

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

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

JOSEFINA LILIANA CABEZAS ALVAREZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 24 de septiembre de 2015

Directora de Tesis:
Dra. Mary Kalin

Co-Directora de Tesis
Dra. María Fernanda Pérez

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Alejandra González

Dr. Marco Méndez









BIOGRAFÍA



Josefina Liliana Cabezas Álvarez nació el 13 de agosto de 1987 en Santiago, Chile. En el año 2006 inició sus estudios de Biología Ambiental en la Universidad de Chile. Durante sus primeros años en la universidad comenzó a trabajar en botánica, y posteriormente realizó su trabajo de tesis de pregrado con la especie andina *Rhodophiala rhodolirion*. Nadadora y amante de los deportes acuáticos, compitió en múltiples torneos representando a su amado campus Juan Gómez Millas, con muy buenos resultados. Realizó su tesis de magíster en evolución de los sistemas reproductivos en el género *Chaetanthera*, también un género andino de Chile.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por acompañarme y apoyarme durante todos estos años.

A mis tutoras Mary Kalin y Fernanda Pérez por guiarme, enseñarme, y por su paciencia durante el desarrollo de esta tesis. Y por ser dos grandes mujeres.

Agradezco a Mary Kalin, Felipe Hinojosa y Ana María Humaña por enseñarme y mostrarme la flora chilena y por haberme invitado a recorrer lugares hermosos en busca de plantas.

A Fernanda Pérez por recibirme en su laboratorio, por aconsejarme, ayudarme y responder a mis preguntas durante mi paso por ahí.

Agradezco a mis profesores y miembros de la comisión, Alejandra González y Marco Méndez, por ser tan buenas personas y tan buenos profesores.

A Paola Jara le agradezco por ayudarme siempre en todo lo que fuera necesario, por apoyarme, aconsejarme y por hacer funcionar el laboratorio en el que trabajamos.

A mis amiguitos queridos William Henríquez, Stephanie Fischer, Benjamín Castro, Elena Frago y Daniel Acosta por su amistad y por su compañía.

A Ana María Humaña y Alberto Jiménez por ser los más bacanes siempre.

A mi amiga linda y vecina de laboratorio Francisca Campano, por todos sus sabios consejos, apoyo, cariño y compañía durante estos años de magíster.

A mis compañeros de cruzada Diego Pacheco, Claudia Scognamillo, Constanza Pinochet y Alejandra Rojas por compartir alegrías, entrenamientos, sufrimientos y todas las situaciones locas y sinsentido de laboratorio, terreno y congresos.

Agradezco a todos quienes me ayudaron, acompañaron y choferearon en terreno y a quienes se acordaron de mí, y me trajeron florecillas desde los lugares más extraños:

Mi papá Eduardo, mi mamá Liliana, mi hermana Camila, mi abuela Mena, Diego Pacheco, Constanza Pinochet, Claudia Scognamillo, Andrés Pinto, Felipe Vera, Ana María Humaña, Alberto Jiménez, Pablo Guerrero, Marcela Cuartas, Gabriela Píriz, Oscar Muñoz y Mario Vega.

Agradezco a Milén Duarte y a Francisca Campano, por ayudarme a descifrar los misteriosos enigmas de arcGIS.

Agradezco a CONAF y guardaparques del Parque Nacional Nahuelbuta, Parque Nacional Laguna del Laja, Reserva Nacional Malalcahuello y Reserva Nacional Río Clarillo. Al Herbario de Concepción, por recibirme y darme acceso a las muestras. Y a minera Barrick por permitirme trabajar en las dependencias de Mina El Indio.

A todos mis compañeros de laboratorio por su compañía, especialmente a don Juan Valencia y a Romina Villagra, por ser los más cariñosos, amables y simpáticos.

Agradezco a la Rama de Montaña de la Universidad y al equipo de natación, que hicieron de estos años de magíster los más movidos e inolvidables de mi paso por la universidad, por entregarme grandes amistades y por enseñarme de lo bueno, lo malo y lo muy malo de las personas. Agradezco el apoyo de mi bonita prima Kati, quien estuvo a mi lado cuando la rabia y el odio ajeno me alejaron de mi querido equipo, de mi amada natación y de grandes amistades. Finalmente agradezco la llegada a mi vida del profesor Antonio Abarca, el mejor profe. Gracias por ayudarme a recuperar el cariño al nuevo equipo de JGM. Que la vida le devuelva toda la entrega que ha tenido con sus nadadores y todo el aporte que ha hecho al deporte universitario.

La realización de esta tesis fue posible gracias al financiamiento de Beca de Magíster CONICYT, FONDECYT 1140541, ICM MINECON P05-002-IEB, PFB 23

ÍNDICE DE MATERIAS

Lista de tablas	vi
Lista de figuras	viii
Lista de símbolos y abreviaturas	x
Resumen	xii
Abstract	xvii
Introducción	1
Hipótesis	6
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
Materiales y métodos	10
Modelo de estudio	10
Filogenia molecular	15

Análisis filogenético.....	16
Enraizamiento del árbol.....	18
Sistema reproductivo	18
Morfología floral	21
Caracterización del hábitat.....	22
Reconstrucción de caracteres y método comparado.....	23
Resultados	27
Relaciones filogenéticas del género.....	27
Sistema reproductivo	30
Rasgos florales y forma de vida	35
Evolución del sistema de reproducción y forma de vida	37
Relación entre la evolución de los sistemas reproductivos y la forma de vida.....	40
Relación entre el hábitat, rasgos florales y sistema reproductivo	42
Patrones evolutivos de los rasgos estudiados.....	45
Discusión.....	47
Sobre la filogenia	47
Sobre la reproducción.....	49
Conclusiones.....	56
Bibliografía	58
Anexos	71

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Especies del subgénero <i>Chaetanthera</i> y <i>Tylloma</i> y su forma de vida (FV): anual (A) o perenne (P), localidades, sistema reproductivo y morfología (SR/M): datos colectados durante esta tesis (T) y datos previos (MK), y datos usados para filogenia: número de acceso a GenBank (GB) y número de herbario (Herb)	11
Tabla II. Codificación binaria del sistema reproductivo y de la forma de vida	24
Tabla III. Porcentaje de aquenios por capítulo en los tratamientos de autopolinización no aislada (A), autopolinización manual (S) y polinización cruzada manual (C) en 22 especies de <i>Chaetanthera</i> (valor promedio y error estándar); n, número de capítulos fructificados; SCI, índice de autocompatibilidad, y AFI, índice de autogamia. Además se muestran los resultados de la comparación entre el porcentaje de frutos producidos entre los tratamientos C vs A y C vs S, usando el test de t (*) y Mann – Whitney. De acuerdo a los valores de SCI y AFI se categorizaron los sistemas de reproducción en compatible, y parcialmente incompatible o incompatible, autógena y exógena	31

Tabla IV. Temperatura promedio (desviación estándar) de la estación de floración y rasgos florales de 22 especies de <i>Chaetanthera</i> . Se muestra el diámetro total (D1) e interno (D2) del capítulo en milímetros, número de flores del disco, área total (mm ²) y atractividad.(mm ²)	36
Tabla V. Significancia estadística de las correlaciones estudiadas con y sin PICs	44
Tabla VI. λ y δ de Pagel para cada uno de los rasgos continuos	46

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diversidad floral en algunos representantes del género 9
- Figura 2. Puntos de ocurrencia de todas las especies de *Chaetanthera*, para mostrar la distribución geográfica del género. Fuente de ocurrencias: Herbario Universidad de Concepción, Herbario digital Darwinion, Herbario Dra. MTK Arroyo 14
- Figura 3. Rasgos florales medidos en las especies de *Chaetanthera*..... 22
- Figura 4. A la izquierda una de las 3 hipótesis filogenética de 22 especies del género *Chaetanthera* inferida mediante Parsimonia. Se observan los valores de bootstrap superiores o iguales a 70%. El clado A y B corresponde a las especies del subgénero *Chaetanthera* y el clado C al subgénero *Tylloma*. A la derecha, hipótesis filogenética de 22 especies del género *Chaetanthera* obtenida mediante Inferencia Bayesiana. Se observan los valores de bootstrap del análisis de MV y de probabilidad *a posteriori* 29
- Figura 5. Porcentaje de aquenios por capítulo para cada tratamiento en 21 especies del género *Chaetanthera*. Las barras negras corresponden a los valores promedio. 35

Figura 6. Reconstrucción mediante Máxima Parsimonia de los estados ancestrales de la autocompatibilidad (arriba izquierda), capacidad de autogamia (arriba derecha), forma de vida (abajo izquierda) y hábitat (abajo derecha) para el género <i>Chaetanthera</i>	39
Figura 7. Reconstrucción de los estados ancestrales de la autocompatibilidad, capacidad de autogamia y forma de vida para el género <i>Chaetanthera</i> , mediante Máxima Verosimilitud	40
Figura 8. Tasas de evolución para los modelos de evolución correlacionada entre hábito de vida con sistema de incompatibilidad y hábito de vida con nivel de autogamia	41

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

A: tratamiento de autopolinización autónoma

AFI: índice de autogamia (autofertility index)

AIC: criterio de información de Akaike

BIC: criterio de información Bayesiano

C: tratamiento de polinización cruzada

CI: índice de consistencia

CONC: herbario de la Universidad de Concepción

D1: diámetro total de la flor

D2: diámetro del disco de la flor

FV: forma de vida

IB: inferencia bayesiana

ITS: espaciador transcrito interno (internal transcribed spacer)

MP: máxima parsimonia

MV: máxima verosimilitud

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PICs: contrastes filogenéticamente independientes

PSI: pseudo autoincompatibilidad (pseudo self-incompatibility)

RI: índice de retención

S: tratamiento de autopolinización asistida

SCI: índice de autocompatibilidad (self-compatibility index)

SI: autoincompatibilidad (self-incompatibility)

λ : lambda de Pagel

δ : delta de Pagel

RESUMEN

En especies con flores hermafroditas se pueden encontrar dos principales estados reproductivos relativamente estables; aquellas especies autocompatibles capaces de autopolinizarse autónomamente, y aquellas especies autoincompatibles y forzadas a la exogamia o polinización cruzada. Estudios en la evolución de los sistemas reproductivos han mostrado que el cambio desde la polinización cruzada hacia la autopolinización es una de las transiciones más frecuentemente observadas en la naturaleza, lo cual podría ocurrir como un mecanismo de aseguramiento reproductivo frente a la escasez de polinizadores. Del mismo modo, se ha establecido que la transición hacia la autogamia sería irreversible y que el restablecimiento del sistema de incompatibilidad genética, una vez que se ha perdido, es irrecuperable. Aunque teóricamente se ha propuesto que la autogamia debiera ser más frecuente en zonas altoandinas (debido a la disminución de vectores para la polinización que ocurre a mayores alturas), esta hipótesis es puesta en duda por la falta de evidencia empírica que la apoye. Alternativamente se proponen mecanismos que compensarían la falta de polinizadores, como mayores tamaños florales.

El objetivo de esta investigación fue determinar la direccionalidad de los cambios evolutivos en el sistema reproductivo, si existe alguna asociación entre la evolución de éstos con la evolución de la forma de vida, y si a mayores altitudes se observa más frecuentemente un sistema de reproducción autógeno o si hay mecanismos que compensen la disminución de polinizadores. Si la autogamia y la pérdida del sistema de incompatibilidad son irreversibles, si el aseguramiento reproductivo mediante autogamia es más frecuente en plantas anuales, y si a mayores alturas se presenta una fuerte disminución en los polinizadores es esperable que: 1) la autogamia y la autocompatibilidad evolucionen repetidamente y de manera irreversible; 2) la forma de vida haya evolucionado correlacionadamente con el sistema reproductivo y 3) la autogamia haya evolucionado más frecuentemente a mayores alturas o que alternativamente hayan evolucionado mecanismos florales que compensen la falta de polinización. Para evaluar esto se realizó una comparación entre los sistemas reproductivos, rasgos morfológicos y forma de vida de las especies del género *Chaetanthera* (Asteraceae) en un contexto filogenético. Para esto se construyó una hipótesis filogenética del género, se caracterizó el sistema reproductivo y se trazó su trayectoria evolutiva, se estudió la correlación entre la evolución del sistema reproductivo y la forma de vida, y se caracterizó la temperatura media durante la temporada de floración para luego estudiar su correlación con el sistema de reproducción y los rasgos florales, excluyendo el efecto filogenético.

El género *Chaetanthera* lo componen treinta especies que se distribuyen principalmente en Chile, pero también en Perú, Bolivia y Argentina, desde el nivel del mar hasta los 4000 msnm. Este género presenta condiciones ideales para este estudio pues además de distribuirse a bajas y altas altitudes, presenta tanto especies anuales

como perennes, su morfología floral es variada, al igual que el sistema de incompatibilidad y el grado de autogamia observado.

La hipótesis filogenética del género inferida a partir de las secuencias de la región ITS del núcleo, muestra una clara agrupación de uno de los dos subgéneros, mientras que el otro aparece como un grupo polifilético. Las especies andinas se encuentran mayoritariamente en el clado del subgénero *Tylloma*, a excepción de la especie andina *C. perpusilla*, que habita en el límite norte de la distribución andina de las especies.

El sistema reproductivo en el género abarca desde especies altamente capaces de autopolinizarse autónomamente y al mismo tiempo completamente autocompatibles, hasta especies que son incompatibles y obligatoriamente exógamas. También existen especies intermedias, con autoincompatibilidad parcial y dependencia intermedia de polinizadores. El área floral varía conjuntamente con la atractividad y con el número de óvulos, observándose que las especies con flores más grandes, como *C. spathulifolia*, *C. renifolia* y *C. villosa* pueden alcanzar hasta un diámetro de 6 cm, y especies tan pequeñas que su diámetro es de apenas 2 mm, como *C. taltalensis*. De las especies estudiadas, siete presentan una forma de vida perenne y 15 forma de vida anual. Las temperaturas durante la temporada de floración revelaron una tendencia en aquellas especies andinas a presentar valores más bajos, a excepción de *C. villosa*, posiblemente a causa de su floración tardía.

La evolución del sistema reproductivo estaría mostrando una transición desde un ancestro con autoincompatibilidad parcial, hacia especies con incompatibilidad total, parcial y autocompatibilidad. En consecuencia, estaría ocurriendo una restauración del sistema genético de incompatibilidad esporofítico, así como pérdida de este mismo

(para los distintos casos). El sistema reproductivo además estaría evolucionando correlacionadamente con la forma de vida, observándose que todas las especies autógamas son obligatoriamente anuales. Excluyendo el efecto filogenético, el hábitat de cada especie no muestra una correlación con el sistema reproductivo o con los rasgos florales estudiados. Sin embargo al no excluir la filogenia, se observa una tendencia a que aquellas especies que no son autógamas tengan un mayor número de óvulos a mayores altitudes. Es decir que las especies con dependencia de polinizadores que habitan en Los Andes tienen un mayor número de floretes por capítulo, sin embargo estas mismas se encuentran más emparentadas entre ellas que con el resto de las especies del género. En las especies de *Chaetanthera* tanto el hábitat como los rasgos florales están fuertemente determinados por la historia filogenética, mientras que el sistema reproductivo muestra mayor labilidad.

En el género *Chaetanthera* no se observa que en zonas más altas que presentan escasez de polinizadores, exista aseguramiento reproductivo a través de autogamia, ni tampoco se observan mecanismos compensatorios como los investigados en este trabajo. No se puede descartar que existan otros mecanismos que estén compensando las menores tasas de visita, como por ejemplo una mayor longevidad floral.

En términos generales, permanece poco clara la direccionalidad de los cambios evolutivos en el sistema reproductivo en este género, aunque estos cambios si serían reversibles. Los resultados estarían dando cuenta de que el fuerte efecto de la forma de vida en los sistemas reproducción en *Chaetanthera* no permite la adquisición de autogamia en muchas especies perennes, aún cuando hay limitación de polen.

Una pregunta que falta por contestar en el género *Chaetanthera* todavía es cómo las especies no autógamas que viven a mayores alturas logran reproducirse teniendo en cuenta la escasez de polinizadores.

ABSTRACT

In species with hermaphrodite flowers you can find two main relatively stable reproductive strategies; those self-compatible species capable of autonomous self-pollination and those self-incompatible and forced to cross-pollination or outcrossing species. Studies on the evolution of reproductive systems have shown that the change from outcrossing to selfing is one of the most frequently observed transitions in nature, which could occur as a reproductive assurance mechanism against scarcity of pollinators. Similarly, it is established that the transition to outcrossing would be irreversible and that the restoration of genetic incompatibility system, once lost, is irretrievable. Although theoretically it is proposed that inbreeding should be more common in highlands (due to decreased vectors for pollination that occurs at higher altitudes), this assumption is challenged by the lack of empirical evidence to support it. Alternatively, mechanisms to compensate for the lack of pollinators are proposed, such as increased floral sizes.

The objective of this research was determine the directionality of evolutionary changes in the reproductive system, if there is any association between the evolution of these with the evolution of the life strategy, and if selfing is most often observed at higher

altitudes or if there are mechanisms to compensate the lack of pollinators. If inbreeding and loss of self-incompatibility system are irreversible, if reproductive assurance through self-pollination is more common in annual plants, and if at higher altitudes there is a decrease in pollinators, it is expected that: 1) selfing and self-compatibility have evolved repeatedly and irreversibly; 2) life strategies have evolved in correlation with the reproductive system and 3) selfing has evolved more frequently at higher altitudes or alternatively floral mechanisms have evolved to compensate the lack of pollination. To assess this, it was performed a comparison between reproductive systems, morphological features and life strategy of the genus *Chaetanthera* (Asteraceae) in a phylogenetic context. A phylogenetic hypothesis for this genus was built, the reproductive system was characterized and its evolutionary path was traced, the correlated evolution between the reproductive system and life strategy was studied, and the average temperature was characterized during the flowering season to study its correlation with the reproductive system and floral traits, excluding phylogenetic effect.

The genus *Chaetanthera* has thirty species distributed mainly in Chile, but also in Perú, Bolivia and Argentina, from sea level to 4000 masl. This genus presents ideal conditions for this study because, as well as is distributed at low and high altitudes, presents both annual and perennial species, the flower morphology is varied, just like the strength of the incompatibility system and the degree of selfing observed.

Phylogenetic hypothesis inferred from sequences of ITS nuclear region, shows a clear grouping of one of the two subgenus, while the other appears as a polyphyletic group. Andean species are mostly in the clade of the subgenus *Tylloma* except for *C. perpusilla*, inhabiting the northern edge of the Andean species distribution.

The reproductive system range from species highly capable of autonomous selfing and at the same time completely self-compatible, to species that are self-incompatible and necessarily exogamous. There are also intermediate species with partial self-incompatibility and intermediate dependence on pollinators. The floral area varies along with the attractiveness and the ovule number, and it was observed that species with larger flowers, as *C. spathulifolia*, *C. renifolia* and *C. villosa* can reach a diameter of 6 cm, and there are species so small that its diameter is only 2 mm, as *C. taltalensis*. Of the species studied, seven have a perennial life form and 15 are annual. Temperatures during the flowering season revealed a trend in those Andean species to have lower values, except for *C. villosa*, possibly because of its late flowering.

The evolution of the reproductive system show a transition from an ancestor with partial self-incompatibility, to species with total and partial self-incompatibility and self-compatibility. According to this, it is happening a restoration of the sporophytic self-incompatibility genetic system and loss of the same (for the different cases). Reproductive strategy it is also evolving in correlation to life form, our results show that all the autogamous species are necessarily annual. Excluding the phylogenetic effect, the habitat of each species shows no correlation with the reproductive system or floral traits studied. However by not excluding phylogeny, a trend is observed where those species who depend on pollinators have a greater ovule number per flower at higher altitudes. This means that the pollinator dependent species inhabiting the Andes have a larger number of florets per capitulum, yet these species are more related to each other than with the rest of the species of the genus. *Chaetanthera* species in both habitat and floral traits are strongly determined by the phylogenetic history, while the reproductive system shows greater lability.

The genus *Chaetanthera* shows that there is no reproductive assurance in higher areas with lack of pollinators, through selfing, nor compensatory mechanisms as those investigated in this work. It cannot be excluded that there are other mechanisms that are compensating for lower visit rates, such as increased floral longevity.

Overall, it remains unclear the directionality of evolutionary changes in the reproductive system in this genus, although these changes would be indeed reversible. The results revealed that the strong effect of life form on reproductive strategy in *Chaetanthera* not allow the acquisition of selfing in many perennial species, even when there is pollen limitation.

One question which still remains unanswered in *Chaetanthera* is how the not-autogamous species, that live at higher altitudes, manage to reproduce given the lack of pollinators.

INTRODUCCION

Las flores, o el órgano reproductivo de las angiospermas, muestran una gran diversidad funcional y morfológica, más que cualquier otra estructura reproductiva en cualquier otro grupo de organismos (Barrett 2004, Barrett 2010a). Esta gran variedad radica en la inmovilidad de las plantas, la necesidad de vectores que transporten el polen hacia otros individuos para asegurar la polinización cruzada y una alta dependencia en vectores bióticos de polinización. Por lo que la variación floral observada, sería la consecuencia histórica de la selección natural frente a la interacción con diversos vectores de polinización (Waser & Ollerton 2006, Harder & Barrett 2006, Harder & Johnson 2009, Barrett 2010a, Barrett 2010b).

La mayoría de las angiospermas tienen flores hermafroditas, con órganos reproductivos masculinos y femeninos en la misma flor, que muestran múltiples arreglos reproductivos (flores solitarias, inflorescencias, agrupaciones de flores), sin embargo sólo entre un 20 a 25% de ellas tienen la capacidad de autopolinizarse de manera autónoma (autogamia), es decir sin la ayuda de un vector externo (Barrett & Eckert 1990). Para evitar la autopolinización y asegurar la polinización cruzada, muchas especies con flores hermafroditas presentan adaptaciones morfológicas como

la separación espacial (hercogamia) y temporal (dicogamia) en el desarrollo de las partes masculinas y femeninas de la flor. Paralelamente otras especies presentan sistemas de incompatibilidad genética (autoincompatibles) que obligan a la exogamia o polinización cruzada, donde el traspaso de polen desde una flor a otra estaría obligatoriamente mediado por un vector abiótico o polinizador. Esta extraordinaria diversidad de sistemas de reproducción, ha intrigado a los biólogos evolutivos desde los tiempos de Darwin (Darwin 1876, Stebbins 1950, Bateman 1952, Lloyd & Schoen 1992, Barrett 1995, Goodwillie *et al.* 2005, Busch & Delph 2011), pues estaría estrechamente relacionada con patrones morfológicos y fisiológicos de las flores, así como con el ambiente donde se encuentran, y en particular, con la abundancia y eficiencia de los vectores de polinización.

La gran labilidad de los sistemas de reproducción de las angiospermas implicaría que ha habido transiciones entre uno y otro estado. Sin embargo el conocimiento sobre la dirección, frecuencia y factores evolutivos que subyacen estas transiciones es aun pobre. La evolución de linajes o especies capaces de realizar autogamia a partir de ancestros exógamos es una de las transiciones evolutivas más frecuentes en las angiospermas (Stebbins 1950, Stebbins 1957, Takebayashi & Morrell 2001). De este tipo de observación y otras, se ha propuesto que la autoincompatibilidad genética sería un rasgo primitivo en las angiospermas, mientras que la autocompatibilidad y la autogamia, habrían derivado secundariamente. Sumado a esto, en el caso de los taxa con sistemas genéticos de incompatibilidad que presentan un sistema de reconocimiento y rechazo del polen basado en un locus altamente polimórfico (locus S) (Ej: Solanaceae, Rosaceae), se ha argumentado que la pérdida de la polimorfía ocurriría rápidamente y sería prácticamente imposible de recuperar. Esto se ha

probado en la familia Solanaceae (Ilgic *et al.* 2006), pero se desconoce cuán generalizable es esta conclusión. Por otra parte, se ha propuesto que la autogamia podría representar un callejón evolutivo "sin salida" (Stebbins 1957), lo que tendría dos implicaciones: primero, que la autogamia no persistiría como una estrategia a largo plazo; y segundo, que aquellos linajes autógamos no podrían revertir a la exogamia (Takebayashi & Morrel 2001). Esta hipótesis ha sido ampliamente respaldada por estudios comparativos, que no han podido mostrar inequívocamente una transición desde la autogamia hacia la exogamia. Por otra parte, estudios filogenéticos en angiospermas señalan que sistemas de incompatibilidad (SI) podrían haber evolucionado independientemente, al menos 21 veces (Weller *et al.* 1995), y recientemente se ha descrito que en la familia Asteraceae la pérdida del SI no es irreversible, si no que ocurrirían cambios dinámicos entre los distintos estados del sistema reproductivo (Ferrer & Good-Avila 2007).

Con respecto a los factores evolutivos que subyacen a las transiciones entre los sistemas de reproducción, los esfuerzos se ha enfocado principalmente en aspectos genéticos y el grado de dependencia de los sistemas en los polinizadores. En base a esto se ha propuesto que la autogamia sería seleccionada en ciertas circunstancias específicas, y se han propuesto dos hipótesis para explicar su evolución: la hipótesis de selección automática, derivada de modelos genético poblacionales que muestran que la transmisión del gen de la autogamia tiene una ventaja de 3:2 en relación con aquellos que causan la exogamia (o transmisión automática de los genes a la descendencia) (Fisher 1941, Lloyd 1979). La hipótesis de aseguramiento reproductivo postula que la autogamia evolucionó dado que aumenta la producción de semillas cuando hay escasez de parejas reproductivas o de vectores para la polinización

(Darwin 1876, Lloyd 1965, Arroyo 1973, Stebbins 1974, Arroyo & Squeo 1990, Inouye *et al.* 1996, Busch & Delph 2011). En concordancia con la hipótesis de aseguramiento reproductivo, se ha descrito mayor incidencia de autogamia en ambientes donde hay déficit o impredecibilidad de visitas de polinizadores o donde las poblaciones son de tamaño reducido (Barrett 2010b), como en islas (Barrett 1996), en los márgenes del rango de distribución de las especies (Pérez *et al.* 2013), y en hábitats con condiciones climáticas extremas (Lloyd 1979). Adicionalmente se ha descrito que el aseguramiento reproductivo vía autogamia es más frecuente en plantas anuales, ya que tienen sólo una oportunidad de reproducirse en su vida, comparado con plantas perennes que se reproducen más de una vez (Stebbins 1950, Arroyo & Squeo 1990).

En contraposición a los factores genéticos y ecológicos que favorecen a la autogamia, modelos teóricos proponen que esta estrategia presenta fuertes desventajas, primero la disminución de la diversidad genética, que conllevaría a una pérdida de potencial adaptativo, lo que eventualmente afectaría la persistencia a largo plazo de las especies que presenten este sistema reproductivo (Stebbins 1957, Charlesworth & Charlesworth 1995), y segundo la degradación genética o acumulación de mutaciones deletéreas, que conllevarían a la depresión por endogamia (Charlesworth *et al.* 1993).

Tomando en cuenta los diversos antecedentes, los sistemas de reproducción reflejarían múltiples factores. Un buen ejemplo lo constituyen los ambientes de altamontaña en donde hay un progresivo descenso en la temperatura del aire con respecto al aumento de la altitud (Barry 1981). En dichos ambientes se han descrito cambios concomitantes en el espectro de polinizadores a medida que se aumenta en altura (Arroyo *et al.* 1982) o se disminuye en temperatura (Körner 2003), observándose que la riqueza y diversidad de polinizadores, así como las tasas de visita son más

bajas a mayores altitudes (Arroyo *et al.* 1985). De acuerdo con la hipótesis de aseguramiento reproductivo, se ha propuesto que la incidencia de la autogamia debiese aumentar junto con la altura (Bliss, 1962). Sin embargo, el sistema de autopolinización autónoma no pareciera ser más frecuente con la altitud, incluso muchas especies andinas encontradas a altas alturas son fuertemente autoincompatibles, polinizadas por insectos, con flores vistosas y de gran tamaño (Arroyo *et al.* 1982, Arroyo & Squeo 1990, Bingham & Orthner 1998).

Los patrones de distribución de los sistemas reproductivos en las altas montañas estarían sugiriendo que algunas especies andinas presentan otros mecanismos que les permitan lidiar con las menores tasas de polinización y sus consecuencias genéticas (Stebbins 1981, Arroyo *et al.* 1985, Eckhart 1991, Conner & Rush 1996). En varias especies se ha descrito un aumento del tamaño floral (Baonza & Malo 1997, Maad *et al.* 2013), en la fracción de recursos asignada a las flores (Fabbro & Korner 2004), así como también en la longevidad floral (Arroyo *et al.* 1985, 2013), que han sido interpretados como mecanismos compensatorios para aumentar la tasa de visitas y la probabilidad de polinización (Arroyo *et al.* 2006). Otro rasgo floral que podría ser favorecido en ambientes con escasez o altas fluctuaciones de polinizadores, es el incremento en el número de óvulos por flor (Burd *et al.* 2009). De acuerdo a Burd (2009) cuando existe una gran disparidad en la recepción de polen, habrán impredecibles ganadores y perdedores entre las flores de una planta, entonces frente a la posibilidad de que los recursos sean desperdiciados en cualquier flor que no sea polinizada, aquellas flores que sí lo son y tienen un gran número de óvulos, realizarán una gran contribución a la producción de semillas, compensando así a aquellas flores que no fueron polinizadas.

Una manera de avanzar en el entendimiento del papel de los diversos factores que modulan los sistemas de reproducción en las angiospermas es considerar su expresión en linajes que varían en relación con el hábitat, forma de vida, rasgos florales y sistema de reproducción. De acuerdo con lo anterior, en esta tesis se eligió el género *Chaetanthera* Ruiz & Pav. (Asteraceae: Mutisieae) como modelo de estudio. Este género tiene 30 especies anuales, perennes y subarborescentes, que se distribuyen desde los 10 hasta los 41°S, y entre la costa del Pacífico hasta los 4000 msnm en la cordillera de los Andes abarcando un amplio rango de temperatura ambiental. Los capítulos de las especies de *Chaetanthera* son muy variables en cuanto a tamaño, color de los radios y número de floretes y se ha constatado gran variación en el sistema de reproducción (MTK Arroyo, datos no publicados).

Utilizando reconstrucción filogenética y contrastes filogenéticamente independientes se investigaron las siguientes preguntas: 1) ¿Es la evolución de la autogamia un "callejón sin salida" en el género *Chaetanthera*? 2) ¿La autogamia ha evolucionado en asociación a la forma de vida anual? 3) ¿Bajo condiciones más frías (y por tanto menos propicias para la actividad de los polinizadores) se observa más frecuentemente un sistema de reproducción autógeno? y 4) ¿Bajo condiciones más frías se observan mayores capítulos y mayor número de óvulos por capítulo?

HIPOTESIS

1. La autogamia evolucionó repetidamente en el género a partir de la exogamia y en forma irreversible.
2. Los sistemas de reproducción y la forma de vida habrían evolucionado en forma correlacionada.

3. A mayor altura se observará una mayor tendencia a la compatibilidad genética y autogamia, o alternativamente la evolución de mecanismos compensatorios, como un mayor tamaño en los capítulos florales, así como un mayor número de floretes por capítulo.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Analizar la relación evolutiva existente entre el sistema de reproducción, la forma de vida, la morfología floral y el hábitat, en el género *Chaetanthera*.

Objetivos específicos:

- Determinar el sistema de reproducción, y medir distintos rasgos florales en al menos 20 especies del género.
- Reconstruir la filogenia del género mediante secuencias del marcador molecular ITS.
- Reconstruir los estados ancestrales del sistema de reproducción, y determinar si las estrategias han evolucionado en forma correlacionada con la forma de vida.
- Reconstruir los estados ancestrales de la morfología floral y determinar si ha evolucionado en forma correlacionada con la temperatura media del hábitat de cada especie.

- Determinar si existe alguna tendencia en la relación entre el hábitat que ocupa cada especie, y la estrategia reproductiva que presenta.



Figura 1. Diversidad floral en algunos representantes del género

MATERIALES Y METODOS

Modelo de estudio

El género *Chaetanthera* (Asteraceae: Mutiseae) fue descrito en el año 1794 por Ruiz & Pavón (Fig. 1), y desde entonces ha sido revisado en múltiples ocasiones, siendo particularmente debatida su relación con el género *Oriastrum* descrito en 1842 por Poeppig & Endlicher (Lessing 1832, de Candolle 1838, Reiche 1904). En 1937 Cabrera reunió ambos géneros en el género *Chaetanthera*, el cual se componía de siete subgéneros y 44 especies. Estudios posteriores mostraron marcadas diferencias entre los dos grupos en la morfología de los granos de polen (Parra & Marticorena 1972, Tellería & Katinas 2004) y en el tipo de pilosidad presente en los aquenios (Hansen 1991, Davies & Facher 2001). Estos resultados fueron apoyados por un estudio filogenético basado en datos moleculares, que también mostró una clara división entre los grupos (HersHKovitz *et al.* 2006) y recogidos por Davies (2010) en una revisión sistemática del grupo, donde reestablece a *Oriastrum* como un género propiamente tal y define dos subgéneros para *Chaetanthera*: *Tylloma* y *Chaetanthera*. Para el desarrollo de esta tesis se consideró a *Chaetanthera* y *Oriastrum* como géneros distintos, y se trabajó con las 30 especies establecidas por Davies en 2010 (Tabla I).

Tabla I. Especies del subgénero *Chaetanthera* y *Tylloma* y su forma de vida (FV): anual (A) o perenne (P), localidades, sistema reproductivo y morfología (SR/M): datos colectados durante esta tesis (T) y datos previos (MK), y datos usados para filogenia: número de acceso a GenBank (GB) y número de herbario (Herb).

<i>Chaetanthera</i>	FV	Localidad	SR/M	Filogenia
<i>C. albiflora</i>	A	Los Vilos	MK	GB: DQ355877 Herb: Arroyo 25012
<i>C. chilensis</i>	P	Río Clarillo	MK	Lab Herb: Arroyo 25043
<i>C. ciliata</i>	A	Chillán	MK	GB: DQ355888 Herb: Arroyo 25157
<i>C. depauperata</i>	A	-	-	-
<i>C. elegans</i>	P	Nahuelbuta	T	GB: DQ355839 Herb: Arroyo 26000
<i>C. glandulosa var glandulosa</i>	P	La Disputada	T	-
<i>C. glandulosa var gracilis</i>	P	-	-	-
<i>C. incana</i>	A	Los Vilos	MK	GB: DQ355885 Herb: Arroyo 25013
<i>C. linearis</i>	A	Farellones	MK	GB: DQ355875 Herb: Arroyo 25164
<i>C. linearis x albiflora</i>	A	-	-	-
<i>C. microphylla</i>	A	Roblería de Cobre de Loncha	MK	GB: DQ355871 Herb: Arroyo 25007
<i>C. moenchioides</i>	A	Las Chinchillas	MK	GB: DQ355846 Herb: Arroyo 25018
<i>C. multicaulis</i>	A	Cuesta Lo Prado	MK	Lab Herb: Arroyo 25062
<i>C. perpusilla</i>	A	Putre	MK	GB: DQ355880 Herb: Arroyo 25202
<i>C. peruviana</i>	A	-	-	-
<i>C. ramosissima</i>	A	Cuesta La Dormida	MK	Lab Herb: Arroyo 25064
<i>C. x serrata</i>	P	Chillán	MK	Lab Herb: Arroyo 25070
<i>C. taltalensis</i>	A	Cuesta Buenos Aires	MK	GB: DQ355878 Herb: Arroyo 25055
<i>Tylloma</i>	FV	Localidad	SR/M	Filogenia
<i>C. euphrasioides</i>	A	Farellones	MK	GB: DQ355868 Herb: Arroyo 25176
<i>C. flabellata</i>	A	Yerba Loca	MK	Lab Herb: Arroyo 25162
<i>C. flabellifolia</i>	A	Mina El Indio	T	GB: DQ355852 Herb: Arroyo 25078

<i>C. frayjorgensis</i>	A	Punta Teatinos	T	-
<i>C. glabrata</i>	A	Yerba Loca	MK	GB: DQ355856 Herb: Arroyo 25163
<i>C. kalinae</i>	A	Mina El Indio	T	Lab Herb: Arroyo 25226
<i>C. limbata</i>	A	-	-	-
<i>C. philippii</i>	P	Mina El Indio	T	GB: DQ355863 Herb: Arroyo 25075
<i>C. pubescens</i>	A	-	-	-
<i>C. renifolia</i>	P	La Parva	MK	GB: DQ355860 Herb: Arroyo 25175
<i>C. schroederi</i>	A	La Disputada	T	-
<i>C. spathulifolia</i>	P	Las Cuevas	T	GB: DQ355864 Herb: Arroyo 25098
<i>C. splendens</i>	A	-	-	-
<i>C. villosa</i>	P	Laguna del Laja	T	GB: DQ355865 Herb: Arroyo 210671

De acuerdo con Davies (2010), *Chaetanthera* es un género de plantas endémico del sur de Sudamérica, que se distribuye desde los 10°S, en el altiplano peruano, a lo largo de la cordillera de Los Andes, hasta los 41°S en los bosques templados de Chile y Argentina (Cabrera 1937) y desde el nivel del mar hasta los 4000 msnm (Fig. 2). Consta de 30 especies en total, dos variedades (*C. glandulosa* var *glandulosa* y *C. glandulosa* var *gracilis*), y dos híbridos (*C. x serrata* y *C. linearis x albiflora*). El centro de diversidad se encuentra entre los 29 y 34°S en zonas semiáridas y mediterráneas del norte chico y zona central de Chile. La mayoría de las especies crece bajo el piso subandino de vegetación, aunque hay algunas especies distribuidas a mayores altitudes. Restringidas a la zona subandina se encuentran: *C. renifolia* y *C. flabellata* en Los Andes alrededor de Santiago, y *C. kalinae* y *C. splendens* en Los Andes alrededor de Coquimbo. Otras especies de altas altitudes son *C. peruviana*, distribuida en el límite inferior de la vegetación de puna, *C. perpusilla*, en el límite austral del Altiplano.

El género es representado en su mayoría por hierbas anuales, sin embargo existen siete especies que son perennes y una bianual. Al igual que el resto de los miembros de la familia Asteraceae, las flores están organizadas en capítulos florales que en términos ecológicos constituyen la unidad reproductiva y de atracción de polinizadores. La morfología y tamaño de los capítulos florales varía ampliamente, con algunas especies de lígulas muy reducidas, o carentes de ellas, y otras con capítulos vistosos provistos por flores liguladas grandes. En relación al tamaño existen capítulos de apenas 2 mm de diámetro (*C. taltalensis*), hasta algunos de 50 mm (*C. villosa* y *C. renifolia*). De acuerdo a los antecedentes usados en este trabajo, el sistema de reproducción también es variado en este género. Es posible encontrar especies altamente autógamas, como *C. euphrasioides*, en donde el número de semillas que se produce por autopolinización autónoma (no asistida) es de un 100%, y también podemos encontrar especies completamente autoincompatibles, como *C. multicaulis*, en donde la autopolinización asistida produjo un valor cercano al 0% de fructificación (MTK Arroyo, datos no publicados).





Figura 2. Puntos de ocurrencia de todas las especies de *Chaetanthera*, para mostrar la distribución geográfica del género. Fuente de ocurrencias: Herbario Universidad de Concepción, Herbario digital Darwinion, Herbario Dra. MTK Arroyo.

Filogenia molecular

Para reconstruir la filogenia del género se obtuvieron 16 secuencias de GenBank de distintas especies del género *Chaetanthera*, generadas por Hershkovitz *et al.* (2006). Las especies en cuestión fueron renombradas de acuerdo a la nueva taxonomía propuesta por Davies (2010). Nos aseguramos de que aquellas secuencias utilizadas tuvieran un respaldo identificado taxonómicamente por Allison Davies en el Herbario de Concepción. De los taxa faltantes, se tenían muestras conservadas en sílica gel, etiquetadas de acuerdo a su número de herbario, por lo que nuevamente usamos sólo las identificadas por A. Davies (Tabla I).

El ADN fue extraído siguiendo el protocolo de JanBen (1997), con las modificaciones propuestas por Drabkova (2002). Mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó la región ITS (espaciador transcrito interno de genes ribosomales) usando los partidores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') (White *et al.* 1990). La reacción se llevó a cabo en un volumen total de 30 μ L compuesto por 15 μ L de Master Mix (Promega®), 1,8 μ L de cada partidor (10 mM), 1,5 μ L de BSA (10 mg/mL), 2,5 μ L de $MgCl_2$ (25 mM), 1 μ L de DNA (100 ng/ μ L) y 6,4 μ L agua purificada. Inicialmente el DNA se desnaturizó a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de amplificación, que contempla la etapa de desnaturación de 0,75 min a 94 °C, alineamiento de 1,5 min a 52 °C y elongación de 1,5 min a 72 °C. Se finalizó con un ciclo de extensión de 7 minutos a 72 °C, y luego las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta ser retiradas del termociclador. El producto de PCR se analizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% teñidos con Redgel (5 μ L/50mL) en buffer TAE 1X. Los productos de PCR fueron purificados y mandados a secuenciar en Macrogen Inc. (Korea). Las secuencias se editaron en el

programa ProSeq (Filatov 2002). Para la evaluación visual de las secuencias se utilizó el programa BioEdit (Hall 2011), y el alineamiento se realizó en el programa ClustalX v2.1 (Larkin *et al.* 2001). Todas las secuencias utilizadas corresponden a la sección del ADN nuclear conformado por ITS1, 5,8S rRNA e ITS2, que luego del alineamiento, tuvo un largo total de 767 pares de bases.

Análisis filogenético

Para reconstruir la filogenia del género se utilizaron tres aproximaciones. En el caso de la inferencia filogenética mediante Parsimonia, se utilizó el programa PAUP v4.0b10 (Swofford 2001). Se realizó una búsqueda heurística de los árboles más parsimoniosos, y se obtuvo el valor de respaldo de los nodos con un análisis de bootstrap con 1000 réplicas. Previo al análisis se realizó una exclusión de aquellos caracteres no informativos para parsimonia, por lo que el análisis final se realizó sólo con 218 caracteres. Estos fueron tratados como no ordenados y con igual peso. El criterio de optimización utilizado por defecto fue ACCTRAN y los re-arreglos de los árboles usados en la búsqueda heurística se obtuvieron mediante Tree bisection and reconnection (TBR). Los análisis se realizaron con el programa PAUP v4.0b10 (Swofford 2001). Para los análisis de Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB), lo primero que se realizó fue una búsqueda del mejor modelo de sustitución nucleotídica, en el programa jModeltest (Darriba *et al.* 2012). Se evaluaron los modelos mediante el criterio de información de Akaike (AIC), y Bayesiano (BIC). Cada resultado se aplica en ML y en IB respectivamente.

De acuerdo al criterio de información de Akaike, el mejor modelo de sustitución nucleotídica para los datos, es SYM + G (AIC = 9126,6). Los parámetros a utilizar fueron: igual frecuencia de bases, 6 tipos de sustitución con sus respectivas tasas (0,6468 1,3772 0,8413 0,3059 4,4850 1,0000), variación en la tasa de sustitución entre sitios ($\gamma = 0,3420$) y ausencia de sitios invariantes. De acuerdo a estos parámetros, en el programa PAUP se utilizó el modelo GTR + G para la reconstrucción filogenética mediante ML, pues no tiene como opción el modelo indicado por jModeltest. A través de una búsqueda heurística se encontró el árbol más probable, y el respaldo de los nodos se calculó mediante un bootstrap de 1000 réplicas. Los arreglos de los árboles usados en la búsqueda heurística se obtuvieron mediante Tree bisection and reconnection (TBR).

En el caso del criterio de información Bayesiano, el mejor modelo de sustitución nucleotídica para los datos, es TIM3ef + G (BIC = 9399,7). Los parámetros a utilizar fueron: igual frecuencia de bases, 6 tipos de sustitución con sus respectivas tasas (0,4786 1,4667 1,0000 0,4786 4,7761 1,0000), variación en la tasa de sustitución entre sitios ($\gamma = 0,3400$) y ausencia de sitios invariantes. De acuerdo a estos parámetros, en el programa Mr.Bayes (Ronquist & Huelsenbeck 2003) se utilizó el modelo GTR + G para la reconstrucción filogenética, realizando un análisis mediante MCMC con 5000000 de generaciones, muestreando cada 500 y descartando los primeros 2000 árboles. Para comprobar que los parámetros alcanzaran la convergencia, dado el número de generaciones especificado, se utilizó el programa Tracer (Rambaut & Drummond 2007). El respaldo de los nodos fue la probabilidad a *posteriori* calculada a partir del conjunto de árboles obtenidos.

Enraizamiento del árbol

Se obtuvieron 6 secuencias de GenBank, para ser utilizadas como grupo externo, de las especies *Perezia virens*, *Mutisia hamata*, *Plazia daphnoides*, *Oriastrum acerosum*, *Oriastrum stuebelii* y *Oriastrum lycopodioides*. Las últimas tres especies corresponden al grupo hermano del género (Hershkovitz *et al.* 2006), que presenta divergencias pequeñas, por lo que no significan ninguna dificultad para el alineamiento. Sin embargo debido a que estas secuencias eran muy similares a las de *Chaetanthera*, cuando sólo se utilizaban ellas, el grupo interno no presentaba un valor alto de respaldo. Por esto se usaron además las tres primeras especies mencionadas, que son de la misma familia, pero más lejanamente emparentadas. Dada la baja divergencia de este grupo, su obtuvo un alineamiento confiable.

Sistema reproductivo

En este trabajo se estudió el sistema reproductivo de nueve especies para luego complementar esta información con la obtenida previamente por la Dra. MTK Arroyo en 16 especies del género. De esta forma se logró reunir la información de los sistemas reproductivos de 22 de las 30 especies descritas de *Chaetanthera*. En la Tabla I se entrega información sobre las especies, las localidades y números de herbario.

Para determinar el sistema reproductivo de cada especie del género, se localizó una población por especie con una densidad alta de plantas. En cada población se marcó un máximo de 30 capítulos por tratamiento, provenientes de distintas plantas. En las ocasiones que fueron posibles, los tres tratamientos se realizaron en la misma planta.

El número de capítulos estudiados varió de acuerdo a la densidad de las poblaciones encontradas y a la herbivoría presente en las plantas.

Autopolinización manual (S): Se embolsaron los capítulos en estado de yema, y al momento de su apertura se polinizó con polen del mismo capítulo, o con polen proveniente de flores de la misma planta, para así determinar si la especie era autocompatible.

Autogamia no asistida (A): Las flores fueron embolsadas en estado de yema, y fueron dejadas sin intervención hasta la fructificación con el objetivo de determinar si la especie era autógena.

Polinización cruzada manual (C): Al momento de la apertura de las flores, éstas se polinizaron manualmente utilizando polen proveniente de otros individuos de la misma especie.

Emasculación: Cuando los capítulos estaban en estado de yema y a punto de abrir se cortó cuidadosamente la parte apical de ellos, donde se sitúan las anteras, teniendo la precaución de no dañar la parte basal de los capítulos, donde se encuentran los ovarios. Los capítulos emasculados fueron embolsados para evitar la interferencia de polinizadores y de esta forma determinar si la especie era apomíctica.

Para la mayoría de las especies se repetían los cruzamientos de cada tratamiento a lo largo de la vida del capítulo. En el caso en que no fue posible polinizar varias veces, se contó el número de floretes con estigmas receptivos el día de la polinización, utilizando este valor en vez del total de floretes por capítulo para los cálculos de porcentaje de floretes que formaron frutos. Al final de la temporada, lo que varió entre 3 y 4 semanas, se recolectaron los capítulos y se contó el número de aquenios producidos en cada

capítulo marcado y se estimó el porcentaje de aquenios obtenido respecto al número de floretes polinizados para cada tratamiento. En la mayoría de las especies los floretes ligulados no forman o forman escasos aquenios por lo que no fueron contabilizados en estos casos.

Con esta información se estimó el índice de autocompatibilidad (SCI) y el índice de autofertilidad (AFI) (*sensu* Lloyd & Schoen 1992) de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$\text{SCI} = \% S / \% C$$

$$\text{AFI} = \% A / \% C$$

donde %S, %A y %C corresponden al porcentaje de aquenios obtenidos mediante autopolinización manual, autopolinización autónoma y polinización cruzada respectivamente. Ambos índices varían idealmente, de 0 a 1. En el caso de SCI un valor de 0 significa que la especie es altamente incompatible, y un valor de 1 significa que la especie es completamente compatible. Para el AFI un valor de 0 significa que la especie no es capaz de autopolinizarse autónomamente por lo que necesita la intervención de polinizadores, y un valor de 1 significa que la especie es completamente autógena. Además se realizó una prueba t de student o de Mann-Whitney (para datos paramétricos y no paramétricos respectivamente) para determinar si el número de aquenios producido era significativamente diferente entre tratamientos (A vs C; S vs C). Esto fue llevado a cabo en el programa R (R Core Team, 2014).

Morfología floral

Para las mismas poblaciones donde se realizaron los experimentos reproductivos descritos anteriormente, se colectó en terreno un capítulo de 50 individuos. Se midieron 4 rasgos florales: diámetro del capítulo incluyendo y excluyendo flores liguladas (D1 y D2 respectivamente); número de flores del disco; y número de flores del rayo (Fig. 3). Esta información también fue complementada con la obtenida previamente por la Dra. MTK Arroyo. A partir de los datos de morfología se calculó el área total de cada capítulo y el área del centro del mismo, para luego definir a la atraktividad, como aquella área que considera solamente la parte llamativa de la flor (flores liguladas). Se consideró el número de óvulos como el número de flores tubulares. Se excluyeron las flores liguladas ya que fue evidente que en la mayoría de las especies no suelen fructificar.

$$\text{N}^\circ \text{ de óvulos} = \text{Número de flores tubulares}$$

$$\text{Área total del capítulo} = \pi \times (D1/2)^2$$

$$\text{Área interna del capítulo} = \pi \times (D2/2)^2$$

$$\text{Atraktividad} = \text{Área total del capítulo} - \text{Área interna del capítulo}$$

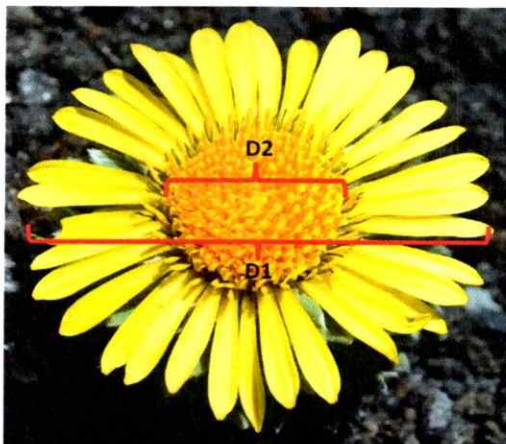


Figura 3. Rasgos florales medidos en las especies de *Chaetanthera*.

Caracterización del hábitat

Dado que los cinturones vegetacionales descienden globalmente a medida que se aumenta en latitud (Luebert & Pliscoff 2006), y que el género estudiado presenta una amplia distribución latitudinal, usar un valor absoluto de altitud como un proxy de la temperatura bajo la cual viven las especies no es posible. Por ejemplo dos especies puede que estén a una misma altitud, una en los Andes de Coquimbo y otra en los Andes de Santiago pero presentan valores diferentes de temperatura promedio (ver resultados). Por esto escogimos trabajar con valores de temperatura media en vez de altura. Por otra parte, se decidió trabajar sólo con la temperatura del periodo de floración ya que lo relevante son las condiciones que existen cuando ocurre la polinización pues como describimos anteriormente, los polinizadores son susceptibles a las temperaturas y porque nuestras hipótesis se respaldan en la escasez de visitas de polinizadores observada a mayores alturas.

A partir de muestras del Herbario de Concepción (CONC), herbario digital del Instituto de Botánica Darwinion (SI) y del herbario personal de la Dra. MTK Arroyo, se obtuvieron los puntos de ocurrencia de todas las especies y se registró la fecha de cada muestra y su estado fenológico, para así determinar los meses de floración de cada una de ellas. Se escogieron los tres meses seguidos en que la floración fue más frecuente.

Con el objetivo de evitar la sobreestimación de las temperaturas de aquellos lugares con muchas colectas, los puntos de ocurrencia se transformaron en una grilla de presencia en donde cada cuadrante tenía un tamaño de 1 km² aproximadamente. Las 22 grillas de distribución de cada especie se superpusieron a las capas de temperaturas promedio de tres meses del año, obtenidas de Worldclim (Hijmans *et al.* 2005), cada una para cada mes de floración. La extracción de la temperatura para cada cuadrante de cada grilla, se realizó utilizando la función Extract by Mask implementada en el programa ArcGIS (Esri 2011). Como resultado se obtuvo una tabla de temperaturas por cuadrante por mes para cada especie desde donde se calcularon los promedios mensuales para cada una de las 22 especies.

Reconstrucción de caracteres y método comparado

El sistema reproductivo y el hábito de vida se mapearon en la hipótesis filogenética obtenida mediante Inferencia Bayesiana debido a que este es el método con el que se obtuvo un árbol mejor resuelto y con mayores valores de respaldo en los nodos. Para trazar la evolución, se realizó una codificación binaria de los índices de autocompatibilidad y autofertilidad, en donde se definieron los rangos de acuerdo a la

literatura (Ruiz & Arroyo 1978, Lloyd & Schoen 1992), pero también respetando la distribución natural de los datos (Tabla II). Para evaluar la trayectoria evolutiva de los caracteres codificados de manera binaria, se mapearon y se reconstruyeron los estados ancestrales mediante MP y MV bajo un modelo de evolución con un solo parámetro (Lewis 2001) y bajo un modelo con dos parámetros. Como los modelos son anidados los valores de verosimilitud se compararon con una prueba de razones de verosimilitud, estimando $LR = -2(\ln L_0 - \ln L_1)$ y se evalúa en una distribución de χ^2 con 1 grado de libertad. Estos análisis se realizaron en el programa Mesquite (Maddison & Maddison 2011).

Tabla II. Codificación binaria del sistema reproductivo y de la forma de vida.

Estado	Autocompatibilidad	Autogamia	Forma de vida
0	Autoincompatible (desde 0 a 0,78)	Exógama (desde 0 a 0,69)	Perenne
1	Compatible (desde 0,79 a 1)	Autógama (desde 0,70 a 1)	Anual

Se indagó además en la trayectoria evolutiva de los sistemas de reproducción como caracteres continuos. Para esto se mapearon los caracteres en la filogenia y se reconstruyeron sus estados ancestrales mediante el criterio de máxima parsimonia

cuadrática ponderada por los largos de rama en el programa Mesquite (Maddison & Maddison 2011).

Para los seis caracteres estudiados (temperatura, número de óvulos, atractividad, área total del capítulo, autocompatibilidad y autogamia) se evaluó la señal filogenética y el modo de evolución mediante los parámetros λ y δ de Pagel respectivamente (Pagel 1999). El parámetro λ varía entre 0 (cuando la evolución del rasgo es independiente de la filogenia) y 1 (cuando el rasgo evolucionado de acuerdo a lo esperado por un modelo browniano). El parámetro δ escala la longitud total del árbol, o la distancia entre la raíz y las especies. Valores inferiores a 1 indican que las ramas más cortas contribuyen desproporcionadamente a la evolución del rasgo, por lo que habría radiación adaptativa, y valores superiores a 1 indican que los caminos más largos contribuyen más a los cambios del rasgo, o que la evolución se acelera a medida que avanza el tiempo (adaptación especie-específica). Cuando el valor de δ es igual a 1, significa que el rasgo cambia a una tasa de evolución constante en el tiempo. Los parámetros λ y δ fueron estimados para cada carácter separadamente por MV usando el paquete Geiger (Harmon *et al.* 2014) implementado en R (R Core Team 2014). Para determinar si los valores de λ diferían significativamente de cero y de uno se usó el criterio de AIC.

Para evaluar si los sistemas reproductivos y los rasgos florales evolucionaron en asociación con la temperatura se realizaron análisis de contrastes independientes (PICs) (Felsenstein 1985) en el paquete Geiger. Previamente se evaluó el supuesto de independencia entre los contrastes y la raíz del largo de ramas en el módulo PDAP (Midford *et al.* 2007) del programa Mesquite (Maddison & Maddison 2011). Para el caso de la autogamia y la autoincompatibilidad, se encontró una correlación negativa

significativa entre los contrastes y la raíz de los largos de rama, por lo que se realizó una transformación logarítmica de los largos de rama (Garland *et al.* 1992), de modo de obtener la independencia entre estas variables. Para calcular los PICs de estos dos rasgos, se utilizó el árbol con los largos de rama transformados, y para los otros cuatro rasgos se utilizó el árbol original. Para evaluar si la autocompatibilidad y autogamia evolucionaron en asociación con la forma de vida anual se compararon los promedios de los contrastes en los rasgos continuos cuando hay versus cuando no hay un cambio en el carácter discreto mediante una prueba t de student (Purvis & Rambaut 1995, González & Pérez 2010). Un promedio significativamente diferente de cero indica que el sistema de reproducción difiere entre plantas anuales y perennes. Este análisis se realizó utilizando el paquete caper (Orme *et al.* 2013) de R (R Core Team 2014).

RESULTADOS



Relaciones filogenéticas en el género

En análisis de Parsimonia, arrojó tres árboles igualmente parsimoniosos de largo igual a 648 pasos, de un total de 20131 re-arreglos probados. Los árboles más parsimoniosos tuvieron un CI = 0,5370, RI = 0,7056 y RC = 0,3789. En los tres árboles, las especies del subgénero *Tylloma* se agrupan en un único clado (Clado C), apoyado por un valor de bootstrap de 86%, mientras que las especies del subgénero *Chaetanthera* aparecen en dos clados (A y B), ambos respaldados por valores de bootstrap superiores al 96%. Las hipótesis más parsimoniosas difieren en la agrupación de estos clados. En uno de los árboles los dos clados del subgénero *Chaetanthera* (A y B) se agrupan formando un grupo monofilético (Fig 4), con un respaldo menor al 70%, en los otros árboles, uno de los clados del subgénero *Chaetanthera* (Clado A) se agrupa junto al subgénero *Tylloma*.

El análisis de MV arrojó como resultado sólo un árbol más probable (-lnL = 4503,3), donde se reconocen los mismos clados detectados mediante el análisis de MP, pero en este caso el subgénero *Tylloma* (Clado C) aparece agrupado con parte del subgénero

Chaetanthera (Clado A), con valor bajo el 70% de bootstrap. Esta misma topología fue revelada por el análisis de Inferencia Bayesiana, donde los clados A y C aparecen agrupados con una probabilidad a posteriori de 0,57 (Fig. 4).

De acuerdo a la altitud promedio de las especies, aquellas especies que se distribuyen desde los 1800 hasta los 4000 msnm se agrupan en el clado *Tylloma*, a excepción de *C. perpusilla*, que es una especie andina perteneciente al subgénero *Chaetanthera*. La única especie del clado C que se distribuye a menor altitudes es *C. glabrata*. El resto de las especies se distribuye en promedio entre los 100 y los 1800 msnm (Fig. 4)

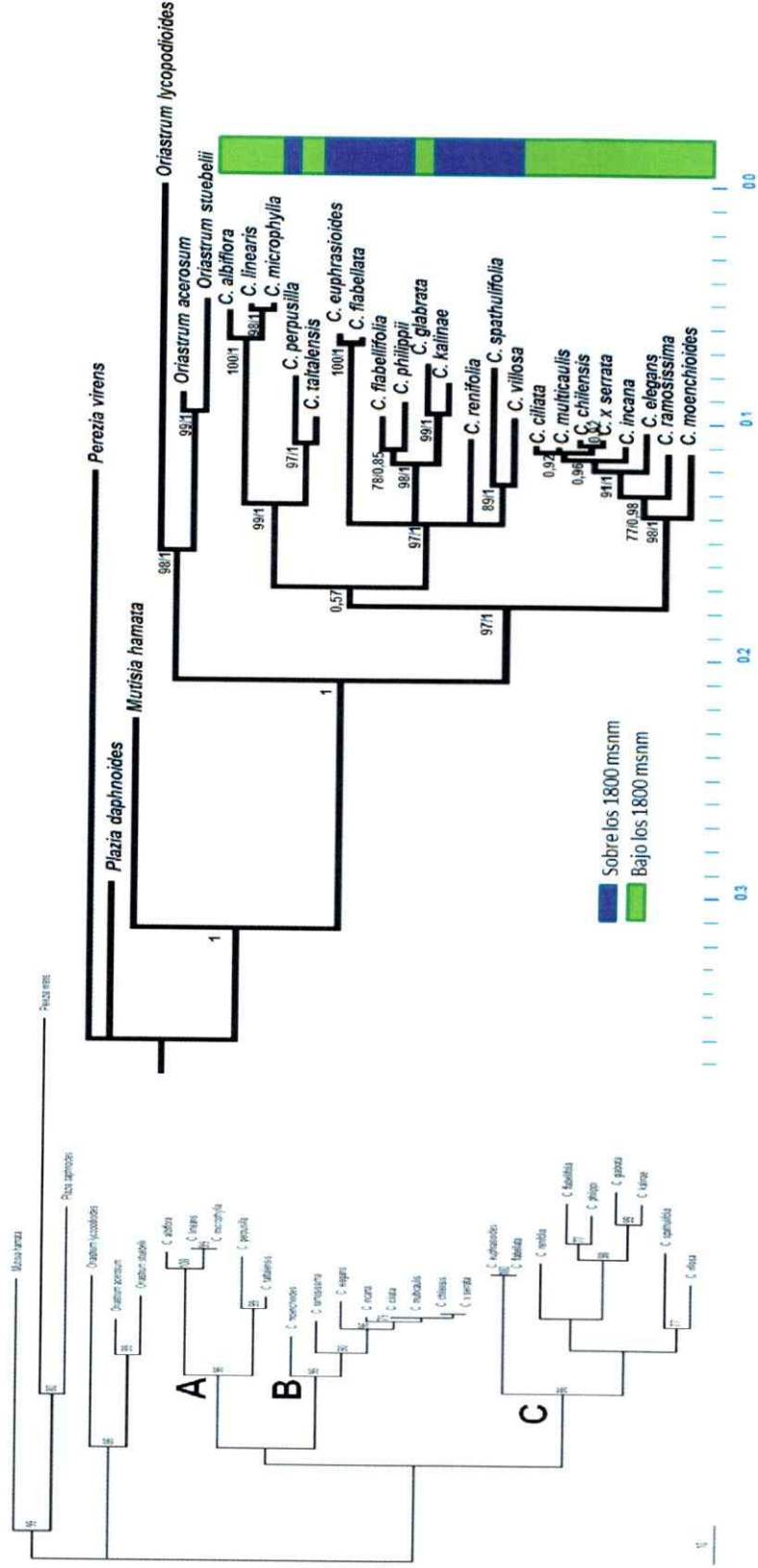


Figura 4. A la izquierda una de las 3 hipótesis filogenética de 22 especies del género *Chaetanthera* inferida mediante Parsimonia. Se observan los valores de bootstrap superiores o iguales a 70%. El clado A y B corresponde a las especies del subgénero *Chaetanthera* y el clado C al subgénero *Tylloma*. A la derecha, hipótesis filogenética de 22 especies del género *Chaetanthera* obtenida mediante Inferencia Bayesiana. Se observan los valores de bootstrap del análisis de MV y de probabilidad *a posteriori*.

Sistema reproductivo

Las especies de *Chaetanthera* presentaron una gran diversidad de sistemas de reproducción. En doce de las 21 especies estudiadas el porcentaje de frutos producido por autopolinización manual fue significativamente menor que el porcentaje de frutos producidos por polinización cruzada. Ocho de estas especies presentaron altos niveles de incompatibilidad genética, con valores de SCI inferiores o iguales a 0,20, mientras que otras dos resultaron parcialmente autoincompatibles con valores de SCI entre 0,28 y 0,64 y una de ellas resultó ser altamente autocompatible con un valor de SCI de 0,84. De las nueve especies restantes, cinco fueron capaces de autopolinizarse autónomamente con valores de AFI superiores o iguales a 0,70. Sin embargo en dos de éstas (*C. moenchioides* y *C. microphylla*) el porcentaje de frutos producidos por autopolinización autónoma fue significativamente menor que el producido por polinización cruzada manual, indicando algo de dependencia de los polinizadores (Fig. 5, Tabla III). En las especies *C. perpusilla* y *C. taltalensis* no fue posible realizar las polinizaciones manuales, de tal forma que el sistema reproductivo se infirió sólo a partir de los resultados del tratamiento de autopolinización no asistida, en donde se obtuvo altos porcentajes de fructificación.

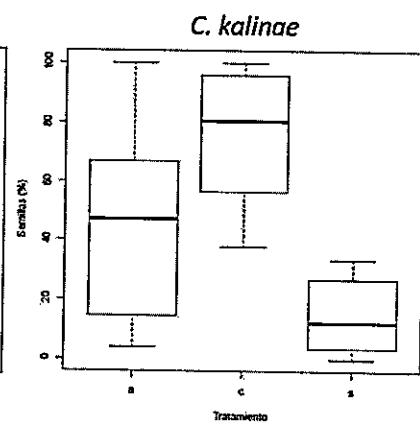
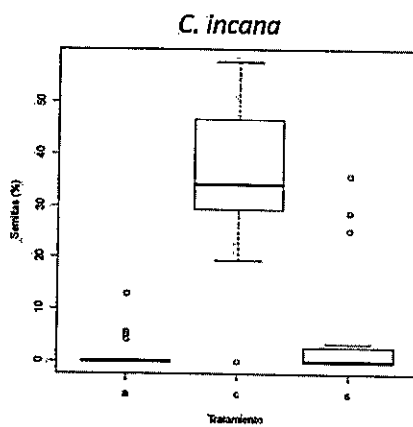
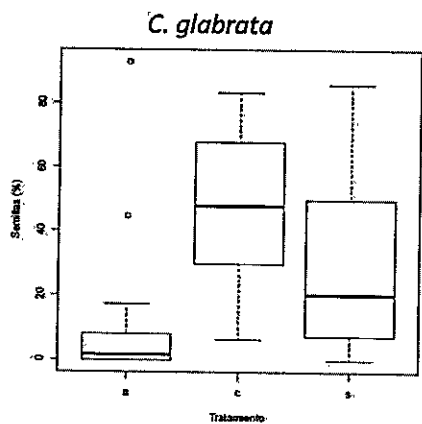
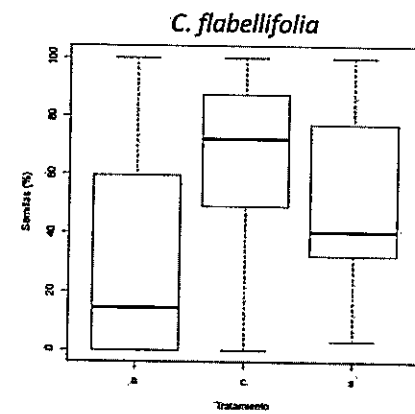
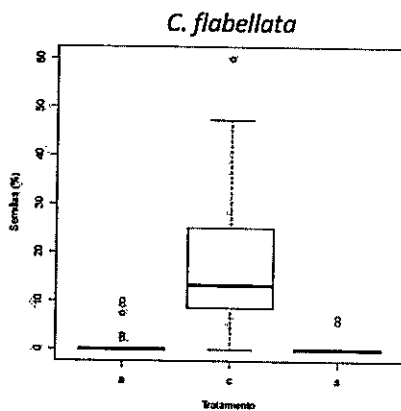
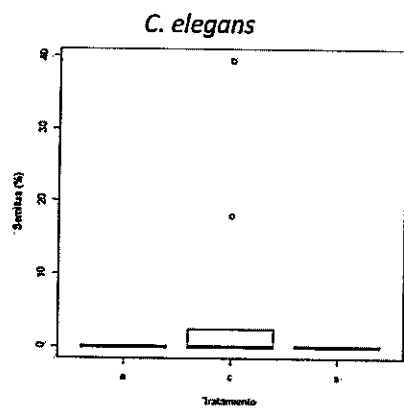
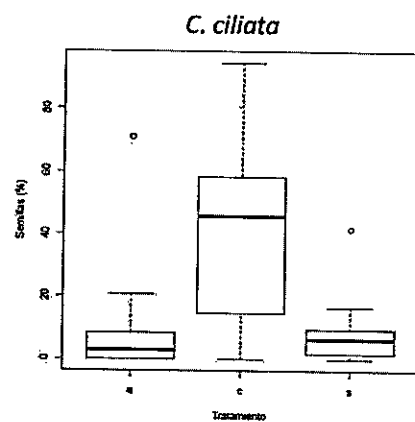
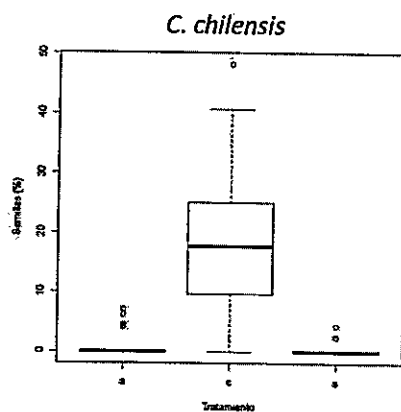
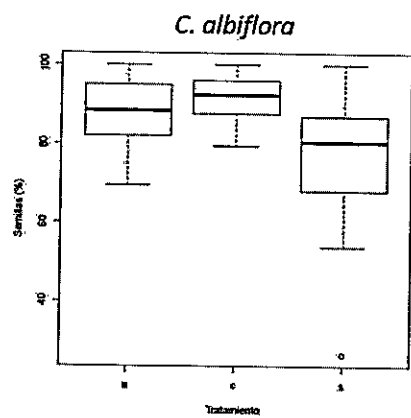
Particularmente problemática fue la especie *C. kalinae*. Esta especie produjo escasa cantidad de frutos en el tratamiento de autopolinización manual (SCI), pero en el tratamiento de autopolinización no asistida (AFI) a fructificación fue relativamente alta. Considerando que la autopolinización manual pudo haber sido poco efectiva, consideramos a esta especie parcialmente autógena.

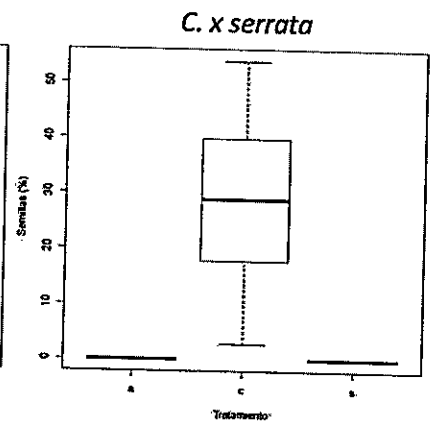
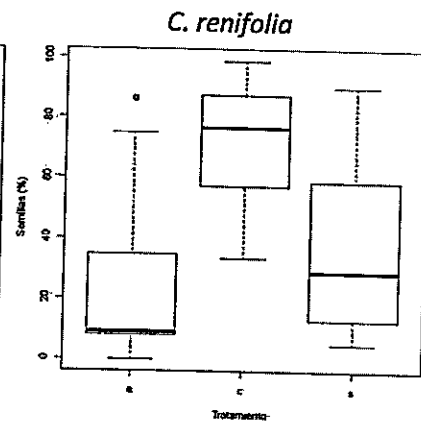
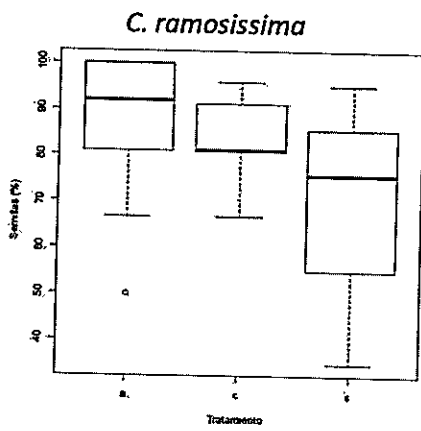
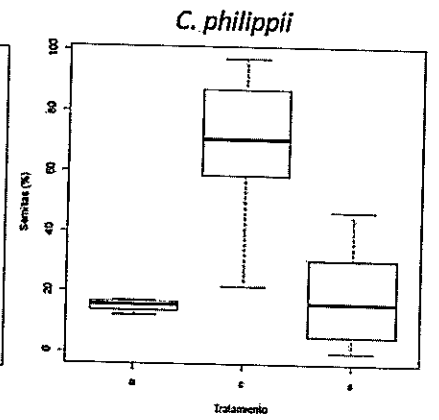
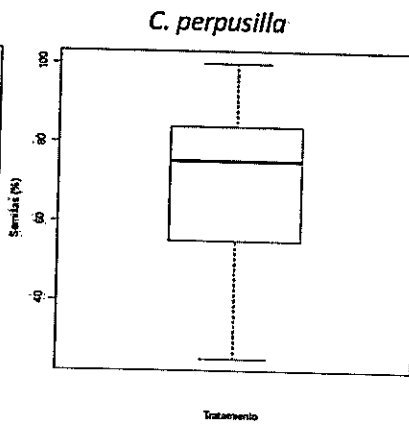
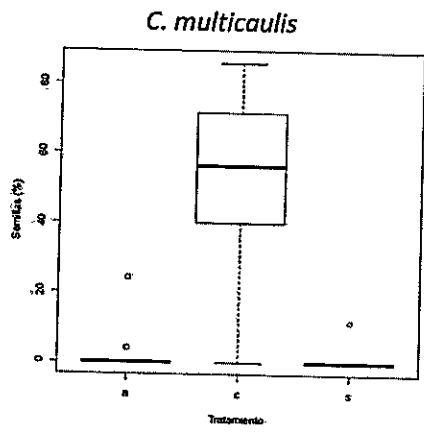
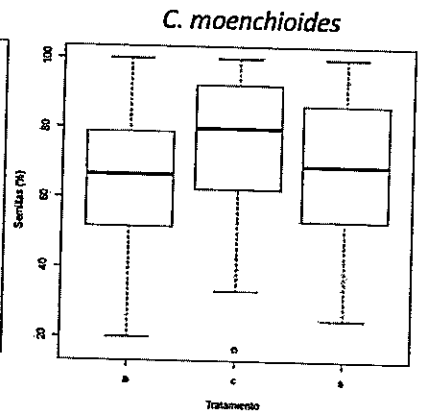
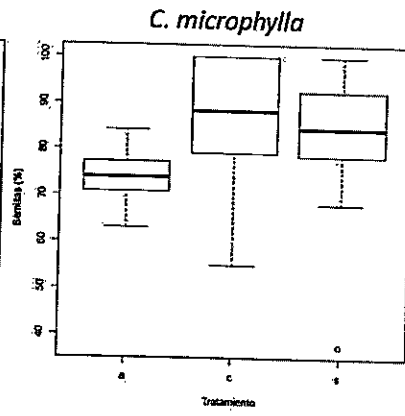
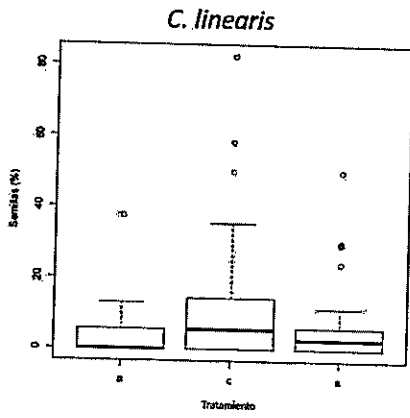
Tabla III. Porcentaje de akenios por capítulo en los tratamientos de autopolinización no asistida (A), autopolinización manual (S) y polinización cruzada manual (C) en 22 especies de *Chaetanthera* (valor promedio y error estándar); n, número de capítulos fructificados; SCI, índice de autocompatibilidad, y AFI, índice de autogamia. Además se muestran los resultados de la comparación entre el porcentaje de frutos producidos entre los tratamientos C vs A y C vs S, usando el test de t (*) y Mann - Whitney. De acuerdo a los valores de SCI y AFI se categorizaron los sistemas de reproducción en compatible, y parcialmente incompatible o incompatible, autógama y exógama.

	C		S		A		SCI	AFI	C - A		C - S		Sistema reproductivo	
	91,67 (2,51) n = 16	76,85 (5,06) n = 14	0,23 (0,16) n = 30	7,90 (2,10) n = 20	0 (0) n = 10	88,04 (2,37) n = 15			0,84	0,96	n.s.	p	p	< 0,01
<i>C. albiflora</i>							0,01	0,04	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	Incomp.	Exógama
<i>C. chilensis</i>	18,78 (2,25) n = 33	0,23 (0,16) n = 30	7,90 (2,10) n = 20	0 (0) n = 3	0 (0) n = 10	0,69 (0,37) n = 32	0,20	0,19	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	Incomp.	Exógama
<i>C. ciliata</i>	36,60 (5,49) n = 23	7,90 (2,10) n = 20	0 (0) n = 3			7,54 (3,94) n = 18	0	0	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	Incomp.	Exógama
<i>C. elegans</i>	6,64 (4,54) n = 9	0 (0) n = 3				0 (0) n = 10	1,06	0,88					Incomp.	Exógama
<i>C. euphrasioides</i>													Incomp.	Autógama
<i>C. flabellata</i>	17,47 (2,96) n = 26	0,59 (0,41) n = 21	53,39 (7,93) n = 15	0,59 (0,41) n = 21	1,16 (0,55) n = 27	1,16 (0,55) n = 27	0,03	0,07	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	Incomp.	Exógama
<i>C. flabellifolia</i>	67,26 (5,50) n = 23	53,39 (7,93) n = 15	30,08 (3,90) n = 41	53,39 (7,93) n = 15	28,13 (11,02) n = 10	28,13 (11,02) n = 10	0,79	0,42	< 0,1	< 0,1	n.s.	n.s.	Comp.	Exógama
<i>C. glabrata</i>	46,77 (3,28) n = 46	30,08 (3,90) n = 41	4,95 (2,31) n = 21	30,08 (3,90) n = 41	8,43 (3,24) n = 32	8,43 (3,24) n = 32	0,64	0,18	< 0,001	< 0,001	< 0,01	< 0,01	Incomp.	Exógama
<i>C. incana</i>	36,34 (3,26) n = 19	4,95 (2,31) n = 21	13,66 (3,99) n = 10	4,95 (2,31) n = 21	1,32 (0,69) n = 21	1,32 (0,69) n = 21	0,14	0,04	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	Incomp.	Exógama
<i>C. kalinae</i>	76,41 (6,66) n = 11	13,66 (3,99) n = 10	6,80 (2,20) n = 29	13,66 (3,99) n = 10	46,28 (8,89) n = 15	46,28 (8,89) n = 15	0,18	0,61	< 0,05	< 0,05	< 0,001	< 0,001	Incomp.	Exógama
<i>C. linearis</i>	13,28 (3,77) n = 29	6,80 (2,20) n = 29		6,80 (2,20) n = 29	4,35 (1,41) n = 30	4,35 (1,41) n = 30	0,51	0,33	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	Incomp.	Exógama

<i>C. microphylla</i>	86,67 (3,09) n = 19	83,47 (3,26) n = 19	73,79 (1,29) n = 22	0,96	0,85	< 0,001	n.s.	Comp.	Autógama
<i>C. moenchioides</i>	75,80 (3,18) n = 41	68,80 (3,39) n = 39	65,26 (3,61) n = 35	0,91	0,86	< 0,05	n.s.	Comp.	Autógama
<i>C. multicaulis</i>	52,48 (4,30) n = 30	0,47 (0,46) n = 25	0,89 (0,77) n = 32	0,01	0,02	< 0,001	< 0,001	Incomp.	Exógama
<i>C. perpusilla</i>			69,59 (4,16) n = 28		0,70			Comp.	Autógama
<i>C. philippii</i>	67,15 (9,17) n = 9	18,83 (4,44) n = 12	15,23 (1,09) n = 4	0,28	0,23	< 0,001	< 0,001	Incomp.	Exógama
<i>C. ramosissima</i>	83,92 (3,85) n = 7	70,27 (9,60) n = 7	87,42 (3,86) n = 15	0,84	1,04	n.s.	n.s.	Comp.	Autógama
<i>C. renifolia</i>	71,89 (4,05) n = 20	37,23 (7,07) n = 15	24,40 (5,74) n = 22	0,52	0,28	< 0,001	< 0,001	Incomp.	Exógama
<i>C. spathulifolia</i>	29,20 (6,02) n = 15	12,50 (12,50) n = 8	3,00 (0,75) n = 27	0,43	0,10	< 0,001	< 0,01	Incomp.	Exógama
<i>C. taltalensis</i>			89,02 (2,55) n = 12		0,89			Comp.	Autógama
<i>C. villosa</i>	14,98 (4,95) n = 3	3,87 (2,40) n = 4	0,59 (0,36) n = 22	0,26	0,04	< 0,01	n.s.	Incomp.	Exógama
<i>C. x serrata</i>	28,00 (3,10) n = 24	0 (0) n = 24	0 (0) n = 24	0	0	< 0,001	< 0,001	Incomp.	Exógama

Valores: promedio (error estándar). n.s. = no significativo





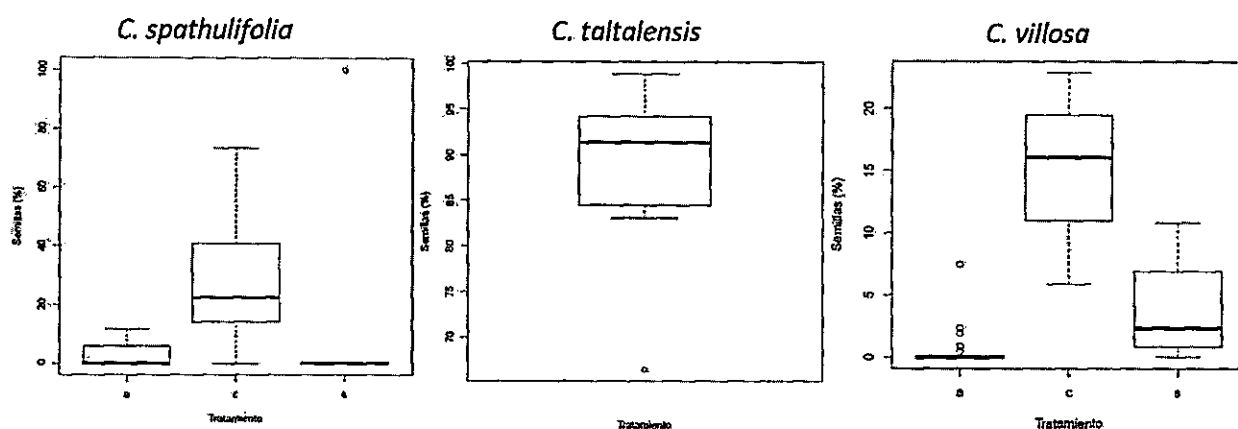


Figura 5. Porcentaje de aquenios por capítulo para cada tratamiento en 21 especies del género *Chaetanthera*. Las barras negras corresponden a los valores promedio.

Rasgos florales y forma de vida

Se observó una amplia variedad de tamaños florales, los cuales abarcaron un rango entre los 2 y los 50 mm aproximadamente, considerando el diámetro total de los capítulos (incluyendo flores liguladas). En general, las especies de hábito de vida perenne presentaron una diferencia mayor entre el diámetro externo e interno (promedio = 23,69 mm) que las especies anuales (promedio: 8,80 mm), dando cuenta de una mayor atraktividad (Tabla IV).

Las temperaturas muestran que aquellas especies distribuidas hacia las zonas más altas de Los Andes, presentan las temperaturas más bajas observadas, que fueron menores a 7,64 °C, a excepción de *C. villosa* que presentó un valor más alto de temperatura (11,27 °C), lo cual puede deberse a la tardía floración que muestra esta especie.

Tabla IV. Temperatura promedio (desviación estándar) de la estación de floración y rasgos florales de 22 especies de *Chaetanthera*. Se muestra el diámetro total (D1) e interno (D2) del capítulo en milímetros, número de flores del disco, área total (mm²) y atractividad (mm²).

	Temperatura	D1	D2	N° óvulos	Área total	Atractividad
<i>C. albiflora</i>	12,25 (4,0)	9,40 (1,28)	2,48 (0,50)	15,98 (3,89)	69,45	64,63
<i>C. chilensis</i>	14,39 (5,1)	26,74 (4,26)	5,72 (1,39)	24,94 (8,14)	561,66	535,97
<i>C. ciliata</i>	17,98 (2,4)	22,66 (2,69)	5,80 (0,98)	41,95 (12,68)	403,31	376,91
<i>C. elegans</i>	13,05 (2,8)	35,45 (5,75)	9,62 (1,72)	56,90 (12,51)	987,24	914,57
<i>C. euphrasioides</i>	9,80 (5,3)	7,47 (0,96)	1,91 (0,35)	7,52 (1,56)	43,79	40,92
<i>C. flabellata</i>	7,71 (5,3)	12,56 (1,18)	4,41 (0,78)	31,94 (7,53)	123,87	108,57
<i>C. flabellifolia</i>	4,39 (3,4)	23,05 (3,07)	13,20 (3,20)	35,06 (8,87)	417,43	280,66
<i>C. glabrata</i>	12,73 (4,7)	32,82 (3,31)	7,00 (1,01)	52,06 (11,29)	845,98	807,53
<i>C. incana</i>	16,12 (2,5)	18,82 (2,94)	4,71 (1,12)	25,62 (8,37)	278,03	260,65
<i>C. kalinae</i>	7,64 (3,3)	20,31 (3,24)	6,16 (1,62)	41,88 (15,48)	323,93	294,11
<i>C. linearis</i>	12,43 (5,8)	11,73 (1,38)	4,16 (0,57)	27,44 (5,57)	108,00	94,41
<i>C. microphylla</i>	13,43 (4,9)	6,83 (0,86)	1,99 (0,39)	12,30 (4,23)	36,68	33,57
<i>C. moenchioides</i>	10,68 (5,1)	6,11 (0,89)	1,58 (0,30)	5,28 (2,04)	29,29	27,34

<i>C. multicaulis</i>	15,14 (3,8)	13,85 (2,39)	3,77 (0,80)	9,34 (3,62)	150,58	139,40
<i>C. perpusilla</i>	3,46 (2,1)	4,00	3,00	5,35 (1,41)	12,57	5,50
<i>C. philippii</i>	6,94 (4,2)	31,88 (2,71)	15,83 (3,34)	89,18 (15,85)	798,02	601,22
<i>C. ramosissima</i>	14,53 (3,7)	4,46 (0,62)	1,87 (0,39)	17,63 (5,95)	15,62	12,89
<i>C. renifolia</i>	2,24 (2,1)	48,21 (5,09)	16,33 (2,99)	146,66 (37,22)	1825,56	1616,07
<i>C. spathulifolia</i>	4,72 (4,1)	41,37 (6,13)	20,44 (4,16)	112,00 (27,08)	1344,24	1016,04
<i>C. taltalensis</i>	16,03 (1,7)	-	1,83 (0,41)	20,38 (6,09)	2,64	0
<i>C. villosa</i>	11,27 (3,7)	49,89 (6,84)	21,14 (4,45)	145,33 (63,07)	1954,52	1603,57
<i>C. x serrata</i>	17,20 (2,5)	26,56 (2,62)	5,20 (0,86)	23,76 (6,21)	554,05	532,81

Evolución del sistema de reproducción y forma de vida

La reconstrucción del sistema reproductivo y de la forma de vida mediante el criterio de máxima parsimonia sugiere que el ancestro del género sería autocompatible, autógeno y anual. La forma de vida perenne habría evolucionado al menos cuatro veces en el género, en cambio la incompatibilidad genética y la exogamia habrían evolucionado tres veces, una vez en el clado de las especies altoandinas, otra vez en el clado de las especies distribuidas en la zona central y una tercera vez en la especie *C. linearis*. De acuerdo a este análisis, habrían ocurrido dos reversiones hacia la autocompatibilidad, en *C. euphrasioides* y *C. flabellifolia* y una reversión hacia la

autogamia en *C. euphrasioides* (desde un ancestro parcialmente incompatible y dependiente de polinizadores hacia la autocompatibilidad completa y la autogamia), y ninguna reversión en la forma de vida (Fig. 6). De acuerdo al análisis por MV, es igualmente probable que el ancestro sea autocompatible o incompatible, exógamo o autógeno y anual o perenne. De acuerdo a este análisis, la única transición que persiste es hacia una forma de vida perenne en las especies hermanas *C. chilensis* y *C. x serrata*. A pesar de que las reversiones son infrecuentes, las bondades de ajuste de los modelos que permiten tasas asimétricas no fueron significativamente mayores que las de los modelos simétricos con una sola tasa, tanto para la autocompatibilidad ($\ln L_1 = -14,37$, $\ln L_0 = -14,9$; $p = 0,2$), como para la autogamia ($\ln L_1 = -13,74$; $\ln L_0 = -14,9$; $p = 0,08$) y la forma de vida ($\ln L_1 = -13,0$; $\ln L_0 = -14,0$; $p = 0,1$), indicando que las transiciones entre sistemas de reproducción y formas de vida son reversibles.

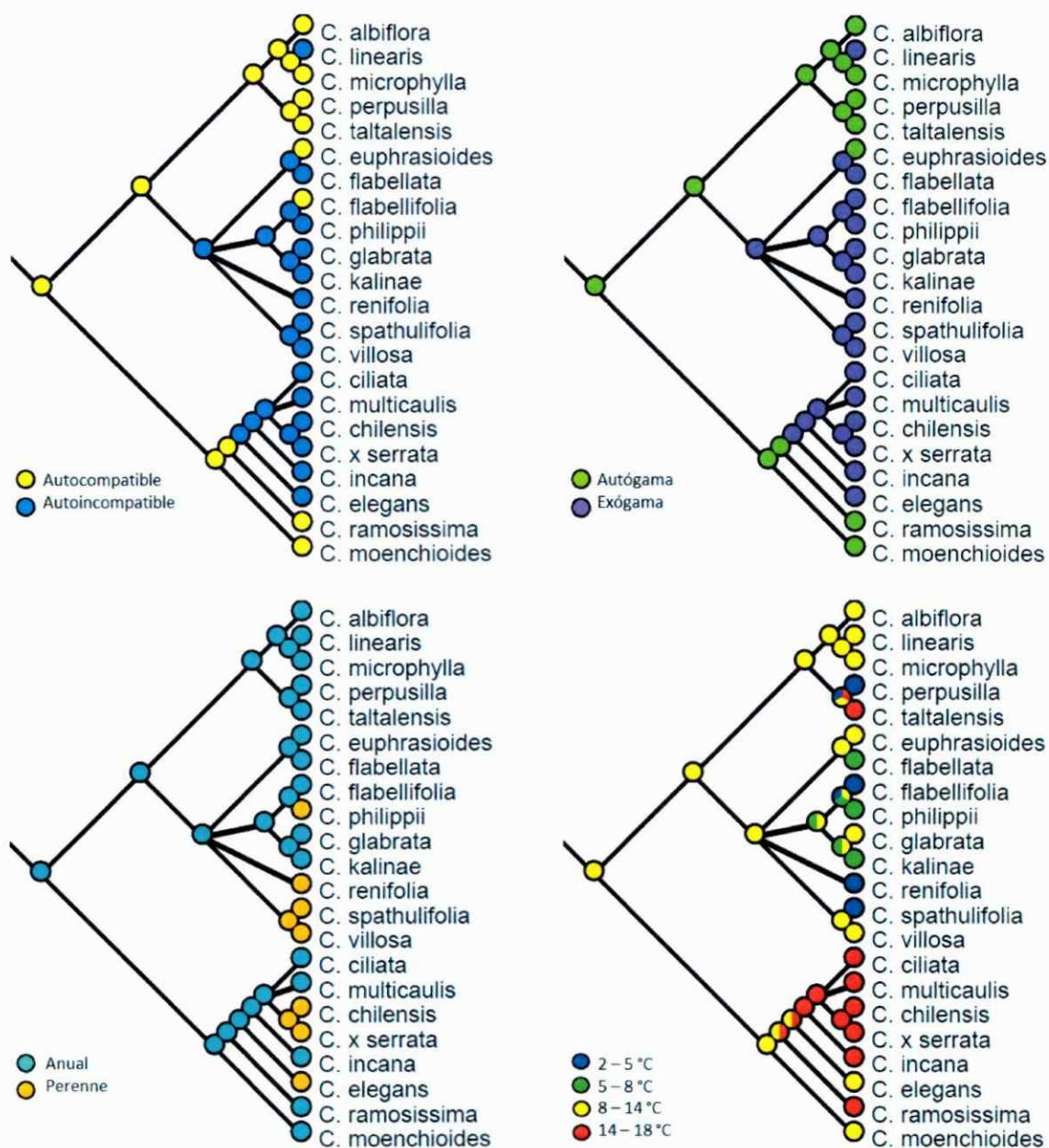


Figura 6. Reconstrucción mediante Máxima Parsimonia de los estados ancestrales de la autocompatibilidad (arriba izquierda), capacidad de autogamia (arriba derecha), forma de vida (abajo izquierda) y hábitat (abajo derecha) para el género *Chaetanthera*.

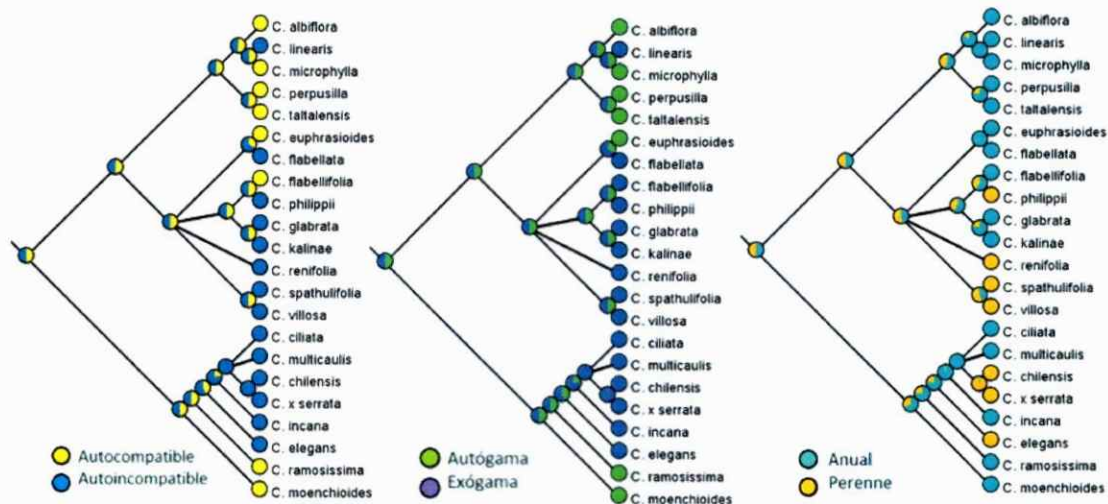


Figura 7. Reconstrucción de los estados ancestrales de la autocompatibilidad, capacidad de autogamia y forma de vida para el género *Chaetanthera*, mediante Máxima Verosimilitud.

Relación entre la evolución de los sistemas reproductivos y la forma de vida

Al considerar los sistemas reproductivos como caracteres categóricos con dos estados posibles (autógamos vs. exógamos; autocompatibles vs. autoincompatibles), se encontró una relación significativa entre la autocompatibilidad y la forma de vida, pues la bondad de ajuste del modelo que permite evolución correlacionada ($\ln L_1 = -21,99$) fue significativamente mayor que el modelo de evolución independiente ($\ln L_0 = -25,99$; $p = 0,03$). La autogamia también evolucionó correlacionadamente con la forma de vida ($\ln L_1 = -22,00$; $\ln L_0 = -25,36$; $p = 0,05$), sin embargo al considerar los sistemas de reproducción como rasgos continuos, no se encontró una relación entre éstos y la forma de vida. El análisis de contrastes independientes no detectó una relación significativa entre SCI y forma de vida ($F_{1,3} = 3,7$, $p = 0,15$), pero si entre AFI y forma de

vida ($F_{1,3} = 16,89, p = 0,03$). Aquellas especies anuales mostraron en promedio un AFI = 0,54, mientras que las especies perennes tuvieron en promedio un AFI = 0,1. De acuerdo a la correlación entre la forma de vida y el sistema de reproducción con los caracteres discretizados, se observa que la tasa de cambio hacia la autocompatibilidad en plantas anuales, es siete veces superior a este mismo cambio en plantas perennes. En aquellas especies que son autocompatibles, la tasa de cambio hacia una forma de vida anual es cerca de dos mil veces más alta que este mismo cambio en especies autoincompatibles. En aquellas plantas autógamas la transición hacia una forma de vida anual tiene tasas treinta veces más altas que en especies exógamas, y el cambio hacia la autogamia en especies anuales tiene una tasa quinientas mil veces superior a este cambio en plantas perennes (Fig. 8).

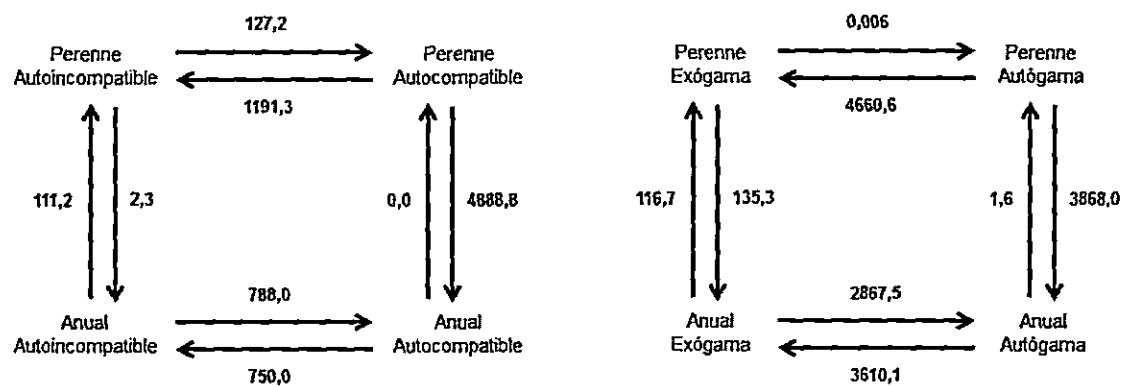


Figura 8. Tasas de evolución para los modelos de evolución correlacionada entre hábito de vida con sistema de incompatibilidad y hábito de vida con nivel de autogamia.

La reconstrucción de los estados ancestrales del sistema de reproducción mediante MP, cuando se considera como un carácter continuo, indica que las flores ancestrales del género habrían presentado incompatibilidad parcial ($SCI = 0,57$), así como niveles intermedios de autogamia ($AFI = 0,54$). Además se trazó la trayectoria evolutiva de todos los otros rasgos continuos estudiados, en donde se observó que el ancestro habría tenido un tamaño floral intermedio (área total = $528,9 \text{ mm}^2$; atractividad = $449,0 \text{ mm}^2$), un bajo número de óvulos ($48,5$), y que habría habitado en sectores templados (temperatura = $10,5 \text{ }^\circ\text{C}$).

Relación entre el hábitat, rasgos florales y sistema reproductivo

Al realizar las correlaciones entre los contrastes para cada carácter, no se encontró que el hábitat (caracterizado por la temperatura del período de floración) estuviera relacionado con el tamaño floral o el número de óvulos, rasgos que dieran cuenta de algún mecanismo compensatorio. Tampoco se encontró una relación entre el hábitat y la autocompatibilidad o la autogamia. Al realizar un análisis multivariado para resolver si los rasgos florales y los sistemas reproductivos tienen en conjunto un efecto sobre la temperatura durante los meses de floración, no se encontró valores significativos (Tabla V).

Al estudiar las correlaciones entre los caracteres sin excluir el efecto de la filogenia, se observan las mismas tendencias observadas utilizando PICs, sin embargo existe una correlación marginalmente significativa entre el hábitat y el número de óvulos por flor ($p = 0,06$), la cual se ve aumentada cuando las especies autógamias son excluidas del



análisis ($p = 0,03$). En este caso se observa que a temperaturas más bajas hay un mayor número de óvulos.

Indagando en otras posibles correlaciones, se encontró que los tres rasgos morfológicos están relacionados significativamente entre ellos. Flores más grandes, son más atractivas y poseen un mayor número de óvulos. También se observa correlación entre estas variables morfológicas y el nivel de autogamia, en donde aquellas especies más autóгамas presentan flores más pequeñas (menos atractivas y con menor número de óvulos). La única variable morfológica correlacionada significativamente con la autocompatibilidad fue el número de óvulos. Las especies más autocompatibles muestran un menor número de óvulos, así como un mayor AFI. Al quitar aquellas especies autóгамas del análisis, se pierden aquellas correlaciones significativas entre el AFI y cualquier carácter (ver Anexo I).

Tabla V. Significancia estadística de las correlaciones estudiadas con y sin PICs.

Rasgos comparados	Con PICs						Sin PICs					
	Todas las especies		Sin autógamias		Todas las especies		Sin autógamias		Todas las especies		Sin autógamias	
	t	p	t	p	T	p	t	p	T	p	t	p
Temperatura – Atractividad	0,189	n.s.	0,416	n.s.	-1,077	n.s.	-1,165	n.s.				n.s.
Temperatura – Área total	0,095	n.s.	0,331	n.s.	-1,334	n.s.	-1,457	n.s.				n.s.
Temperatura – N° de óvulos	0,354	n.s.	0,9	n.s.	-1,964	0,06	-2,403	< 0,05				
Temperatura – Autocompatibilidad	1,527	n.s.	0,943	n.s.	-0,966	n.s.	-1,720	n.s.				n.s.
Temperatura – Autogamia	1,403	n.s.	0,297	n.s.	-0,438	n.s.	-1,963	0,07				
Autocompatibilidad – Autogamia	10,79	< 0,001	1,654	n.s.	7,634	< 0,001	2,404	< 0,05				

Patrones evolutivos de los rasgos estudiados

A excepción de la autogamia, para todas las variables estudiadas se encontraron valores de λ significativamente distintos de cero, lo que sugiere que la atractividad, área floral, autocompatibilidad, número de óvulos y hábitat están sujetas a una señal filogenética. En el caso de las áreas florales (atractividad y área total), el número de óvulos, y la temperatura, no se encontraron diferencias significativas de $\lambda = 1$, lo que sugiere que estos rasgos han evolucionado siguiendo un modelo Browniano de evolución (Tabla VI).

Para el caso del modo de evolución, la atractividad, el área total, el número de óvulos y la temperatura, siguen un modo gradual de evolución en el tiempo, pues no se encontraron diferencias significativas de un $\delta = 1$. Para el caso del sistema reproductivo (autoincompatibilidad y autogamia), se encontraron valores cercanos a 3 del parámetro δ , y significativamente distintos de 1, lo que sugiere que en las especies del género habrían ocurrido cambios tardíamente en la filogenia (adaptación especie específica).

Tabla VI. λ y δ de Pagel para cada uno de los rasgos continuos

	Valores estimados		Significancia		
	λ	δ	$\lambda=0$	$\lambda=1$	$\delta=1$
Atractividad	1,00	0,80	0,0002	-	1,2
Temperatura	0,92	2,17	0,007	0,12	0,1
Autocompatibilidad	0,50	2,99	0,04	$4,2 \times 10^{-7}$	$3,1 \times 10^{-5}$
Autogamia	0,58	2,99	0,16	$4,8 \times 10^{-6}$	0,0001
Número de óvulos	0,95	1,24	0,0001	0,04	0,92
Área total	1,00	0,72	$5,1 \times 10^{-5}$	-	0,76

DISCUSIÓN

Sobre la filogenia

En la hipótesis filogenética obtenida en este trabajo mediante Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana se observó la formación de dos grupos, uno conformado por el clado B (subgénero *Chaetanthera*) y otro conformado por los clados A (subgénero *Chaetanthera*) y C (subgénero *Tylloma*), en donde el subgénero *Chaetanthera* es un grupo parafilético, y *Tylloma* monofilético (Fig. 4). En concordancia con esto, Hershkovitz (2006) encuentra estas mismas agrupaciones en la reconstrucción por Máxima Parsimonia (árbol de consenso), pero estos resultados se contradicen con los que obtuvo mediante Máxima Verosimilitud, en donde los dos subgéneros establecidos por Davies (2006) corresponderían a grupos monofiléticos. Sin embargo en éste último resultado, no se muestran los valores de bootstrap de los clados, por lo que no podemos saber qué agrupaciones están respaldadas. Davies (2006) clasifica a *Chaetanthera* y *Tylloma* en dos subgéneros de acuerdo a diferencias morfológicas importantes en: la estructura del papus, rasgos de los lóbulos del estigma, la pilosidad de los aquenios y la estructura del polen. Pese a esto, los resultados mostrados en

esta tesis muestran que no hay un respaldo filogenético significativo que avale esta clasificación.

De acuerdo al trabajo de Hershkovitz (2006) para el subgénero *Tylloma* (clado C), *C. flabellata* es la especie hermana de todo el resto del subgénero, sin embargo en esta tesis, se aprecia a esta especie se agrupa junto a *C. euphrasioides* con un respaldo de bootstrap del 100% y una probabilidad *a posteriori* de 1. De la misma forma, en este trabajo se observa que *C. spathulifolia* con *C. villosa* son especies hermanas (bootstrap = 89%, probabilidad *a posteriori* = 1), sin embargo de acuerdo a Hershkovitz (2006) *C. spathulifolia* se agrupa más cercanamente con *C. renifolia*. Para el caso del subgénero *Chaetanthera* se observan una posición en conflicto entre este trabajo y el de Hershkovitz (2006), en donde se clasifica a *C. elegans* como especie hermana del grupo *C. chilensis* – *C. x serrata*, mientras que en la hipótesis filogenética construida en esta tesis *C. elegans* es la especie hermana de todo el grupo conformado por *C. incana* – *C. x serrata* – *C. chilensis* – *C. multicaulis* – *C. ciliata*.

Las diferencias observadas en la topología entre las hipótesis filogenéticas mostradas en esta tesis, y el trabajo de Hershkovitz (2006) se pueden deber a varios motivos. En primer lugar, Hershkovitz utilizó 63 secuencias en su análisis, pues él consideró a todas las especies establecidas por Cabrera (1937), lo cual comprende a especies que actualmente se clasifican dentro del género *Oriastrum*. Esto tiene un efecto sobre el alineamiento generado, que finalmente se utiliza en el análisis filogenético. Del mismo modo, el método para enraizar el árbol fue distinto en ambos trabajos, y finalmente los parámetros utilizados en el análisis de Hershkovitz (2006) no son detallados en su trabajo por lo que pudieron haber sido distintos a los utilizados en esta tesis.

El grupo *Tylloma* tiene la particularidad de contener a la mayoría de las especies andinas, las cuales presentan las flores más vistosas del género, entre ellas *C. villosa* y *C. spathulifolia* que se agrupan juntas y cercanamente relacionadas con *C. renifolia*, la tercera flor más llamativa del género. *C. euphrasioides* y *C. flabellata*, especies muy similares en su distribución y también morfológicamente corresponden a especies hermanas, que a su vez son el grupo hermano de todo el resto de este subgénero. Por último existe una agrupación entre *C. flabellifolia*, *C. philippi*, *C. glabrata* y *C. kalinae*. Las tres primeras especies tienen distribuciones similares, en la zona centro-norte de Chile. Las relaciones dentro del grupo *Tylloma* podrían ser aclaradas si se incluyeran las secuencias de las especies faltantes como *C. limbata*, *C. pubescens* y *C. schroederi*, *C. frayjorgensis* y *C. splendens*.

En el caso del subgénero *Chaetanthera* se observan dos clados (A y B) con altos valores de respaldo. En este grupo sólo se observa una politomía, entre *C. ciliata*, *C. multicaulis* y el grupo *C. chilensis* - *C. x serrata*. Las dos primeras especies se diferencian entre sí por su rango de distribución pero morfológicamente son muy similares. Las especies *C. ramosissima* y *C. taltalensis*, previamente consideradas como dos variedades de la misma especie (*C. tenella*) se ubican lejanamente emparentadas dentro de la filogenia. Dentro de este subgénero falta por incluir a tres representantes: *C. peruviana*, *C. depauperata* y *C. glandulosa*.

Sobre la reproducción

Los factores que determinan los sistemas de reproducción de las plantas y su relación con la morfología son temas fundamentales en la biología reproductiva de plantas.

Una pregunta clave en esta tesis fue determinar el estado ancestral del sistema de reproducción, nivel de autogamia y forma de vida en *Chaetanthera*. Usando caracteres discretos, el análisis de Máxima Verosimilitud arrojó resultados ambiguos. Sin embargo mediante Máxima Parsimonia, se obtuvo que el ancestro del género es autocompatible, autógeno y anual. Según la reconstrucción en donde se consideraron el sistema de reproducción y nivel de autogamia como caracteres continuos (usando parsimonia), el ancestro sería parcialmente incompatible y parcialmente autógeno. Consideramos que los más confiables de estos resultados son los obtenidos con el método de Máxima Verosimilitud con caracteres discretos, ya que cuando se usan datos continuos, los programas tienden a calcular el estado ancestral en base de un promedio entre las condiciones extremos. Tomando en cuenta los resultados no ambiguos, la forma de vida ancestral del género sería anual. En cuanto al sistema de reproducción, considerando los dos conjuntos de resultados, se inclina hacia la incompatibilidad incompleta, con cierta capacidad para la autogamia. Esta conclusión, sumado al hecho de que existen especies totalmente autoincompatibles en el género, sugiere fuertemente que la transición desde la compatibilidad hacia la autoincompatibilidad ha ocurrido en el género *Chaetanthera*. De hecho se observó esta última tendencia con Máxima Parsimonia, aunque con Máxima Verosimilitud, de nuevo, se obtuvieron resultados ambiguos.

Sumado a lo anterior, en *Chaetanthera* se observó una correlación fuerte entre la forma de vida y el sistema reproductivo, tendencia que fue ampliamente respaldada por el análisis de evolución correlacionado con datos discretos. Ninguna especie perenne de *Chaetanthera* presenta un alto nivel de autogamia o autocompatibilidad; es decir todas presentan incompatibilidad o exogamia completa o parcial. Por otra parte, todas las

especies que mostraron autocompatibilidad o autogamia completa, son anuales. Este resultado es concordante con lo esperado teóricamente y de datos empíricos en donde se ha mostrado que la mayoría de las especies anuales son altamente autógamas (Stebbins 1970, Lloyd 1980, Barrett *et al.* 1997). Existen tres hipótesis que explicarían esta relación: i) comparado con plantas perennes, las anuales adquieren más beneficios de un sistema de reproducción autógeno por aseguramiento reproductivo (ej. los óvulos se ven más limitados por polen externo, que por polen de la misma planta) (Stebbins 1957, Fishman & Wyatt 1999); ii) para las plantas perennes autógamas hay un costo más grande en su adaptación biológica, dado el descuento de semillas y la depresión por endogamia, (Lloyd 1992, Morgan *et al.* 1997) y iii) tanto la autogamia como una forma de vida anual evolucionan producto de la "selección r", asociada con el alto riesgo de mortalidad en hábitats efímeros con una corta disponibilidad de tiempo para su crecimiento y reproducción (Aarssen 2000).

Si bien se ha mostrado correlaciones entre el sistema de reproducción y la forma de vida anteriormente, de nuestro conocimiento transiciones en el sistema de reproducción en la dirección de un mayor grado de incompatibilidad y menor grado de autogamia, con evolución correlacionada en la forma de vida de anual a perenne no han sido documentados previamente. Esta direccionalidad de las transiciones de los sistemas de reproducción tal vez no es sorprendente en el género *Chaetanthera* dado su distribución altitudinal y que tenga un ancestro anual. La mayoría de las especies anuales del género se encuentran a bajas alturas, mientras muchas especies perennes se encuentran a mayores alturas. De acuerdo con la filogenia, las especies perennes de mayor altura habrían evolucionado de un ancestro anual con la consiguiente

adquisición de un mayor grado de autoincompatibilidad genética y menor grado de autogamia que las especies anuales típicas.

La posibilidad de la restitución de incompatibilidad genética a partir de la compatibilidad genética que implica la tendencia encontrada en *Chaetanthera* es un tema que ha sido ampliamente debatido en la literatura. Basado un estudio de la evolución del sistema de incompatibilidad gametofítico en la familia Solanaceae, Igic *et al.* (2006) planteó que la generación *de novo* del sistema de autoincompatibilidad es una opción extremadamente improbable por la complejidad y por la diversidad alélica que tendría que haber sido recuperada. Una vez que ésta se ha perdido por mutaciones en el locus S, es prácticamente imposible de restituir por la rápida disminución del polimorfismo propio de este locus (Igic *et al.* 2004). Sin embargo, si estas mutaciones ocurren en alelos moduladores del locus S, o que no están ligados a este mismo, podría haber una recuperación del SI por selección o por hibridización (Rick & Chetelat 1991, Nasrallah *et al.* 2004, Ferrer & Good-Avila 2005). Nuestros resultados en *Chaetanthera* indicarían que la restitución de la incompatibilidad genética no es imposible. Posiblemente esto tiene que ver precisamente con las particularidades del sistema de incompatibilidad genética de la familia Asteraceae al cual pertenece el género *Chaetanthera*. La familia Asteraceae presenta autoincompatibilidad 'esporofítica'. A diferencia de los sistemas de incompatibilidad gametofíticos, en éstos se expresan ambos alelos del locus S en la antera y los productos de esta expresión permanecen en la capa externa del grano de polen. La dominancia de uno de los dos productos de estos alelos puede llevar a que la autofecundación se realice y se generen individuos homocigotos pese a la presencia del sistema de reconocimiento y rechazo del grano de polen (de Nettancourt 2001). Sin embargo no está descrito a cabalidad el mecanismo por el cual el polen es inhibido

luego de llegar al estigma, y tampoco el funcionamiento del sistema de incompatibilidad. Si llegara a haber dominancia de unos de los dos alelos expresados tanto por las anteras como por el estigma, entonces esto podría explicar la autoincompatibilidad parcial observada en el género *Chaetanthera* y la posibilidad de transiciones evolutivas más fáciles desde la autocompatibilidad en la dirección de la incompatibilidad genética.

Se ha dicho en varias ocasiones que la autogamia constituye un "callejón evolutivo sin salida" (Stebbins. 1957). Nuestros resultados en *Chaetanthera* sugieren que, por lo menos en las Asteraceae, esto no necesariamente es el caso. De acuerdo con lo anterior, en un estudio macroevolutivo al nivel genérico en las Asteraceae se ha detectado cambios entre autocompatibilidad, autoincompatibilidad y autoincompatibilidad parcial en cualquiera de las direcciones (Ferrer & Good-Avila 2005); a diferencia de nuestro estudio, en el estudio anterior la variable forma de vida no fue considerada.

Acerca de los patrones de distribución de los sistemas reproductivos en plantas, se ha propuesto que, de acuerdo con la hipótesis de aseguramiento de reproducción por autogamia de Darwin (1876), en las floras alpinas las tasas de autogamia debieran aumentar como resultado de la bajas tasas de polinización (Arroyo *et al.* 1985; Arroyo & Squeo, 1990) que ocurre a mayores alturas (Bliss 1962, García-Camacho & Totland 2009). Esta limitación de polinizadores estaría por lo tanto "forzando" a las plantas alpinas a autofertilizarse para asegurar la producción de semillas (Kalisz & Vogler 2003, Kalisz *et al.* 2004). A pesar de esta predicción, no hay evidencia empírica de que la autogamia sea más frecuente en zonas cordilleranas. Estudios genéticos han mostrado que la progenie en plantas alpinas es principalmente producto de la

exogamia (Ritland 2002), del mismo modo, estudios genético-poblacionales han reportado coeficientes de endogamia y diversidad similares en un rango altitudinal (Oyama 1998, Bingham & Ranker 2000). De hecho, recientemente García-Camacho y Totland (2009) mostraron que no hay diferencia en el nivel de limitación de polen entre la flora que crece sobre y por debajo del límite arbóreo. En contraste con la hipótesis de aseguramiento reproductivo, existe la hipótesis del incremento de la probabilidad de polinización, que predice que un incremento en la atraktividad floral y en la longevidad floral (Bliss 1971, Arroyo *et al.* 1985, Fabbro & Körner 2004) a mayores alturas podría estar compensando la escasez de polinizadores.

En el género *Chaetanthera*, en contraposición a la hipótesis de aseguramiento reproductivo por autogamia no se encontró que existiera mayor incidencia de la autogamia en los pisos vegetacionales más altos, a pesar de que se ha documentado limitación de polen en *Chaetanthera renifolia* (Torres-Díaz *et al.* 2011), especie altoandina que no es autógena. Teniendo en cuenta la evolución correlacionada del sistema de reproducción y la forma vida, ello indicaría que el fuerte efecto de la forma de vida en los sistemas reproducción en *Chaetanthera* no permite la adquisición de autogamia en muchas especies perennes, aún cuando hay limitación de polen. Tampoco encontramos fuerte evidencia para la evolución correlacionada de dos potenciales rasgos compensatorios (número de óvulos - Burd *et al.* 2009; área total de la cabezuela, atraktividad - Arroyo *et al.* 2004; Fabbro & Körner, 2004) para paliar las bajas tasas de polinización a mayor altura, sin embargo cuando no se considera el efecto filogenético, se encontró una correlación significativa entre el número de óvulos y la altitud en aquellas especies dependientes de polinizadores. Pese a que se han datado cambios morfológicos y en la asignación de recursos a las flores en un

gradiente altitudinal (Baonza & Malo 1997, Fabbro & Korner 2004, Maad *et al.* 2013), para el caso del género *Chaetanthera* se observó que el tamaño de la cabezuela es un rasgo muy conservado; es decir que los patrones de similitud en el área del capítulo son explicados completamente por las relaciones de parentesco entre las especies. Estudios anteriores muestran que la morfología floral es un rasgo más bien lábil (Armbruster 1992, Prather 1999), incluso en la misma familia, se ha observado que las estructuras reproductivas muestran mucha mayor labilidad evolutiva que las estructuras vegetativas de las especies (Kimball & Crawford 2004).

Finalmente, no es descartable que otros mecanismos estén compensando la polinización errática que ocurre a mayores alturas en el género *Chaetanthera*. Uno de estos mecanismos puede ser una prolongación de la longevidad floral, o del tiempo en que la flor permanece abierta y disponible para la polinización, la cual se ha observado que ocurre en ambientes con menor polinización a mayores altitudes (Arroyo *et al.* 2013, Weber & Goodwillie 2013). De hecho se ha mostrado que en *C. renifolia*, una de las especies con cabezuelas más grandes del género, y que crece sobre los 3000 msnm en los Andes de Chile central presenta estigmas que pueden mantenerse receptivos hasta 28 días cuando no ocurre la polinización (Torres-Díaz *et al.* 2011).

CONCLUSIONES

- En *Chaetanthera*, lo único que impide que ocurra la autofecundación es el sistema de incompatibilidad genética, pues no se observa que existan especies altamente compatibles pero con valores intermedios de autogamia, excepto para el caso de *C. flabellifolia*,
- En *Chaetanthera* la evolución del sistema reproducción permanece poco claro, aunque podría estar ocurriendo una restauración del sistema de incompatibilidad, a partir de la incompatibilidad parcial.
- En *Chaetanthera* la evolución de la autogamia está correlacionada positivamente con la evolución de una forma de vida anual.
- En *Chaetanthera* no hay correlación entre la evolución del hábitat con el sistema reproductivo, ni tampoco con la evolución de rasgos florales que compensen la disminución de la polinización a mayores altitudes.
- A mayores alturas, las especies dependientes de polinizadores muestran un mayor número de óvulos o floretes por capítulo que las especies a bajas elevaciones.

La principal contribución de esta tesis fue mostrar evidencia que sugiere que el sistema de autoincompatibilidad en *Chaetanthera* es recuperable, aunque no es claro si a partir de un ancestro autocompatible o parcialmente incompatible. De esta manera además se plantea la interrogante del valor evolutivo de la autoincompatibilidad parcial, el cual puede ser un estado de transición o un estado estable del sistema reproductivo en este género. Por otra parte se mostró que en el género la morfología está fuertemente determinada por la filogenia, por lo que es poco probable que este sea un factor modulado por fuerzas externas, como la disponibilidad de polinizadores. Otro aspecto interesante es que en este grupo pareciera ser que no existen mecanismos morfológicos o temporales que inhiban la autopolinización, por lo que la autogamia está fuertemente asociada a la potencia del sistema de incompatibilidad genética que presentan los taxa.

Las observaciones realizadas en terreno nos sugieren que ya que a mayores alturas no hay aseguramiento reproductivo mediante la autogamia, pero tampoco hay cambios morfológicos que ayuden a contrarrestar el efecto de la baja polinización, entonces puede que existan otro tipo de mecanismos compensatorios, como por ejemplo el alargamiento de la longevidad floral. Esto suponiendo que en el género *Chaetanthera* a mayor altitud disminuye la tasa de visita de polinizadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Aarssen LW. 2000. Why are most selfers annuals? A new hypothesis for the fitness benefit of selfing. *Oikos* **89**: 606 – 612.
- Arroyo MTK. 1973. A taximetric study of intraspecific variation in autogamous *Limnanthes fucosa* (Limnanthaceae). *Brittonia* **25**: 177 – 191.
- Arroyo MTK & Squeo FA. 1990. Relationship between plant breeding systems and pollination. En (S. Kawano, ed), "Biological Approaches and Evolutionary Trends in Plants", pp. 205 – 227. Academic Press, London.
- Arroyo MTK, Primack RB & Armesto JJ. 1982. Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of central Chile. I. Pollination mechanisms and altitudinal variation. *American Journal of Botany* **69**: 82 – 97.
- Arroyo MTK, Armesto JJ & Primack RB. 1985. Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of central Chile. II. Effect of temperature on visitation rates and pollination possibilities. *Plant Systematics and Evolution* **149**: 187 – 203.

- Arroyo MTK, Muñoz S, Henríquez C, Till-Bottraud I & Pérez F. 2006. Erratic pollination, high selfing levels and their correlates and consequences in an altitudinally widespread above-tree-line species in the high Andes of Chile. *Acta Oecologica* **30**: 248 – 257.
- Arroyo MTK, Pacheco DA & Aguilera P. 2013. Floral allocation at different altitudes in highly autogamous alpine *Chaetanthera euphrasioides* (Asteraceae) in the central Chilean Andes. *Alpine Botany* **123**: 7 – 12.
- Arroyo MTK, Dudley LS, Jespersen G, Pacheco DA & Cavieres LA. 2013. Temperature-driven flower longevity in a high-alpine species of *Oxalis* influences reproductive assurance. *New Phytologist* **200**: 1260 – 1268.
- Baonza J & Malo JE. 1997. Floral size variability of *Cytisus scoparius* along an altitudinal gradient. *Lagascalia* **19**: 845 – 850.
- Barrett SCH. 1995. Mating-system evolution in flowering plants: micro- and macroevolutionary approaches. *Acta Botanica Neerlandica* **44**: 385 – 402.
- Barrett SCH. 1996. The reproductive biology and genetics of island plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society Ser. B.* **351**: 725 – 733.
- Barrett SCH. 2004. Flower diversity and plant mating strategies. En: "Yearbook of science & technology" 110 – 113. McGraw-Hill, New York.
- Barrett SCH. 2010a. Darwin's legacy: the forms, function and sexual diversity of flowers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Ser. B.* **365**: 351 – 368.

- Barrett SCH. 2010b. Understanding plant reproductive diversity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Ser. B.* **365**: 99 – 109.
- Barrett SCH & Eckert CG. 1990. Variation and evolution of mating systems in seed plants. En (S. Kawano, ed), "Biological Approaches and Evolutionary Trends in Plants", pp. 229 – 254. Academic Press, London.
- Barrett SCH, Harder LD & Worley AC. 1997. The comparative biology of pollination and mating in flowering plants. En (Silvertown J, Franco M & Harper JL eds.) pp 57 – 76. Cambridge University Press, London.
- Barry RG. 1981. Mountain weather and climate. Methuen & Co. Ltda. 313 p. London, UK.
- Bateman AJ. 1952. Self-incompatibility systems in angiosperms. I. Theory. *Heredity* **6(3)**: 285 – 310.
- Bingham RA & Orthner AR. 1998. Efficient pollination of alpine plants. *Nature* **391**: 238 – 239.
- Bingham RA & Ranker TA. 2000. Genetic diversity in alpine and foothills populations of *Campanula rotundifolia* (Campanulaceae). *International Journal of Plant Sciences* **161**: 403 – 411.
- Bliss LC. 1962. Adaptations of arctic and alpine plants to environmental conditions. *Arctic* **15**: 117 – 144.
- Bliss LC. 1971. Arctic and Alpine plant life cycles. *Annual Review of Ecology and Systematics* **2**: 405 – 438.

- Burd M, Ashman T-L, Campbell DR, Dudash MR, Johnston MO, Knight TM, Mazer SJ, Mitchell RJ, Steets JA & Vamosi JC. 2009. Ovule number per flower in a world of unpredictable pollination. *American Journal of Botany* **96**: 1159 – 1167.
- Busch JW & Delph LF. 2011. The relative importance of reproductive assurance and automatic selection as hypotheses for the evolution of self-fertilization. *Annals of Botany* **109**: 553 – 562.
- Cabrera AL. 1937. Revisión del género *Chaetanthera* (Compositae). *Revista del Museo de La Plata, Sección Botánica (Argentina)* **1**: 87 – 120.
- de Candolle AP. 1838. Prodrômus VII. **1**: 29 – 32.
- Charlesworth D & Charlesworth B. 1995. Quantitative genetics in plants: the effect of the breeding system on genetic variability. *Evolution* **49**: 911 – 920.
- Charlesworth D, Morgan MT & Charlesworth B. 1993. Mutation accumulation in finite outbreeding and inbreeding populations. *Genetical Research* **61**: 39 – 56.
- Conner JK & Rush S. 1996. Effects of flower size and number on pollinator visitation to wild radish, *Raphanus raphanistrum*. *Oecologia* **105**: 509 – 516.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R & Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9(8)**: 772.
- Darwin C. 1876. The effects of cross- and self-fertilization in the vegetable kingdom. John Murray, London, UK.

- Davies A. 2010. A systematic revision of *Chaetanthera* Ruiz & Pav., and the reinstatement of *Oriastrum* Poepp. & Endl. (Asteraceae: Mutisieae). Dissertation. Ludwig-Maximilians-Universität München: Fakultät für Biologie.
- Davies A & Facher E. 2001. Achene hairs and their diversity in the genus *Chaetanthera* Ruiz et Pav. (Mutisieae: Asteraceae). *Sendtnera* 7: 13 – 33.
- Drabkova L, Kirschner J, & Viček Ć. 2002. Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of Juncaceae. *Plant Molecular Biology Reporter* 20: 161 – 175.
- Eckhart VM. 1991. The effects of floral display on pollinator visitation vary among populations of *Phacelia linearis* (Hydrophyllaceae). *Evolutionary Ecology* 5: 370 – 384.
- Esri. 2011. ArcGIS Desktop: Release 10. Environmental System Research Institute. Redlands, CA, USA.
- Fabbro T & Korner C. 2004. Altitudinal differences in flower traits and reproductive allocation. *Flora* 199: 70 – 81.
- Felsenstein J. 1985. Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist* 125(1): 1 – 15.
- Ferrer MM & Good-Avila SV. 2007. Macrophylogenetic analysis of the gain and loss of self-incompatibility in the Asteraceae. *New Phytologist* 173: 401 – 414.
- Filatov DA. 2002. PROSEQ: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes* 2: 621 – 624.

- Fisher RA. 1941. Average excess and average effect of a gene substitution. *Annals of Eugenics* **11**: 53 – 63.
- Fishman L & Wyatt R. 1999. Pollinator-mediated competition, reproductive character displacement, and the evolution of selfing in *Arenaria uniflora* (Caryophyllaceae). *Evolution* **53**: 1723 – 1733.
- García-Camacho R & Totland Ø. 2009. Pollen limitation in the Alpine: A meta-analysis. *Arctic, Antarctic and Alpine Research* **41**: 103 – 111.
- Garland T Jr, Harvey PH & Ives AR. 1992. Procedures for the analysis of comparative data using phylogenetically independent contrast. *Systematic Biology* **41(1)**: 18 – 32.
- González A & Pérez MF. 2010. Pollen limitation and reproductive assurance in the flora of the Coastal Atacama Desert. *International Journal of Plant Sciences* **171**: 607 – 614.
- Goodwillie C, Kalisz S & Eckert CG. 2005. The evolutionary enigma of mixed mating systems in plants: occurrence, theoretical expectations, and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **36**: 47 – 49.
- Hall T. 2011. BioEdit: Biological sequence alignment editor for Windows 95/98/NT/2000/XP/7. Ibis Biosciences, Carlsbad, CA.
- Hansen HV. 1991. Phylogenetic studies in Compositae tribe Mutisieae. *Opera Botanica*. **109**: 5 – 50.

- Harder LD & Barrett SCH. 2006. Ecology and evolution of flowers. Oxford University Press Oxford, UK.
- Harder LD & Johnson S. 2009. Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. *New Phytologist* **183**: 530 – 545.
- Harmon L, Weir J, Brock C, Glor R, Challenger W, Hunt G, FitzJohn R, Pennell M, Slater G, Brown J, Uyeda J & Eastman J. 2014. Package "geiger" v.2.0.3: Analysis of evolutionary diversification. Version 2.0.3
<http://www.webpages.uidaho.edu/~lukeh/software.html>
- Hershkovitz MA, Arroyo MTK, Bell C & Hinojosa LF. 2006. Phylogeny of *Chaetanthera* (Asteraceae: Mutisieae) reveals both ancient and recent origins of the high elevation lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **41**: 594 – 605.
- Hijmans RJ, Cameron, SE, Parra, JL, Jones PG & Jarvis, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* **25**: 1965 – 1978.
- Igic B, Bohs L & Kohn JR. 2004. Historical inferences from the self-incompatibility locus. *New Phytologist* **161**: 97 – 105.
- Igic B, Bohs L & Kohn JR. 2006. Ancient polymorphism reveals unidirectional breeding system shifts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103(5)**: 1359 – 1363.
- Igic B, Lande R & Kohn JR. 2008. Loss of self-incompatibility and its evolutionary consequences. *International Journal of Plant Science* **169(1)**: 93 – 104.

- Inouye K, Maki M & Masuda M. 1996. Evolution of Campanula flowers in relation to insect pollinators on islands. In: (Lloyd DG & Barrett SCH, eds) "Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plant", pp. 377 – 301. Chapman and Hall, New York, NY.
- JanBen. 1997. DNeasy Plant Mini Kit and DNeasy Plant Maxi Kit. *Handbook for DNA isolation from plant tissue*. pp 27.
- Kalisz S & Vogler DW. 2003. Benefits of autonomous selfing under unpredictable pollinator environments. *Ecology* **84**: 2928 – 2942.
- Kalisz S, Vogler DW & Hanley KM. 2004. Context-dependent autonomous self-fertilization yields reproductive assurance and mixed mating. *Nature* **430**: 884 – 887.
- Kimball RT & Crawford DJ. 2004. Phylogeny of Coreopsidae (Asteraceae) using ITS sequences suggest lability in reproductive characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **33**(1): 127 – 139.
- Körner C. 2003. Alpine plant life – Functional plant ecology of high mountain ecosystems. 2nd Edition. 344 p. Springer. Berlin, Germany.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **23**: 2947 – 2948.
- Lessing CF. 1832. Synopsis Generum Compositarum. Sumtibus Dunckeri et Humboldtii, Berlin.

- Levin DA. 1996. The evolutionary significance of pseudo self-fertility. *The American Naturalist* 148: 321 – 332.
- Lewis PO. 2001. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Systematic Biology* 50: 913 – 925.
- Lloyd DG. 1965. The evolution of self-compatibility and racial differentiation in *Leavenworthia* (Cruciferae). *Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University* 195: 3 – 134.
- Lloyd DG. 1979. Some reproductive factors affecting the selection of self-fertilization in plants. *American Naturalist* 113: 67 – 79.
- Lloyd DG. 1980. Demographic factors and mating patterns in angiosperms. En (Solbrig OT eds) *Demography and Evolution in Plant Populations* pp 67 – 68. Blackwell, London.
- Lloyd DG. 1992. Self and cross-fertilization in plants. I. The selection of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences* 153: 370 – 380.
- Lloyd DG & Schoen DJ. 1992. Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences* 153(3): 358 – 369.
- Maad J, Armbruster WS & Fenster CB. 2013. Floral size variation in *Campanula rotundifolia* (Campanulaceae) along altitudinal gradients: patterns and possible selective mechanisms. *Nordic Journal of Botany* 31(3): 361 – 371.
- Mani MS & Saravanan JM. 1999. Pollination ecology and evolution in Compositae (Asteraceae). Science Publishers Inc, Enfield, USA.



- Maddison WP. 2006. Confounding asymmetries in evolutionary diversification and character change. *Evolution* **60**: 1743 – 1746.
- Maddison WP & Maddison DR. 2011. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75 <http://mesquiteproject.org>.
- Midford PE, Garland T & Maddison WP. 2007 PDAP: PDTREE package for Mesquite. Version 1.12. http://mesquiteproject.org/pdap_mesquite/.
- Morgan MT, Schoen DJ & Bataillon TM. 1997. The evolution of self-fertilization in perennial. *The American Naturalist* **150**: 618 – 638.
- Nasrallah ME, Liu P, Sherman-Boyles S, Boggs NA & Nasrallah JB. 2004. Natural variation in expression of self-incompatibility in *Arabidopsis thaliana*: implications for the evolution of selfing. *Proceedings of the National Academy of Science* **101**: 16070 – 16074.
- de Nettancourt D. 2001. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plants. Springer-Verlag. New York, Usa
- Orme D, Freckleton R, Thomas G, Petzoldt T, Fritz S, Isaac N & Pearse W. 2013. Package "caper": Comparative analyses of phylogenetic and evolution in R. Version 0.5.2 Disponible en <http://caper.r-forge.r-project.org>
- Oyama K. 1998. Genetic differentiation among populations of *Arabis serrata* (Brassicaceae) along its geographic distribution. *Plants Systematic and Evolution* **213**: 91 – 102.

- Pagel M. 1999. Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* **401**: 877 – 884.
- Parra O & Marticorena C. 1972. Granos de polen de plantas Chilenas II Compositae – Mutisieae. *Gayana Botanica* **21**: 1 – 107.
- Pérez F, León C & Muñoz T. 2013. How variable is delayed selfing in a fluctuating pollinator environment? A comparison between a delayed selfing and a pollinator-dependent *Schizanthus* species of the high Andes. *Evolutionary Ecology* **27(5)**: 911 – 922.
- Prather LA. 1999. The relative lability of floral versus non-floral characters and morphological phylogenetic analysis of *Cobea* (Polemoniaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **131**: 433 – 450.
- Purvis A & Rambaut A. 1995. Comparative analysis by independent contrast (CAIC): an Apple Macintosh application for analyzing comparative data. *Computer Application in Bioscience* **11**: 247 – 251.
- R Core Team 2014. R: A language and environment for statistical computing. R foundation for statistical computing. ISBN 3-900051-07-0. Vienna, Austria.
- Rambaut A & Drummond AJ. 2007. Tracer versión 1.4, Disponible en <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Reiche K. 1904. Anales Universidad de Chile **115**: 317 – 339.
- Rick CM & Chetelat RT. 1991. The breakdown of self-incompatibility in *Lycopersicon hirsutum*. En (Hawkes L, Nee E, Estrada N eds) "Solanaceae III: taxonomy,

- chemistry, evolution" pp 253 – 256. Royal Botanic Gardens Kew and Linnean Society of London. Richmond, UK.
- Ritland K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating using n independent loci. *Heredity* **88**: 221 – 228.
- Ronquist F & Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19(12)**: 1572 – 1574.
- Ruiz T & Arroyo MTK. 1978. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica* **10(3)**: 221 – 230.
- Stebbins GL. 1950. Variation and evolution in plants. Columbia University Press, New York.
- Stebbins GL. 1957. Self-fertilization and population variability in the higher plants. *American Naturalist* **91**: 337 – 354.
- Stebbins GL. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I. Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* **1**: 307 – 326
- Stebbins GL. 1974. Flowering plants: evolution above the species level. Cambridge, MA: Belknap.
- Stebbins GL. 1981. Why are there so many species of flowering plants?. *BioScience* **31(8)**: 573 – 577.
- Swofford DL. 2001. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates

- Takebayashi N & Morrell PL. 2001. Is self-fertilization an evolutionary dead end? Revisiting an old hypothesis with genetic theories and a macroevolutionary approach. *American Journal of Botany* **88**: 1143 – 1150.
- Tellería MC & Katinas L. 2004. A comparative palynologic study of *Chaetanthera* (Asteraceae: Mutisieae) and allied genera. *Systematic Botany* **29(3)**: 752 – 773.
- Torres-Díaz C, Gómez-González S, Stotz GC, Torres-Morales P, Paredes B, Pérez-Millaqueo M & Gianoli E. 2011. Extremely long-lived stigmas allow extended cross-pollination opportunities in a high Andean plant. *Plos One* **6(5)**: 1 – 8.
- Waser NM & Ollerton J (eds). 2006. Plant-pollinator interactions from specialization to generalization. University of Chicago Press. Chicago IL.
- Weber JJ & Goodwillie C. 2013. Variation in floral longevity in the genus *Leptosiphon*: mating system consequences. *Plant Biology* **15**: 220 – 225.
- Weller SG, Donoghue MJ & Charlesworth D. 1995. The evolution of self-incompatibility in flowering plants: a phylogenetic approach. En (Hoch PC & Stephenson AG eds) "Experimental and molecular approaches to plant biosystematics" pp 355 – 382. Missouri Botanical Garden, MO, USA.
- White TJ, Bruns T, Bruns SL & Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ & White TJ, eds) PCR protocols: a guide to methods and application pp. 315 – 322. Academic press, New York, USA.

ANEXOS

Anexo I. Significancia estadística de las correlaciones estudiadas con y sin PICs.

Rasgos comparados	Con PICs				Sin PICs			
	Todas las especies		Sin autógamias		Todas las especies		Sin autógamias	
	t	p	t	p	t	p	t	p
Área total – Atractividad	47,5	< 0,001	36,0	< 0,001	42,0	< 0,001	28,1	< 0,001
Área total – N° de óvulos	6,3	< 0,001	5,6	< 0,001	14,2	< 0,001	10,1	< 0,001
Área total – Autocompatibilidad	-0,7	n.s.	0,6	n.s.	-1,7	n.s.	0,9	n.s.
Área total – Autogamia	-1,3	n.s.	-0,3	n.s.	-3,0	< 0,01	-0,6	n.s.
Atractividad – N° de óvulos	5,9	< 0,001	5,2	< 0,001	11,4	< 0,001	7,9	< 0,001
Atractividad – Autocompatibilidad	-0,7	n.s.	0,6	n.s.	-1,8	0,08	0,8	n.s.
Atractividad – Autogamia	-1,2	n.s.	-0,3	n.s.	-3,1	< 0,01	-0,6	n.s.
N° de óvulos – Autocompatibilidad	-1,4	n.s.	1,1	n.s.	-1,3	n.s.	1,2	n.s.
N° de óvulos – Autogamia	-2,0	0,06	1,1	n.s.	-2,2	< 0,05	0,1	n.s.