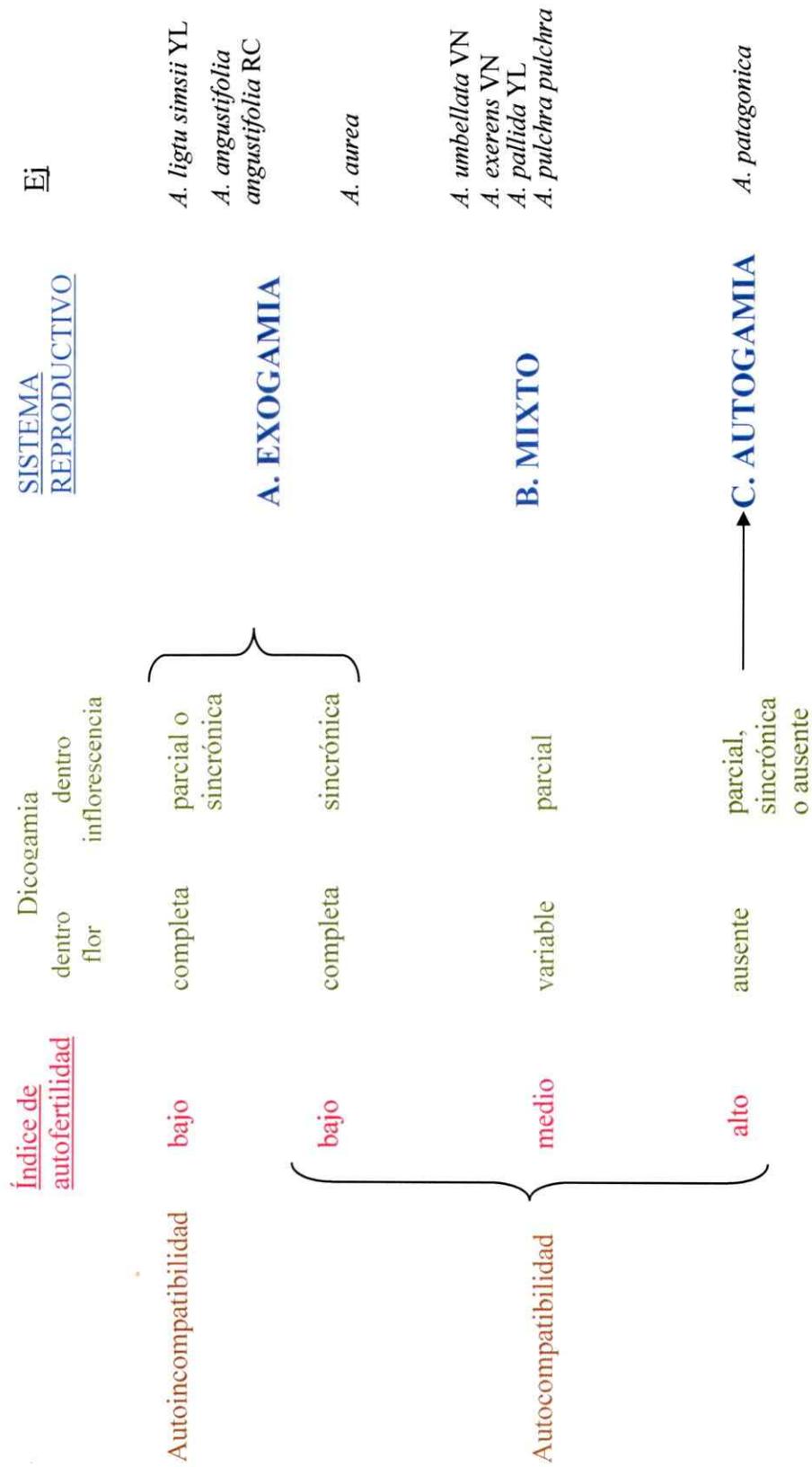
El análisis de los índices reproductivos evaluados en los experimentos de cruzamientos controlados revela que la relación entre autofertilidad espontánea y autoincompatibilidad es compleja. En algunas especies, se halla mayor autofertilidad espontánea en especies autocompatibles (e.g. *A. pulchra* ssp. *pulchra* y *A. patagonica*) y menor autofertilidad en especies autoincompatibles (e.g. *A. angustifolia* ssp. *angustifolia* RC y *A. ligtu* ssp. *simsii* YL) (Tabla 2.4). Esto es concordante con un estudio en 66 especies de diferentes familias (Lloyd y Schoen, 1992). Sin embargo, al igual que en el estudio mencionado, existen casos de especies que se alejan de dicho patrón. Por ejemplo, *A. angustifolia* ssp. *angustifolia* RC, una especie autoincompatible, desarrolló una cierta capacidad de autofecundación y, en el otro extremo, *A. exerens* y *A. aurea* y *A. umbellata*, las que son especies autocompatibles, poseen baja o nula capacidad de autofecundarse, respectivamente. De lo anterior se concluye que la condición de ser autocompatible no implica necesariamente que se lleve a cabo la autopolinización y que el grado de autocompatibilidad no sería el único factor que influye en la magnitud de la capacidad de autopolinización espontánea (Lloyd & Schoen, 1992).

Un aspecto clave para entender la compleja relación entre el grado de autoincompatibilidad y autofertilidad espontánea en *Alstroemeria* es la dicogamia o separación temporal entre las funciones femeninas y masculinas de la flor. Sólo se ha estudiado en detalle la protandria en *A. aurea* (Aizen & Basilio, 1995; Harder & Aizen, 2004) en donde resultó ser completa dentro de una flor y sincrónica entre las flores del mismo verticilo de un "ramet". En una flor la fase "masculina" tarda 4 días, seguida por una fase neutra que dura aproximadamente 1 día, para finalizar con tres días de fase

“femenina”. Si la inflorescencia cuenta con más de un verticilo, las flores del segundo verticilo comienzan a madurar luego que las del primero se han marchitado. Harder y Aizen (2004) demostraron que la dicogamia sincrónica en *A. aurea* reduce la autofertilización y la depresión por “inbreeding” (Darwin, 1876; Husband & Schemske, 1996), proceso que es frecuente en plantas clonales de larga vida donde se acumulan grandes cargas de mutaciones con la edad (Klekowski, 1988). Con ese estudio descartaron la hipótesis que relaciona la dicogamia con reducir la interferencia entre las funciones femeninas y masculinas promoviendo la exportación de polen y aumentando la producción de semillas por “outcrossing” (Lloyd & Webb, 1986; Bertin, 1993; Harder y col., 2000; Barrett, 2002). Sin embargo, si la protandria fuera incompleta, existiría la posibilidad de autofertilización tal como se demostró en *A. aurea* cuando se construyeron inflorescencias femeninas y masculinas artificialmente (Harder y Aizen, 2004). En condiciones naturales, la existencia de dicogamia parcial a nivel de la inflorescencia, en especies autocompatibles, permitiría la geitonogamia, es decir la fecundación entre las flores de un mismo individuo. Además, siempre existiría la posibilidad de autofecundación entre flores de diferentes inflorescencias. Teniendo en cuenta el papel de la dicogamia, la presencia de ésta en especies de *Alstroemeria* sugiere que el índice de autofertilidad es un mejor descriptor del sistema reproductivo que el grado de autoincompatibilidad/autocompatibilidad. En resumen, el sistema de reproducción en *Alstroemeria* está determinado por la combinación de tres factores: el grado de autoincompatibilidad/autocompatibilidad, el grado de autofertilidad espontánea y la dicogamia. Este último factor no se evaluó en este estudio pero tiene una importancia que futuros estudios podrán explorar.

La figura 2.3 resume los sistemas de reproducción en el género *Alstroemeria*. La exogamia (Fig. 2.3A) sería el resultado de la autoincompatibilidad genética que generalmente impide la autofertilización. Este es un mecanismo presente en muchas geófitas en general (Fryxell, 1957) y también de Chile (Arroyo & Uslar, 1993, Arroyo & Squeo, 1990) y detectada hasta la fecha, en especies de *Alstroemeria*, sólo en *A. ligtu* ssp. *simsii* YL (Arroyo & Uslar; 1993) y *A. angustifolia* ssp. *angustifolia* RC (este estudio). En estas especies cabría esperar que la dicogamia a nivel floral fuese total al igual que en la mayoría de las especies del género y que a nivel de la inflorescencia fuera variable, pudiendo ser parcial o sincrónica. Además, la exogamia podría darse en especies autocompatibles con bajos niveles de autofertilidad asociados a la dicogamia, al igual como se ha encontrado para otras especies (Lloyd & Schoen, 1992), en que la dicogamia debería ser sincrónica dentro de la inflorescencia (e.g. *A. aurea*, Aizen & Basilio, 1995). En una categoría intermedia de sistema reproductivo, que se llamará "mixto" (Fig. 2.3B), están presentes tanto especies facultativas exógamas como facultativas autógamas. Esta categoría correspondería a la mayoría de las especies de *Alstroemeria* estudiadas e incluye a especies parcial o completamente autocompatibles con niveles moderados y variables de autofertilidad espontánea. En ellas, la fecundación dentro de un mismo individuo podría darse por geitonogamia con la condición de que exista dicogamia parcial. Ejemplos de estas especies son *A. exerens* VN, *A. pallida* YL, *A. pulchra pulchra* y *A. umbellata*. Finalmente, las especies autógamas (Fig. 2.3C) serían aquellas autocompatibles con alta autofertilidad espontánea, tal como *A. patagonica*. El pequeño tamaño de su flor y de sus estambres sugiere una

Figura 2.3. Esquema general del sistema reproductivo en las especies chilenas de *Astroemeria* indicando los tres factores principales que lo determinan: nivel de autoincompatibilidad, autofertilidad y dicogamia.



hercogamia débil lo que sumado a la ausencia de protandria total (obs. pers.) permitiría la autofertilización. En este caso, dentro de la inflorescencia podría o no haber sincronía en la protandria. Vale la pena señalar que *A. patagonica* habita en los márgenes o periferia de la distribución del género en Chile, hecho ampliamente documentado para otras especies autógamas (Lloyd, 1980; Barrett, 1989; Pannell & Barrett, 1998).

El segundo aspecto a considerar en esta discusión es el uso de la razón P/O como indicador del sistema de reproducción en *Alstroemeria*. La relación significativa entre la razón P/O y el índice de autofertilidad en este género (Fig. 2.2) avala el uso de la razón polen-óvulo como indicador del sistema reproductivo. Si se examina la figura 2.2 resulta evidente que la correlación se sustenta sólo en un punto, específicamente, en el bajo valor de razón P/O de *A. patagonica*. No fue posible realizar cruzamientos en terreno en *A. graminea*, la especie con el menor valor de razón P/O. Sin embargo, su pequeño tamaño floral, ausencia de dicogamia (obs. personal) y su hábito anual, permiten inferir que se trata de una especie autógama. Aún cuando se contara con el valor del índice de autofertilidad de *A. graminea*, la correlación se sustentaría en pocos puntos, sólo dos. Dado que *Alstroemeria* parece ser un género con marcada tendencia a la exogamia, el aumento en el número de especies con su índice de autofertilidad conocido no solucionaría esta situación. Si bien son pocos los estudios que evalúan la correlación entre razón P/O e índice de autofertilidad, muestran la misma tendencia que la hallada en *Alstroemeria*. Un estudio realizado en cultivos de mostaza mostró también que altos valores de la razón P/O se corresponden con valores bajos de autofertilidad (Yashiro y col., 1999) aunque Gallardo y col. (1994) encontraron una tendencia similar, pero no

significativa. Otros estudios sí indican fuerte asociación entre la razón P/O y el grado de exogamia, tendencia que se evidencia en distintos niveles de análisis como, por ejemplo, entre flores cleistógamas (autógamas) y chascógamas (posiblemente exógamas) de *Lamium amplexicaule* (Lord, 1980); entre distintas poblaciones de *Gilia achilleifolia* (Schoen, 1977), de *Clarkia* (Vasek & Weng, 1988), de *Arenaria uniflora* (Wyatt, 1984b); dentro de especies del género *Trichostema* (Spira, 1980), *Potamogeton* (Philbrick & Anderson, 1987), *Clarkia* (Vasek & Weng, 1988), *Solanum* section *Basarthrum* (Mione & Anderson, 1992), *Plantago* (Sharma y col., 1992) y *Mimulus* (Ritland & Ritland, 1989), en donde se halló una correlación positiva con la tasa de exogamia. Finalmente, esta relación también se halla entre especies pertenecientes a niveles taxonómicos mayores como Cruciferae (Preston, 1986) y Caryophylloideae (Jürgens y col. 2002).

La aplicabilidad de la razón P/O como indicador del sistema reproductivo sería sólo para las especies de *Alstroemeria* con valores extremos de razón P/O en las cuales puede inferirse su sistema reproductivo con cierta seguridad. Sería el caso de especies con valores altos de P/O tales como *A. polyphylla*, *A. presliana* ssp. *presliana*, *A. violacea*, *A. magnifica* ssp. *magnifica* y *A. magnifica* TN (Tabla 2.2), que tendrían una marcada tendencia a la exogamia. En el otro extremo, *A. graminea*, por su bajo valor de razón P/O (Tabla 2.2), pequeño tamaño floral, ausencia de dicogamia (obs. personal) y distribución en hábitat desértico y forma de vida anual correspondería a una especie autógama. La gran mayoría de especies, con valores de razón P/O intermedios, tales como *A. versicolor*, *A. angustifolia* ssp. *angustifolia* Q y *A. angustifolia* ssp. *velutina*, *A.*

*zoellneri*, *A. hookeri* ssp. *recumbens*, *A. schizanthoides* y *A. diluta* ssp. *chrysantha* caerían en la categoría de sistema de reproductivo mixto siendo autógamas facultativas o exógamas facultativas. Estas especies podrían presentar índices de autofertilidad y/o autoincompatibilidad que las hiciera comportarse de muy diferente manera con relación al grado de exogamia. Futuros estudios que evalúen experimentalmente la tasa de exogamia permitirían discriminar entre las especies autógamas facultativas y exógamas facultativas, un poder resolutivo que el presente trabajo no tiene. La ausencia de una regresión significativa entre la razón P/O e índice de autoincompatibilidad podría deberse a la presencia de dicogamia en *Alstroemeria*, la que modula fuertemente el efecto del grado de autoincompatibilidad en el sistema de reproducción de una especie. Por lo tanto, el índice de autofertilidad describe mejor el sistema de reproducción en *Alstroemeria* (ver arriba).

Respecto a la comparación entre la razón P/O de *Alstroemeria* y de otros taxa, al considerar los valores de Cruden (1977) todas las especies del presente estudio caerían en la categoría de xenógamas facultativas u obligadas lo cual es inexacto (ver arriba). No obstante, tal como se ha demostrado, existe una diversidad de valores de incompatibilidad y autofertilidad asociados con una misma razón P/O. Los valores de cada categoría reproductiva de la tabla presentada por Cruden (1977) son un promedio de muchas especies diferentes. Frecuentemente el límite superior de una categoría se sobrepone con el inferior de la siguiente. Según Cruden (1977) algunas especies de *Alstroemeria* deberían incluirse como xenógamas facultativas pero, sin embargo son, a lo menos, autógamas facultativas, por ejemplo *A. patagonica* (Arroyo & Squeo, 1990) y

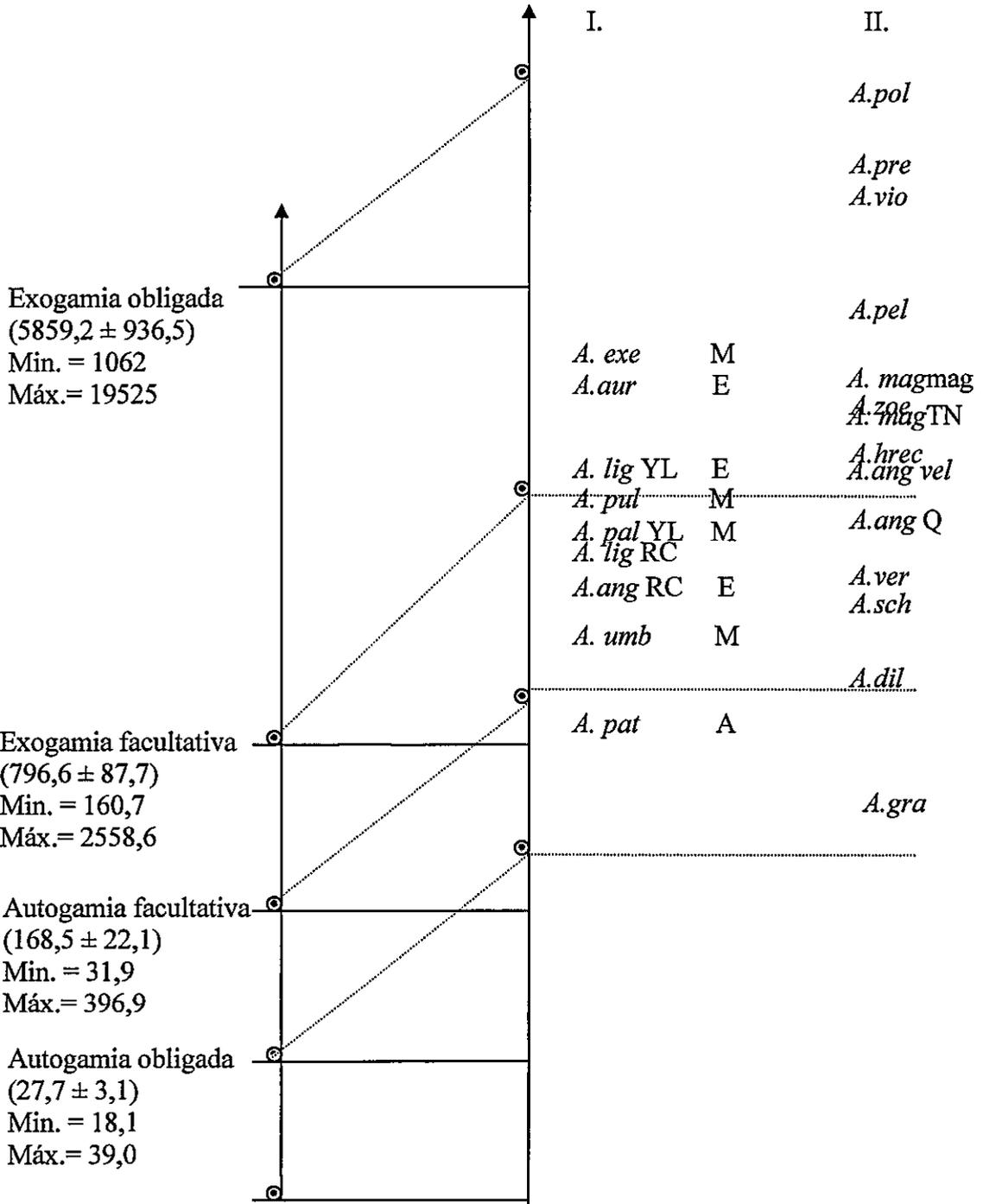
*A. graminea*, la especie con el valor más bajo de razón polen-óvulo (Tabla 2.3 y Fig. 2.1). Otras especies de *Alstroemeria* deberían ser xenógamas según las categorías definidas por Cruden (1977), sin embargo, como ya se ha discutido anteriormente, algunas tienen un comportamiento más cercano a la xenogamia facultativa o autogamia facultativa (e.g. *A. exerens* VN, *A. pallida* YL, *A. pulchra pulchra* y *A. umbellata*) por cuanto poseen cierta capacidad de formar semillas por autofecundación espontánea o capacidad para fertilizarse dentro de la misma planta si existe un polinizador disponible. Finalmente, sólo tres especies, *A. angustifolia* ssp. *angustifolia* RC, *A. aurea* y *A. ligtu* ssp. *simsii* YL, son incluidas acertadamente dentro de la categoría de xenógamas de Cruden (1977). Lo anterior sugiere que en el género *Alstroemeria* las categorías de sistema de reproducción reconocidas por Cruden (1977) estarían desplazadas hacia valores mayores de la razón polen-óvulo (Fig. 2.4). La figura 2.4 muestra una proposición para *Alstroemeria*, con los valores de razón P/O desplazados, aunque los límites entre categorías no pueden establecerse claramente a partir de los datos disponibles. Se han encontrado desplazamientos similares en la razón P/O en el género *Potamogeton* (Philbrick & Anderson, 1987), en el género *Astrocaryum* (Consiglio & Bourne, 2001) y en la familia Cruciferae (Preston, 1986). Inversamente, se han encontrado valores menores que los de Cruden (1977) para grupos de especies xenógamas y autógamias en Inuleae, subtribu Gnaphaliinae (Short, 1981) y para especies exógamas en Caryophylloideae (Jürgens y col. 2002). En la figura 2.4 no se indican valores específicos de razón P/O para cada categoría debido a que el número de especies cuyo sistema reproductivo ha sido evaluado por un método independiente es aún bajo como para fijar límites. Los límites entre categorías no serían excluyentes,

encontrándose una superposición de valores de razón P/O entre taxas pertenecientes a categorías cercanas (Cruden, 1977; Preston, 1986; Jürgens y col., 2002).

Figura 2.4. Razones P/O y sistema reproductivo. a) Razón P/O para categorías de sistema reproductivo de Cruden (1977); b) Razón P/O para sistemas reproductivos propuestos para *Alstroemeria*; I.= taxa cuyo sistema reproductivo fue evaluado a través de cruzamientos controlados mostrando las categorías reproductivas basadas en IAF, IAI y estimación de la protandria. E= exógama, M= mixta, A= autógama. II.= taxa en que sólo se conoce la razón P/O. Para dos especies la razón P/O indicada corresponde al promedio entre este estudio y otro previo (*A. aurea*; Aizen & Basilio, 1995 y *A. pallida* YL, Uslar, 1982).

a) Cruden  
(1977)

b) *Alstroemeria*



El desplazamiento de los valores de razón P/O en *Alstroemeria* apoya la sugerencia (Preston, 1986; Vasek & Weng, 1988) que los rangos dados por Cruden (1977) no deben utilizarse para predecir sistemas reproductivos en especies determinadas y a nivel comunitario (Medan, 2003). Los rangos definidos por Cruden (1977) son de poca utilidad puesto que cada especie puede estar influenciada por distintos factores que modifican la razón polen-óvulo, aún cuando puedan poseer similar sistema reproductivo. Entre estos factores se cuentan el tipo principal de recompensa que ofrece la planta; el tipo de vector de polinización; existencia de mecanismos especiales de transporte de polen, como por ejemplo polinios; mecanismos de liberación del polen; el momento de la estación en que se determina, y finalmente factores ecológicos tales como depredación y dispersión de semillas, y parasitismo que pueden crear compromisos en los números tanto de óvulos como de granos de polen (Wilbur, 1976; Preston, 1986; López et al., 1999; Cruden, 2000; Wyatt y col., 2000; Hansman, 2001; Jürgens y col., 2002; pero ver Seijo & Neffa, 2004). Por lo tanto, se ha sugerido el desarrollo de estándares a nivel de género, tribu o familia (Preston, 1986; Philbrick & Anderson, 1987; Vasek & Weng, 1988), posición que este trabajo confirma fuertemente. En este sentido, el presente estudio es uno de los primeros que determina valores de razón P/O para un gran número de especies de un mismo género.

Finalmente, el último aspecto a abordar es una consideración metodológica. Los resultados obtenidos en *Alstroemeria* confirman la necesidad de evaluar la variabilidad en la cantidad de polen entre todas las anteras de la flor, previo a la decisión de tomar sólo algunas como representativas de la totalidad. Otros estudios también muestran

variación entre anteras (Wyatt, 1984b; Preston, 1986; Gallardo y col., 1994). Si bien el contabilizar el número de granos de polen sólo en algunas anteras de la flor es una práctica común en trabajos que evalúan la razón polen óvulo (Cruden, 1977; Spira, 1980; Cruden & Millar-Ward, 1981; Dudash, 1991; Escaravage y col., 1997; Wang y col., 2004), puede conducir a resultados sesgados en el caso de que dicha variabilidad sea elevada (Wyatt, 1984b). En el otro extremo, la mayoría de los estudios contabilizan la razón P/O mezclando todas las anteras de una misma flor (Philbrick & Anderson, 1987; Ritland & Ritland, 1989; Jürgens y col., 2002). Al mezclar anteras de una flor no se detecta la potencial variación entre ellas la que puede tener un significado biológico. Por ejemplo, en *Epliglottis* la variación entre anteras reflejaría la probabilidad diferencial de autopolinización dependiendo la antera de la cual deriva el grano de polen (Gallardo y col., 1994). El significado biológico del contenido diferencial de polen en las anteras de los dos verticilos en *Alstroemeria* (Tabla 2.1) es una pregunta abierta.

## CAPÍTULO 3. EVOLUCIÓN DE CARACTERES FLORALES Y RAZÓN P/O EN EL GÉNERO *ALSTROEMERIA* EN CHILE

### INTRODUCCIÓN

La biología evolutiva se ha preocupado de estudiar patrones y procesos de evolución que han llevado a la diversificación de los organismos (Darwin, 1872; Gould, 1986), en los cuales la adaptación habría tenido un rol fundamental (Miles & Dunham, 1993). En este contexto, comparaciones entre especies han servido para generar o evaluar hipótesis acerca de la evolución de adaptaciones (Miles & Dunham, 1993). Específicamente, correlaciones entre rasgos o entre éstos y algún factor ambiental sugerirían el sentido adaptativo del rasgo (Miles & Dunham, 1993) siendo usadas como hipótesis sobre evolución de caracteres (Brooks & McLennan, 1991). Sin embargo, su uso en biología comparativa ha sido puesto en duda ya que los métodos comparativos tradicionales, que utilizan la estadística convencional, asumen que los datos son independientes (Harvey & Pagel, 1991). Debido a que las especies bajo estudio no están igualmente relacionadas existe la posibilidad de correlaciones espurias (Martins, 2000).

La presencia de un rasgo en una especie podría ser el resultado de una herencia filogenética más que una adaptación (Miles & Dunham, 1993).

La incorporación de las relaciones filogenéticas entre las especies permite incorporar una perspectiva histórica dentro de la evolución de caracteres (Armbruster, 1993; Brown y col., 2000) gracias al uso de métodos cladísticos para estimar una filogenia (Hennig, 1966), a partir de caracteres morfológicos, moleculares o ecológicos (Armbruster, 1993). El conocimiento de la filogenia de un grupo de especies, es decir, el patrón jerárquico de descendencia de ese grupo a partir de un ancestro común, sumado a la información acerca de los estados de caracteres en especies actuales, permite reconstruir los eventos históricos de evolución (Pagel, 1999) conociendo los patrones de cambio evolutivo que un carácter ha experimentado (Martins & Hansen, 1997). El uso de filogenias provee un sustrato que permite la evaluación de asociaciones evolutivas entre caracteres, es decir, si la aparición de un carácter es contingente a la aparición de otro; dicho de otra manera, si existe evidencia de cambio evolutivo correlacionado (Ackerly & Reich, 1999; Martins & Hansen, 1997). Además, al mapear caracteres morfológicos, ecológicos, de comportamiento y de historia de vida en la filogenia se puede evaluar si ellos representan herencias de un ancestro común o si se deben a eventos evolutivos repetidos e independientes (McLennan, 1994; Losos, 1990; Brown et al 2000).

En las angiospermas, la selección por parte de los polinizadores es reconocida como una de las fuerzas primordiales en la evolución floral (Kevan, 1983; Waser, 1983).

Por ello, en la presente tesis se estudiaron dos caracteres florales que han mostrado ser importantes en la relación entre planta y polinizador y por ende, en el proceso de reproducción (Galen & Newport, 1987; Stanton & Preston, 1988; Galen, 1989, 1996; Galen & Stanton, 1989; Young & Stanton, 1990; Herrera, 1993a, 1993b; Johnson y col., 1995; Johnson & Dafni, 1998; Totland y col., 1998)

El primer carácter floral estudiado fue la forma. La evolución de una amplia gama de formas florales se relaciona con el proceso que permite a los polinizadores discriminar entre flores de diferentes especies (Davenport & Lee, 1985). En el presente trabajo se estudia el grado de disección del contorno de la corola, es decir, la variación existente desde flores cuyos pétalos conforman un contorno redondeado hasta aquellas donde este contorno está marcadamente interrumpido por hendiduras superficiales entre los pétalos (Herrera, 1993a). Diversos estudios muestran la preferencia de abejas, mariposas, polillas y moscas-abeja por flores artificiales con contornos disecados (Hertz, 1935; Free, 1993; Herrera, 1993b; Kelber & Pfaff, 1997; Johnson & Dafni, 1998; pero ver Dafni, 1997 para un resultado contrario en escarabajos). Otros estudios muestran una mayor producción de frutos en flores con mayor grado de disección del contorno de la corola la que se asociaría con una mayor discriminación por parte de los insectos (Herrera, 1993b). Las flores con contornos disecados serían más detectables por insectos que se están moviendo debido a que generan un mayor estímulo de encendido y apagado ("visual flicker") en el ojo compuesto (Wolf & Zerrhan-Wolf, 1935; Anderson, 1977). El contorno de la corola ha sido estudiado evaluando la dimensión fractal del contorno (Herrera, 1993b) y con el uso de morfometría geométrica, específicamente con

“landmarks” (Herrera, 1993a) o bien en pruebas en que se ofrece modelos con distinto grado de disección del contorno de la corola a polinizadores (Johnson & Dafni, 1998).

El segundo carácter floral relevante es el tamaño floral. El tamaño floral es uno de los rasgos que ha concentrado mayor atención de los botánicos debido a que afectan el proceso de polinización. Estudios de campo muestran mayores tasas de visita a flores grandes por abejas en *Epilobium angustifolium* (Moller, 1995), por moscas sírfidos y abejas en *Raphanus sativus* (Stanton & Preston, 1988; Young & Stanton, 1990), en *Polemonium viscosum* (Galen & Newport 1987; Galen, 1989) y en *Sidalcea* (Ashman & Stanton, 1991), y mayores tasa de remoción de polen en *Raphanus sativus* (Young & Stanton, 1990). En *Campanula americana* en que se redujo artificialmente el tamaño floral también se encuentra una disminución en la tasa de visita de polinizadores (Johnson y col., 1995). Estudios realizados en laboratorio con flores artificiales revelan la misma tendencia de preferencias en mosca-abeja (Johnson & Dafni, 1998), en abejorros (Kugler, 1943; Brian, 1957), abejas melíferas (Free, 1970; Lehrer y col., 1995), polillas (Knoll, 1922; Brantjes, 1973) y escarabajos (Dafni, 1991b), como así también tiempos de búsqueda menor cuando se trata de flores de mayor tamaño (Spaethe y col., 2001). Existen diversos modos en que se ha estimado el tamaño floral. Entre ellos se cuentan diámetro floral o de la inflorescencia (Mulligan & Kevan, 1973; Spira, 1980; Bell, 1985, Galen & Newport, 1987; Kang & Primack, 1991), longitud del lóbulo de la corola (Ashman & Stanton, 1991), ancho (Galen, Zimmer & Newport, 1987), largo de la antera (Whalen, 1978), longitud del contorno (Kevan, 1970) y la proyección plana desde la dirección de aproximación del visitante (Dafni, 1991a, 1992; Herrera, 1993a).

Si se considera el tamaño desde la perspectiva de la evolución del sistema de reproducción, la transición hacia la autofertilización en varios taxa está asociada con la evolución de rasgos que facilitan la depositación del propio polen y reducción de asignación de recursos a estructuras florales (Ornduff, 1969; Arroyo, 1973; Cruden 1977; Ritland & Ritland, 1989). Se ha documentado que las flores de especies autóгамas son más pequeñas, menos vistosas y menos perfumadas que las flores de especies altamente exógamas (Arroyo, 1973; Vasek & Harding, 1976; Cruden, 1977; Wyatt, 1984a; Goodwillie, 1999). Strid (1970) halló un menor tamaño floral en *Nigella doerfleri* que en *N. arvensis* que es más exógama. Similar tendencia se encuentra en *Lycopersicon pimpinellifolium* (Rick y col., 1977), entre especies de *Trichostema* (Spira, 1980), en el género *Clarkia* donde tanto al nivel de especies, de subespecies y de poblaciones se encuentra que taxa autóгамos poseen flores más pequeñas que los exógamos (Vasek & Harding, 1976; Vasek & Weng, 1988). Sin embargo, Shoen (1982) usando el peso floral como indicador del tamaño floral, no halló correlación en *Gilia achilleifolia*.

Escasos son los estudios que han abordado la relación entre tamaño y contorno de la corola. Johnson y Dafni (1998) hallaron que flores artificiales con contornos de corola disecados eran más visitadas que flores del mismo tamaño con contornos menos disecados. Dafni y Kevan (1997) sugirieron que el contorno más complejo de la corola en flores pequeñas era una estrategia compensatoria dado que producirían más “parpadeo” (flicker”) en el sistema visual del insecto.

Con relación al tamaño floral, en *Alstroemeria*, Bayer (1987) distinguió 3 categorías de flores: pequeñas, medianas y grandes, pudiendo la longitud de los tépalos de las flores grandes duplicar la de las pequeñas. Un estudio realizado en *A. pallida* en que se disminuyó artificialmente el tamaño de las flores y en donde la flor quedaba sin sus guías de néctar, demostró que la tasa de visita de insectos disminuía (Cavieres y col., 1998). Este resultado ocurre sólo en la condición de parches de alta densidad, sugiriendo que tanto la densidad como el tamaño de las flores son señales importantes para el polinizador (Cavieres y col., 1998). Sin embargo, trabajos en que se disminuyó artificialmente el tamaño de los tépalos laterales de *A. ligtu* spp. *simsii* no mostraron cambios en la tasa de visita (Botto & Ojeda-Camacho, 2000).

Con relación a parámetros de la forma floral, todas las especie chilenas del género *Alstroemeria* poseen simetría bilateral (Bayer, 1987). Sin embargo, en la forma del contorno floral existe una gran variación resultado de la longitud y ancho de cada uno de los tépalos y del grado de yuxtaposición de ellos. Las especies varían desde aquellas cuyas flores poseen contornos muy redondeados, con alto grado de yuxtaposición entre los tépalos, es decir, con bajo grado de disección del contorno floral, hasta aquellas con bajo grado de yuxtaposición entre los tépalos y mayor grado de disección floral, generando un aspecto parecido a estrella. Un estudio que evaluó el efecto de la alteración de la simetría floral en los tépalos laterales (A2 y A3, Fig. 2 Modelo de Estudio) de *A. ligtu* spp. *simsii*, demostró ausencia de cambio en la tasa de visitas. Sólo se observó disminución en la tasa de visita cuando se extrajeron los tépalos

internos superiores (I1 e I2, Fig. 2 Modelo de Estudio) que son los poseen guías de néctar (Botto & Ojeda-Camacho, 2000).

Los escasos estudios sugieren que en *Alstroemeria* tamaño y simetría floral, siendo esta última uno de los aspectos de la forma floral, pueden jugar un papel importante en la atracción de los polinizadores y por ello, en el sistema de reproducción. Asumiendo que los caracteres florales pueden ser interpretados como rasgos que evolucionaron a través de presiones selectivas generadas por ejemplo, por polinizadores (Kevan, 1983; Waser, 1983), surge la posibilidad de analizar ambos caracteres desde una perspectiva evolutiva.

Los objetivos del presente trabajo fueron, en primer lugar, examinar la variación del tamaño floral y grado de disección del contorno de la corola de 21 taxa chilenos de *Alstroemeria*. En segundo lugar, evaluar las correlaciones evolutivas entre caracteres florales y entre éstos y caracteres reproductivos. Finalmente, se trazaron las trayectorias filogenéticas de los caracteres florales y de la razón P/O, como indicador del sistema de reproducción, mapeando los estados de los caracteres en el cladograma y reconstruyendo los caracteres ancestrales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

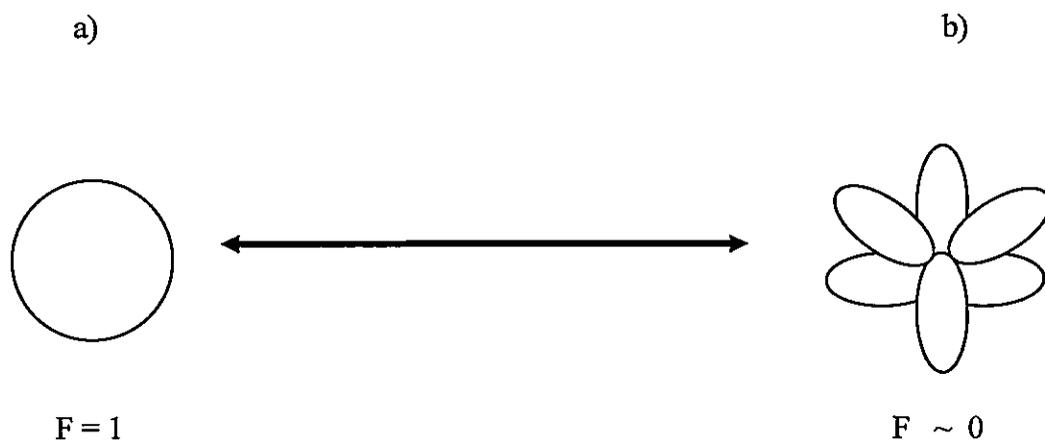
### I. GRADO DISECCIÓN DE LA COROLA

El grado de disección del contorno floral se evaluó a partir de fotografías tomadas a las flores en el terreno, con una cámara digital AGFA ePhoto CL30 Clik™ con una resolución de 640x1420 pixeles. Se eligieron flores que no tuvieran rastro de daño por herbívoros. Las flores fueron cortadas del eje floral y colocadas en un soporte frente a una cámara digital que captura la proyección plana frontal de la flor (Dafni, 1991a, 1992, 1994; Herrera, 1993a). Las flores se fotografiaron con un fondo negro. Las fotografías se procesaron con la ayuda del programa Adobe® Photoshop 5.0 con el que obtuvo imágenes en blanco y negro. El estudio se realizó en un total de 21 taxa pertenecientes a 19 especies (Tabla 1.1). Las mediciones se realizaron en una flor por individuo y el número promedio de individuos muestreados en cada taxon fue de 47,76 (desviación estándar = 5,18) con un mínimo y un máximo de 35 y 56, respectivamente. Con la ayuda del programa SigmaScan Pro 5.0.0 se computó el “factor de forma” floral definido por la siguiente fórmula:

$$F = \frac{4 \pi A}{P^2} \quad \text{Donde } A = \text{área, } P = \text{perímetro}$$

El factor de forma varía desde valores de 1 en objetos completamente redondos hacia valores cercanos a 0 en aquellos objetos cuyo contorno es más disecado, con una menor razón área/perímetro para objetos redondos de la misma área (Fig. 3.1).

Figura 3.1. Grado de disección del contorno floral. Se muestra la variación posible de contornos florales en *Alstroemeria* y sus valores de factor de forma asociados. a) contorno de corola semejante a un círculo con factor de forma igual a 1 y b) contorno de corola complejo con factor de forma cercano a 0.



## II. TAMAÑO DE LA COROLA

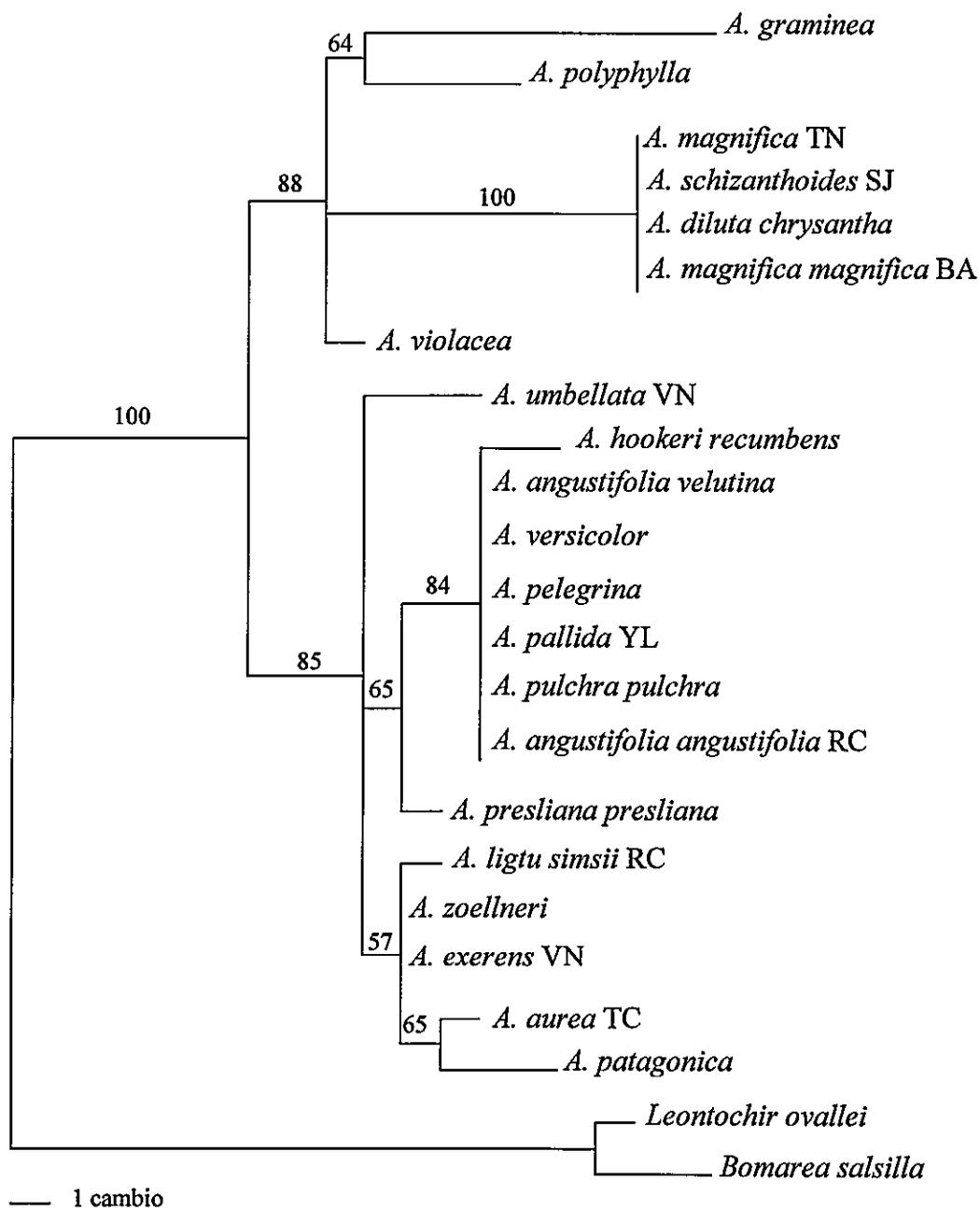
El tamaño de la corola se evaluó como la proyección plana de la corola (Dafni, 1991a, 1992, 1994; Herrera, 1993a) a partir de las mismas fotografías con las cuales se evaluó el grado de complejidad de la forma de la corola usando el programa SigmaScan Pro 5.0.0 que calcula dicha variable. El número de individuos muestrados es el mismo que en el estudio de la complejidad del contorno de la corola.

## III. CORRELACIÓN ENTRE CARACTERES Y FILOGENIA

Para el estudio de evolución de caracteres tamaño y factor de forma floral, y de la razón P/O, se construyó una hipótesis filogenética que contiene sólo los 21 taxa estudiados, más las dos especies de grupo externo. Las relaciones filogenéticas entre los taxa de *Alstroemeria* usados en este estudio se derivan del análisis filogenético mayor, presentado en el capítulo 1, y que comprende un número mayor de especies. Los 9 árboles más parsimoniosos obtenidos sólo se diferencian en el orden en que se presentan sus ramas, por lo tanto, se escogió uno al azar (Fig. 3.2). En todos los análisis realizados se usó el promedio de la especie para cada carácter.

El análisis de las relaciones filogenéticas basadas en datos moleculares evita el riesgo de circularidad en el que se puede incurrir al utilizar caracteres para construir la filogenia que pueden estar correlacionados, genética o funcionalmente, con aquellos caracteres que se mapean (Brooks & McLennan, 1991; Armbruster, 1993; de Queiroz, 1996; pero ver Härlin, 1999).

Figura 3.2 . Filograma de uno de los 9 árboles más parsimoniosos resultantes del análisis de máxima parsimonia de las secuencias del espaciador *trnF-ndhJ*, para los 21 taxa de *Alstroemeria* en los cuales se estudió la evolución de caracteres. El número sobre las ramas es el valor de bootstrap mayor que 50% para 500 réplicas.



La evaluación de la existencia de evolución correlacionada entre caracteres se realizó utilizando el criterio de máxima verosimilitud implementada en el programa Continuous (Pagel, 1997, 1999). Se calcula un estadístico, la razón de verosimilitud (LR) que compara la bondad de ajuste de un modelo simple con un modelo que contiene los parámetros que representan los procesos evolutivos que se desea estimar ( $LR = -2 \log_e (H_0/H_1)$ ), donde  $H_0$  representa el modelo nulo, más simple, y  $H_1$  el modelo alternativo que contiene los parámetros que representan el proceso evolutivo que se desea estimar. Cuando el modelo más simple es un subconjunto del más complicado, el estadístico LR se distribuye asintóticamente como chi-cuadrado con grados de libertad iguales a la diferencia en el número de parámetros entre los dos modelos. En este caso en modelo simple ( $H_0$ ) lo constituye aquel que contempla evolución independiente de los rasgos y el modelo complejo es el que sí la contempla ( $H_1$ ).

La reconstrucción de estados ancestrales y el mapeo de los estados de los caracteres en el cladograma se llevaron a cabo utilizando métodos basados en el principio de parsimonia, es decir, aquel que minimiza el número de cambios de carácter ocurridos en la historia evolutiva de ese carácter para producir la diversidad observada entre las especies contemporáneas (Maddison, 1991; Pagel, 1999). Específicamente, se usó parsimonia cuadrática ponderada implementada en el programa Mesquite (Maddison & Maddison, 2004). Esta aproximación toma en cuenta tanto el cambio de los estados del carácter a través de las ramas como el largo de las mismas, específicamente, minimiza la suma de los cambios cuadráticos, dividida por el largo de las ramas (Maddison, 1991; Webster & Purvis, 2002).

Para el cálculo de las razones de verosimilitud es necesario determinar cuál de dos modelos explica mejor la evolución de los caracteres en estudio. Uno de ellos, el más simple, no considera una tendencia hacia una dirección dominante de cambio evolutivo, en cambio el segundo sí lo hace, es decir, el valor del estado del carácter se hace mayor o menor desde los ancestros hacia las especies actuales (Pagel, 1997, 1999). Una vez que se ha determinado cuál de los modelos representa mejor la evolución de los caracteres bajo estudio, se calcula el parámetro  $\lambda$  que estima la influencia de la filogenia en la evolución de rasgos.  $\lambda$  igual a 0 quiere decir que se asume una filogenia en forma de "estrella", donde la evolución de un carácter es independiente de las relaciones filogenéticas entre las especies,  $\lambda$  menor a 1 implica que la historia filogenética tiene mínimo efecto y  $\lambda$  igual a 1 cuando sí la tiene (Pagel, 1997, 1999). El cálculo de la razón de verosimilitud antes descrito, para detectar evolución correlacionada de caracteres, se hizo estimando tanto en el modelo nulo como en el alternativo, los valores del parámetro  $\lambda$ .

Dado que las politomías interfieren en la reconstrucción de la evolución de los caracteres (Maddison, 1989) y que la reconstrucción de estados ancestrales por parsimonia cuadrática ponderada no permite incluirlas, tanto para estos análisis como para la evaluación de evolución correlacionada se resolvieron las politomías presentes en el cladograma. Estas fueron interpretadas como politomías "blandas", es decir como incertezas acerca de las relaciones evolutivas de los taxa involucrados (Maddison, 1989). Si bien algunos autores recomiendan como método para solucionar estas politomías el considerar el largo de ramas entre los nodos internos como igual a 0

(Felsenstein, 1985; Purvis & Garland, 1993), este procedimiento no permite utilizar el criterio de parsimonia cuadrática.

Dado que la mayoría de las politomías presentadas por la hipótesis filogenética provienen de la presencia de secuencias idénticas entre taxa, la forma de resolución de éstas fue arbitraria, creando un patrón de ramificación al azar dentro de la politomía, asignándole un largo de ramas pequeño, igual a  $10^{-6}$ . Para explorar en qué grado la resolución de politomías elegida afecta el análisis de evolución correlacionada y la reconstrucción de los estados ancestrales, ambos análisis se llevaron a cabo en dos topologías alternativas resueltas de distinta manera, comparándose sus resultados.

#### IV. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Con relación a los caracteres florales tamaño y complejidad del contorno de la corola, previo al análisis de los datos, se probó la normalidad (Test Kolmogorov Smirnov) y homocedasticidad (Test Levine) de los datos. En caso de no cumplir con algunos de estos requisitos se usó estadística no paramétrica. Para detectar diferencias en el tamaño floral y en el factor de forma entre los taxa estudiados se llevó a cabo, en cada caso, un ANDEVA de una vía.

## RESULTADOS

### I. GRADO DE DISECCIÓN DE LA COROLA

La variación en la complejidad del contorno de la corola entre las distintas especies de *Alstroemeria* es significativa (ANDEVA 1 vía,  $F = 105,3$  g.l.= 20  $p < 0,001$ ). La amplitud de valores van desde especies con altos valores de factor de forma y, por lo tanto, con un contorno redondeado, hasta aquellas que presentan un contorno más complejo o disecado (Tabla 3.1). En el primer grupo destaca *A. umbellata*, con el valor de factor de forma más alto, 0,49, y en el otro extremo, *A. hookeri* ssp *recumbens* la que posee flores con la forma más compleja o disecada, con valor de factor de forma de 0,13.

### II. TAMAÑO COROLA

El tamaño floral mostró variación significativa (ANDEVA 1 vía,  $F = 372,94$  g.l.= 20  $p < 0,001$ ). El tamaño de la corola varía desde 1,5 cm<sup>2</sup> en *A. graminea* hasta 25,4 cm<sup>2</sup> en *Alstroemeria magnifica* TN, la especie con flores más grandes (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Tamaño y factor de forma floral para 21 taxa chilenos de *Alstroemeria*.

La nomenclatura es la misma que la contenida en la Tabla 1.1.

Taxon	Tamaño floral (cm <sup>2</sup> ) ± 2 EE	Factor de forma floral ± 2 EE
<i>A. angustifolia</i> ssp. <i>angustifolia</i> Q	6,417 ± 0,308	0,291 ± 0,018
<i>A. angustifolia</i> ssp. <i>velutina</i>	6,570 ± 0,438	0,367 ± 0,020
<i>A. aurea</i> TC	10,317 ± 0,744	0,193 ± 0,014
<i>A. diluta</i> ssp. <i>chrysantha</i>	4,412 ± 0,258	0,327 ± 0,018
<i>A. exerens</i> VN	14,697 ± 0,890	0,361 ± 0,018
<i>A. graminea</i>	1,545 ± 0,162	0,299 ± 0,016
<i>A. hookeri</i> ssp. <i>recumbens</i>	4,450 ± 0,234	0,134 ± 0,010
<i>A. ligtu</i> ssp. <i>simsii</i> RC	6,272 ± 0,410	0,242 ± 0,012
<i>A. magnifica</i> TN	25,445 ± 1,766	0,375 ± 0,014
<i>A. magnifica</i> ssp. <i>magnifica</i> BA	21,679 ± 1,442	0,371 ± 0,012

Tabla. 3.1. Continuación

Taxon	Tamaño floral (cm <sup>2</sup> ) ± 2 EE	Factor de forma floral ± 2 EE
<i>A. pallida</i> YL	9,530 ± 0,598	0,286 ± 0,014
<i>A. patagonica</i>	2,184 ± 0,116	0,390 ± 0,016
<i>A. pelegrina</i>	21,136 ± 1,358	0,318 ± 0,012
<i>A. polyphylla</i>	2,416 ± 0,156	0,249 ± 0,022
<i>A. presliana</i> ssp. <i>presliana</i>	7,696 ± 0,251	0,262 ± 0,022
<i>A. pulchra</i> ssp. <i>pulchra</i>	5,903 ± 0,183	0,335 ± 0,018
<i>A. schizanthoides</i> SJ	5,756 ± 0,166	0,384 ± 0,018
<i>A. umbellata</i> VN	6,743 ± 0,220	0,491 ± 0,022
<i>A. versicolor</i>	4,634 ± 0,108	0,210 ± 0,016
<i>A. violacea</i>	23,507 ± 0,782	0,305 ± 0,014
<i>A. zoellneri</i>	5,354 ± 0,190	0,176 ± 0,010

### III. CORRELACIÓN ENTRE CARACTERES Y FILOGENIA

El resultado del test que evalúa la influencia de las relaciones filogenéticas en la evolución de los caracteres revela que la evolución tanto del tamaño como del factor de forma floral es independiente de las relaciones filogenéticas entre las especies, con un lamda igual a 0 (Tabla 3.2). En el caso de la razón polen-óvulo, la estimación de lamda es de 0,928, el que resulta ser significativamente distinto de 0. Si se realiza el test de máxima verosimilitud que compara un modelo en que lamda toma el valor 1 (i.e. existe efecto filogenético en la evolución del carácter) con otro que considera el lamda estimado (0,928) resulta ser significativo ( $p < 0,05$ ), es decir, el lamda estimado es diferente de 1, indicando que la filogenia sólo tiene cierta influencia en la evolución de los caracteres analizados (Tabla 3.2). Dado que para los tres caracteres evaluados lamda resulta ser distinto de 1, valor que toma ese parámetro “por defecto” en los análisis, para cada uno de los siguientes análisis se estimó el parámetro lamda.

El test de razón de máxima verosimilitud entre el modelo que considera o no la direccionalidad en el cambio evolutivo de los rasgos, resultó no ser significativo, en los tres caracteres estudiados. Ello indica que el modelo que describe mejor la evolución tanto de la razón P/O como del tamaño y complejidad del contorno de la corola es el no direccional (Tabla 3.3). Este es el modelo que se adoptó en los cálculos que siguen.

Tabla 3.2. Valores del parámetro  $\lambda$  para cada uno de los caracteres y test de razón de máxima verosimilitud que compara un modelo de ausencia de efecto filogenético en la evolución de caracteres ( $H_0$ ) con  $\lambda = 0$  con el modelo en que  $\lambda$  se estima con máxima verosimilitud. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Carácter	$\lambda$ estimado	Ln LR	g.l	p
Tamaño floral	0	0	1	1
Factor de forma floral	0	0	1	1
Razón P/O	0,928	2,527	1	$p < 0,05^*$

Tabla 3.3. Test de razón de máxima verosimilitud que compara el modelo no direccional ( $H_0$ ) con el modelo direccional de cambio evolutivo ( $H_1$ ), con  $\lambda$  estimados simultáneamente por máxima verosimilitud. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Carácter	Ln LR	g.l	p
Tamaño floral	1,413	1	0,093
Factor de forma floral	0,406	1	0,367
Razón P/O	1,536	1	0,080

El resultado del test que compara el modelo de evolución independiente con el de evolución correlacionada resultó no significativo para todas las combinaciones entre los caracteres. De ellos se concluye que en *Alstroemeria* tanto la razón polen-óvulo como el tamaño y el factor de forma floral evolucionan independientemente entre sí (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Correlaciones entre caracteres florales y reproductivos bajo un modelo de cambio evolutivo no direccional. Valores de p de los test de razones de máxima verosimilitud que compara el modelo de evolución independiente ( $H_0$ ) con el modelo de evolución correlacionada ( $H_1$ ), con  $\lambda$  estimados simultáneamente por máxima verosimilitud.

Caracteres	Coefficiente de correlación	Ln LR	g.l.	p
Tamaño y factor de forma floral	0,238	0,613	1	0,268
Tamaño y razón P/O	0,348	1,358	1	0,099
Factor de forma floral y razón P/O	-0,285	0,890	1	0,182

Dada la ausencia de efecto filogenético en la evolución de los caracteres tamaño y grado de disección de la corola y del escaso efecto filogenético en el caso de la razón P/O, es posible calcular coeficientes de correlación basados en la estadística clásica, que toma cada punto como datos independientes. La correlación entre los caracteres resulta ser no significativa tanto entre el tamaño de la corola y el factor de forma floral (coeficiente de correlación producto-momento de Pearson  $r = 0,25$   $p = 0,28$ ) (Fig. 3.3a), como entre el tamaño de la corola y la razón P/O (coeficiente de correlación producto-momento de Pearson,  $r = 0,34$   $p = 0,13$ ) (Fig. 3.3b) y entre el factor de forma floral y la razón P/O (coeficiente de correlación producto-momento de Pearson  $r = -0,29$   $p = 0,2$ ) (Fig. 3.3c).

Figura 3.3. Correlaciones entre caracteres florales y reproductivos.  $r =$  coeficiente de correlación producto-momento de Pearson.

a) tamaño de la corola y factor de forma floral.  $r = 0,25$   $p = 0,28$

b) tamaño de la corola y razón P/O.  $r = 0,34$   $p < 0,13$

c) factor de forma floral y razón P/O.  $r = -0,29$   $p < 0,20$

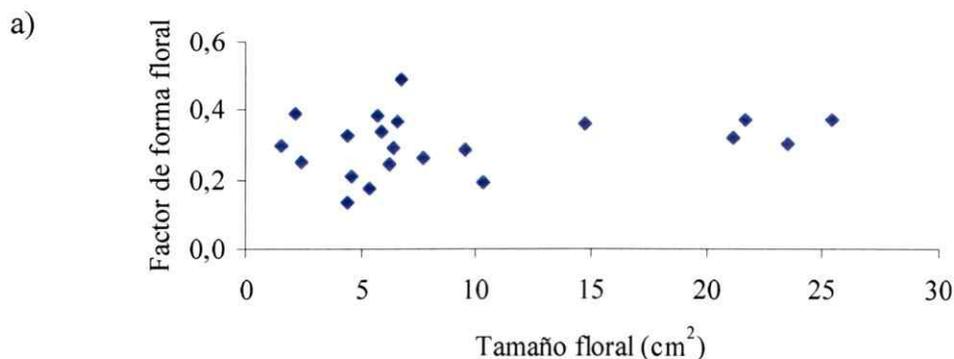
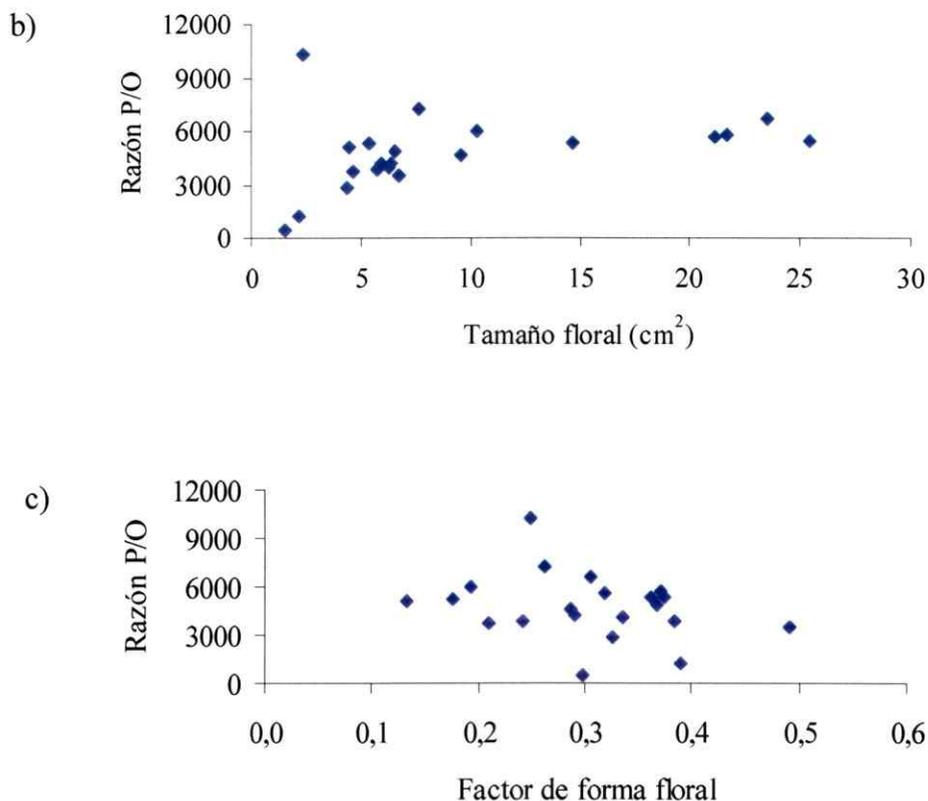


Figura 3.3. Continuación



La trayectoria evolutiva del tamaño de la corola muestra, en términos muy generales, evolución en el clado norte de especies con tamaños florales, en promedio, mayores que las del clado sur, a partir de un ancestro con flores de tamaño intermedio (14,5 cm<sup>2</sup>). Sin embargo, existe evolución paralela de tamaños florales grandes en ambos clados. Esto ocurre en especies que habitan ambientes costeros, *A. magnifica* ssp. *magnifica* BA, *A. magnifica* TN y *A. violacea* en el clado norte y *A. pelegrina* en el clado sur (Fig. 3.4, Tabla 3.1). También existe evolución paralela de tamaños florales

pequeños en ambos clados, representado por *A. graminea* y *A. polyphylla* en el norte y *A. patagonica* en el sur. Es destacable que tamaños florales muy diferentes están ampliamente distribuidos en todo el cladograma y no restringidos en solo un clado o subclado. Es el caso de *A. patagonica* y *A. aurea* y, dentro del subclado con politomías del clado norte, *A. diluta* ssp. *chrysantha* y *A. schizanthoides* en comparación con las ya nombradas *A. magnifica* ssp. *magnifica* y *A. magnifica* TN.

La trayectoria evolutiva del factor de forma floral (Fig. 3.5) revela que no existe una tendencia evolutiva clara entre ambos clados, los que poseen un ancestro común que presenta valores intermedios de factor de forma floral (0,31). Destaca la evolución en sólo una ocasión de un contorno de corola extremadamente redondo, en *A. umbellata*. Por el contrario, de factores de forma pequeños, que reflejan corolas con contornos muy disecados, han evolucionado en repetidas ocasiones y sólo en el clado sur (e.g. *A. hookeri* ssp. *recumbens*, *A. zoellneri*, *A. aurea*). En el clado norte sólo *A. polyphylla* (Tabla 3.1) presenta un grado de disección de la corola casi comparable a las anteriores especies, pues el resto de las especies poseen, en general, contornos redondeados. En el factor de forma, al igual que en el tamaño floral, se presentan estados del carácter muy diferentes entre especies muy cercanas, situación que se da principalmente en el clado sur. Ejemplo de ello es *A. hookeri* ssp. *recumbens*, especie con corola muy disecada, y *A. angustifolia* ssp. *velutina* y *A. pulchra* ssp. *pulchra*, con contornos florales más redondos; entre *A. patagonica*, con corola redondeada y *A. aurea*, con mayor disección del contorno floral.

Figura 3.4. Reconstrucción de estados ancestrales del carácter tamaño de corola expresado como área ( $\text{cm}^2$ ). La reconstrucción fue hecha con el criterio de parsimonia cuadrática implementada en el programa Mesquite. El patrón de ramificación dicotómico, a nivel de los nodos terminales, es arbitrario ( ver Fig. 3.2).

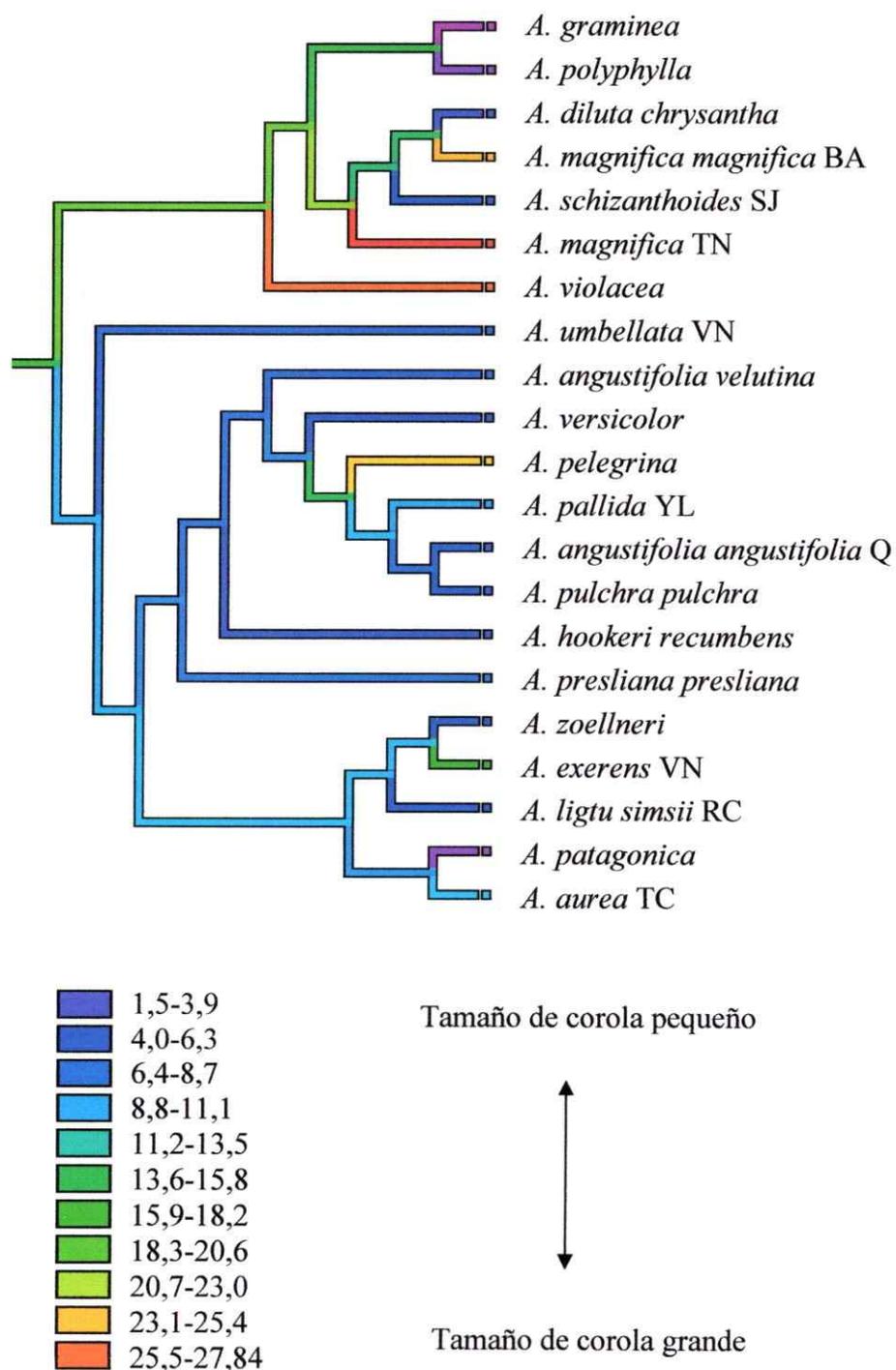
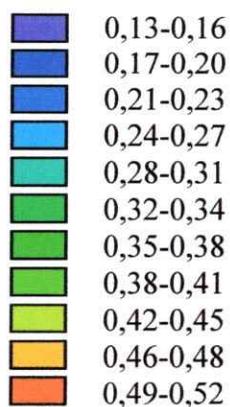
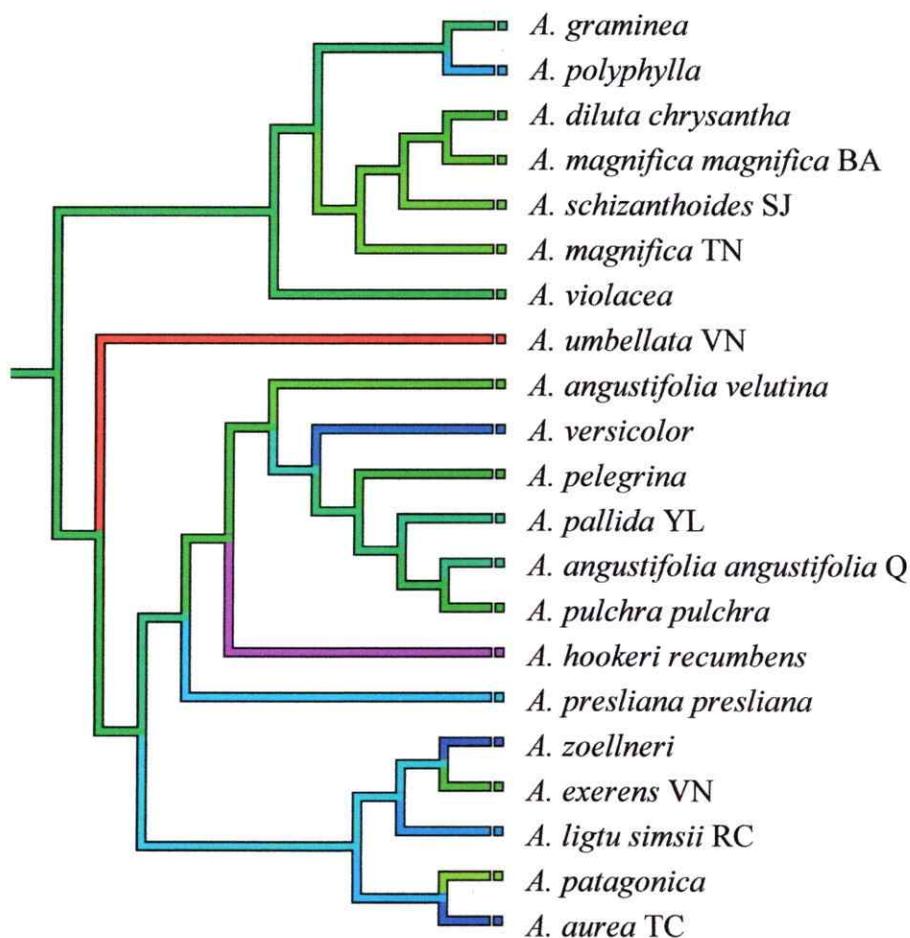


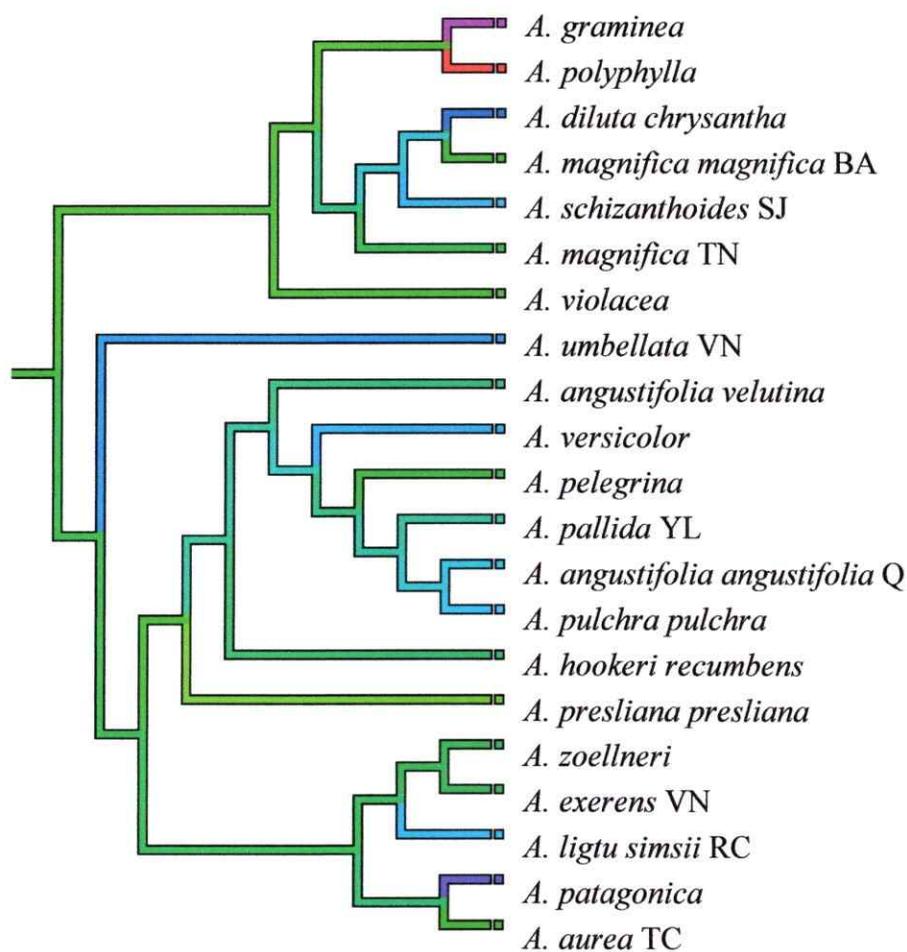
Figura 3.5. Reconstrucción de estados ancestrales del carácter contorno de la corola descrito por el factor de forma floral. La reconstrucción fue hecha con el criterio de parsimonia cuadrática implementada en el programa Mesquite. El patrón de ramificación dicotómico, a nivel de los nodos terminales, es arbitrario ( ver Fig. 3.2).



La razón P/O (Fig. 3.6) muestra una leve tendencia en la evolución hacia razones P/O mayores en el clado norte a partir de un ancestro con valores intermedios (6045). Existe evolución independiente de especies con valores muy pequeños, *A. graminea* en el clado norte y *A. patagonica* en el clado sur (Tabla 3.1). La evolución de una razón P/O extremadamente elevada ocurre sólo en una oportunidad, en *A. polyphylla*, y en menor medida en *A. presliana* ssp. *presliana*, ambas en clados diferentes, lo que también sugiere evolución independiente. Al igual que en los caracteres florales ya discutidos, se encuentran razones P/O muy diferentes en especies cercanas. Es el caso de *A. graminea* y *A. polyphylla* en el clado norte y de *A. patagonica* y *A. aurea* en el clado sur.

Los resultados obtenidos con filogenias donde la politomía se resolvió con una topología alternativa, resultaron ser prácticamente similares (datos no mostrados) a la primera forma de resolución. Otros estudios recomiendan la elección al azar de uno de los árboles con politomías resueltas (Ackerly & Reich, 1999) dado que tienen poca influencia en el análisis de las correlaciones entre rasgos (Donoghue & Ackerly, 1996; Rice y col., 1997).

Figura 3.6. Reconstrucción de estados ancestrales del carácter razón polen-óvulo. La reconstrucción fue hecha con el criterio de parsimonia cuadrática implementada en el programa Mesquite. El patrón de ramificación dicotómico, a nivel de los nodos terminales, es arbitrario ( ver Fig. 3.2).



Autogamia



Exogamia

## DISCUSIÓN

La discusión del presente capítulo se enfocará en tres aspectos: a) la evolución correlacionada de los caracteres florales y reproductivos, b) las trayectorias evolutivas de los caracteres con énfasis en la evolución de la autogamia y c) limitaciones de este estudio.

Uno de los resultados más destacables del presente estudio es la ausencia de correlaciones evolutivas significativas entre caracteres florales, y entre estos y la razón P/O, al considerar los 21 taxa bajo estudio (Tabla 3.4). Esto sugiere que no existe una relación biológica intrínseca entre los cambios evolutivos en los caracteres. Sin embargo, se discutirán casos puntuales donde se sugiere una correspondencia entre caracteres.

Específicamente, si bien la evolución del tamaño floral no estuvo asociada a la evolución de la razón P/O en *Alstroemeria*, existe la tendencia de que a mayor tamaño floral mayor sea la razón P/O (Tabla 3.4), la que es un indicador de exogamia. Numerosos estudios muestran correspondencias entre flores de mayor tamaño en especies o poblaciones exógamas y más pequeñas en poblaciones autógamas (Ornduff, 1969; Rick y col., 1978; Wyatt, 1984a; Schoen, 1982; Geordiady & Lord, 2002). El

tamaño floral en poblaciones exógamas tendría como mecanismo subyacente la selección mediada por polinizadores los que muestran mayor preferencia por flores con ese tamaño (Galen & Newport, 1987; Stanton & Preston, 1988; Galen, 1989, 1996; Galen & Stanton, 1989; Totland y col., 1998; Young & Stanton, 1990; Johnson y col., 1995). A pesar de la ausencia de correlación evolutiva significativa al considerar todas las especies en estudio, es muy evidente que en las especies autógamas de *Alstroemeria* (*A. patagonica* y *A. graminea*) ha evolucionado tamaños florales pequeños.

La evolución de la razón P/O no se correlaciona significativamente con la evolución del factor de forma floral aunque existe la tendencia de que a mayor razón P/O y por ende, mayor exogamia, existan contornos florales más disecados o complejos (Tabla 3.4). Esta tendencia se presenta de forma muy acentuada en *A. polyphylla*, especie con flores de contorno muy disecado y con el valor más elevado de razón P/O de todas las especies estudiadas.

Si bien en el género *Alstroemeria* no existe correlación evolutiva significativa entre el tamaño y la complejidad del contorno de la corola (Tabla 3.4), existe una fuerte tendencia de que a mayor tamaño floral más redondo o menos disecado es el contorno de la corola. Esto es muy evidente en las especies del norte *A. magnifica* ssp *magnifica* BA. *A. magnifica* TN y *A. pelegrina*. Inversamente, *A. polyphylla*, tiene flores pequeñas y con elevado grado de disección floral. El hecho de que sea, con mucha probabilidad, una especie altamente exógama (gran razón P/O) implica su dependencia por parte de polinizadores. Se ha propuesto que flores pequeñas tienden a poseer márgenes más

disecados que las flores grandes, en respuesta a la selección por mayor atracción para los polinizadores (Dafni & Kevan, 1997).

Con respecto a la trayectoria evolutiva de los caracteres florales y de la razón P/O, el mapeo de los caracteres permitió la determinación de los caracteres ancestrales y trazar las direcciones de cambio, en los caracteres bajo estudio. Uno de los resultados más importantes del presente estudio fue hallar que la evolución de la autogamia, inferida a partir de la razón P/O, se ha producido en forma independiente en dos oportunidades, en especies pertenecientes a clados distintos. Estas especies, *A. graminea* y *A. patagonica*, viven en los extremos norte y sur de la distribución del género en Chile, en el desierto costero de la II Región y en la estepa patagónica de las XI y XII Regiones, respectivamente. La evolución independiente de estados de un carácter refleja la capacidad de cambio o labilidad evolutiva de ese carácter. Una segunda expresión de la labilidad en la evolución de caracteres se refiere a la presencia de especies cercanas, e.g. dentro de un subclado, con estados del carácter muy diferentes. En *Alstroemeria*, esto ocurre tanto en el clado norte como en el clado sur (ver Resultados). Pocos estudios abordan, aunque sea tangencialmente, la razón P/O desde el punto de vista evolutivo. Mione y Anderson (1992) sugieren evolución paralela de la razón P/O en especies autoincompatibles, en 2 grupos monofiléticos y hermanos de *Solanum*; McMullen y Stella (datos no publicados) encontraron en las Islas Galápagos, que la razón P/O era un carácter no variable, representando un efecto del ancestro. Otros estudios relativos a la evolución del sistema de reproducción también han encontrado evidencia de labilidad. Se han encontrado paralelismos y reversiones en *Dalechampia* (Armbruster, 1993),

múltiples orígenes de la autocompatibilidad en *Linanthus* (Goodwillie, 1999), evolución en repetidas ocasiones de la autofertilización en *Houstonia* (Church y col., 2003), y evolución independiente de especies autógamas en *Tarasa* (Tate & Simpson, 2004).

El cambio evolutivo también es dinámico en el tamaño floral. Se detectó evolución independiente, tanto en el clado norte como en el sur, de tamaños florales grandes y pequeños. Evidencia similar se tiene en *Disa* donde se ha visto evolución de flores grandes a partir de pequeñas en dos oportunidades en clados distantes asociada a cambios en el sistema de polinización (Johnson y col., 1998). En *Streptocarpus* se halló una tendencia al aumento de tamaño floral con reversiones a flores pequeñas en algunas especies, en donde tanto diferencias en tamaño como en la forma aparecen muy temprano durante ontogenia (Harrison y col., 1999). En *Tarasa* el cambio de exogamia a autogamia implicó reducción en la morfología floral (Tate & Simpson, 2004). En Veroniceae, flores ancestrales fueron pequeñas con lóbulos y tubos de corola moderadamente cortos, con surgimiento 4 veces de tubos de corola largos y dos veces de lóbulos de corola grandes (Kampny. & Dengler, 1997).

Con relación al grado de disección del contorno floral, su trayectoria evolutiva no ha sido estudiada con anterioridad pero, sin embargo, puede afirmarse que en *Alstroemeria*, es extraordinariamente dinámico. Con relación al grado de complejidad del contorno de la corola, *Alstroemeria* parece tener un ancestro con una corola poco disecada. Esto parece ser congruente con el hecho que los géneros hermanos *Bomarea* y *Leontochir* (Aagesen & Sanso, 2003) siendo *Bomarea* probablemente ancestral a

*Alstroemeria* (Hunziker & Xifreda, 1990) presentan flores con simetría radial (Bayer, 1998), y con una forma del contorno de la corola muy parecida a las especies de *Alstroemeria* con baja complejidad del contorno de la corola.

Finalmente, es necesario establecer las restricciones que presenta este estudio. El valor de utilizar la aproximación filogenética en el estudio de evolución de caracteres está limitado por la capacidad de la filogenia de reflejar la verdadera historia evolutiva del grupo (Goodwillie, 1999). La hipótesis filogenética generada para las especies chilenas de *Alstroemeria* resulta potente para separar las especies en dos grandes clados, sin embargo, a nivel de los subclados terminales no presenta una buena resolución. Esto conlleva a que sólo sea posible analizar las trayectorias evolutivas comparando los estados de caracteres del ancestro más antiguo con el de las especies actuales. No es posible detectar direcciones del cambio evolutivo de los caracteres, en nodos cercanos a las especies actuales lo que habría permitido un análisis en ese nivel. Sin embargo, hay que destacar que el mapeo de caracteres se realizó sobre una filogenia que contiene ca. el 50% de las especies chilenas (ca. 25% de las especies totales del género) y que la adición de nuevos taxa probablemente no afectará las conclusiones sobre origen independiente de los caracteres pues el submuestreo tiende a infraestimar el número de orígenes independientes de los rasgos (Johnson y col., 1998). Por ello, a pesar de las restricciones mencionadas anteriormente, los resultados presentados en este capítulo representan un aporte novedoso en el estudio de la evolución de caracteres.

## DISCUSIÓN GENERAL

El presente estudio permitió establecer las relaciones filogenéticas dentro de las especies chilenas del género *Alstroemeria* y determinar los patrones de evolución del sistema reproductivo y de los caracteres tamaño y forma florales.

El análisis de las relaciones filogenéticas dentro de las especies chilenas del género *Alstroemeria* reveló la existencia de dos clados principales, con una fuerte correspondencia geográfica. La incapacidad del marcador para resolver algunos clados terminales podría ser consecuencia de la presencia de numerosas politomías, lo que podría deberse a una diversificación reciente.

La evolución del sistema de reproducción, inferido a partir de la trayectoria evolutiva de la razón P/O, habría consistido en un ancestro facultativamente exógamo (Fig. 3.6). Si bien la regresión entre razón P/O e IAF es significativa (Fig. 2.2), sólo permite la adjudicación a una categoría reproductiva en las especies cuyos valores de razón P/O son extremos. Los resultados de IAF e IAI permiten sugerir la evolución, a partir de este ancestro, de especies exógamas obligadas, tales como *A. aurea*, *A. angustifolia* ssp. *angustifolia* RC y *A. ligtu* ssp. *simsii* YL, y los datos de razón P/O permiten sugerir la evolución de linajes que permanecieron en la condición de exógamas

facultativas o que evolucionaron hacia la autogamia facultativa u obligada. La influencia de otros factores, además de la razón P/O, en el sistema de reproducción junto con la presencia de grandes politomías impide evaluar la trayectoria exacta del sistema de reproducción en los nodos internos de la filogenia de *Alstroemeria*.

El resultado más concluyente del presente trabajo es la evolución independiente de algunos linajes de especies autógamas tales como *A. patagonica* y *A. graminea* a partir de ancestros más exógamos. Este resultado resulta similar al encontrado por otros autores en que linajes autógamos se originan de otros exógamos (Shoen y col., 1997; Johnson y col., 1998; Goodwillie, 1999; Tate & Simpson, 2004), lo que ha permitido que algunos autores sostengan que esta sería la tendencia evolutiva probablemente más común en las angiospermas en donde la autogamia sería una condición final (Lewis, 1954; Stebbins, 1957, 1974; Jain, 1976; Wyatt, 1988). Sin embargo, la evidencia aportada por otros estudios que muestran evolución de exogamia a partir de ancestros autógamos (Barret & Shore, 1987; Olmstead, 1989; Armbruster, 1993) hace que establecer generalizaciones acerca del sentido del cambio evolutivo de los sistemas de reproducción no parece adecuado para todas las angiospermas. La evolución de la autogamia en *Alstroemeria* ha ocurrido en asociación con la ocupación de hábitat temporales, pioneros o difíciles tal como ha sido descrito para otras especies (Stebbins, 1957; Grant & Grant, 1965; Ornduff, 1969; Ornduff, 1972; Raven, 1979; Tate & Simpson, 2004). Ambas especies de viven en los extremos de la distribución del género donde las precipitaciones no son predecibles, en el norte, y el viento y las bajas temperaturas imponen condiciones difíciles, en el sur.

Nuestros resultados confirman la estrecha relación existente entre forma de vida y sistema reproductivo (Arroyo & Squeo, 1990), específicamente, entre forma de vida anual y autogamia (Ornduff, 1969; Barrett y col., 1996; Da-Yong Zhang, 2000). En una de las dos especies autógamas, *A. graminea*, ha evolucionado la forma de vida anual. Bajo la teoría de la seguridad reproductiva (Stebbins, 1950), en anuales la autogamia es favorecida pues asegura producción de semillas cuando el éxito reproductivo a través de exogamia no es posible.

En *Alstroemeria*, la relación que se establece entre sistema de reproducción y caracteres florales es muy evidente en el caso de las especies autógamas. La evolución de la autogamia se asocia con la reducción del tamaño floral tal como ha sido descrito para otras especies (Schoen, 1977; Vasek & Weng, 1988) donde una causa sería la reducción del costo energético que involucra la flor (Ornduff, 1969). Además, se suma la presencia de contornos florales con bajo grado de disección probablemente como consecuencia de la no dependencia de polinizadores (Johnson & Dafni, 1998). En el caso de las especies facultativamente exógamas o exógamas obligadas, se observa una gama mayor de posibilidades de tamaño y complejidad del contorno floral, tal como quedó reflejada en la ausencia de correlación evolutiva entre esos caracteres (Tabla 3.4). Pueden encontrarse especies con tamaños florales grandes y con baja complejidad del contorno de la corola (e.g. *A. violacea*), tamaños florales intermedios con complejidades de contorno de corola grandes (e.g. *A. aurea*) o medianas (e.g. *A. presliana* ssp. *presliana*) o especies con tamaños florales pequeños asociados con una gran complejidad del contorno de la corola (e.g. *A. polyphylla*). Si bien en *Alstroemeria* es

importante el tamaño floral (y la integridad de las guías de néctar) (Cavieres y col., 1998; Botto-Mahan & Ojeda-Camacho, 2000), también lo es la densidad del parche de flores (Cavieres y col., 1998). Esto puede asociarse con el hecho que en *Alstroemeria* la presencia de inflorescencias con un número variable de flores (Bayer, 1987) y diverso grado de empaquetamiento (obs. pers.) hace que la unidad de "atracción" ("advertisement") pueda no ser sólo cada flor sino toda la inflorescencia como se ha sugerido para otras especies (Dafni y col., 1997). Cruden (1977) menciona especies altamente exógamas con flores pequeñas, pero agregadas en inflorescencias llamativas. Este factor, no evaluado en la presente tesis, podría influir en la ausencia de correlación evolutiva entre tamaño floral y sistema de reproducción (Tabla 3.4).

La gran variación de tamaño floral, dentro de una categoría reproductiva, podría ser el resultado de fuertes presiones selectivas locales tales como los polinizadores. Se ha demostrado una correlación entre tamaño de flores y de abejas polinizadoras en *Campanula punctata* (Inoue & Amano, 1986) y en *Streptocarpus*, donde la evolución de tamaños florales mayores probablemente ha ocurrido como respuesta adaptativa a polinizadores más grandes (Harrison y col., 1999). Cambios en la importancia relativa de diferentes especies de polinizadores, podrían causar cambios en determinados caracteres (Armbruster, 1993). En Chile, está ampliamente documentado el cambio en la composición del ensamble y disponibilidad de polinizadores con la latitud y altitud (Arroyo y col., 1983) por lo que es esperable que esto tenga consecuencias en la relación polinizador-flor. Por ejemplo, la ausencia de polinizadores típicos en una zona que es colonizada por una nueva población puede generar evolución de interacciones con otro

polinizadores o evolucionar hacia un sistema de reproducción autógeno (citas en Armbruster, 1993; Baker, 1955). Existe poca información de polinizadores para *Alstroemeria*, pero ella sugiere una relación entre tamaño del polinizador y tamaño floral. *A. aurea*, por ejemplo, que posee corola grande es principalmente polinizada por *Bombus dalhbohmii*, también grande, en el lado argentino (Aizen & Basilio, 1995) y *A. pallida* y *A. ligtu* ssp *simsii*, de tamaño intermedio, son visitadas principalmente por abejas también de tamaño intermedio (Uslar, 1982).

Los caracteres morfológicos de un organismo pueden estar sujetos a múltiples y, a veces, conflictivas presiones de selección (Galen, 1999). Por ejemplo, además de la atracción hacia polinizadores, también es importante la disponibilidad de recursos. La mayor atracción por flores grandes por parte de los polinizadores se puede contraponer al costo de manutención de las flores (Galen, 1999). Un estudio mostró la preferencia del polinizador por modelos del doble del tamaño promedio de las flores de *Linum pubescens* (Johnson & Dafni, 1998). Este factor puede estar operando en el género *Alstroemeria* pues muchas de las especies viven en el desierto, donde los recursos son muy limitantes. Un claro ejemplo podría ser *A. polyphylla*, especie endémica del desierto de la III Región que florece sólo en los años en que hay suficiente precipitación. Su alta razón P/O sugiere que es fuertemente exógama y su tamaño es pequeño. En este caso podría sugerirse que este hecho se “compensa” con un alto grado de disección del contorno de la corola que puede otorgar una mayor detección por los polinizadores (Johnson & Dafni, 1998).

El resultado más importante con relación a las trayectorias evolutivas tanto del sistema de reproducción como del tamaño y forma florales es la capacidad de cambio o labilidad evolutiva. Esta capacidad de cambio no sólo se ha demostrado en el sistema de reproducción (Goodwillie, 1999; Barrett, 2002; Church y col., 2003) sino en otros aspectos, tales como la forma de vida (Church y col., 2003) y sistema de polinización (Armbruster, 1993; Johnson y col., 1998). En general, la existencia de un rasgo lábil (gran número de convergencia y reversiones) sugiere que ese rasgo ha estado sometido a diversas presiones selectivas locales ambientales (Armbruster, 1993; Rolland y col., 1998). En Chile, existe gran variación latitudinal y altitudinal en el ensamble de polinizadores y en la disponibilidad de recursos (e.g. nutrientes del suelo, agua) que pueden actuar en ese sentido.

La evolución del género *Alstroemeria* en un ambiente con condiciones altamente cambiantes (citas en Aker y Healy, 1990) sería responsable en parte, de la gran diversificación de especies de *Alstroemeria* en nuestro país junto con un patrón de evolución de caracteres complejo.

## CONCLUSIONES

- Las relaciones filogenéticas dentro de las especies chilenas de *Alstroemeria* muestran la existencia de dos clados principales, concordantes con la distribución geográfica de las especies.
- La razón P/O es un indicador efectivo del sistema de reproducción en el género *Alstroemeria* de Chile, principalmente en los valores extremos de la razón.
- Las especies chilenas de *Alstroemeria* presentan sistemas de reproducción que varían desde la autogamia hasta la exogamia. La exogamia obligada está relacionada con autoincompatibilidad o con autocompatibilidad asociada a dicogamia. La autogamia está asociada con autocompatibilidad y elevada autofertilidad. Muchas especies tienen categorías intermedias o mixtas.
- La autogamia ha evolucionado independientemente en dos oportunidades, en especies que habitan en los márgenes de distribución del género en Chile y, en una especie, coincide con la evolución de un hábito anual. También habría ocurrido evolución en el sentido inverso, desde un ancestro probablemente exógamo facultativo hacia especies exógamas obligadas.

- El sistema reproductivo no se correlacionó evolutivamente con el tamaño y grado de disección del contorno floral, aunque existe la tendencia de que a mayor exogamia, mayor es el tamaño floral y mayor la complejidad del contorno de la corola.
  
- El patrón de cambio evolutivo muestra una gran labilidad, la que se expresa en estados de caracteres muy diferentes en especies cercanas. Posibles causas de este patrón serían las múltiples y conflictivas presiones de selección que operan sobre el sistema de reproducción y los caracteres florales, entre las cuales destacan los polinizadores y la disponibilidad de recursos. Estos últimos pueden variar, por ejemplo, en asociación a la migración a nuevos hábitat o a cambios históricos en la abundancia de precipitaciones.

## REFERENCIAS

- Aagesen, L. & A.M. Sanso. 2003. The phylogeny of the Alstroemeriaceae, based on morphology, *rps16* intron, and *rbcL* sequence data. *Systematic Botany* 28(1):47-69.
- Ackerly, D.A. & P.B. Reich. 1999. Convergence and correlation among leaf size and function in seed plants: a comparative test using independent contrast. *American Journal of Botany* 86(9):1272-1281.
- Aide, T.M. 1986. The influence of wind and animal pollination on variation in outcrossing rates. *Evolution* 40:434-435.
- Aizen, M.A. & A. Basilio. 1995. Within and among flower sex-phase distribution in *Alstroemeria aurea* (Alstroemeriaceae). *Canadian Journal of Botany* 73:1986-1994.
- Aizen, M.A. & E. Raffaele. 1996. Nectar production and pollination in *Alstroemeria aurea*: responses to level and patterns of flowering shoot defoliation. *Oikos* 76:312-322.
- Aizen, M.A., & A. Basilio. 1998. Sex differential nectar secretion in protandrous *Alstroemeria aurea* (Alstroemeriaceae): is production altered by pollen removal and receipt? *American Journal of Botany* 85:245-252.
- Aker, S. & W. Healy. 1990. The phytogeography of the genus *Alstroemeria*. *Herbertia* 46(2):76-87.
- Alves, R.M., Arter, A.S., Sebbenn, A.M. & A. Figueira. 2003. Mating system in a natural population of *Theobroma grandiflorum* (Willd. ex Spreng.) Schumm., by microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology* 26(3):373-379.

Armbruster, W.S. 1993. Evolution of plant pollination systems: hypotheses and test with the neotropical vine *Dalechampia*. *Evolution* 47:1480-1505.

Anderson, A.M. 1977. The influence of pointed regions on the shape preference of honeybees. *Animal Behavior* 25:88-94.

Appanah, S. 1990. Plant pollinator interactions in the Malaysian rain forest. *En*. Bawa, K.S., & M. Hadley (eds.), *Reproductive Ecology and Tropical Rain Forest Plants*. pp 85-102. UNESCO and Parthenon, Paris.

Arroyo, M.T.K. 1973. Chiasma frequency evidence on the evolution of autogamy in *Limnanthes floccosa* (Limnanthaceae). *Evolution* 27(4):679-688.

Arroyo M.T.K., Armesto, J & R Primack (1983) Tendencias altitudinales y latitudinales en mecanismos de polinización en la zona andina de los Andes Templados de Sudamérica. *Revista Chilena de Historia Natural* 56: 159-180.

Arroyo, M.T.K. & F. Squeo. 1990. Relationship between plant breeding systems and pollination. En Kawano, S (ed.), *Biological Approaches and Evolutionary Trends in Plants*, chapter 13. Academic Press, London.

Arroyo, M.T.K. & P. Uslar. 1993. Breeding systems in a temperate mediterranean-type climate montane sclerophyllous forest in central Chile. *Botanical Journal of the Linnean Society* 111: 83-102.

Ashman, T.L. & M.L. Stanton. 1991. Seasonal variation in pollination dynamics of sexually dimorphic *Sidalcea oregana* ssp. *spicata* (Malvaceae). *Ecology* 72:993-1003.

Assis, M.C. 2001. *Alstroemeria* L. (Alstroemeriaceae) do Brasil. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Assis, M.C. 2002. Novas espécies de *Alstroemeria* L. (Alstroemeriaceae) de Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 25(2): 177-182.
- Assis, M.C. 2003. Duas Novas espécies de *Alstroemeria* L. (Alstroemeriaceae) para o Brasil. *Acta Botânica Brasílica* 17(2): 179-182.
- Assis, M.C. & Mello-Silva, R. 2002. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Alstroemeriaceae. *Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo* 20:49-52.
- Baker, J.G. 1888. *Handbook of the Amaryllideae*. 216 pp. George Bells & Sons, London.
- Baker, H.G. 1955. Self compatibility and establishment of long distance dispersal. *Evolution* 9:337-349.
- Barrett, S.C.H. 1989. Mating-system evolution and speciation in heterostylous plants. *En* Otte., D. & J. Endler (eds.), *Speciation and its consequences*. pp. 257-283. Sinauer, Sunderland, M.A.
- Barrett, S.C.H. 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Reviews* 3:274-284.
- Barrett, S.C.H. & J.S. Shore. 1987. Variation and evolution of breeding systems in the *Turnera ulmifolia* L. complex (Turneraceae). *Evolution* 41(2):340-354.
- Barrett, S.C.H., Harder, L.D. & A.C. Worley. 1996. The comparative biology of pollination and mating in flowering plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 351:1271-1280.

Bawa, K.S., Perry, D.R. & J.H. Beach. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. Sexual systems and incompatibility mechanism. *American Journal of Botany* 72(3):331-345

Bayer, E. 1987. Die gattung in Chile. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 24:1-362.

Bayer, E. 1998. *Taltalia*-eine neue Gattung in der Familie der Alstromeriaceae. *Sendtnera* 5:5-14.

Bell, G. 1985. On the function of flower. *Proceedings of the Royal Society London B* 224:223-265.

Bena, G., Lejeune, B., Prospero, J.M. & I. Olivieri. 1998. Molecular phylogenetic approach for studying life-history evolution: the ambiguous example of the genus *Medicago* L. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 265:1141-1151.

Bertin, R.I. 1993. Incidence of monoecy and dichogamy in relation to self-fertilization in angiosperms. *American Journal of Botany* 80(5):557-560

Bertin, R.I. & C.M. Newman. 1993. Dichogamy in angiosperms. *The Botanical Review* 59(2):112-152

Botto-Mahan, C. & M.Ojeda-Camacho. 2000. The importance of floral damage for pollinator visitation in *Alstroemeria ligtu* L. *Revista Chilena de Entomología* 26:73-76.

Brako, L. & J.L. Zarucchi. 1993. Catálogo de las Angiospermas y Gimnospermas del Perú. *Monographs in Systematic Botany. Missouri Botanical Garden.* 45:1-1286.

- Brantjes, N.B.M. 1973. Sphingophilous flowers, function of their scent. *En Brantjes*, N.B.M. & H.F. Linskens (eds.). Pollination and Dispersal. pp 27-46. University of Nijmegen, Netherlands.
- Brian, A.D. 1957. The pollen collected by bumble-bees. *Journal of Animal Ecology* 20:191-194.
- Bromham, L., Woolfit, M. Lee, M.S.Y. & A. Rambaut. 2002. Testing the relationship between morphological and molecular rates of change along phylogenies. *Evolution* 56(10):1921-1930.
- Brooks, D.R. & D.A. McLennan. 1991. Phylogeny, ecology, and behavior. Chicago University Press, Chicago.
- Brown, B., Emberson, R.M. & A.M. Paterson. 2000. Morphological character evolution in hepialid moths (Lepidoptera: Hepialidae) from New Zealand. *Biological Journal of the Linnean Society* 69:383-397.
- Buitendijk, J.H., Pinsonneaux, N., van Donk, A.C., Ramanna, M.S., van Lammeren, A.M.M. 1995. Embryo rescue by half-ovule culture for the production of interspecific hybrids in *Alstroemeria*. *Scientia Horticulturae* 64(1-2):65-75.
- Buxbaum, F. 1954. Morphologie der Blüte und Frucht von *Alstroemeria* und der Anschluß der Alstroemerioideae bei den echten Liliaceae. *Oesterreichische Botanische Zeitschrift* 101:337-352.
- Cavieres, L., Peñaloza, A.P. & M.T.K Arroyo. 1998. Efectos del tamaño floral y densidad de flores en la visita de insectos polinizadores en *Alstroemeria pallida* Graham (Amaryllidaceae). *Gayana Botánica* 55(1):1-10.

Charnov, E.L. 1982. The theory of sex allocation. Princeton University Press, Princeton, NJ.

Church, S.A. 2003. Molecular phylogenetics of *Houstonia* (Rubiaceae): descending aneuploidy and breeding system evolution in the radiation of the lineage across North America. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27(2):223-238.

Cohen, D. & A. Shimida. 1993. The evolution of flower display and reward. *Evolutionary Biology*. 27:197-243.

Consiglio, T.K. & G.R. Bourne. 2001. Pollination and breeding system of a neotropical palm *Astrocaryum vulgare* in Guyana: a test of predictability of syndromes. *Journal of Tropical Ecology* 17:577-592.

Cruden, R.W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. *Evolution* 31:32-46.

\_\_\_ 2000. Pollen grains: Why so many?. *Plant Systematics and Evolution* 222(1-4):143-165.

Cruden, R.W., & S. Miller-Ward. 1981. Pollen-ovule ratio, pollen size, and the ratio of stigmatic area to the pollen-bearing area of the pollinator: an hypothesis. *Evolution* 35(5):964-974.

Da-Yong Zhang, 2000. Resource allocation and the evolution of self-fertilization in plants. *The American Naturalist* 155(2):187-199.

Dafni, A. 1991a. Advertisement, flower longevity, reward and nectar protection in Labiatae. *Acta Horticulturae* 288:340-346.

Dafni, A. 1991b. The reaction of *Amphicoma spp.* Beetles to red models and its implication in pollination. Abstracts of the conference on: Plant Reproductive Ecology: Progress and Perspectives (Uppsala 9-11.9.1991) p. 18.

Dafni, A. 1992. Pollination Ecology: A Practical Approach. OIRL Press at Oxford University Press: Oxford. 250 pp.

Dafni, A. 1994. Note on side advertisement in flowers. *Functional Ecology* 8:136-138.

Dafni, A. 1997. The response of *Amphicoma spp.* (Coleoptera, Glaphyridae) beetles to red models differing in area, shape and symmetry. *Israel Journal of Plant Sciences* 45:247-254.

Dafni, A. & P. Kevan. 1997. Flower size and shape: implications in pollination. *Israel Journal of Plant Sciences* 45:201-212.

Dafni, A., Lehrer, M. & P.G. Kevan. 1997. Spatial flower parameters and insect spatial vision. *Biological Review* 72:239-282.

Dahlgren, R.M., Clifford, H.T. & P.F. Yeo. 1985. The families of the monocotyledons. Springer-Verlag, Berlin.

Darwin, C. 1872 (reimpresión 1958). The origin of species. 6a Edición. Times Mirror, New York.

Darwin, C. 1876. The Effects of Cross and Self-fertilization in the Vegetable Kingdom. John Murray. London.

Davenport, D. & H. Lee. 1985. Image analysis in the Orchidaceae. *Journal of Theoretical Biology* 114:199-200.

Dayanandan, S., Attygalla, D.N.C., Abeygunasekara, A.W.W.L., Gunatilleke, I.A.U.N. & C.V.S. Gunatilleke. 1990. Phenology and floral ecology in relation to pollination in some Sri Lankan Diptocarps. *En Bawa, K.S., & M. Hadley (eds.), Reproductive Ecology and Tropical Rain Forest Plants.* pp 103-134. UNESCO and Parthenon, Paris.

de Jeu, M.J. & E. Jacobsen. 1995. Early postfertilization ovule culture in *Alstroemeria* L. and barriers to interspecific hybridization. *Euphytica* 86(1):15-13.

de Jeu, M.J. & F. Garriga-Caldere, 1997. Retarded embryo growth and early degeneration of sporophytic tissue are associated with embryo abortion in the interspecific cross *Alstroemeria pelegrina* X *Alstroemeria aurea*. *Canadian Journal of Botany* 75(6):916-924

de Nettancourt, D. 1977. Monographs on theoretical and applied genetics 3. Incompatibility in angiosperms. Springer Verlag, Berlin.

de Queiroz, K. 1996. Including the characters of interest during tree reconstructions and the problems of circularity and bias in studies of character evolution. *The American Naturalist* 148:700-708.

di Castri, F. & E.R. Hajek. 1976. Bioclimatología de Chile. 129 pp. Vicerrectoría Académica de la Universidad Católica de Chile.

Donoghue, M.J. & D.D. Ackerly. 1996. Phylogenetic uncertainties and sensitivity analyses in comparative biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B* 351:1241-1249.

Dubouzet, G. Murata, N. & K. Shinoda. 1997. RAPD analysis of genetic relationships among *Alstroemeria* L. cultivars. *Scientia Horticulturae* 68:181-189.

- \_\_\_ 1998. Relationships among some cultivated species and varieties of *Alstroemeria* L. based on RAPD analysis. *Scientia Horticulturae* 73:37-44.
- Dudash, M. 1991. Plant size effects on female and male function in hermaphroditic *Sabatia angularis* (Gentianaceae). *Ecology* 72(3):1004-1012.
- Escaravage, N., Pornon, A., Doche, B. & I. Till-Bottraud. 1997. Breeding system in an alpine species: *Rhododendron ferrugineum* L. (Ericaceae) in the French northern Alps. *Canadian Journal of botany* 75:736-743.
- Faegri, K. & L. van der Pijl. 1979. *Principles of Pollination Ecology*, 3a Ed. Pergamon Press, Oxford.
- Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist* 125:1-15.
- Foster, M.B. 1952. Fragrant *Alstroemeria* hybrids. *Pl. Life* 8:91-92.
- Free, J.B. 1970. Effect of flower shapes and nectar guides on the behaviour of foraging honeybees. *Behaviour* 37:269-285.
- Free, J.B. 1993. *Insect Pollination of Crops* (2a Ed.) Academic Press, San Diego, CA.
- Fryxell, P.A. 1957. Mode of reproduction of higher plants. *The Botanical Review* 23(3):135-233.
- Galen, C. 1989. Measuring pollinator-mediated selection on morphometric floral traits: bumblebees and the alpine sky pilot, *Polemonium viscosum*. *Evolution* 43(4):882-890.

Galen, C. 1996. Rates of floral evolution: adaptation to bumblebee pollination in an alpine widflower, *Polemonium viscosum*. *Evolution* 50(1):120-125.

Galen, C. 1999. Why do flowers vary? *Bioscience* 49(8): 631-640

Galen, C. & P.G. Kevan. 1980. Scent and color, floral polymorphisms and pollination biology in *Polemonium viscosum*. *Nutt. Amer. Midl. Naturalist* 104:281-289.

Galen, C. & M.E. Newport. 1987. Bumble bee behavior and selection on floral size in the sky pilot *Polemonium viscosum*. *Oecologia* 74:20-23.

Galen, C., Zimmer, K.A. & M.E. Newport. 1987. Pollination in floral scent morphs of *Polemonium viscosum*: a mechanism for disruptive selection on the flower size. *Evolution* 41:599-606.

Galen, C. & M.L. Stanton. 1989. Bumble bee pollination and floral morphology: factors influencing pollen dispersal in the alpine sky pilot, *Polemonium viscosum* (Polemoniaceae). *American Journal of Botany* 76(3):419-426.

Gallardo, R., Domínguez, E. & J.M. Muñoz. 1994 Pollen-ovule ratio, pollen size, and breeding system in *Astragalus* (Fabaceae) subgenus *Epiglottis*: a pollen and seed allocation approach. *American Journal of Botany* 81(12):1611-1619.

Gay, C. 1853. *Historia Física y Política de Chile, Botánica*, t. 6 81-95, París.

Garayenta, A. 1971. El género *Alstroemeria* en Chile. *Anales del Museo de Historia Natural de Valparaíso* 4:63-108.

Gengler-Nowak, K. 2002. Reconstruction of the biogeographical history of Malesherbiaceae. *The Botanical Review* 68(1):171-188.

- Georgiady, M.S. & E. Lord. 2002. Evolution of the inbred flower form in the currant tomato, *Lycopersicon pimpinellifolium*. *International Journal of Plant Sciences* 163(4):531-541.
- Giurfa, M., Eichmann, B. & R. Menzel. 1996. Symmetry perception in an insect. *Nature* 382:458-461.
- Goodwillie, C. 1999. Multiple origins of self-compatibility in *Linanthus* section *Leptosiphon* (Polemoniaceae): phylogenetic evidence from internal-transcribed-spacer sequence data. *Evolution* 53(5):1387-1395.
- Gould, S.J. 1986. Evolution and the triumph of homology, or why history matters. *American Scientist* 74:60-69.
- Grant, V. & K.A. Grant. 1965. Flower Pollination in the Phlox Family. Columbia University Press, New York.
- Grau J. & E. Bayer. 1982. Zwei unbekannte Alstroemerien aus Chile. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 18:219-230.
- Gugerli, F. 1998. Effect of elevation on sexual reproduction in alpine populations of *Saxifraga oppositifolia* (Saxifragaceae) *Oecologia* 114:60-66.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Window 85/98/NT. *Nucleic Acids Symposium. Series* 41:95-98.
- Han, T.H, De Jeu, M., Van Eck, H. & E. Jacobsen. 2000. Genetic diversity of Chilean and Brazilian *Alstroemeria* species assessed by AFLP analysis. *Heredity* 84(5):564-569.

Hannibal, L.S. 1941. Stinson and his alstroemerias. *Herbertia* 8:161-164.

Hansman, D.J. 2001. Floral biology of dry rainforest in north Queensland and a comparison with a adjacent savanna woodland. *Australian Journal of Botany* 49(2):137-153.

Harder, L.D. & M.A. Aizen. 2004. The functional significance of synchronous protandry in *Alstroemeria aurea*. *Functional Ecology* 18:467-474

Härling, M. 1999. The logical priority of the tree over characters and some of its consequences for taxonomy. *Biological Journal of Linnean Society* 68:497-503.

Harrison, C.J., Möller, M. & Q.C.B. Cronk. 1999. Evolution and development of floral diversity in *Streptocarpus* and *Saintpaulia*. *Annals of Botany* 84:49-60.

Harvey, P.H. & M. Pagel. 1991. *The comparative method in evolutionary biology*. Oxford University Press, Oxford.

Helfgott, D.M., Francisco\_Ortega, J., Santos-Guerra, A., Jansen, R.K. & B.B. Simpson. 2000. Biogeography and breeding system evolution of the woody *Bencomia* Alliance (Rosaceae) in Macaronesia based on ITS sequence data. *Systematic Botany* 25(1):82-97.

Hennig, W. 1966. *Phylogenetic Systematics*. Urbana: University of Illinois Press.

Herbert, W. 1837. *Amaryllidaceae*. James Ridway & Sons, London. 428 pp.

Herrera, C.M. 1993a. Selection on floral morphology and environmental determinants of fecundity in a hawk moth-pollinated violet. *Ecological Monographs* 63:251-275.

- Herrera, C.M. 1993b. Selection on complexity of corolla outline in a hawkmoth-pollinated violet. *Evolutionary Trends in Plants* 7:9-13.
- Hershkovitz, M.A. & E.A. Zimmer. 1997. On the evolutionary origins of the cacti. *Taxon* 46:217-232.
- Hershkovitz, M.A., 2005. Phylogenetic relationship among Portulacaceae (enviado).
- Hershkovitz, M.A., Hernández, C.C & M.T.K. Arroyo. 2005. Ribosomal DNA evidence for diversification and hybridization in *Tropaeolum* sect. *Chilensia* (enviado).
- Hertz, M. 1935. Die Untersuchungen über den Formensinn der Honigbiene. *Naturwissenschaften* 36:618-624.
- Heywood, V.H. 1993. *Flowering Plants of the World*. Oxford University Press, New York.
- Holtsford, T.P & N.C. Ellstrand. 1992. Genetic and environmental variation in floral traits affecting outcrossing rate in *Clarkia tembloriensis* (Onagraceae). *Evolution* 46(1):216-225.
- Hofreiter, A. & H.J. Tillich. 2002. The delimitation, infrageneric subdivision, ecology and distribution of *Bomarea* Mirbel (Alstroemeriaceae). *Feddes Repertorium* 113(7-8): 528-544.
- Huber, H. 1969. Die Samenmerkmale und Verwandtschaftsverhältnisse der Liliifloren. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 8:219-538.
- Hunziker, J.H. 1991. Protandry in *Alstroemeria psittacina* (Alstroemeriaceae). *Pol.Bot.Stud.*2:195-198.

- Hunziker, J.H. & C.C. Xifreda. 1990. Chromosome studies in *Bomarea* and *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae). *Darwiniana* 30(1-4):179-183.
- Husband, B.C. & Schemske D.W. 1996. Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution* 50:54-70.
- Hutchinson, J. 1959. *The Families of Flowering Plants. II* (2<sup>a</sup> Ed.). Oxford: Clarendon Press.
- Inoue, K. & M. Amano. 1986. Evolution of *Campanula punctata* Lam. In the Izu Islands: change of pollinators and evolution of breeding systems. *Plant Species Biology* 1:89-97.
- Ishikawa, T., Takayama, T., Ishizaka, H., Ishikawa, K. & M. Mii. 1997. Production of interspecific hybrids between *Alstroemeria ligtu* L. hybrid and *A. pelegrina* L. var. *rosea* by ovule culture. *Breeding Science* 47(1):15-20.
- \_\_\_ 2001. Production of interspecific hybrids between *Alstroemeria pelegrina* L. var. *rosea* and *A. magenta* Bayer by ovule culture. *Euphytica* 118(1):19-27.
- Jain, S.K. 1976. The evolution of inbreeding in plants. *Annual Review of Ecological Systems* 7:469-495.
- Johnson, S.G., Delph, L.F. & C.L. Elderkin. 1995. The effect of petal-size manipulation on pollen removal, seed set, and insect-visitor behavior in *Campanula americana*. *Oecologia* 102:174-179.
- Johnson, S.D. & A. Dafni. 1998. Response of bee-flies to the shape and pattern of model flowers: implications for floral evolution in a Mediterranean herb. *Functional Ecology* 12:289-297.

Johnson, S.D. Linder, H.P. & K.E. Steiner. 1998. Phylogeny and radiation of pollination systems in *Disa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 85(3):402-411.

Jürgens, A., Witt, T. & G. Gottsberger. 2002. Pollen grain numbers, ovule number and pollen-ovule ratios in Caryophylloideae: correlation with breeding system, pollination, life form, style number, and sexual system. *Sexual Plant Reproduction* 14:279-289.

Kampny, C.M. & N.G. Dengler. 1997. Evolution of flower shape in Veroniceae (Scrophulariaceae). *Plant Systematics and Evolution* 205(1-2):1-25.

Kang, H. & R.B. Primack. 1991. Temporal variation of flower and fruit size in relation to seed yield in celandine poppy (*Chelidonium majus*, Papaveraceae). *American Journal of Botany* 78:711-722.

Kearns, C.A. & D.W. Inouye. 1993. *Techniques for Pollination Biologist*. University Press of Colorado.

Kelber, A., & M. P. faff. 1997. Spontaneous and learned preferences for visual flower features in a diurnal hawkmoth. *Israel Journal of Plant Sciences* 45:235-246.

Kevan, P.G. 1970. High-arctic nectar-flower relations: the inter-relationships of arthropods and flowers at Lake Hazen, Ellesmere Island, N.W.T., Canada. Unpublished Ph.D. thesis, University of Alberta, Edmonton, Canada.

Kevan, P.G. 1983. Floral colors through the insect eye: what are they and what do they mean. En *Handbook of Experimental Pollination Biology* (Jones, C.E. & R.J. Little, eds.). pp. 3-30. Van Nostrand Reinhold, New York.

Kimball, R.T., Crawford, D.J. & E.B. Smith. 2003. Evolutionary processes in the genus *Coreocarpus*: insights from molecular phylogenetics. *Evolution* 57(1):52-61.

- Klekowski, E.J. 1988. *Mutation, Developmental Selection and Plant Evolution*. Columbia University Press, New York.
- Knoll, F. 1922. Lichtsinn und Blumenbesuch des Falters *Macroglossum stellatarum*. *Abhandlungen der Zoologisch-Botanische Gesellschaft in Wien* 12:125-377.
- Kohn, J.R., Graham, S.W., Morton, B., Doyle, J.J. & S.C.H. Barrett. 1996. Reconstruction of the evolution of reproductive characters in Pontederiaceae using phylogenetic evidence from chloroplast DNA restriction-site variation. *Evolution* 50(4):1454-1469
- Kosenko, V.N. 1994. Pollen morphology of the family Alstroemeriaceae. *Botanicheskii Zhurnal (St. Petersburg)* 79(8):1-8.
- Kristiansen, K. Vainstein, A. & D. Weiss. 1995. Interspecific hybridization of *Alstroemeria*. *Acta Horticulturae* 420:85-88.
- Kugler, H. 1943. Hummeln als Blütenbesucher, *Ergebnisse Biologie* 19:143-323.
- Kunth, C.S. 1850. *Enumeratio Plantarum* 5:758-781. Stuttgart.
- Lande, R. & D.W. Schemske. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plant. I. Genetic models. *Evolution* 39:24-40.
- Laverty, T.M. 1980. The flower-visiting behaviour of bumble bees: floral complexity and learning. *Canadian Journal of Zoology* 58:1324-35.
- Lehrer, M., Horridge, G. A., Zhang, S.W. & R. Gadagkar. 1995. Shape vision in bees: innate preferences for flower like patterns. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 347:123-137.

- Leppik, E.E. 1953. The ability of insects to distinguish number. *The American Naturalist* 87:229-236.
- Leppik, E.E. 1972. Origin and evolution of bilateral symmetry in flowers. *Evolutionary Biology* 5:49-85.
- Leppik, E.E. 1977. *Floral Evolution in Relation to Pollination Ecology*. Today and Tomorrow's Printers, Hissar.
- Lewis, D. 1954. Comparative incompatibility in angiosperms and fungi. *Advances in Genetics*. 6:235-185.
- Lloyd, D.G. 1965. Evolution of self-compatibility and racial differentiation in *Leavenworthia* (Cruciferae). *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University*. 195:3-134.
- Lloyd, D.G. 1980. Demographic factor and mating patterns in angiosperms. *En O.T Solbrig* (ed.), *Demography and evolution in plant population*, pp. 209-224, Blackwell, Orford.
- Lloyd, D.G., and Schoen, D.J. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences*. 153: 358-369.
- Lloyd, D.G. & C.J. Webb. 1986. The avoidance of interference between the presentation of pollen and stigmas in angiosperms. I. Dichogamy. *New Zealand Journal of Botany* 24:135-162.
- López, J., Rodríguez-Riano, T., Ortega-Olivencia, A., Devesa, J.A. & T. Ruiz. 1999. Pollination mechanism and pollen-ovule ratios in some Genisteae (Fabaceae) from Southwestern Europe. *Plant Systematics and Evolution* 216(1-2):23-47.

- Lord, E.M. 1980. Intra-inflorescence variability in pollen-ovule ratios in the cleistogamous species *Lamium amplexicaule* (Labiatae). *American Journal of Botany* 67(4):529-533.
- Losos, J. 1990. Ecomorphology, performance capability, and scaling of west Indian *Anolis* lizards: an evolutionary analysis. *Ecological Monographs* 60(3):369-388.
- Mabberley, D.J. 1997 *The Plant-Book*. (2<sup>a</sup> Ed.) University Press, Cambridge.
- Maddison, W.P. 1989. Reconstructing character evolution on polytomous cladograms. *Cladistics* 5:365-377.
- Maddison, W.P. 1991. Squared-change parsimony reconstructions of ancestral states for continuous-valued characters on a phylogenetic tree. *Systematic Zoology* 40(3):304-314.
- Maddison, W.P. & D.R. Maddison. 2004. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 1.01 <http://mesquiteproject.org>.
- Mallick, S.A. 2001. Facultative dichogamy and reproductive assurance in partially protandrous plants. *Oikos* 95(3):533-536.
- Martcorena, C. & M. Quezada. 1985. Catálogo de la flora vascular de Chile. *Gayana Botánica* 42(1-2):1-157.
- Martins, E. 2000. Adaptation and the comparative method. *Trends in ecology and Evolution* 15(7):296-299.

Martins, E. & T.F. Hansen. 1997. Phylogenies and the comparative method: a general approach to incorporating phylogenetic information into the analysis of interspecific data. *The American Naturalist* 149(4):646-667.

McLennan, D.A. 1994. A phylogenetic approach to the evolution of fish behaviour. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 4:430-460.

Medan, D. 2003. Reproductive Biology of the Andean Shrub *Discaria nana* (Rhamnaceae). *Plant Biology* 5:94-102.

Meerow, A.W., Tombolato, A.F.C. & F. Meyer. 1999. Two new species of *Alstroemeria* L. (Alstroemeriaceae) from Brazil. *Brittonia* 51(4):439-444.

Miles, D.B. & A.E. Dunham. 1993. Historical perspectives in ecology and evolutionary biology: The use of phylogenies in comparative analyses. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24:587-619.

Mione, T. & G.J. Anderson. 1992. Pollen-ovule ratios and breeding system evolution in *Solanum* section *Basarthrum* (Solanaceae). *American Journal of Botany* 79(3):279-287.

Møller, A.P. 1995. Bumblebee preference for symmetrical flowers. *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.* 92:2288-2292.

Morales, C.L. & L. Galetto. 2003. Influence of compatibility system and life form on plant reproductive success. *Plant Biology* 5(5):567-573.

Mulligan, G.A. & P.G. Kevan. 1973. Color, brightness, and other floral characters attracting insects to the blossom of some Canadian weeds. *Canadian Journal of Botany* 51:1939-1952.

- Muñoz, M. 2000. Novedades en la familia Alstroemeriaceae. *Gayana Botánica* 57(1):55-59.
- Muñoz, M. 2003. Tres nuevas monocotiledóneas descubiertas en Chile: *Alstroemeria mollensis* M. Muñoz et A. Brinck (Alstroemeriaceae), *Miersia chilensis* var. *bicolor* M. Muñoz (Gilliesiaceae) y *Calydorea chilensis* M. Muñoz (Iridaceae). *Gayana Botánica* 60(2):101-106.
- Muñoz, M & A. Moreira. 2003. Alstroemeras de Chile. Diversidad, distribución y conservación. Taller La Era, Santiago, Chile. 140 pp.
- Navarro, L. 1997. Is the dichogamy of *Salvia verbenaca* (Lamiaceae) an effective barrier to self-fertilization? *Plant Systematics and Evolution* 207:111-117.
- Nørbaek, R., Christensen, L.P., Bojesen, G. & K. Brandt. 1996. Anthocyanins in Chilean species of *Alstroemeria*. *Phytochemistry* 42:97-100.
- Olmstead, R. 1989. Phylogeny, phenotypic evolution, and biogeography of the *Scutellaria angustifolia* complex (Lamiaceae): inference from morphological and molecular data. *Systematic Botany* 14(3):320-338.
- Ornduff, R. 1969. Reproductive biology in relation to systematics. *Taxon* 18:121-133.
- Ornduff R. 1972. The breakdown of trimorphic incompatibility in *Oxalis* section *Corniculatae*. *Evolution* 26:52-65.
- Pagel, M. 1997. Inferring evolutionary processes from phylogenies. *Zoologica Scripta* 26(4):331-349.

- Pagel, M. 1999. The maximum likelihood approach to reconstructing ancestral character states of discrete characters on phylogenies. *Systematic Biology* 48(3):612-622.
- Pannell, J.R. & S.C.H. Barrett. 1998. Baker's law revisited: reproductive assurance in a metapopulation. *Evolution* 52(3):657-668.
- Patterson, T.B. & T.G. Givnish. 2002. Phylogeny, concerted convergence, and phylogenetic niche conservatism in the core Liliales: Insights from *rbcL* and *ndhF* sequence data. *Evolution* 56(2):133-252.
- Pax, F. 1890. Beiträge zur Kenntnis der Amaryllidaceae. *En* A. Engler (ed.), *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 11. pp 318-337. Leipzig.
- Pérez, M.F. Hershkovitz, M.A. & M.T.K. Arroyo. Phylogenetic relationship among species of genus *Schizanthus* (Solanaceae) (en preparación).
- Philbrick, C.T. & G.J. Anderson. 1987. Implications of pollen/ovule ratios and pollen size for the reproductive biology of *Potamogeton* and autogamy in aquatic angiosperms. *Systematic Botany* 12:98-105.
- Philippi, R.A. 1857-58. Plantarum novarum Chilensium centuria quinta. *Linnaea* 29:48-95
- \_\_\_ 1860. *Florula Atacamensis*, p. 51. Halle.
- \_\_\_ 1862. Descripción de unas plantas nuevas recojidas en el verano pasado en las provincias del Maule i en Chillán por don Jerman Volckmann. *Anales Universidad de Chile* 21:442-450

\_\_\_ 1864. Plantarum novarum Chilensium Centuriae, inclusis quibusdam Mendocinis et Patagonicis. *Linnaea* 33:1-308.

\_\_\_ 1873. Descripción de las plantas nuevas incorporadas últimamente en el herbario chileno. *Anales Universidad de Chile* 43:479-583.

\_\_\_ 1896. Plantas nuevas chilenas. *Anales Universidad de Chile* 93:143-352.

Preston, R.E. 1986. Pollen-ovule ratios in the Cruciferae. *American Journal of Botany* 73(12):1732-1740.

Purvis, A. & T. Garland Jr. 1993. Polytomies in comparative analyses of continuous characters. *Systematic Biology* 42(4):569-575.

Raven, P.H. 1979. A survey of reproductive biology in Onagraceae. New Zealand. *Journal of Botany* 17:575-596.

Rice, W.R. 1989. Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution* 43(1):223-225

Rice, K.A., Donoghue, M.J. & R.G. Olmstead. 1997. Analyzing large data sets: *rbcL* 500 revisited. *Systematic Biology* 46:554-563.

Richards, A.J. 1997. *Plant Breeding Systems*. 2ª. Edición, Chapman & Hall, London.

Rick, C.M., Fobes, J.F. & M. Holle. 1977. Genetic variation in *Lycopersicon pimpinellifolium*: evidence of evolutionary change in mating systems. *Plant Systematics and Evolution* 127:139-170.

- Rick, C.M., Holle, M. & R.W. Thorpe. 1978. Rates of cross-pollination in *Lycopersicon pimpinellifolium*: Impact of genetic variation in floral characters. *Plant Systematics and Evolution* 129:31-44.
- Ritland, C. & K. Ritland. 1989. Variation of sex allocation among eight taxa of the *Mimulus guttatus* species complex (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany* 76:1731-1739.
- Riveros, M. 1991. Biología reproductiva en especies vegetales de dos comunidades de la zona templada del sur de Chile, 40° S. Tesis de Doctor en Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 263 pp.
- Rolland, C., Danchin, E. & M. de Fraipont. The evolution of coloniality in birds in relation to food, habitat, predation and life-history traits: a comparative analysis. *The American Naturalist* 151(6):514-529.
- Runions, C.J. & M.A. Geber. 2000. Evolution of the self-pollinating flower in *Clarkia xantiana* (Onagraceae). I Size and development of floral organ. *American Journal of Botany* 87(10):1439-1451.
- Ruiz, H. & J. Pavón. 1802. *Flora peruviana et chilensis* III, Madrid.
- Ruiz, T. & M.T.K. Arroyo. 1978. Plant Reproductive Ecology of a Secondary deciduous Topical Forest in Venezuela. *Biotropica* 10(3):221-130.
- Rundel, P.W., Dillon, M.O., Palma, B., Mooney, H.A., Gulmon, S.L. & J.R. Ehleringer. 1991. The phytogeography and ecology of the coastal Atacama and Peruvian deserts. *Aliso* 13:1-49.

Sanso, A.M. 1996. El género *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) en Argentina. *Darwiniana* 34:349-382.

Sanso, A.M. 2002. Chromosome studies in Andean taxa of *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 138(4):451-459.

Sanso, A.M. & C.C. Xifreda. 1999. The synonymy of *Schickedantzia* with *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae). *Systematics and Geography of Plants* 68:315-323.

Sanso, A.M. & C.C. Xifreda. 2001. Generic delimitation between *Alstroemeria* and *Bomarea* (Alstroemeriaceae). *Annals of Botany* 88:1057-1069.

Savolainen, V., Chase, M.W., Hoot, S.B., Morton, C.M., Soltis, D.E., Bayer, C., Fay, M.F., de Bruijn, A.Y., Sullivan, S. & Y-L. Qiu. 2000. Phylogenetics of flowering plants based on combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* gene sequences. *Systematic Biology* 49(2):306-362.

Schemske, D.W. & R. Lande. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plant. II. Empirical observations. *Evolution* 39(1):41-52.

Schoen, D.J. 1977. Morphological, phenological, and pollen-distribution evidence of autogamy and xenogamy in *Gilia achilleifolia* (Polemoniaceae). *Systematic Botany* 2(4):280-286.

Schoen, D.J. 1982. The breeding system of *Gilia achilleifolia*: Variation in floral characteristics and outcrossing rate. *Evolution* 36(2):352-360.

Schoen, D.J. Johnston, M.O., L'Heureux, A.M. & J.V. Marsolais. 1997. Evolutionary history of the mating system in *Amsinckia* (Boraginaceae). *Evolution* 51(4):1090-1099.

- Seijo, J.G. & V.G.S. Neffa. 2004. The cytological origin of the polyads and their significance in the reproductive biology of *Mimosa bimucronata*. Botanical Journal of the Linnean Society 144(3):343-349
- Sharma, N. Koul, P. & K. Koul. 1992. Reproductive Biology of *Plantago*: Shift from Cross to Self-pollination. Annals of Botany 69:7-11.
- Short, P.S. 1981. Pollen-ovule ratios, breeding systems and distribution patterns of some Australian Gnaphaliinae (Compositae: Inuleae). Muelleria 4:395-417.
- Simmonds, M.P. & H. Ochoterena. 2000. Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. Systematic Biology: 49(2):369-381.
- Sobrevila, C. & M.T.K. Arroyo. 1982. Breeding systems in a montane tropical cloud forest in Venezuela. Plant Systematics and Evolution 140:19-37
- Spaethe, J., Tautz, J. & L. Chittka. 2001. Visual constraints in foraging bumblebees: Flower size and color affect search time and flight behavior. Proceedings of the National Academy of Sciences 98(7):3898-3903.
- Spira, T.P. 1980. Floral parameters, breeding system and pollinator type in *Trichostema* (Labiatae) American Journal of Botany 67(3):278-284.
- Squeo, F. 1991. Estructuración de comunidades vegetales andinas en relación con la polinización, en la Cordillera de los Baguales, Patagonia, Chile. Tesis de Doctor en Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 301 pp.
- Squeo, F., Arancio, G., Marticorena, C. & M. Muñoz. 2001. Listado de las Especies en categoría Extinta, En Peligro y Vulnerable de la Flora Nativa de Coquimbo. En F.A. Squeo, G. Arancio y J.R. Gutiérrez (eds.), Libro Rojo de la Flora Nativa y de los Sitios

Prioritarios para su Conservación: Región de Coquimbo Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile 4:41-42.

Stanton, M.L. & R.E. Preston. 1988. Ecological consequences and phenotypic correlates of petal size variation in wild radish, *Raphanus sativus* (Brassicaceae). American Journal of Botany 75(4):528-539.

Stebbins, G.L. 1950. Variation and evolution in plants. Columbia University Press, New York.

Stebbins, G.L. 1957. Self fertilization and population variability in the higher plants. The American Naturalist 91:337-354.

Stebbins, G.L. 1958. Longevity, habitat, and release of genetic variability in the higher plants. Cols Spring Harbor Symp. Quant. Biol 23:365-378.

Stebbins, G.L. 1974. Flowering plants: evolution above the species level. Belknap Press, Cambridge, MA.

Stebbins, G.L. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms. I. Pollination mechanisms. Annual Review in Ecology Systematics. 1:307-326

Stewart, H.M. Stewart, S.C. & J.M. Canne-Hilliker. 1996. Mixed mating system in *Agalinis neoscopica* (Scrophulariaceae) with byd pollination and delayed pollen germination. International Journal of Plant Sciences 157(4):501-508.

Stinson, H.L. 1942. Alstroemerid breeding possibilities. Herbertia 9:124-125

Strid, A. 1970. Studies in the Aegean flora. XVI. Biosystematics of the *Nigella arvensis* complex with special reference to the problem of non-adaptive radiation. Op. bot. Soc. Bot. Lund. 28:1-169.

Swensen, S.M. Luthi, J.N. & L.H. Rieseberg. 1998. Datisceae revisited: monophyly and the sequence of breeding system evolution. Systematic Botany 23(1):157-169.

Tate, J.A. & B.B. Simpson. 2004. Breeding system evolution in *Tarasa* (Malvaceae) and selection for reduced pollen grain size in the polyploids species. American Journal of Botany 91(2):207-213.

Todland, O., Andersen, H.L., Bjelland, T., Dahl, V., Eide, W., Houge, S., Pedersen, T., Vie, E.U. 1998. Variation in pollen limitation among plants and phenotypic selection on floral traits in an early-spring flowering her. Oikos 82(3): 491-501.

Traub, H.P. 1943. Dichogamy and interspecific sterility. Herbertia 10:13-14.

Tsuchiya, T, Hang, A., Healy, W.E. Jr. & H. Hughes. 1987 Chromosome studies in the genus *Alstroemeria*. I. Chromosome numbers in 10 cultivars. Botanical Gazette 148(3): 519-524.

Uphof, J.C. 1940. Alstroemerias: a neglected opportunity. Herbertia 7:194-199.

Uphof, J.C. 1952. A review of the genus *Alstroemeria*. Plant Life 8:36-53.

Uslar, P. 1982. Sistemas de reproducción en plantas: zona ecotonal entre la zona andina y matorral esclerófilo de Chile central. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 205 pp.

- Vasek, F.C. & J. Harding. 1976. Outcrossing in natural populations. V. Analysis of outcrossing, inbreeding, and selection in *Clarkia exilis* and *Clarkia tembloriensis*. *Evolution* 30:403-411
- Vasek, F.C. & V. Weng. 1988. Breeding systems of *Clarkia* sect. *Phaeostoma* (Onagraceae): I. Pollen-ovule ratios. *Systematic Botany* 13(3):336-350.
- Wang, Y.Q., Zhang, D.X. & Z.Y. Chen. 2004. Pollen Histochemistry and Pollen: Ovule Ratios in Zingiberaceae. *Annals of Botany* 2004 94(4):583-591.
- Waser, N.M. 1983. The adaptative nature of floral traits: ideas and evidence. *Pollination Biology* (ed. L. Neal). Academic Press, Orlando.
- Webster, A.J. & A. Purvis. 2002. Ancestral states and evolutionary rates of continuous characters. En *Morphology, shape and phylogeny* (Eds. MacLeod, N. & P.L. Forey), pp 247-268.
- Weller, S.G. Donoghue, M.J. & D. Charlesworth. 1995. En P.C. Hoch & A.G. Stephenson (eds.) *Experimental and molecular approaches to plant biosystematics. The evolution of self-incompatibility in flowering plants: a phylogenetic approach.* pp. 355-382. Missouri Botanical Garden, St. Louis, MO.
- West, E.L. & T.M. Lavery. 1998. Effect of floral symmetry on flower choice and foraging behaviour of bumble bees. *Canadian Journal of Zoology* 76:730-739.
- Wilbur, H.M. 1976. Life history evolution in seven milkweeds of the genus *Asclepias*. *Journal of Ecology* 64:223-240.
- Whalen, M.D. 1978. Reproductive character displacement and floral diversity in *Solanum* section *Androceras*. *Systematic Botany* 3:77-86.

Wolf, E. & Zerrhan-Wolf. 1935. The effect of light intensity, area, and flicker frequency on the visual reactions of the honeybee. *Journal of General Physiology* 18:835-863.

Wolfe, L.M. & J.L. Krstolic. 1999. Floral symmetry and its influence on variance in flower size. *The American Naturalist* 154: 484-488.

Wyatt, R. 1984a. Evolution of self-pollination in granite outcrop species of *Arenaria* (Caryophyllaceae). I. Morphological correlates. *Evolution* 38(4):804-816.

\_\_\_ 1984b. Evolution of self-pollination in granite outcrop species of *Arenaria* (Caryophyllaceae). III. Reproductive effort and pollen-ovule ratios. *Systematic Botany* 9(4):432-440.

Wyatt, R. 1988. Phylogenetic aspects of the evolution of self-pollination. *En* L.D. Gottlieb (ed.), *Plant evolutionary biology*. pp 109-131. Chapman and Hall, London.

Wyatt, R., Broyles, S.T. & S.R. Lipow. 2000. Pollen-ovule ratios in milkweeds (Asclepiadaceae): an exception that probes the rule. *Systematic Botany* 25:171-180.

Xifreda, C.C. & A.M. Sanso. 1992. *Bomarea stricta* es sinónimo de *Alstroemeria isabellana* (Alstroemeriaceae). *Darwiniana* 31:355-356.

Yashiro, K., Sakai, Y. & H. Namai. 1999. Relationships between pollen-ovule ratio and autofertility, self-compatibility, automatic self-pollination ability in heterogeneous incomplete autogamous plants, Thai mustard. *Breeding Science* 49(1):39-42.

Young, H.J. & M.L. Stanton. 1990. Influences of floral variation on pollen removal and seed production in wild radish. *Ecology* 71(2):536-547.

Zhang, D-Y. 2000. Resource allocation and the evolution of self-fertilization in plants. *The American Naturalist* 155(2):187-199.

## ANEXO 1. CÁLCULO DE RAZÓN POLEN-ÓVULO (P/O)

### Número de granos de polen

- N° granos de polen/réplica =  $\frac{\text{N° gr polen contados} * \text{vol suspensión antera (cm}^3\text{)}}{\text{superficie contada (cm}^2\text{)} * \text{profundidad cámara recuento (cm)}}$

- N° de granos de polen/antera =  $\frac{\sum_{i=1}^{i=10} \text{réplica}_i}{10}$  i = réplica

- N° de granos de polen/flor

i. Especies en que se contabilizaron todas las anteras: como la suma de los valores obtenidos en cada antera.

- N° de granos de polen/flor =  $\sum_{i=1}^{i=6} \text{antera}_i$  i = antera (A1, A2, A3, I1, I2, UL)

ii. Especies en que se contabilizaron sólo las anteras A2 e I2: el valor de cada antera se multiplica por 3 que es el número de anteras que posee cada verticilo y luego se suman ambos valores

- N° de granos de polen/flor = N° gr. polen antera A2 \* 3 + N° gr. polen antera I2 \* 3

- N° de granos de polen/especie =  $\sum_{i=1}^{i=n} \text{N° granos polen}_i / n$  i = individuo

### Número de óvulos

El número de óvulos se obtuvo disecando el ovario bajo la lupa y contando directamente. El valor de número de óvulos por especie se obtiene promediando los valores obtenidos en las flores contabilizadas.

$$\begin{array}{l}
 \text{- N}^\circ \text{ de óvulos/especie} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{N}^\circ \text{ óvulos}_i}{n} \qquad i = \text{individuo}
 \end{array}$$

### Razón polen/óvulo (P/O)

La razón polen-óvulo se calculó dividiendo los valores de número de granos de polen y número de óvulos.

$$\text{- Razón polen-óvulo/flor} = \frac{\text{N}^\circ \text{ granos polen /flor}_i}{\text{N}^\circ \text{ de óvulos/flor}_i} \qquad i = \text{individuo}$$

$$\begin{array}{l}
 \text{- Razón polen-óvulo/especie} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{razón polen-óvulo}_i}{n} \qquad i = \text{individuo}
 \end{array}$$