



I M B I V

Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales

EL COLOR DE LAS FLORES DE *NICOTIANA GLAUCA* Y SU PERCEPCIÓN A TRAVÉS DE LA MIRADA DE LOS DIFERENTES POLINIZADORES EN POBLACIONES NATIVAS E INTRODUCIDAS.



Tesinista: Antonella Costa

Firma: 

Directora: Dra. Valeria Paiaro

Firma: 

Co- directora: Dra. Marcela Moré

Firma: 

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral. Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (CONICET - Universidad Nacional de Córdoba)

Noviembre de 2020

**EL COLOR DE LAS FLORES DE *NICOTIANA GLAUCA* Y SU PERCEPCIÓN A
TRAVÉS DE LA MIRADA DE LOS DIFERENTES POLINIZADORES EN
POBLACIONES NATIVAS E INTRODUCIDAS**

Tribunal Examinador

Nombre y Apellido: **Firma:**

Nombre y Apellido: **Firma:**

Nombre y Apellido: **Firma:**

Calificación:

Fecha:

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS	8
2.1 Sistema de estudio	8
2.2 Sitios de muestreo y contextos de polinización	9
2.3 Procesamiento y análisis de la variación de los espectros de reflexión de la corola.	12
2.4 Percepción del color en el sistema visual de los visitantes florales	13
2.5 Discriminación del color en el sistema visual de los visitantes florales	16
2.6 Percepción y discriminación de flores amarillas y rojas bajo el sistema de visión de picaflores y abejorros	17
3. RESULTADOS	20
3.1 Variación objetiva del color floral	20
3.2 Percepción del color por los visitantes florales	24
3.3 Discriminación del color por los visitantes florales	26
3.4 Percepción y discriminación del color de flores amarillas y rojas por picaflores y abejorros.	30
4. DISCUSIÓN	32
4.1 Variación en el color de las flores de <i>N. glauca</i> y su percepción por los visitantes florales en el rango nativo y en áreas invadidas	33
4.2 Percepción y discriminación de las flores de color rojo y amarillo de poblaciones nativas según el sistema de visión de abejorros y picaflores	38
5. CONSIDERACIONES FINALES	41
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
7. ANEXOS	51

RESUMEN

La identidad y abundancia de los polinizadores puede variar significativamente entre rangos de distribución nativos y no-nativos. Diferentes polinizadores muestran distintas habilidades visuales y cognitivas que pueden influir en la evolución del color floral. *Nicotiana glauca* (Solanaceae) es una planta Sudamericana polinizada por picaflores que se ha convertido en una importante invasora de áreas semiáridas del mundo, donde es visitada por animales locales, como aves de la familia Nectariniidae en Sudáfrica o esfíngidos diurnos en España. Además, abejorros de la especie *Xylocopa ordinaria* actúan como ladrones de néctar en el rango nativo. En esta Tesina, se midió el espectro de reflectancia de la corola en un total de 541 individuos de esta especie pertenecientes a tres poblaciones nativas y cuatro poblaciones introducidas que abarcan los diferentes contextos de polinización. Para determinar cómo es percibida la coloración de las flores de dichas poblaciones por los distintos visitantes florales presentes en las regiones estudiadas, los loci de color floral fueron representados en el espacio visual de aves tetracromáticas: nectarínidos y picaflores sensibles a la longitud de onda ultravioleta (UV) y picaflores sensibles al violeta (V), esfíngidos y abejorros tricromáticos. Mediante contrastes cromáticos y acromáticos, se evaluó si los distintos visitantes florales discriminarían el color de la corola de las poblaciones de los diferentes contextos. Además, se indagó si el color rojo para el ojo humano presente de algunas flores en el rango nativo podría haber evolucionado para evitar a los abejorros ladrones de néctar. Para ello, se clasificaron las flores de las poblaciones nativas en cuatro categorías de color (rojas y amarillas que absorben o reflejan UV) de manera objetiva mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP), y se compararon los contrastes cromáticos y acromáticos entre pares de categorías para los sistemas de visión de picaflores y abejorros. Se encontró una variación significativa en el espectro de reflexión de la corola tanto entre contextos de polinización como entre poblaciones dentro de cada contexto, especialmente en el área de distribución nativa. Desde el punto de vista de los polinizadores (picaflores, nectarínidos y esfíngidos), las flores de las poblaciones nativas fueron, en general, significativamente discriminadas de las de las poblaciones no nativas, que en su mayoría no fueron discriminadas como diferentes entre sí. En cuanto a la conspicuidad de las flores de diferentes colores en el rango nativo, se encontró que más que el color rojo vs el amarillo, es la reflexión en el rango UV tanto en flores rojas (en mayor proporción) como amarillas lo que las hace indistinguibles del fondo verde de las hojas de *N. glauca* tanto para los abejorros como para

los picaflores. Por otra parte, mientras las flores que reflejan UV serían distinguidas de las flores que absorben por ambos grupos de visitantes florales, las flores rojas y amarillas que reflejan UV no serían distinguidas entre sí por los abejorros. Estos hallazgos se discuten bajo la hipótesis de la selección de color mediada por polinizadores y por ladrones de néctar, como también en relación a procesos evolutivos alternativos, como la deriva génica, que pueden ocurrir durante las invasiones, y a factores abióticos como posibles modeladores del color floral.

Palabras claves: abejorros, color de la corola, esfíngidos, especies invasoras, espectros de reflexión, interacción planta-polinizador, ladrones de néctar, modelos de visión, nectarínidos, picaflores, polinización.

1. INTRODUCCIÓN

Las invasiones biológicas tienen un gran impacto sobre la biodiversidad nativa y la dinámica de los ecosistemas naturales. Las especies exóticas invasoras pueden alterar la estructura de las comunidades compitiendo directamente con las especies nativas por la explotación de recursos, e indirectamente al afectar las interacciones interespecíficas (mutualistas o antagonistas) de especies claves para el funcionamiento del ecosistema (Charles y Dukes, 2007; Vilá, 2011; Richardson y Pyšek, 2012). La colonización, establecimiento y propagación de una especie de planta invasora depende, en parte, de su integración a la red de polinización local (Aizen *et al.* 2008; Geerts y Pauw, 2009; Traveset y Richardson, 2014). Para que esta nueva interacción planta-polinizador sea exitosa, en primera instancia, los potenciales polinizadores en el nuevo hábitat deben ser atraídos hacia las plantas introducidas (Stout y Tiedeken, 2017). Para ello, las plantas despliegan diferentes señales florales anunciando recompensas para los polinizadores (Ashworth *et al.* 2015). Las capacidades sensoriales de los visitantes florales les permiten detectar dichas señales y relacionarlas con la recompensa ofrecida. El color floral es una señal clave que se manifiesta como estímulos visuales a los ojos de sus visitantes (Chittka y Thomson, 2001). La capacidad de percibir y distinguir las señales de color floral depende de los sistemas visuales de los visitantes florales, los cuales son específicos de cada grupo animal (Briscoe y Chittka, 2001; Chittka y Thomson 2001; Kelber *et al.* 2003; Ödeen y Håstad, 2003; Stoddard *et al.* 2008; Telles *et al.* 2016; Chen *et al.* 2020a).

El aislamiento reproductivo y los cambios que se establecen en el nuevo ecosistema colonizado provocan presiones selectivas locales que pueden conducir a cambios evolutivos rápidos en las especies de plantas invasoras (Lee, 2002; Geng *et al.* 2007; Sekor y Franks, 2018). Los propágulos que llegan a establecerse en el nuevo rango geográfico sustentan sólo parte de la variación genética de la población nativa, por lo tanto, las poblaciones invasoras están sometidas a una pérdida de variación génica (Sakai, 2001; Dlugosch y Parker, 2008), y la fuerza e intensidad con la que actúe la selección natural determinará el camino evolutivo que tomará la población (Sekor y Franks, 2018). La selección natural mediada por polinizadores se considera uno de los principales procesos evolutivos subyacentes a la diversificación floral (Harder y Johnson, 2009; Van der Niet y Johnson *et al.* 2020). Los rasgos florales como la morfología, color, fragancia, calidad y cantidad de recompensa pueden atraer polinizadores efectivos específicos o generalistas que modulan e influyen en el éxito reproductivo y aptitud de la planta

que visitan (Moran y Alexander, 2014; Ashworth *et al.* 2015). Por otro lado, las relaciones planta-polinizador evolucionan dentro de un contexto ecológico espacialmente cambiante (Herrera *et al.* 2006; Nattero *et al.* 2010). Es por ello que, la variación geográfica de los ensambles de polinizadores con diferentes capacidades sensoriales entre ambientes nativos e invadidos puede conducir a caminos evolutivos diferentes en los rasgos florales en muy poco tiempo. Así, las poblaciones de plantas introducidas integradas a la red de polinización local pueden estar sujetas a selección natural que podría favorecer caracteres florales de atracción y ajuste a los polinizadores. Estos caracteres podrían ser diferentes a los favorecidos en poblaciones de ambientes nativos con diferentes ensambles de polinizadores, y por ende sujetos a una presión selectiva diferente (Hierro *et al.* 2005).

Uno de los caracteres más influyentes en la atracción de polinizadores es el color floral (Rausher, 2008). Este rasgo está determinado por la presencia y proporción de pigmentos como carotenoides (responsables de los colores amarillo, naranja y rojo para el ojo humano) y antocianinas (responsables de los colores rojo, rosa, azul y morado), que están ampliamente extendidos entre las angiospermas (Gretewold, 2006), y pueden encontrarse solos o combinados dando el característico color a la corola (Ng y Smith, 2016). Los flavonoides, precursores de las antocianinas, son compuestos que absorben en la longitud de onda ultravioleta y generan patrones y colores diferentes a los visibles por el ojo humano (Santos *et al.* 2017). Tanto las flores amarillas como las rojas pueden absorber o reflejar de manera uniforme los rayos ultravioletas (UV; Lunau *et al.* 2011; Papiorek *et al.* 2016).

Los polinizadores pueden responder al color de la flor por la capacidad de percibirlos y distinguirlos, ya sea por preferencia innata (Raine y Chittka, 2007) o por un aprendizaje asociado a las recompensas que la flor ofrece (Melendez-Ackerman *et al.* 1997). Los grupos funcionales de visitantes florales presentan diferentes sistemas visuales y cognitivos que les permiten discriminar entre distintas señales visuales (Briscoe y Chittka 2001; Chittka y Thomson, 2001). El modelo de síndrome floral postula que la evolución del color de las flores está mediada y direccionada por el comportamiento perceptivo de los polinizadores mediante la selección que ejercen sobre dicho rasgo floral (Schiestl y Johnson, 2013). En este sentido, existen estudios que asocian cambios en el color de las flores con cambios en el tipo de polinizador (Altshuler, 2003; Bradshaw y Schemske, 2003). Además, se ha demostrado que los polinizadores perciben poca variación del color floral en relación con la variación percibida por animales que no juegan

ningún papel en su polinización (Paine *et al.* 2019). Este hallazgo es consistente con la idea de que las flores se adaptan a la visión de sus polinizadores (Schiestl y Johnson, 2013). Por otro lado, se cree que las señales visuales son el resultado evolutivo del compromiso entre ser recibidas por los polinizadores de manera eficiente y fácil, y pasar desapercibidas para los visitantes no deseados que tienen el potencial de reducir la aptitud de las plantas (Endler, 2000). De esta manera, se ha propuesto que las flores rojas en plantas polinizadas por aves podrían favorecer una mayor atracción de las aves (tienen mayoría de fotorreceptores rojos en la retina) y/o ser más eficientes para evitar a las abejas (no tienen fotorreceptores rojos en sus ojos), que suelen ser ladrones de néctar o visitantes relativamente ineficientes comparados con las aves (Raven, 1972).

Las señales de color floral deben interpretarse en relación con las capacidades visuales de los polinizadores específicos (Shrestha *et al.* 2013). Sin embargo, son escasos los estudios que consideran el modelo de visión de los polinizadores al evaluar el color de las flores (Campbell *et al.* 2012; Renoult *et al.* 2013, Papiorek *et al.* 2016; Chen *et al.* 2020a). Asimismo, existen pocos trabajos que evalúen si la variación geográfica en el elenco de polinizadores puede resultar en una variación espacial del color de las flores a nivel intraespecífico (Niovi Jones y Reithel, 2001; Schemske y Bierzychudek, 2001; Johnson *et al.* 2020). Dado que el elenco y la abundancia de polinizadores pueden diferir sustancialmente entre hábitats nativos e invadidos (Ollerton *et al.* 2012), las especies de plantas invasoras resultan sistemas ideales para poner a prueba esta hipótesis. Además, se ha resaltado que estudios comparativos entre poblaciones nativas e introducidas resultan necesarios para comprender cuáles son los cambios que sufren las plantas invasoras en su nuevo rango geográfico y los mecanismos que posibilitan el éxito de sus poblaciones (Bossdorf *et al.* 2005; Hierro *et al.* 2005).

Nicotiana glauca R. Graham (Solanaceae) es una planta ornitófila nativa de Sudamérica, distribuida en el sur de Bolivia y el centro y noroeste de Argentina, que ha invadido diversas regiones del mundo (Ollerton *et al.* 2012). Al ojo humano, sus flores son típicamente amarillas, aunque en algunas poblaciones nativas hay polimorfismo de color, que incluye plantas con flores de color amarillo, anaranjado y rojo (V. Paiaro, *obs. pers.*, Figura 1C-E). En su rango nativo, la especie es polinizada exclusivamente por picaflores (Nattero y Cocucci 2007; Nattero *et al.* 2011). Además, en poblaciones nativas se ha observado que abejorros de la especie *Xylocopa ordinaria* (Hymenoptera: Apidae) roban néctar con mayor frecuencia en flores amarillas que en

flores rojas (A.A. Cocucci, *com. pers.*). En algunas regiones invadidas, *N. glauca* es visitada por polinizadores locales, como las aves Nectariniidae en Sudáfrica (Geerts y Pauw, 2009), mientras que en otras áreas invadidas donde no hay aves polinizadoras, como la región mediterránea de Europa, se reproduce casi exclusivamente por autopolinización, y sólo recibe visitas ocasionales del esfingido diurno *Macroglossum stellatarum* (Lepidoptera: Sphingidae; Ollerton *et al.* 2012; Issaly *et al.* 2020). Tanto los esfingidos diurnos como los abejorros presentan una visión tricromática del color basada en tres clases de fotorreceptores: UV, azul y verde (Kelber, 1997; Peitsch *et al.* 1992). Las aves nectarívoras pertenecientes a las familias Trochilidae y Nectariniidae, en cambio, tienen un sistema de visión con receptores tetracromáticos, que les permite detectar brillo, movimiento y un amplio espectro de colores (Papiorek *et al.* 2016; Chen *et al.* 2020a; Stoddard *et al.* 2020). Sin embargo, puede existir una variación en la percepción del color entre especies o grupos que depende, entre otros factores, de si la secuencia del gen *sws1* (“short-wavelength sensitive”) que codifica a la proteína opsina para el receptor de longitud de onda corta se expresa en pigmentos sensibles al ultravioleta (UV) o al violeta (V). Si bien un estudio molecular reveló que los nectarínidos poseen un sistema visual sensible al UV mientras que los picaflores tendrían un sistema visual sensible al V (Ödeen y Håstad 2010), estudios comportamentales demostraron que especies de picaflores también ven el UV (Herrera *et al.* 2008; Stoddard *et al.* 2020). Por otra parte, los picaflores discriminan de manera más eficiente las flores rojas que las flores de otros colores (Herrera *et al.* 2008), mientras que una especie de ave de la familia Nectariniidae (*Nectarinia osea*) no tiene una preferencia de color entre flores rojas y amarillas (Kaczorowski *et al.* 2014). Sin embargo, un estudio reciente reveló que en comparación con otros colores florales, las flores rojas, especialmente las del Nuevo Mundo, son muy llamativas para las aves, tanto para aquellas especies sensibles al violeta como para las sensibles a la luz ultravioleta, y mucho menos llamativas para las abejas (Chen *et al.* 2020a).

Por todo esto, *N. glauca* resulta un sistema interesante para estudiar las señales de color floral en el rango de distribución nativo y en áreas invadidas con distintos contextos de polinización (polinización por picaflores, polinización por nectarínidos, y visitas ocasionales de un esfingido diurno pero sin ser un polinizador efectivo), tanto de manera objetiva como a través del espacio perceptivo de sus diferentes polinizadores y visitantes florales. Por otro lado, *N. glauca* ofrece la oportunidad de explorar y comparar cómo son percibidos los distintos colores de la corola existentes en el rango nativo por polinizadores efectivos (*i.e.* picaflores) y robadores

de néctar (*i.e.* abejorros) presentes en este ambiente. En este trabajo, se pusieron a prueba dos hipótesis:

1) El color de las flores de *N. glauca* en poblaciones del rango de distribución nativo e invadido es producto de las diferentes presiones de selección de los polinizadores que las visitan en cada región geográfica. Si esta hipótesis es correcta, se debería encontrar una divergencia en el color de las flores entre poblaciones del rango nativo polinizadas por picaflores, las de áreas invadidas polinizadas por aves nectarínidas y las de áreas invadidas visitadas ocasionalmente por *M. stellatarum*, que optimice la visibilidad de los diferentes visitantes florales. Además, se espera que el color de las flores de las distintas regiones geográficas sea percibido y discriminado de manera diferente por visitantes florales con diferente sistema visual.

2) El color rojo en las flores del rango nativo ha evolucionado principalmente para evitar a los abejorros ladrones de néctar. En ese caso, se espera que en las poblaciones nativas las flores de color rojo sean menos conspicuas que las flores de color amarillo en el modelo visual de los abejorros y puedan distinguirlas entre ellas, mientras que en el modelo de visión de los picaflores las flores de ambos colores sean igualmente conspicuas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar si el contexto de polinización en poblaciones nativas e introducidas de *Nicotiana glauca* (*i.e.* polinización por picaflores, polinización por nectarínidos y visitas ocasionales del esfíngido diurno *M.stellatarum*) afecta el color de sus flores.

Objetivos específicos

- 1) Evaluar la variación objetiva en el color de la corola entre poblaciones nativas e introducidas que presentan distintos contextos de polinización.
- 2) Determinar cómo sería percibida la coloración de las flores de poblaciones con diferente contexto de polinización en el espacio visual de los diferentes visitantes florales (picaflores, nectarínidos, esfíngidos diurnos y abejorros).
- 3) Evaluar si los distintos grupos de visitantes florales discriminarían el color de la corola entre las poblaciones del mismo y diferentes contextos de polinización.

- 4) Evaluar la precepción y discriminación de flores rojas y amarillas del rango nativo de acuerdo al modelo visual de picaflores y abejorros.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Sistema de estudio

Nicotiana glauca, conocida vulgarmente como palán palán, es un arbusto nativo del centro y noroeste de Argentina y Bolivia (Goodspeed, 1954; Figura 1A). Esta especie ha sido introducida en numerosas regiones del mundo como planta ornamental, desde donde se ha expandido, ha colonizado y ha invadido diversos hábitats nativos en cuatro continentes (América, incluida América del Norte y otras partes de América del Sur, Europa, África y Oceanía). La especie está incluida en la Base de Datos de Especies Invasoras Globales (<http://www.issg.org>), y es considerada invasora en regiones mediterráneas de Europa y en Sudáfrica (Ollerton *et al.* 2012). Tanto en su rango de distribución nativo como en las regiones donde esta especie ha sido introducida, se la encuentra en áreas naturalmente y antropogénicamente disturbadas, tales como riberas de ríos, costados de caminos y canteras abandonadas, principalmente en ambientes semiáridos de baja a elevada altitud (0-3500 m).

Nicotiana glauca es una planta ornitófila que presenta flores tubulares de longitud variable (30 a 57 mm, Nattero *et al.*, 2011), principalmente de color amarillo dado por la presencia de carotenoides (Zhu *et al.* 2007), aunque en algunos sitios nativos puede presentar flores anaranjadas y rojas por la presencia de antocianos (Ng y Smith 2016). Cada planta produce numerosas flores dispuestas en panículas, que son visitadas a lo largo del día, y duran alrededor de 3 a 4 días (Schueller, 2004; Nattero y Cocucci, 2007). Cada flor produce abundante cantidad de néctar (20 µl aproximadamente) de moderada concentración de azúcar (25% de sacarosa aproximadamente; Schueller, 2007; Ollerton *et al.* 2012). Dentro de su área de distribución natural, al igual que en áreas invadidas del Hemisferio Sur, la temporada de floración se extiende desde principios de septiembre hasta abril, mientras que en áreas invadidas del Hemisferio Norte la floración se extiende desde marzo hasta octubre. En muchas áreas invadidas, sus flores sirven como una importante fuente de alimento para aves nectarívoras, incluso como la única fuente de néctar en ciertas épocas del año (Kaczorowski *et al.* 2014). Al igual que otras plantas ornitofílas, las flores de *N. glauca* no producen fragancias (M. Moré, *obs.*

pers.), por lo que el despliegue visual resulta esencial para la atracción de sus polinizadores. Los frutos son cápsulas dehiscentes en los que persiste el cáliz. La fructificación es alta y cada fruto contiene cientos de pequeñas semillas secas que son liberadas cuando el fruto está maduro; la viabilidad de las semillas oscila alrededor del 90% (Ollerton *et al.* 2012).

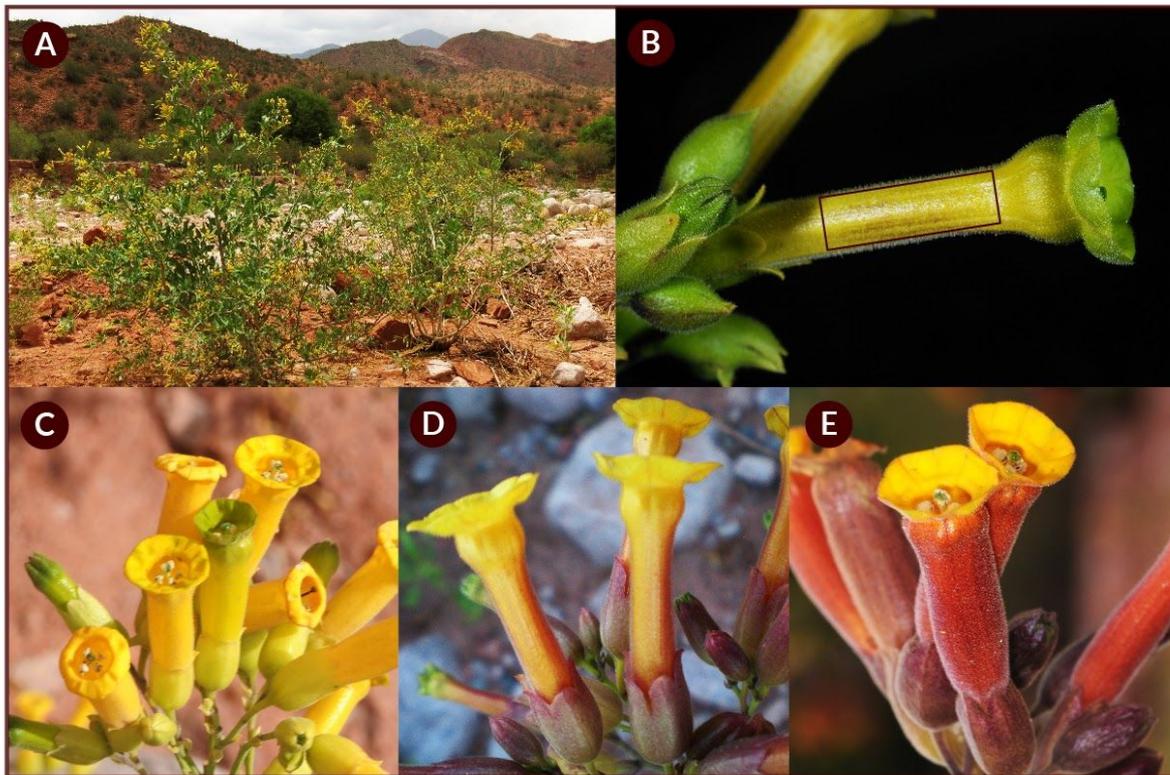


Figura 1. La especie de estudio: *Nicotiana glauca*. (A) Vista general de la planta. (B) Vista de una flor. El rectángulo señala la zona donde se midió el color. (C-E) Inflorescencias con flores de diferentes morfotipos de color para el ojo humano: amarillas (C) , anaranjadas (D) y rojas (E).

2.2 Sitios de muestreo y contextos de polinización

Se estudiaron siete poblaciones de *N. glauca*: tres nativas (dos en Argentina y una en Bolivia), dos introducidas en la región del Cabo en Sudáfrica, y dos introducidas en la región Mediterránea de Europa, específicamente en la isla Balear de Mallorca, España (Tabla 1), con el objetivo de abarcar los distintos contextos de polinización de la especie (*i.e.* polinización por picaflores, polinización por nectarínidos, visitas ocasionales de un esfingido diurno). Entre las poblaciones nativas, se incluyeron dos que presentan polimorfismo de color floral para el ojo humano (EM y PP). En las poblaciones estudiadas del rango nativo (EM, PP, TU), las plantas de *N. glauca* son visitadas por diferentes ensambles de picaflores, conformados por una o tres

especies (*Patagona gigas* -Figura 2A-, *Sappho sparganura*, *Chlorostilbon lucidus*), dependiendo de la población (García *et al.* 2020). Además, en el rango nativo, el abejorro *Xylocopa ordinaria* roba néctar de las flores de *N. glauca* a través de una perforación que realiza en la base de la corola (A.A. Cocucci, *com. pers.*, Figura. 2D). Las plantas de las poblaciones estudiadas en Sudáfrica (TT, BR) son polinizadas por tres especies de aves de la familia Nectariniidae (*Nectarinia famosa* -Figura 2B-, *Cinnyris fuscus*, *Cinnyris chalybeus*; Geerts y Pauw, 2009; García *et al.* 2020). Si bien estas aves normalmente perchan para alimentarse, en *N. glauca* también visitan las flores en vuelo suspendido (Geerts y Pauw, 2009; Figura 2B). En Mallorca, donde no hay aves polinizadoras especializadas, sólo se observó al esfíngido colibrí (*Macroglossum stellatarum.*, Figura 2E) como visitante ocasional en las poblaciones estudiadas (BI, GE; García *et al.* 2020). *Nicotiana glauca* es auto-compatible en todas las poblaciones estudiadas del rango de distribución nativo y no nativo, aunque las plantas en las poblaciones de Mallorca tienen una capacidad mucho mayor de autopolinización autónoma que en los sitios con polinizadores (Issaly *et al.* 2020). La polinización por picaflores y por nectarínidos aumenta el éxito reproductivo de las plantas en las poblaciones sudamericanas y sudafricanas, respectivamente (Geerts y Pauw, 2009; Issaly *et al.* 2020). Si bien en Mallorca las plantas dependen de la autopolinización para reproducirse, también se detectó un pequeño porcentaje de polinización cruzada (1,43%) que podría atribuirse a las visitas ocasionales del esfíngido diurno *M. stellatarum* (Issaly *et al.* 2020).

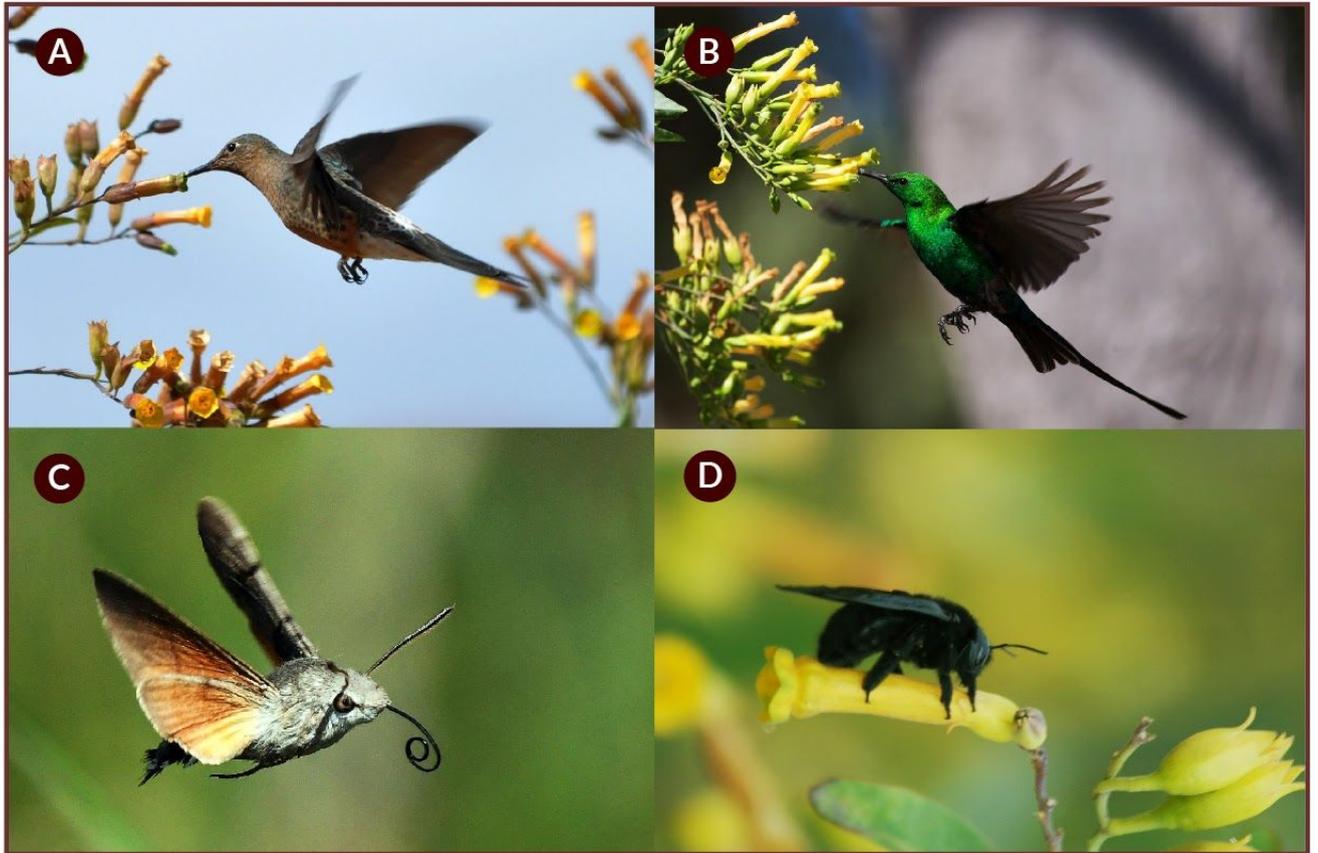


Figura 2. Polinizadores y visitantes florales de *Nicotiana glauca*. (A) Picaflor *Patagona gigas* en Piedra Pintada, (B) Macho del nectarínido *Nectarinia famosa* en Troe Troe River, (C) Esfíngido diurno *Macroglossum stellatarum* que visitó las poblaciones de Mallorca y (D) Abejorro *Xylocopa ordinaria* robando néctar en Piedra Pintada.

Tabla 1. Datos de los sitios de muestreo de *Nicotiana glauca*. Se detalla el origen (nativo o introducido), el contexto de polinización (*i.e.* polinización por picaflores, polinización por nectarínidos y visitas ocasionales del esfíngido diurno *M.stellatarum*), la ubicación, coordenadas geográficas y datos climáticos de las siete poblaciones estudiadas. Se provee información del número de individuos y de flores muestreadas en cada población. Código = código del nombre de la población muestreada; TMA = temperatura media anual; PMA = precipitación media anual; N ind = número de individuos muestreados por población; N flo = número de flores muestreadas por individuo.

<i>Origen-contexto de polinización</i>	Código	Ubicación	Latitud	Longitud	Altitud (m)	TMA (°C)	PMA (mm)	N ind	N flo
<i>Nativo-Polinización por picaflores</i>									
Embarcación	EM	Salta, Argentina	23°14'40'' S	64°8'7'' O	310	17,2	692	43	3
Piedra Pintada	PP	La Rioja, Argentina	29°25'46'' S	67°49'47'' O	1590	19,6	338	71	3
Tupiza	TU	Potosí, Bolivia	21°40'39'' S	65°34'43'' O	3213	11,2	370	86	3
<i>Introducido-Polinización por Nectarínidos</i>									
Buffels River	BF	Northern Cape, Sudáfrica	29°43'13'' S	17°36'53'' E	201	18,4	105	62	5
Troe Troe River	TT	Western Cape, Sudáfrica	31°36'37'' S	18°43'40'' E	125	18,3	145	81	5
<i>Introducido- Visitas ocasionales de M. stellatarum</i>									
Biniamar	BI	Mallorca, España	39°25'48'' N	2°32'60'' E	58	16,6	608	100	5
Génova	GE	Mallorca, España	39°21'1'' N	2°23'25'' E	58	18,3	437	100	5

2.3 Procesamiento y análisis de la variación de los espectros de reflexión de la corola.

Entre 2012 y 2014, durante la primavera de cada continente, se seleccionaron de 43 a 100 individuos por población (Tabla 1). De cada individuo, se colectaron de 3 a 5 flores, las cuales fueron conservadas en un medio húmedo y fresco hasta su procesamiento en el laboratorio. Se midió la reflectancia en la región central del tubo corolino (Figura 1B) con un espectrofotómetro USB2000 y una fuente de luz estandarizada DH-2000 (Ocean Insights, Goethestr. 1918055 Rostock, Alemania), bajo condiciones definidas de brillo, distancia e inclinación (Chittka y

Kevan, 2005). Un estándar blanco (WS-1-SS, Ocean Optics Inc.) se utilizó para calibrar el equipo entre mediciones. Los datos fueron adquiridos mediante el programa SpectraSuite (Ocean Insights, Goethestr. 1918055 Rostock, Alemania).

El procesamiento y la visualización de los espectros de reflectancia se realizaron con el paquete *pavo* 2.2.0 (Maia *et al.* 2019) del programa R (R Core Team 2020). Los espectros fueron recortados en el rango de visión de los visitantes florales reportados para *N. glauca* (300 a 700 nm) utilizando la función *as.rspec*. Los espectros fueron suavizados y los valores de reflectancia negativos, que pueden ser introducidos por ruidos eléctricos del equipo, fueron removidos con la función *procspec* (span= 0,25). Los espectros fueron promediados por individuo y luego por población con la función *aggspec*. Los datos promediados por individuo se utilizaron para todos los análisis subsiguientes.

Dos enfoques complementarios fueron utilizados para evaluar la variación de color dentro y entre poblaciones, y entre diferentes contextos de polinización independientemente del sistema visual del receptor. En primer lugar, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP). Los valores de reflectancia de los espectros originales se estandarizaron con media igual a cero de modo que sólo se analizó la variación de la forma espectral (forma de la curva espectral) sin tener en cuenta el valor de brillo (altura del espectro; Cuthill *et al.* 1999). Los espectros estandarizados se agruparon en 20 categorías de 21 nm que fueron las variables analizadas en el ACP. La variación total en la coloración de las flores resumida por los dos primeros ejes del ACP se representó en un biplot (Cuthill *et al.* 1999). En segundo lugar, se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA) anidado a partir de los primeros dos ejes de componentes principales individuales (CP1 Y CP2) obtenidos en el ACP. Los niveles jerárquicos utilizados fueron: origen (esto es, nativo-introductor), contextos de polinización dentro de cada origen (esto es, polinización por picaflores, polinización por nectarínicos, con visitas ocasionales de *M. stellatarum*; Tabla 1), poblaciones dentro de los contextos e individuos dentro de las poblaciones. Las diferencias en este último nivel fueron utilizadas como el término del error (Sokal y Rohlf, 1993). Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico R (R Core Team 2020).

2.4 Percepción del color en el sistema visual de los visitantes florales

Se realizaron modelos de visión para determinar cómo los espectros de reflexión de la corola de las diferentes poblaciones serían percibidos y discriminados por el sistema visual de

los distintos grupos de polinizadores y visitantes ocasionales reportados para *N. glauca* (Ollerton *et al.* 2012; García *et al.* 2020). Se utilizó el modelo del receptor limitado por ruido (RNL por su sigla en inglés; Vorobyev y Osorio, 1998) para todos los visitantes florales. Este modelo supone que la discriminación del color, es decir, la capacidad de distinguir dos colores como diferentes, está dada por el mecanismo de pares oponentes de color en la retina y limitada por el ruido total del receptor (Vorobyev y Osorio, 1998; Henze *et al.* 2018; Olsson *et al.* 2018). Éste se genera por la suma del ruido de fotones ("cuántico") y el ruido del receptor interno ("neural"). Es un modelo fisiológico basado en estudios de comportamiento que permite predecir la capacidad de discriminar colores en animales, incluidos primates, abejas y aves (Stoddard *et al.* 2008; Martínez-Harms *et al.* 2009; Stevens *et al.* 2009). Además, se utilizó el modelo del hexágono de color (Chittka, 1992) para el sistema de visión del abejorro *X. ordinaria*. Este modelo se ha validado ampliamente a partir del comportamiento en Hymenopteros, por lo que resulta útil y confiable para determinar las distancias de color en este grupo (Chittka *et al.* 2014). En este caso, el modelo supone que la discriminación del color sólo está codificada por el mecanismo de oponencia de color en la retina (Dyer y Chittka, 2004).

Para determinar la estimulación de los fotorreceptores se calculó el número de fotones absorbidos (Q_i "captura cuántica") por cada tipo de fotorreceptor (i) presente en los sistemas visuales en estudio (ver más abajo), bajo un espectro de luz ambiental determinado en el rango de longitud de onda (λ) de 300 a 700 nm como:

$$Q_i = \int_{300}^{700} I(\lambda) S_i(\lambda) R(\lambda) d\lambda \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde $I(\lambda)$ es el espectro de iluminación ambiental, $S(\lambda)$ el espectro de reflectancia de la corola y $R(\lambda)$ es la sensibilidad de cada fotorreceptor (Wyszecki y Stiles, 1982). Luego, se calculó la captura de fotones de cada fotorreceptor según la reflectancia del fondo (Q_{Bi}):

A partir del cociente entre Q_i y Q_{Bi} se puede calcular la captura relativa de fotones del fotorreceptor:

$$q_i = \frac{Q_i}{Q_{Bi}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Este cálculo, denominado transformación de von Kries, se apoya en el hecho de que los fotorreceptores están fisiológicamente adaptados a la luz procedente del fondo (Chittka *et al.* 2014). De modo que si el entorno es rico en longitudes de onda en la región del espectro de luz del fondo, los fotorreceptores sensibles a esta región responderán menos (Gawryszewski, 2017).

Para cuantificar la estimulación de los fotorreceptores de los diferentes visitantes a la coloración de las flores de las diferentes poblaciones de *N. glauca* en base a las ecuaciones 1 y 2 mencionadas previamente empleamos la función *vismodel* del paquete 'pavo 2' (Maia *et al.* 2019) de R (R Core Team 2019). En todos los modelos (picaflor, nectarínido, esfíngido diurno y abejorro) se utilizaron valores de iluminación estándar de luz diurna (D65, Bergamo *et al.* 2016) y los espectros de reflexión de la corola procesados y suavizados, como fue explicado previamente. Se utilizaron valores de los picos de máxima sensibilidad de los receptores reportados para cada visitante floral (Figura 2, Tabla 3) y la captura cuántica del receptor "Qi" como $relative = F$ (Gawryszewski, 2017). En cuanto a los picaflores (familia Trochilidae), no existe un consenso en la bibliografía respecto a su sistema de visión. La evidencia molecular que sugiere que tendrían el tipo de cono sensible al V (Ödeen & Håstad 2010) parece estar en conflicto con los resultados fisiológicos que sugieren que el tipo de cono sensible al UV está presente en las especies *Archilochus colubris* (Chen y Goldsmith, 1986) y *Sephanoides sephaniodes* (Herrera *et al.* 2008). Este último es un estudio empírico basado en grabaciones de electroretinograma. Además, un estudio comportamental reciente demostró que el picaflor *Selasphorus platycercus* discrimina tanto objetos que reflejan la luz ultravioleta como también colores no espectrales adicionales que se perciben cuando los tipos de conos no adyacentes, sensibles a longitudes de onda separadas en el espectro de luz, se estimulan predominantemente en simultáneo (Stoddard *et al.* 2020). Al no existir un acuerdo sobre el modelo de visión para picaflores, en este trabajo utilizamos dos modelos diferentes: 1) picaflor sensible al UV, donde se utilizaron los picos de sensibilidad reportados por Herrera *et al.* (2008) para *Sephanoides sephaniodes* (Figura 3A), y 2) picaflor sensible al V, donde se utilizaron las curvas de sensibilidad espectral reportadas por Chen *et al.* (2020a) para un ave con visión sensible al violeta (Figura 3B). En el caso de los nectarínidos (familia Nectariniidae), que poseen un sistema visual sensible al UV (Ödeen & Håstad 2010), se utilizaron los picos de máxima sensibilidad de los receptores descritos para un ave con visión sensible al UV, ya que no hay estudios que determinen los picos de absorción máximos exactos para este grupo (Figura 3C; Heystek *et al.* 2014; Chen *et al.* 2020a). Para el esfíngido diurno *Macroglossum stellatarum*, utilizamos los valores descritos para cada tipo de cono (Figura 3D; Telles *et al.* 2016). En el caso del abejorro, como los picos de máxima sensibilidad no están medidos para la especie en estudio, se tomaron los valores reportados para *Xylocopa brasiliatorum*, una especie filogenéticamente cercana a *X. ordinaria* (Figura 3E; Telles *et al.* 2018). Con respecto al parámetro "bkg" (fondo) se utilizaron

los espectros de reflexión promediados de 10 hojas de *N. glauca*. Por último, se consideró la normalización de los cuantos de captura con respecto al fondo y se asumió la transformación de von Kries (vonkries=TRUE). Con la función *colspace* se modelaron los espacios visuales en un tetraedro para el modelo aviar (picaflor sensible al UV, picaflor sensible al V y nectarínido) y en un triángulo de Maxwell para *Macroglossum stellatarum* y *Xylocopa ordinaria*. Este último también fue modelado en el hexágono de color (Chitkka, 1992). En cada espacio visual, se representaron los loci de color de los individuos de todas las poblaciones.

2.5 Discriminación del color en el sistema visual de los visitantes florales

Se calcularon los contrastes cromáticos y acromáticos de la corola entre poblaciones del mismo y de diferentes contextos, con respecto al fondo (hojas de *N. glauca*), bajo el sistema visual de cada visitante floral utilizando el modelo RNL. El contraste cromático tiene en cuenta el tono del color (patrón de reflectancia espectral) y excluye la información del brillo (luminancia). En cambio, el contraste acromático se define como la diferencia de brillo entre flor y fondo y desestima el tono del color.

Los contrastes cromáticos y acromáticos se calcularon utilizando como unidad de medida la 'mínima diferencia perceptible' (JND por sus siglas en inglés). Valores de contrastes grandes indican que la flor es fácilmente distinguible del fondo verde bajo los supuestos del modelo seleccionado (Chen *et al.* 2020a; Papiorek *et al.* 2016). Para obtener las distancias de color promedio por pares de individuos de todas las poblaciones empleamos la función *coldist*. En este cálculo, se utilizaron los parámetros incorporados en cada modelo visual y se agregaron los valores de densidad relativa de los fotorreceptores sensibles a longitud de onda ultravioleta/violeta (UV/V), corta (C), media (M) y larga (L) según el sistema visual de cada visitante floral (Tabla 3). Se asumieron valores de especies filogenéticamente cercanas a las de nuestro estudio. Para las aves con visión UV (picaflor y nectarínido) se utilizaron valores reportados para *Leiostrix lutea* y para el picaflor sensible al V los valores reportados para *Columba livia* (Chen *et al.* 2020a). En el caso de *M. stellatarum*, se asumieron valores descritos para *Manduca sexta* y *Deilephila elpenor* (Telles *et al.* 2014) y para *X. ordinaria*, valores reportados para *Bombus terrestris* (Defrize *et al.* 2010). Se incorporó la fracción de Weber para cada tipo de contraste. Este parámetro considera al ruido del receptor y relaciona la diferencia de intensidad más pequeña que se puede detectar para un estímulo de intensidad determinado (Olsson *et al.* 2018). Para contraste cromático en aves se utilizó un valor de 0,1 reportados para

Leiosthix lutea (Chen *et al.* 2020a), para *M. stellatarum* un valor de 0,1 (Henze *et al.* 2018) y para *X. ordinaria* se consideró el valor de 0,12 reportado para *Apis mellifera* (Olsson *et al.* 2018). Para contrastes acromático se utilizó para el modelo de nectarínidos el valor 0,34 descrito para *Sturnus vulgaris* (Heystek *et al.* 2014), para los dos sistemas de visión de picaflor el valor de 0,25 reportado para *Columbia livia* (Olsson *et al.* 2018), para el esfingido se consideró el valor 0,05 descrito para el fotorreceptor de longitud de onda larga (Telles *et al.* 2016) y 1,5 en el modelo del abejorro reportado para *Bombus terrestris* (Osorio *et al.* 2015).

Se analizó si existían diferencias significativas entre todas las poblaciones (del mismo y de diferentes contextos de polinización) mediante un análisis de PERMANOVA utilizando la función *adonis* del paquete 'vegan'. Este enfoque no paramétrico utiliza distancias para calcular un estadístico pseudo-F, para lo que simula una distribución nula mediante la aleatorización de las distancias entre observaciones (Anderson, 2005). Se utilizó la función *bootcoldist* para calcular las distancias de color promedio entre las medias geométricas por pares de individuo a partir de un remuestreo (con reemplazo). Se obtuvo un valor de distancia media por cada par de poblaciones y un intervalo de confianza del 95% (límites de confianza superior e inferior). Si la media junto al intervalo de confianza (umbral de percepción) excede el umbral de discriminación teórico de JND para cada visitante floral -contraste cromático: 1 JND para aves (Chen *et al.* 2020a) y esfingido (Telles *et al.* 2016) y 2,3 JND para abejorro (Benitez-Vieyra *et al.* 2007); contraste acromático: 1 JND para aves (Chen *et al.* 2020a), 0,1 JND para esfingido (Henze *et al.* 2018) y 2,3 JND para abejorro (Benitez-Vieyra *et al.* 2007)-, se puede determinar que los colores son discriminables (Maia y White, 2018).

2.6 Percepción y discriminación de flores amarillas y rojas bajo el sistema de visión de picaflores y abejorros

Para determinar la percepción y discriminación de flores rojas y amarillas del rango nativo bajo el modelo de visión de picaflores y abejorros, en primer lugar, se realizó un ACP sólo con individuos de poblaciones nativas donde los espectros de reflectancia se agruparon en 20 categorías de 21 nm. La variación espectral de las flores se representó en un biplot resumido por los dos primeros ejes del ACP (Anexo I). Para determinar categorías de color de manera objetiva, se dividió el biplot en cuatro cuadrantes tomando como referencia la distribución de las 20 categorías de longitudes de onda en el ACP. El CP2 se dividió a partir del valor de 0,1: se consideraron flores rojas hacia valores positivos y flores amarillas hacia valores negativos,

mientras que el CP1 se dividió a partir del valor 0: individuos con flores que absorben UV hacia valores positivos e individuos con flores que reflejan UV hacia valores negativos. Con respecto a las flores amarillas que reflejan UV, se seleccionaron 9 individuos del cuadrante 3 (CU3; Anexo I) que presentaban valores de reflectancia $> 5\%$ para el rango de longitudes de onda UV (entre los 300-400 nm). Los individuos restantes de dicho cuadrante se consideraron flores amarillas que absorben UV (CU4; Anexo I). Es decir que, se consideraron cuatro categorías de color: rojas que absorben UV (RR), rojas que reflejan UV (RU), amarillas que absorben UV (AA) y amarillas que reflejan UV (AU).

Se representaron los loci de color bajo el modelo RNL para picaflores sensibles al V, picaflores sensibles al UV y abejorros. Se calcularon los contrastes cromáticos y acromáticos entre las categorías de color. Se analizó si existían diferencias significativas entre ellas a partir de un análisis de PERMANOVA. También se modeló el hexágono de color para el abejorro, y se calcularon distancias euclídeas para cada categoría de color floral (RR, RU, AA, AU) en relación al fondo de las hojas de *N. glauca* (centro del hexágono). Aquellas categorías con valores de distancia menores a 0,04 unidades en el hexágono se consideran indistinguibles del fondo, las que presentan distancias con valores entre 0,04 y 0,11 son poco distinguibles, mientras que aquellas con valores de distancia de a partir de 0,11 unidades de hexágono se discriminan fácilmente del fondo (Dyer *et al.* 2012).

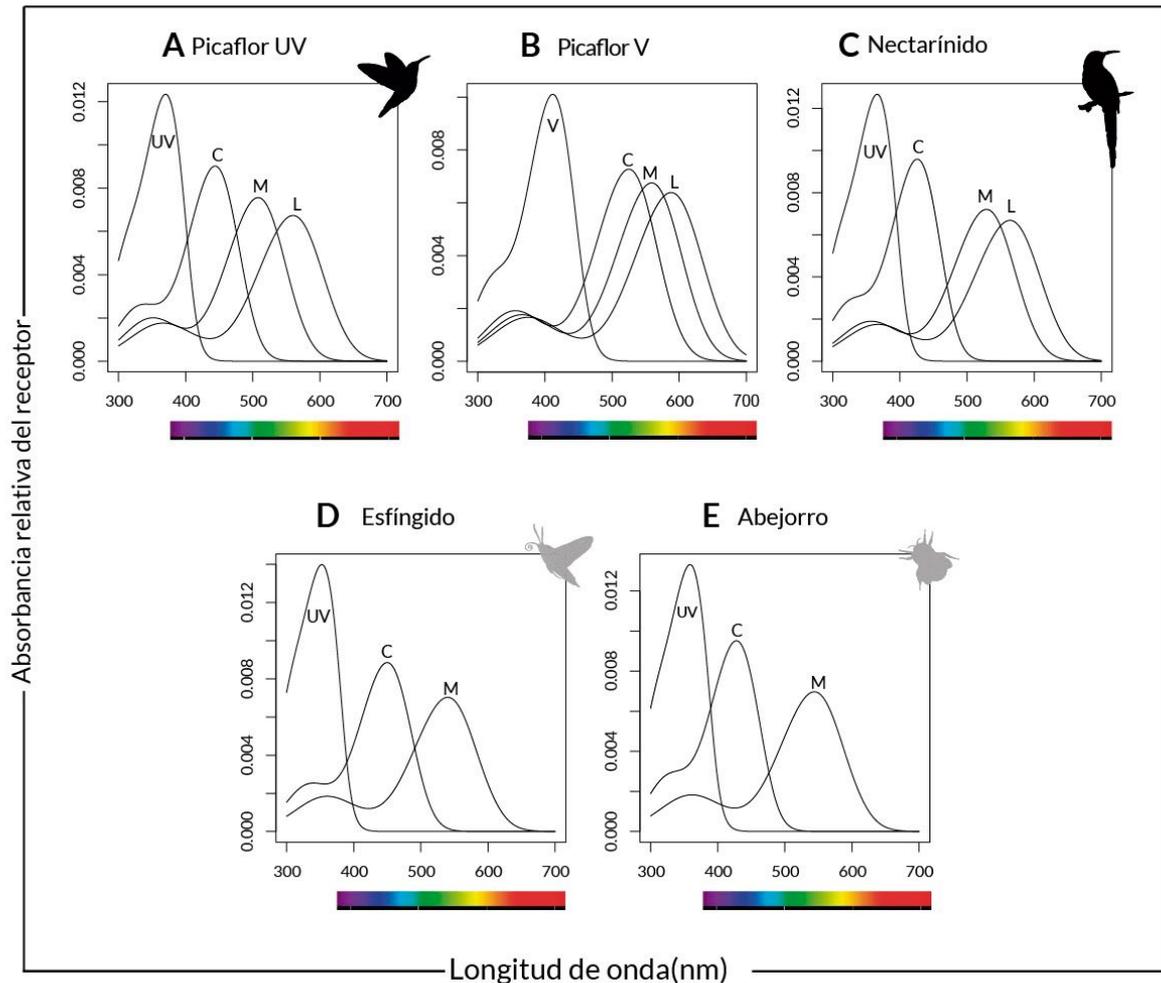


Figura 3. Picos de máxima sensibilidad de los fotorreceptores en los visitantes florales de *Nicotiana glauca*: picaflor sensible al UV (A), picaflor sensible al V (B), nectarínido (C), esfingido (D) y abejorro (E). Los picos de máxima sensibilidad para picaflor y nectarínido corresponden a longitudes de onda del ultravioleta (UV), corta (C), media (M) y larga (L). Mientras que para el picaflor sensible al V la longitud de onda más corta es la del violeta (V). Los picos de máxima sensibilidad de esfingido y abejorro corresponden a las longitudes de onda del ultravioleta (UV), corta (C) y media (M).

Tabla 3. Picos de máxima sensibilidad de los fotorreceptores de longitud de onda ultravioleta/violeta (UV/V), corta (C), media (M) y larga (L) y sus respectivas densidades para cada visitante floral: picaflor sensible al UV, picaflor sensible al V, nectarínido (Chen *et al.*

2020a y referencias allí citadas), esfingido diurno (Telles *et al.* 2014; Telles *et al.* 2016) y abejorro (Telles *et al.* 2018 y referencias allí citadas; Defrize *et al.* 2010).

<i>Visitantes florales</i>	<i>Picos de máxima sensibilidad de los fotorreceptores</i>				<i>Densidad de los fotorreceptores</i>			
	<i>UV/V</i>	<i>C</i>	<i>M</i>	<i>L</i>	<i>UV/V</i>	<i>C</i>	<i>M</i>	<i>L</i>
Picaflores sensible al UV	371	444	508	560	0,5	1	2	6
Nectarínidos	367	426	529	564	1	2	2	4
Picaflores sensible al V	412	559	525	588	1	1	1	2
Esfingido diurno (<i>Macroglossum stellatarum</i>)	349	440	521		1	1	7	
Abejorro (<i>Xylocopa sp.</i>)	360	428	544		1	0,417	4,412	

3. RESULTADOS

3.1 Variación objetiva del color floral

El análisis de los espectros de reflectancia mostró que todas las poblaciones estudiadas reflejaron en longitudes de onda similares, aproximadamente entre los 500 y 700 nm, que corresponden a colores verdes, amarillos y rojos (Figura 4). Sin embargo, las curvas reflejadas por las diferentes poblaciones no fueron homogéneas. Las poblaciones del rango nativo presentaron espectros de reflectancia muy diferentes entre ellas. Las poblaciones nativas EM y PP mostraron un incremento gradual en la reflectancia entre los 500 y 700 nm y alcanzaron valores máximos a los 700 nm, mientras que la población nativa TU mostró un pico de reflectancia a los 560 nm (Figura 4, panel izquierdo). Además, PP y EM mostraron mayor variación intrapoblacional en los valores de reflectancia a lo largo de las longitudes de onda medias y largas, mientras que la población de TU mostró una mayor variabilidad en la reflectancia a longitudes de onda corta (300-400 nm). Por su parte, las poblaciones dentro de cada contexto de polinización del rango invadido (i.e., polinización por nectarínidos en Sudáfrica y visitas ocasionales de *M. stellatarum* en España) mostraron curvas similares (Figura 4, panel

derecho). En ambos ambientes invadidos, las curvas de reflectancia mostraron una variación marcada entre las longitudes de onda corta y media en relación a las largas. Además, ambas poblaciones de España mostraron un doble pico: uno a los 550 nm y otro a los 615 nm. Se observaron flores que reflejan UV en una de las poblaciones introducidas de España (GE). Las poblaciones de España tuvieron una mayor variación intrapoblacional en la forma espectral que las poblaciones de Sudáfrica, principalmente a lo largo de las longitudes de onda medias y largas.

Los primeros dos componentes del ACP (CP1 y CP2) explicaron más del 96% de la variación total en la reflectancia de la corola (Figura 5). El CP1 se asoció con la variación en la proporción de reflectancia de longitudes de onda corta y media (300-500) en relación a las de onda larga (Anexo II). A lo largo de este componente se puede apreciar una separación de las poblaciones según su contexto de polinización. Con valores altos del CP1 los individuos de las poblaciones de origen nativo se ubicaron hacia la derecha del eje, mientras que los individuos de las poblaciones introducidas en España, con valores negativos de CP1, se ubicaron hacia la izquierda del eje (Figura 5). Por su parte, los individuos de las poblaciones introducidas en Sudáfrica presentaron valores intermedios, por lo que se ubicaron en el centro del CP1. La población nativa PP y la población introducida GE mostraron gran variación en la reflectancia de sus individuos a lo largo de este eje. Mientras que la distribución de los valores de reflectancia de las poblaciones sudafricanas se superpuso con la de las poblaciones nativas a lo largo del CP1, en el caso de las poblaciones de España, la superposición fue sólo parcial. El CP2 se asoció con la variación en las longitudes de onda corta y larga en relación con las longitudes de onda medias (Anexo II). Además, este CP describió un pico a los 510 nm, y un incremento entre las longitudes de onda medias y largas con un pico a los 700 nm. A lo largo del CP2 se separaron las poblaciones del rango nativo entre sí: la mayoría de los individuos de EM y muchos de los individuos de PP se ubicaron, con valores positivos, hacia arriba en el gráfico, mientras que los individuos de la población de TU, con valores negativos, se ubicaron en la parte inferior del eje (Figura 5). Además, las poblaciones nativas EM y PP mostraron gran variación a lo largo de este eje. Por su parte, los individuos de las poblaciones de ambos contextos invadidos presentaron valores intermedios para el CP2 (Figura 5).

Los ANOVAs anidados para los dos primeros componentes del ACP (CP1 y CP2) revelaron que todos los niveles considerados (entre orígenes, entre contextos de polinización y entre poblaciones dentro de los contextos) explicaron una proporción estadísticamente

significativa de la variación total en el color de las flores de *N. glauca* (Tabla 2). El contexto de polinización explicó el mayor porcentaje de variación en el CP1, mientras que la mayor variabilidad en el CP2 fue explicada por el nivel poblacional (Tabla 2).

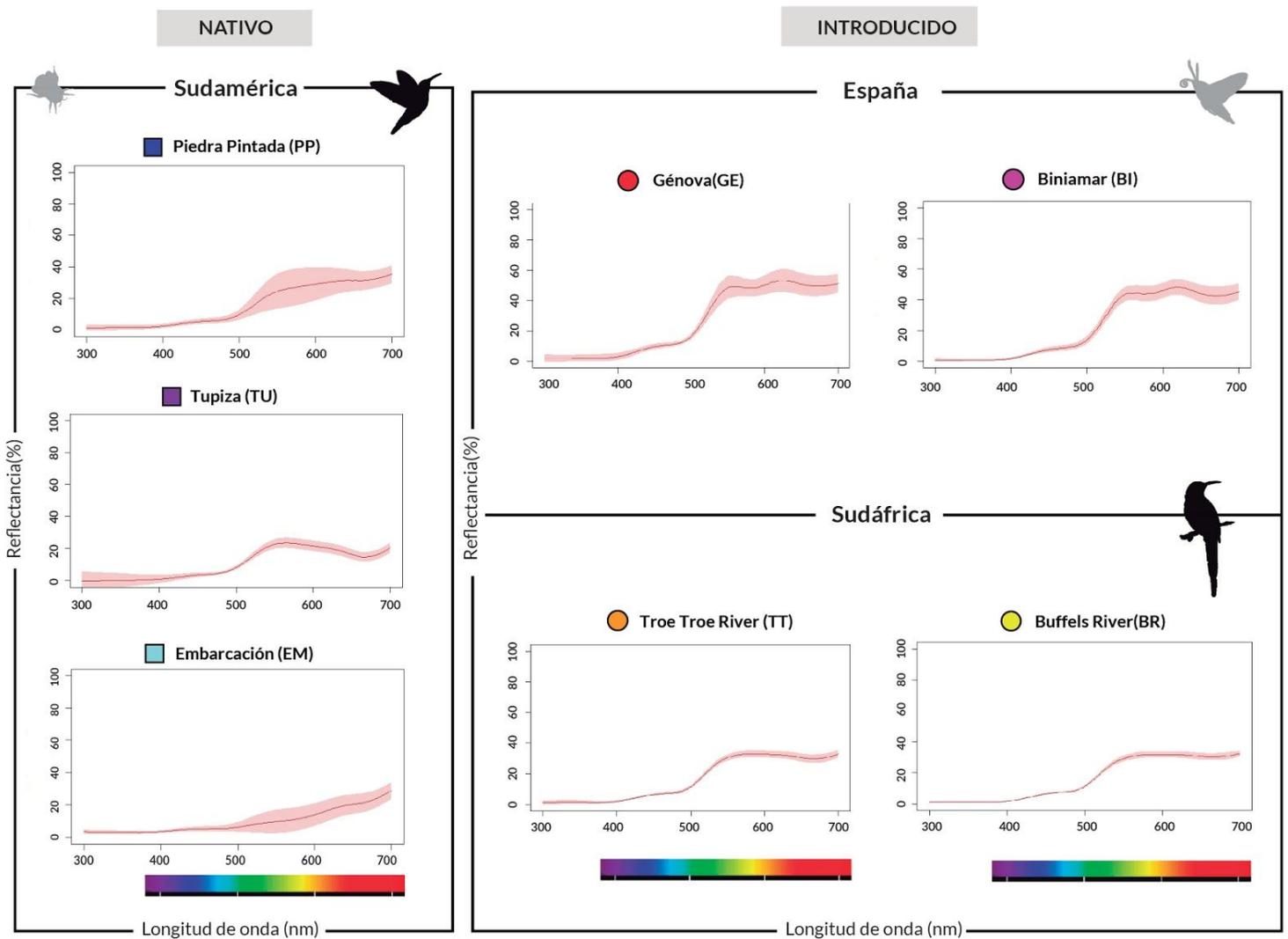


Figura 4. Reflectancia espectral de la corola en siete poblaciones de *N. glauca* del rango de distribución nativo (Sudamérica) e introducido (España y Sudáfrica) con distintos contextos de polinización. La línea roja representa el promedio poblacional y el sombreado rosa, el desvío estándar.

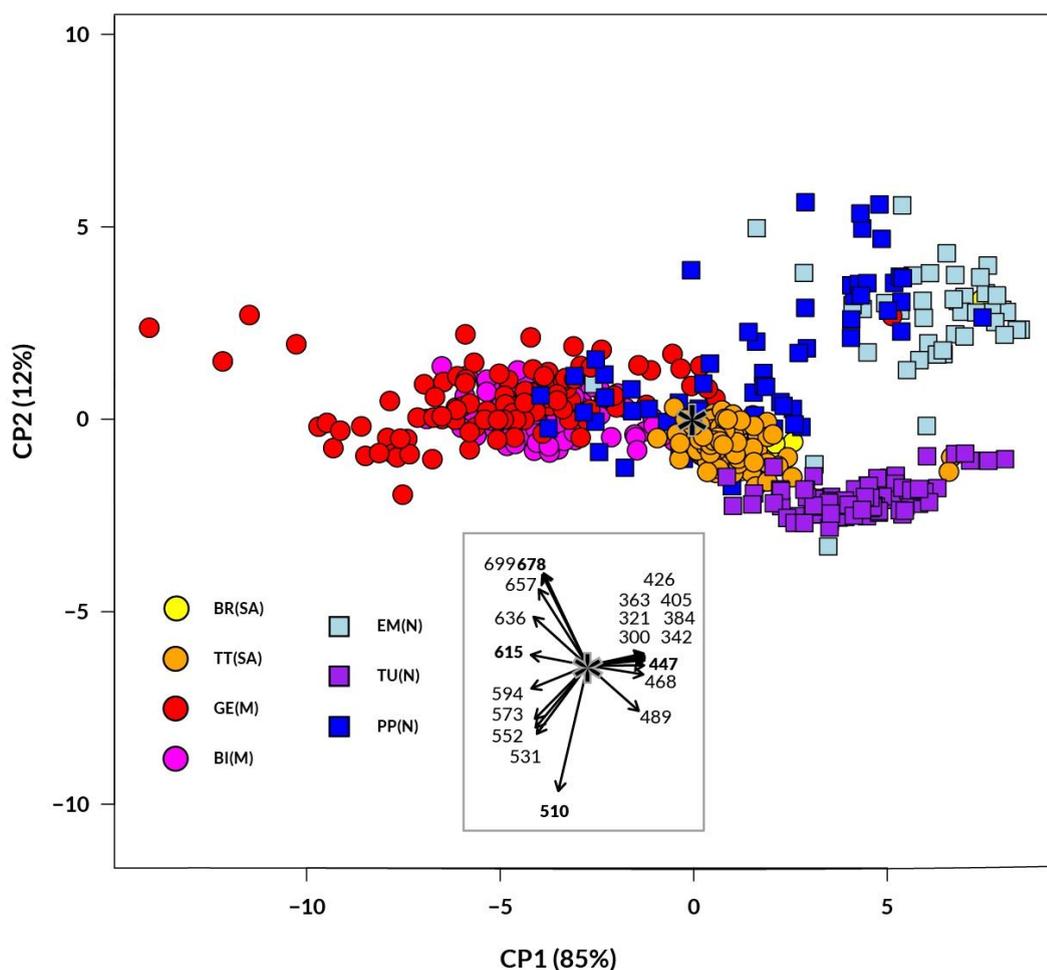


Figura 5. Variación en la reflectancia de la corola de *Nicotiana glauca* según un Análisis de Componentes Principales (ACP) de los datos espectrales de las flores de siete poblaciones. Se representan los dos primeros ejes del ACP. Cada punto corresponde al promedio por individuo. Las distintas poblaciones están identificadas con diferentes colores y la forma del punto representa el origen: circular = invadido; cuadrado = nativo. En un recuadro se muestran las flechas correspondientes a las variables originales (intervalos de longitud de onda de 21 nm) para facilitar la interpretación del ACP. El punto de intersección de las flechas se simboliza con un asterisco en el biplot.

Tabla 2. Partición de varianza (ANOVA anidado) para evaluar la diferenciación geográfica en los descriptores del color de las flores (CP1 y CP2) derivados del ACP en poblaciones nativas e introducidas de *Nicotiana glauca* con distintos contextos de polinización.

Fuente de variación	Componente de varianza (%)	<i>F</i>	<i>P</i>
CP1			
Origen	22,652	1246,555	<0,0001
Contexto (Origen)	52,035	683,964	<0,0001
Población (Contexto, Origen)	11,35	50,635	<0,0001
Individuos (Población, Contexto, Origen)	13,963		
Total	100		
CP2			
Origen	0	4,818	0,029
Contexto (Origen)	0	59,078	<0,0001
Población (Contexto, Origen)	69,569	203,389	<0,0001
Individuos (Población, Contexto, Origen)	30,431		
Total	100		

3.2 Percepción del color por los visitantes florales

Los modelos de visión de todos los visitantes florales reportados para *N. glauca*, excepto el del picaflor sensible al V, mostraron una distribución de loci de color que se extiende desde el eje de longitud de onda media-larga (M-L) hacia el vértice del fotorreceptor del longitud de onda ultravioleta (UV; Figura 4).

Los modelos de visión aviar con fotorreceptores para UV mostraron un patrón de distribución más disperso, mientras que en el modelo del picaflor con fotorreceptor para el violeta, los loci de color se encontraron más condensados y cercanos al centro (Figura 6A,B y C). Para picaflores sensibles al UV y nectarínidos los loci de color se agruparon desde la región UV - centro hacia el eje entre los fotorreceptores largo y medio (Figura 6A y C). En los tres modelos visuales de aves, los loci de color correspondientes a los individuos de las poblaciones nativas mostraron una mayor dispersión que los de las introducidas (Figura 6A-C). En el modelo del picaflor UV, algunos loci de color de las poblaciones EM y TU son los que se observaron más cercanos del vértice del fotorreceptor UV (Figura 6A). En el modelo visual del picaflor sensible al V, los loci de color de las poblaciones nativas mostraron una distribución compacta

cercana al centro con una tendencia hacia el eje del fotorreceptor verde (Figura 6B). En el modelo visual del nectarínido, los loci de las poblaciones sudafricanas BR y TT se agruparon cercanas al eje entre los fotorreceptores de onda larga y media (Figura 6C).

Con respecto al triángulo de Maxwell para el esfíngido *M. stellatarum* (Figura 6D) y para el abejorro *X. ordinaria* (Figura 6E), se observó una distribución clara de los loci de color a lo largo del eje entre los fotorreceptores UV y medio. Los loci de color de las poblaciones introducidas se mostraron más condensados cerca del fotorreceptor de longitud de onda media (verde), mientras que los de las poblaciones nativas se extendieron a lo largo del eje entre los fotorreceptores UV y medio. Por último, el modelo del hexágono de color para *X. ordinaria* (Figura 6F) muestra que algunos loci de color de las tres poblaciones nativas se ubicaron cercanos al centro, mientras que los loci de los demás individuos de poblaciones nativas e introducidas se ubicaron dentro del sector de tono verde.

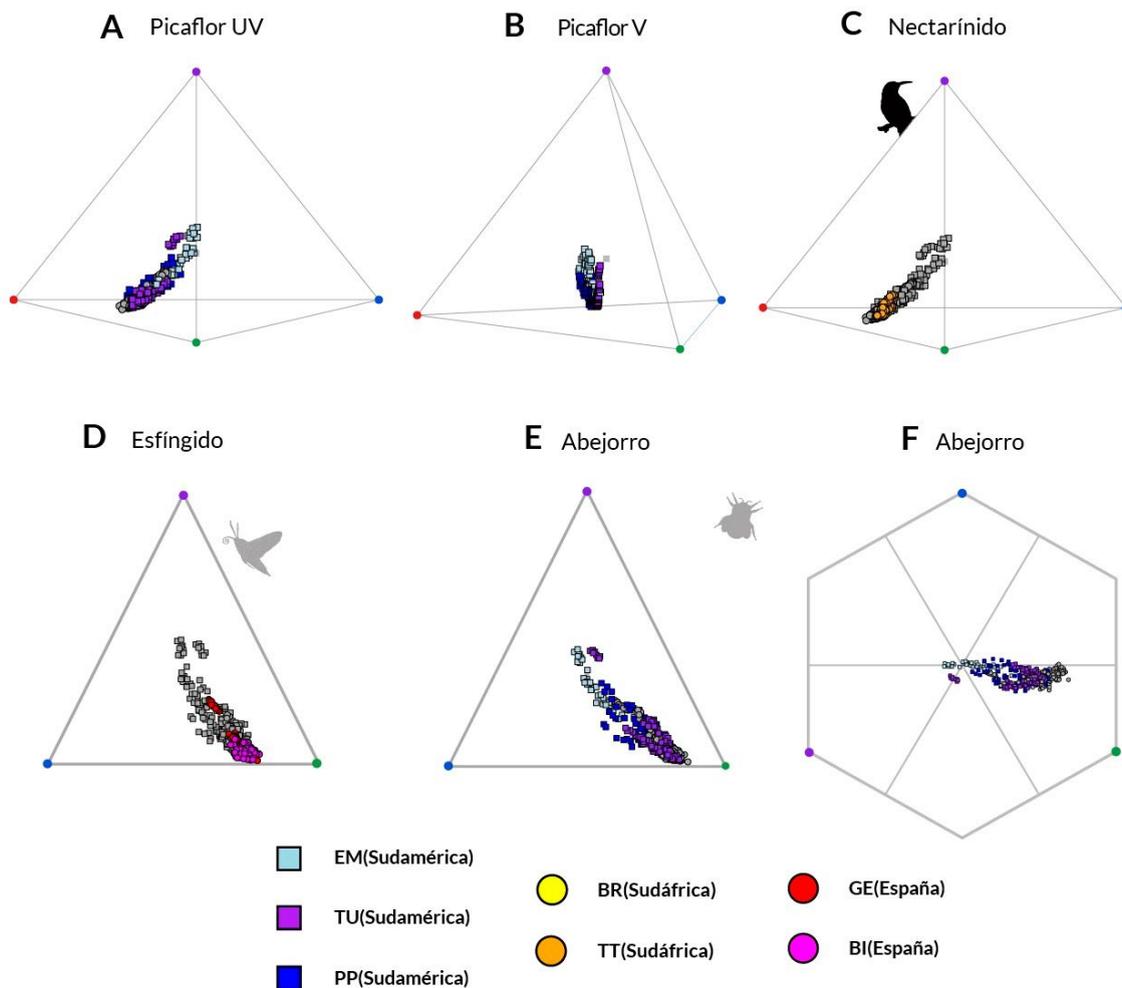


Figura 6. Loci de color de los individuos de todas las poblaciones estudiadas según los diferentes modelos de visión de los visitantes florales de *N. glauca*. Se representan los loci de color en: espacios tetraédricos para picaflores sensibles al UV (A), picaflores sensibles al V (B), y nectarínidos (C), triángulo de Maxwell para esfingidos (D) y para abejorros (E) y hexágono de color para abejorros (F) donde los vértices representan las señales máximas (captura cuántica) de los fotorreceptores UV (violeta), corta (azul), media (verde) y larga (rojo). En cada espacio visual, los loci de color diferente al gris corresponden al contexto de polinización de dicho visitante floral y los loci de color gris corresponden a otros contextos de polinización. El centro de cada modelo representa el color del fondo de las hojas de *N. glauca*.

3.3 Discriminación del color por los visitantes florales

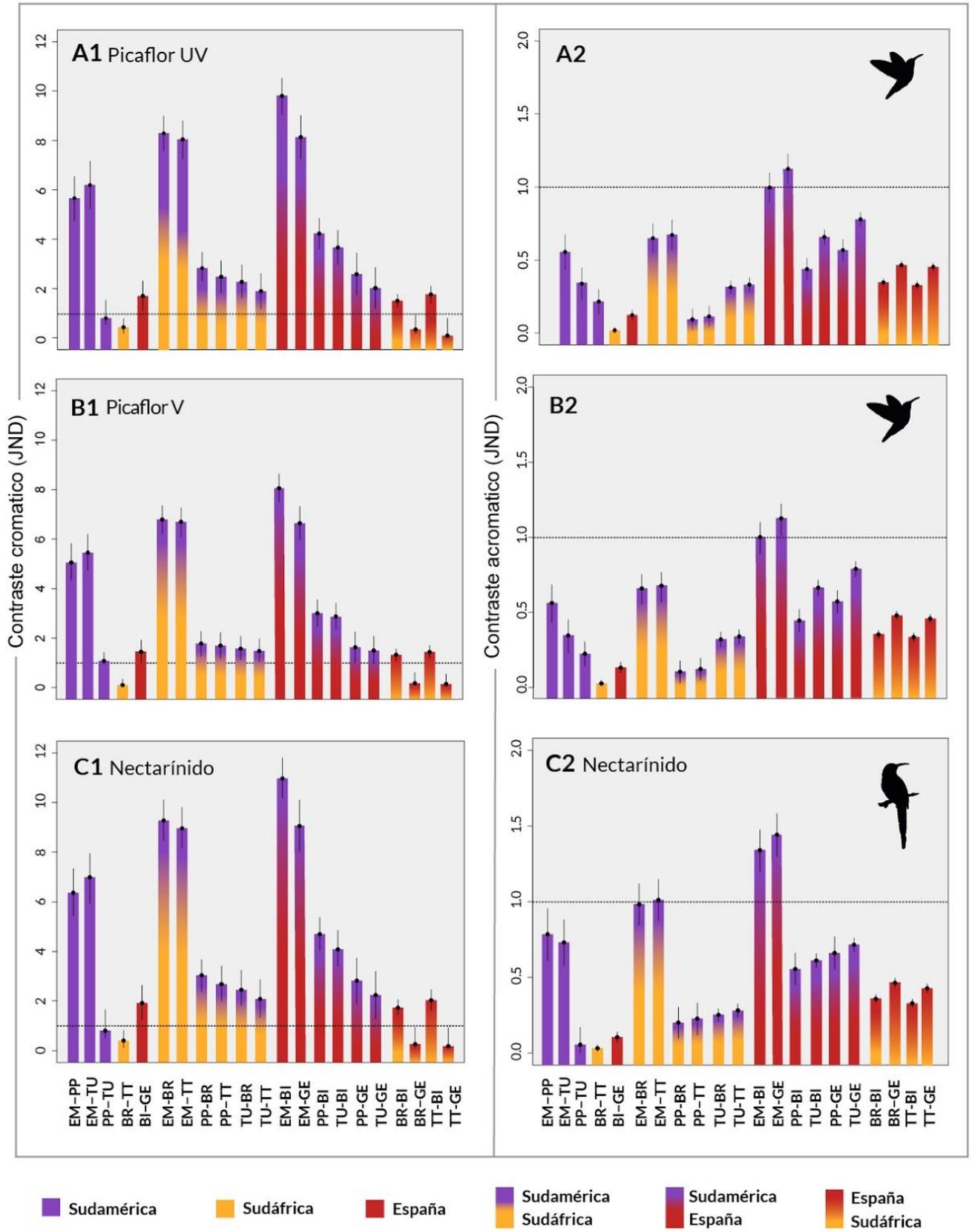
Los resultados de los contrastes cromáticos y acromáticos bajo el sistema de visión de aves, esfingido y abejorro revelaron una tendencia general similar (Figura 7). Los contrastes entre poblaciones del mismo contexto resultaron mayores dentro del rango nativo, excepto entre PP-TU, que dentro de ambas regiones invadidas. Por otra parte, la población sudamericana EM presentó los mayores valores de contraste con el resto de las poblaciones, tanto con las otras nativas como con las introducidas de Sudáfrica y de España. En general, las poblaciones de Sudáfrica y España mostraron mayores valores de contraste con las poblaciones nativas que entre ellas. Según los resultados del PERMANOVA, los loci de color serían discriminables de manera cromática y acromática entre pares de poblaciones ($P > 0,001$). Sin embargo, según el umbral teórico perceptivo determinado para cada visitante floral, algunas poblaciones serían discriminables entre sí pero otras no.

En el caso del contraste cromática de las flores dentro de cada contexto (Sudamérica, Sudáfrica y España), las aves (picaflor sensibles al UV, picaflor sensible al V y nectarínido) podrían discriminar entre las poblaciones de Sudamérica, excepto entre TU y PP, y entre las poblaciones de España (Figura 7A1, B1, C1). Por el contrario, las diferencias en el color floral entre las poblaciones de Sudáfrica serían imperceptibles para los tres grupos de aves. Entre contextos, la discriminación del color floral entre todas las poblaciones de Sudáfrica y Sudamérica y entre las de Sudamérica y España sería posible para las aves. En el caso de los contextos invadidos (Sudáfrica y España), sólo la población española BI sería distinguible de las sudfricanas BR y TT. Por otro lado, el contraste acromático de las flores para los modelos de visión aviar, sólo la población sudamericana EM y la española GE serían percibidas como

diferentes, y en el caso del nectarínido también discriminaría los colores entre las poblaciones EM y BI (Figura 7A2, B2, C2).

Bajo el modelo visual de *M. stellatarum*, el contraste cromática mostró los mismos resultados de discriminación entre el color floral contra el fondo que en los modelos de visión aviar (Figura 7D1). En cambio, el contraste acromático dentro de los contextos, el esfíngido diurno sólo podría discriminar las flores de las poblaciones de origen nativo (Figura 7D2). En relación a la discriminación entre contextos, percibiría como diferentes todas las poblaciones, excepto la población de Sudamérica PP de ambas poblaciones de Sudáfrica.

Para el modelo visual de *X. ordinaria*, dentro de cada contexto, sólo la población de origen nativo EM sería discriminada cromáticamente de las poblaciones PP Y TU (Figura 7E1). Entre poblaciones de contextos diferentes, podría discriminar la población sudamericana EM de ambas poblaciones sudafricanas, como también entre la población nativa EM y las poblaciones españolas. Además podría discriminar las flores de la población sudafricana BI de las poblaciones nativas PP y TU. En cuanto al contraste acromático, los colores florales entre todas las poblaciones en estudio resultaron indistinguibles para el abejorro (Figura 7E2).



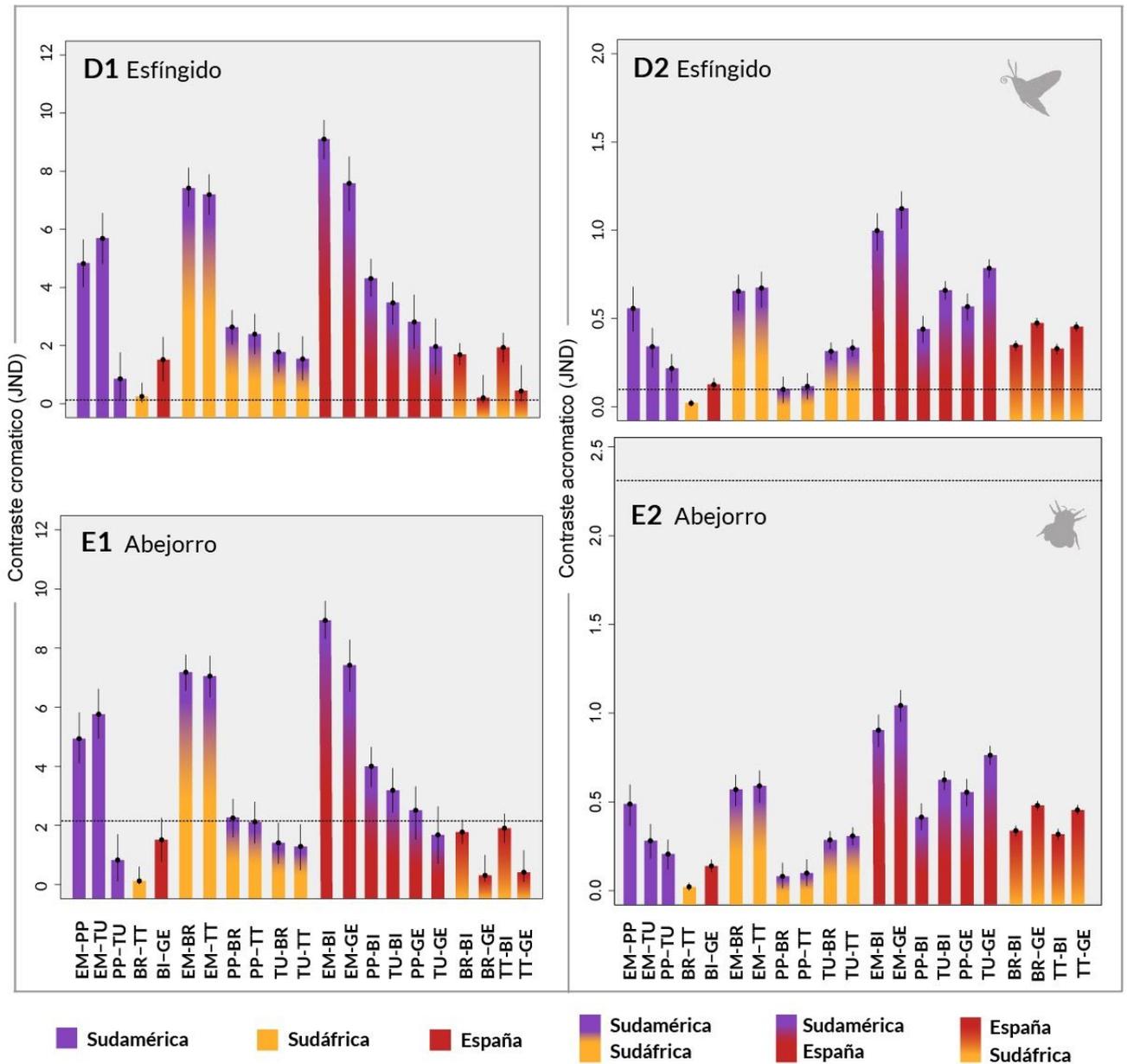


Figura 7. Contraste cromático (izquierda) y acromático (derecha) entre las flores de las siete poblaciones en estudio de *N. glauca* bajo el sistema de visión de: Picaflor sensible al UV (A1, A2), picaflor sensible al V (B1, B2), nectarínido (C1, C2), esfíngido (D1, D2) y abejorro (E1, E2). Cada barra representa el contraste entre un par de poblaciones (ver códigos de las poblaciones en Tabla 1). La altura de la barra representa el valor de contraste medio con sus

barras de error asociado. La línea punteada representa el umbral teórico perceptivo en unidad JND para cada visitante floral.

3.4 Percepción y discriminación del color de flores amarillas y rojas por picaflores y abejorros.

Los espacios visuales de picaflores sensibles al UV (Figura 8A) y abejorros (Figura 8C), bajo el modelo RNL, mostraron una distribución similar de los loci de color que se extiende desde el eje de longitud de onda media-larga (vértice verde y rojo) para picaflores y longitud de onda media (vértice verde) para abejorros hacia el vértice del fotorreceptor del longitud de onda ultravioleta (vértice violeta). Esta distribución se pudo observar para los loci de color rojo que reflejan UV, los cuales mostraron una amplia dispersión dentro de cada espacio de color, mientras que las flores amarillas que reflejan UV se agruparon cercanas al centro hacia la longitud de onda UV. Las flores rojas y amarillas que absorben UV se agruparon, cercanas entre ellas, hacia la longitud de onda media-larga en el espacio visual de picaflores sensible al UV y hacia el vértice de longitud de onda corto en el espacio visual de abejorros. Con respecto al modelo visual de picaflor sensible al V (Figura 8B), los loci de color mostraron una distribución restringida. Las flores amarillas y rojas que reflejan UV se agruparon cercanas al centro, mientras que las amarillas y rojas que absorben UV se agruparon hacia la longitud de onda media-larga. Dentro del hexágono de color para el espacio visual de abejorros (Figura 8D), los loci de color amarillos que reflejan UV se agruparon en el sector de percepción UV cercano al centro con un valor promedio de distancia euclidia de 0,09, mientras que las flores rojas que reflejan UV mostraron una distribución más dispersa desde el centro hacia el eje que divide el sector de percepción verde y verde-azul, presentando un valor promedio de distancia euclidia de 0,13. Con respecto a las flores amarillas y rojas que absorben UV, los loci de color se ubicaron cercanos y agrupados en el sector de percepción verde, con un valor promedio de distancia euclidia de 0,4 para ambas categorías.

Según los resultados del PERMANOVA, los contrastes cromáticos y acromáticos serían discriminables entre los pares de categorías de color consideradas ($P > 0,001$). Sin embargo, según el umbral teórico perceptivo determinado para cada visitante floral, algunas categorías resultarían distinguibles y otras no. En cuanto al contraste cromático entre los pares de colores bajo estudio, los valores de JND fueron similares para picaflores y abejorros. Bajo los tres modelos estudiados (picaflor sensible al UV y sensible al V, y abejorro) se podrían discriminar

los colores florales que reflejan UV de aquellos que lo absorben, pero bajo ninguno de ellos las flores rojas y amarillas que absorben UV podrían ser distinguidas entre sí (Figura 8E-G). Además, para el modelo visual de los abejorros, resultaron indistinguibles las flores rojas y amarillas que reflejan UV (Figura 8G). Con respecto a los contraste acromáticos, tanto para los dos modelos de picaflor como para el modelo visual de abejorros todas las categorías de color resultaron indistinguibles.

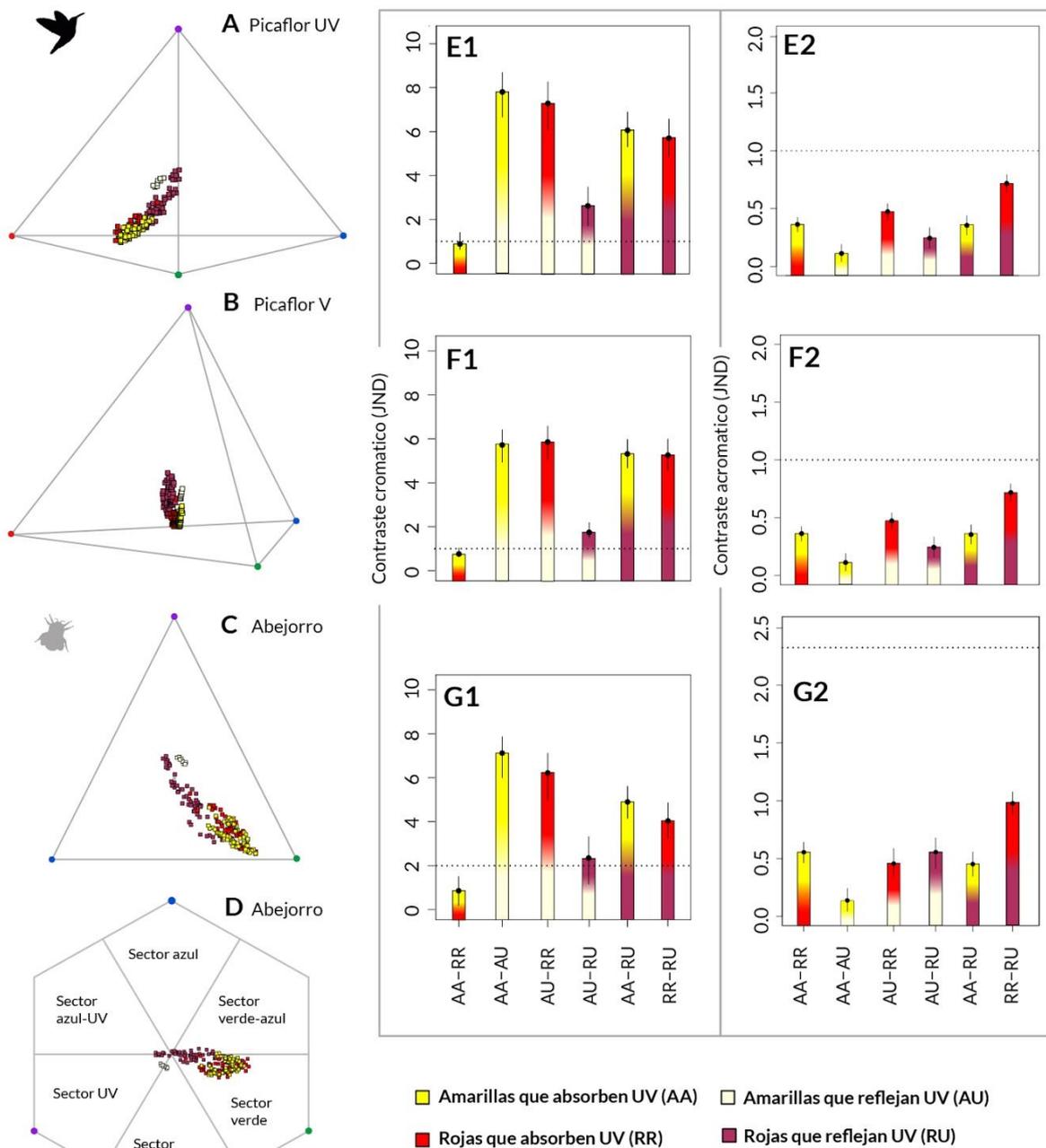


Figura 8. Percepción y discriminación de flores que absorben UV amarillas (AA), flores rojas que absorben UV (RR), rojas que reflejan UV (RU) y amarillas que reflejan UV (AU) en el sistema visual de picaflores sensibles al UV (A), picaflores sensibles al V (B), y abejorros (C y D). Los vértices con círculos de colores representan las señales máximas (captura cuántica) de los fotorreceptores de longitud de onda ultravioleta (violeta), corta (azul), media (verde) y larga (roja). El centro de cada modelo representa el color del fondo de las hojas de *N. glauca*. Los sectores descritos en el hexágono de color pertenecen a los tonos de color subjetivo que puede percibir el abejorro. Los contrastes cromáticos y acromáticos entre loci de color de flores AA, AU, RR Y RU se representan para el modelo visual RNL de picaflores sensible al UV (E1,E2), picaflores sensible al V (F1,F2) y abejorros (G1,G2). Cada barra representa el contraste entre un par de categorías de color. La altura de la barra representa el valor de contraste medio con sus barras de error asociado. La línea punteada representa el umbral teórico perceptivo en unidad JND para cada visitante floral.

4. DISCUSIÓN

Nicotiana glauca es una planta sudamericana que ha sido introducida en numerosas regiones semiáridas del mundo, donde se encuentra ampliamente distribuida y constituye una especie invasora (Ollerton *et al.* 2012). En cada área geográfica, nativa e invadida, sus flores son visitadas por diferentes grupos de polinizadores y visitantes florales locales (Nattero y Cocucci 2007; Geerts y Pauw 2009; Issaly *et al.* 2020). Teniendo en cuenta que distintos grupos de polinizadores poseen diferentes sistemas visuales, se podría esperar que éstos afecten el color de las flores de las plantas presentes en regiones geográficas con distintos ensambles de visitantes florales. Hasta el momento, la mayoría de los estudios de variación del color floral bajo la percepción de sus visitantes florales se realizaron a nivel intraespecífico e interespecífico en una comunidad (Niovi y Reithel 2001; Shrestha *et al.* 2013; Paine *et al.* 2019) o entre especies de plantas que habitan diferentes áreas geográficas (Ohashi, Makino y Arikawa 2015; Papiorek *et al.* 2016; Chen *et al.* 2020a). Por otra parte, la variación del color de las flores y su percepción por los diferentes polinizadores rara vez se ha estudiado en el contexto de las invasiones por plantas (pero ver Makino y Yokoyama, 2015). Por esta razón, analizar el color de las flores de *N. glauca* en su rango de distribución nativo y en distintas áreas invadidas, tanto de manera objetiva

como a través del sistema de visión de sus polinizadores y visitantes florales, resulta novedoso dentro de los estudios del color floral.

En esta Tesina, se planteó la hipótesis de que el color de las flores de *N. glauca* en poblaciones del rango de distribución nativo e invadido es producto de las diferentes presiones de selección de los polinizadores que las visitan en cada región geográfica. Para evaluar esto, en primer lugar, nos preguntamos si existían diferencias objetivas en la coloración floral de la especie entre áreas con distintos contextos de polinización (*i.e.* polinización por picaflores, polinización por nectarínidos y visitas ocasionales del esfíngido diurno *M.stellatarum*). Luego, nos preguntamos si esas diferencias eran percibidas y discriminadas como tales por los distintos visitantes florales. Dado que los abejorros de la especie *Xylocopa ordinaria* actúan como ladrones de néctar de *N. glauca* en el rango nativo, este grupo también fue incluido como visitante floral. Por otro lado, de manera anexa a la hipótesis central del trabajo, indagamos si las flores rojas y amarillas que absorben y reflejan UV en el rango nativo son discriminadas por abejorros y picaflores. Éste representa un primer paso para evaluar si el color rojo en las flores de *N. glauca* respondería más a evitar el robo de néctar por abejorros que la atracción de los picaflores. Estos dos aspectos son discutidos en distintos apartados.

4.1 Variación en el color de las flores de *N. glauca* y su percepción por los visitantes florales en el rango nativo y en áreas invadidas

Los resultados de esta Tesina indican que existen variaciones en los espectros de reflexión entre las flores del rango nativo y las distintas áreas invadidas por *N. glauca*, lo que concuerda con nuestra primera predicción. Dichas variaciones entre contextos de polinización se dieron principalmente por una diferencia marcada en la curva de reflectancia a partir de los valores de longitud de onda media y larga (550 a 700 nm), que representan colores verde-amarillo, anaranjado y rojo para el ojo humano, y por la absorbancia y/o reflectancia en la longitud del UV (300-400nm). Las longitudes de onda que reflejan las flores de *N. glauca* podría estar dada por la presencia de varios pigmentos que coexisten en la misma flor: clorofila, pigmento que refleja en longitud de onda de los 550 nm y se conserva en ancestros del género *Nicotiana* (Mc Carthy *et al.* 2015), también carotenoides como luteína y β -caroteno que reflejan en longitud de onda a partir de 600 nm (Grotewold 2006, Zhu *et al.* 2007) y, como revela el

estudio de Ng y Smith (2016), antocianinas, específicamente cianidinas y delfinidinas que, en combinación con carotenoides, podrían generar el color rojo en las flores de nuestra especie de estudio contribuyendo a la reflectancia en longitudes de onda entre los 650 y 700 nm.

En el rango nativo, encontramos gran variabilidad en la reflectancia de longitudes de onda larga (650-700 nm), que representa el color rojo para el ojo humano, tanto entre como dentro de algunas poblaciones. Esto era esperable considerando que dos de las tres poblaciones nativas estudiadas (EM y PP) presentan polimorfismo de color, con individuos que tienen flores amarillas, rojas o anaranjadas. Además, parte de las flores en el rango nativo reflejaron UV, algo que resulta interesante si se tiene en cuenta la discusión y la falta de consenso hasta la fecha acerca del modelo de visión de los picaflores (*i.e.* si son sensibles al V o al UV; Chen *et al.* 2020a). Lo hallado en esta Tesina podría apoyar la idea de que los picaflores, únicos polinizadores de *N. glauca* en el rango nativo y con quienes esta especie ha evolucionado, tienen la capacidad de percibir las señales UV, algo que ha sido demostrado empíricamente en un trabajo reciente (Stoddard *et al.* 2020). Sin embargo, la reflectancia de UV en las flores del rango nativo también podría estar asociada al modelo visual de los abejorros que roban néctar en esta especie (ver apartado siguiente).

A pesar de que en las poblaciones introducidas todas las flores fueron amarillas para el ojo humano, la forma de los espectros de reflexión de las poblaciones de Mallorca y Sudáfrica fueron diferentes (Figura 4). La variación objetiva del color de las flores en las poblaciones sudafricanas cayó dentro del rango de variación de las poblaciones muestreadas en el rango nativo, lo que sugiere que el fenotipo de color floral introducido en Sudáfrica podría provenir de alguna de estas poblaciones nativas. Por otra parte, las principales diferencias en el color floral se dieron entre el contexto nativo y el contexto invadido de España. La forma espectral en esta última área, diferente a las de Sudamérica y Sudáfrica, sugiere que en este contexto invadido el fenotipo de color floral sería novedoso respecto a aquellos presentes en el rango nativo. Resulta poco probable que las visitas ocasionales del esfíngido diurno *M. stellatarum* ejerzan una fuerza selectiva que favorezca el patrón espectral novedoso encontrado en Mallorca, ya que el porcentaje de polinización cruzada reportado para estas poblaciones es extremadamente bajo y las plantas se reproducen casi exclusivamente por autogamia (Issaly *et al.* 2020). Una explicación alternativa para los patrones de reflectancia observados en España es que dichas poblaciones deriven de una población nativa fuera de nuestra área de estudio que posea plantas

con flores con esa coloración. Un estudio genético en curso en nuestro grupo de trabajo (Issaly, Sércic y Paiaro, en ejecución), donde se evalúa la genealogía de las poblaciones bajo estudio y otras poblaciones en el rango nativo e invadido, será muy revelador porque permitirá conocer posibles fuentes y rutas de invasión de *N. glauca*.

Las diferencias objetivas en la coloración de las flores observadas entre los diferentes contextos de polinización serían percibidas como tales por los visitantes florales de la especie. En todos los modelos visuales estudiados, se observó una gran dispersión de los loci de color de las flores del rango nativo que coincide con la variación objetiva del color en estas poblaciones. Por su parte, la variación de color de las flores en ambas regiones invadidas (España y Sudáfrica) mostró una dispersión restringida y se superpuso con la del rango nativo bajo todos los modelos visuales estudiados. A pesar de que esta superposición sugiere que los visitantes no distinguirían las flores del rango nativo de las de las áreas invadidas, los análisis de contraste cromático mostraron que éstas sí serían discriminadas, mientras que las diferencias de color entre ambas regiones invadidas sólo serían percibidas en algunos casos. A partir de estos análisis, se puede inferir que algunas de las poblaciones que solo presentan flores amarillas indistinguibles para el ojo humano serían discriminadas por ambos grupos de aves polinizadoras, picaflores y nectarínidos, y por el visitante floral *M. stellatarum*. Esto nos permite resaltar y reafirmar que la capacidad de percepción y discriminación de los diferentes grupos de visitantes florales de *N. glauca* es diferente y más amplia de la que puede percibir el ojo humano (Chittka y Thomson, 2011).

A diferencia de lo esperado, todos los visitantes florales percibieron de manera similar la variación del color de las flores de *N. glauca* en el rango estudiado. Esto podría deberse a que sus sistemas visuales no resultan tan diferentes entre sí. En este sentido, por ejemplo, se ha observado que picaflores y nectarínidos, a pesar de que sólo están emparentados lejanamente (Hackett et al. 2008) y están geográficamente aislados, poseen una convergencia en varios rasgos morfológicos y ecológicos (Stiles 1981, Fleming y Muchhala 2008). En cuanto al procesamiento de señales visuales, ambos grupos de aves sensibles al UV tienen un sistema tetracromático con similares picos de máxima sensibilidad de los fotorreceptores. La presencia del cuarto receptor sensible a longitud de onda larga les permite responder a señales cromáticas que se extienden más allá de los 500 nm, las cuales están presentes en los espectros de color de las flores de algunas de las poblaciones estudiadas, al igual que en muchas otras especies ornitófilas (Herrera

et al. 2008; Stoddard *et al.* 2008; Shrestha *et al.* 2013). Por su parte, pese a que el sistema de visión de los esfíngidos carece del fotorreceptor de longitud de onda larga (L), *M. stellatarum* podría utilizar el contraste acromático para diferenciar flores que reflejan dichas longitudes de onda (Kelber y Henique, 1999). Aunque los abejorros también perciben de manera acromática las señales de color fuera de su rango de visión (Martine-Harms *et al.* 2009), nuestros resultados indican que el contraste acromático no intervendría en su discriminación del color floral entre poblaciones de *N. glauca*. La discriminación cromática de muchas de las poblaciones de estudio encontrada para los tres modelos visuales de aves, el de esfíngidos y el de abejorros podría deberse a la presencia de un pico de reflectancia entre los 500-550 nm en las flores de algunas poblaciones, longitud de onda que coincide con el máximo de sensibilidad para el fotorreceptor de longitud media en todos los grupos de visitantes florales estudiados (Tabla 3).

La similar percepción y discriminación de los colores florales encontrada bajo el modelo de visión de picaflores sensibles al UV, nectarínidos, esfíngidos diurnos y abejorros sugiere que la variación de color percibida por polinizadores efectivos (esto es, picaflores y nectarínidos) no sería significativamente menor que la variación percibida por visitantes que no juegan ningún papel en la polinización (esto es, esfíngidos y abejorros), a diferencia de lo sugerido por Paine *et al.* (2019). Sin embargo, nuestros resultados respecto al modelo de visión del picaflor sensible al V parecerían apoyar lo reportado por este estudio, ya que la percepción de la variación en poblaciones nativas por el picaflor con este modelo de visión es menor que la percibida por el abejorro *X. ordinaria*.

En cuanto a las diferencias inter-poblacionales dentro de cada contexto de polinización, y teniendo en cuenta sólo aquellos visitantes presentes dentro de cada contexto, los resultados indican que, excepto las poblaciones de Sudáfrica que son indistinguibles para los nectarínidos, todos los visitantes florales podrían detectar variaciones de color floral (al menos las cromáticas) entre las poblaciones muestreadas en el contexto geográfico donde están presentes. En el caso de los picaflores, tanto los sensibles al UV como al V, y los abejorros, la discriminación de las poblaciones en el contexto nativo se debe a las grandes diferencias que éstas presentan en el color de la corola. Si bien las poblaciones nativas estudiadas difieren en los ensambles de picaflores que las visitan (García *et al.* 2020), y no existe un consenso sobre el sistema visual de este grupo de aves (Ödeen y Håstad, 2003; Herrera *et al.* 2008), nuestros resultados muestran que picaflores con distintos sistema de visión discriminan de forma similar las flores de *N.*

glauca. Por esta razón, no sería esperable que los diferentes ensamblajes promuevan distintos colores de la corola hallados en las poblaciones nativas. Por otra parte, de acuerdo a los resultados de la presente Tesina, la presencia diferencial de abejorros en las poblaciones nativas tampoco promovería las diferencias de coloración floral encontradas entre ellas (ver apartado siguiente).

Alternativamente, la variación inter-poblacional en el color floral observada en el rango nativo podría haber evolucionado de manera neutral (a través de deriva), o por efecto pleiotrópico (Smith, 2015), es decir mediante la selección indirecta de caracteres correlacionados. El color floral es a menudo pleiotrópico (Schoen *et al.* 1984; Rausher 2008), y puede covariar con otros rasgos florales, como el tamaño y la forma de la corola. En este sentido, en un estudio reciente en *N. glauca*, se encontró un ajuste entre la longitud del tubo corolino y la longitud del pico de los picaflores presentes en cada una de las poblaciones nativas, y además, se demostró que este rasgo floral y la forma de las flores se encuentran bajo selección mediada por los polinizadores locales (García *et al.* 2020). Por otro lado, teniendo en cuenta que las aves eligen el color floral principalmente por su asociación con las recompensas (Stiles, 1976; Kaczorowski *et al.* 2014), el color de la corola en *N. glauca* podría ser seleccionado de manera correlacionada con las características del néctar. Finalmente, la variación en el color de las flores encontrada entre los sitios nativos podría estar dada por una respuesta plástica o adaptativa a factores abióticos como la temperatura, la sequía o el tipo de suelo (Schemske y Bierzychudek, 2001; Koski y Galloway, 2020; Johnson *et al.* 2020). Por su parte, las flores de las poblaciones sudafricanas resultaron indistinguibles para los nectarínicos, al igual que para el resto de los polinizadores y visitantes florales estudiados, lo que claramente se explica por la similitud de coloración entre estas dos poblaciones. Esta similitud puede estar dada, en parte, por un posible flujo génico mediado por las especies de nectarínicos compartidas entre ambas poblaciones (García *et al.* 2020). El transporte de polen entre las poblaciones de *N. glauca* presentes en zonas áridas como las de Sudáfrica (Tabla 1) puede ser especialmente importante, ya que sus flores están presentes en un momento del año en el que escasean otros recursos florales (Kaczorowski *et al.* 2014). Por último, pese a que las curvas de reflectancia de las dos poblaciones estudiadas de Mallorca parecen prácticamente idénticas, el hecho de que *M. stellatarum* pudiera distinguirlas por el color de sus flores podría deberse a que sólo en una de ellas (GE) algunas

flores reflejaron UV, longitud de onda a la cual esta especie es sensible (Telles *et al.* 2014; Telles *et al.* 2016).

Por último, encontramos que la variación intra-poblacional en el color de las flores, tanto objetiva como desde la perspectiva de los diferentes visitantes florales, fue menor dentro de los contextos invadidos que dentro del ambiente nativo. Este resultado concuerda con lo hallado para otros rasgos florales de *N. glauca*, como la longitud y la forma de la corola (García *et al.* 2020), y podría deberse a que las plantas de los ambientes invadidos hayan sufrido posibles cuellos de botella, pérdida aleatoria y fijación de alelos en sus pequeñas poblaciones fundadoras (Shueller, 2007). Además, la reproducción exclusivamente autógena de las poblaciones de España (Issaly *et al.* 2020) también podría conducir a una reducción de la variación fenotípica en la coloración floral. Los análisis genéticos en curso (Issaly, Sérsic y Paiaro, en ejecución) permitirán evaluar si las poblaciones introducidas tienen una variación genética menor que las nativas, lo cual se esperaría tanto por efecto de la deriva génica como de la selección, pero no si se han producido múltiples introducciones en estos sitios.

4.2 Percepción y discriminación de las flores de color rojo y amarillo de poblaciones nativas según el sistema de visión de abejorros y picaflores

La mayoría de las flores ornitófilas exhiben colores de longitud de onda más larga, especialmente el color rojo (Scogin 1988; Cronk y Ojeda 2008). Las aves tienen su mayor sensibilidad espectral y discriminación de tonos en estas longitudes de onda más largas (Stiles, 1976; Stiles, 1981; Shrestha *et al.* 2013), lo que sugiere que las flores ornitófilas pueden haber desarrollado estos colores como respuesta a la selección ejercida por el sistema visual de sus aves polinizadoras. Pruebas de preferencia han demostrado que los picaflores no tienen una preferencia innata por las flores de color rojo (Lunau *et al.* 2011). Sin embargo, un estudio reciente sobre comportamiento con picaflores entrenados demostró que pueden distinguir fácilmente entre flores rojas que reflejan UV de las que absorben UV (Stoddard *et al.* 2020). Por el contrario, los himenópteros no tienen fotorreceptores de longitud de onda larga, lo que los hace relativamente débiles en el procesamiento cromático de señales visuales rojas (Chittka y Wells, 2004). Además, en un trabajo reciente se observó que en comparación con otros colores florales, las flores rojas son muy llamativas para las aves y mucho menos llamativas para las

abejas (Chen *et al.* 2020a). Finalmente, para la especie en estudio, se observó que abejorros de la especie *Xylocopa ordinaria* roban néctar con mayor frecuencia en flores amarillas que en flores rojas en el rango nativo (A.A. Cocucci, *com. pers.*). Por estas razones, en esta Tesina se postuló que el color rojo en las flores *N. glauca* es más probable que haya evolucionado para evitar a los abejorros robadores de néctar que para la atracción de los picaflores.

Los resultados de esta Tesina muestran que las flores rojas y amarillas que reflejan y absorben UV son discriminadas tanto por picaflores como por abejorros, debido a la presencia en ambos grupos de un receptor de longitud de onda ultravioleta que les permite discriminar colores que absorben y reflejan UV (Peitsch *et al.* 1992; Odeen & Hastad 2003). En picaflores, la discriminación de las flores que absorben UV de las que lo reflejan concuerda con los hallazgos del estudio comportamental realizado por Stoddard *et al.* (2020), donde se demostró que los picaflores son capaces de distinguir una amplia gama de combinaciones de colores incluyendo la región ultravioleta. En cuanto al modelo de los picaflores sensible al V, la conspicuidad cromática y discriminación sería menor ya que carecen del fotoreceptor sensible al ultravioleta.

En cuanto a los abejorros, según las distancias euclídeas calculadas en el hexágono de color, las flores rojas y amarillas que reflejan UV serían menos distinguibles que las flores rojas y amarillas que absorben UV. En este sentido, más que las longitudes de onda larga que aportan el color rojo sería la reflectancia de UV en las flores de *N. glauca* lo que las haría menos distinguibles del fondo de las hojas para los abejorros que actúan como ladrones de néctar. Esto se contrapone con lo hallado en trabajos previos a nivel interespecífico, donde se demostró que las flores rojas son más atractivas para las abejas y abejorros si reflejan la luz UV, y por el contrario, resultan poco distinguibles las flores rojas que absorben UV (Lunau *et al.* 2011; Coimbra *et al.* 2020; Chen *et al.* 2020b). Por otro lado, nuestro hallazgo de que las flores amarillas que absorben y reflejan en el UV serían discriminadas como diferentes se contrapone con lo encontrado en otros estudios donde se observó que las abejas no distinguen entre flores amarillas que absorben y reflejan UV (Coimbra *et al.* 2020) ni flores amarillas con diferentes reflectancias de UV (Papiorek *et al.* 2016). Finalmente, las flores de color rojo que reflejan UV respecto de las flores amarillas que absorben UV sean menos distinguibles a los ojos de *X.ordinaria* podría explicar la mayor tasa de visitas de los abejorros en las flores amarillas de *N. glauca* (A.A. Cocucci, *com. pers.*).

Contrariamente a lo esperado, ni los abejorros ni los picaflones (bajo ninguno de los dos modelos de visión considerados) distinguirían cromáticamente las flores rojas y amarillas que absorben UV, y los abejorros tampoco discriminarían las flores rojas y amarillas que reflejan UV. Estos resultados difieren de lo hallado en un estudio interespecífico donde las flores de color rojo al ojo humano tuvieron un gran contraste cromático con las flores de color amarillo bajo el modelo de visión de las abejas, pero no bajo el modelo de visión de las aves, ni sensibles al UV ni al V (Chen *et al.* 2020a). Nuestros hallazgos sugieren que la coloración roja de la corola de *N. glauca* no evitaría la detección de las flores por parte del abejorro *X. ordinaria*, en contraposición a lo hallado en estudios recientes a nivel interespecífico (Bergamo *et al.* 2019; Chen *et al.* 2020a; Coimbra *et al.* 2020).

Estudios complementarios a los realizados en esta Tesina permitirán profundizar nuestro conocimiento acerca de la variación cromática en las poblaciones nativas bajo los modelos visuales de sus polinizadores y ladrones de néctar, así como de la influencia del color floral sobre las visitas de unos y otros. Es posible que la gran variabilidad encontrada entre las flores rojas que reflejan UV se deba a que esta categoría incluya un degradé de color que va del rojo al anaranjado para el ojo humano. Por esta razón, en primer lugar, se podrían realizar análisis similares a los de este trabajo que utilicen categorías diferentes para clasificar los colores florales. Actualmente, existen métodos para la asignación de las categorías de color como el algoritmo de aprendizaje no supervisado (unsupervised learning algorithm). Mientras que la clasificación objetiva aquí utilizada es una clasificación *a priori*, la segunda no es sesgada ya que intenta identificar agrupaciones sin ningún tipo de información mediante la combinación de datos de reflectancia con procedimientos estadísticos del campo del reconocimiento de patrones (Papiorek *et al.* 2016 y referencias allí citadas). Además, se podrían realizar estudios a campo que relacionen las visitas de picaflones y abejorros con el color de las flores visitadas por estos dos grupos para poner a prueba las hipótesis aquí planteadas.

Alternativamente, la variación del color floral que es detectable por los polinizadores puede ser mantenida y direccionada por otros factores (Strauss y Whittall, 2006). La concentración de pigmentos como la antocianina, responsable de la mayoría de los colores de las flores y presentes en *N. glauca* (Ng y Smith, 2015) puede estar determinada por diferentes factores ambientales o geográficos (Landi *et al.* 2015; Peach *et al.* 2020). Un estudio reciente a nivel intraespecífico reportó que la concentración de antocianinas se correlaciona negativamente

con la altitud (Peach *et al.* 2020). Este patrón encontrado podría explicar la presencia de flores rojas en la población nativa EM ubicada a 310 m snm, en relación a la población TU (3213 m snm) que solo presenta el morfotipo de color amarillo. Por otro lado, las antocianinas también se asocian a menudo con la tolerancia al estrés abiótico como la sequía y altas temperaturas (Strauss y Whittall, 2006), como también a la alta radiación UV (Peach *et al.* 2020). Futuros trabajos en nuestro sistema de estudio podrían echar luz sobre éstas y otras posibles causas de la variabilidad en el color de las flores observada en el rango nativo.

5. CONSIDERACIONES FINALES

En este trabajo se estudió la variación cromática a partir de los espectros de reflectancia de las flores de *N. glauca* de siete poblaciones presentes en áreas nativas e invadidas, considerando como posibles modeladores de este rasgo a visitantes florales, mutualistas y antagonistas con diferentes sistemas visuales. La aproximación utilizada para evaluar el color floral a partir de modelos visuales nos permitió predecir la facilidad con que los visitantes florales pueden percibir y discriminar los colores.

Si bien la variación objetiva del color entre áreas geográficas con distintos contextos de polinización podría sugerir que los visitantes florales de cada región moldean el color de las flores, la representación de los loci de color en los diferentes modelos visuales y los contrastes cromáticos y acromáticos sugieren que dichas variaciones serían percibidas como tales por los distintos polinizadores y visitantes florales pero de manera similar entre ellos. En este sentido, nuestros análisis revelaron que la percepción y discriminación de las flores de *N. glauca* por parte de sus visitantes florales en poblaciones del rango de distribución nativo e invadido no explicaría la variación del color floral entre dichas regiones geográficas. La variación en el color floral de *N. glauca* entre y dentro de las poblaciones nativas e introducidas podría estar dada por mecanismos alternativos a la presión selectiva que puedan ejercer sus polinizadores y visitantes florales, tales como procesos neutrales asociados a las invasiones (*i.e.* cuellos de botella) o la respuesta plástica o adaptativa a factores abióticos (Ollerton *et al.* 2012; Peach *et al.* 2020).

En cuanto a la percepción y discriminación de flores rojas y amarillas que absorben y reflejan UV por picaflores y abejorros, los resultados muestran que las flores con morfotipos diferentes presentes en las poblaciones nativas son igualmente distinguibles de manera cromática por polinizadores y ladrones de néctar. Por esta razón, nuestros hallazgos sugieren que la presencia de flores rojas en algunas poblaciones nativas de *N. glauca* no parecería favorecer la

atracción de los picaflores ni disminuir la percepción por ladrones de néctar como *X. ordinaria*. Sería interesante evaluar, a partir de estudios de campo, si estos mutualistas y antagonistas visitan diferencialmente las flores de los distintos morfotipos presentes en el rango nativo. También se podrían considerar las diferencias cromáticas entre el limbo y tubo corolino, que quizás jueguen un papel diferente en la localización y discriminación de las flores por parte de abejorros y picaflores.

Por otra parte, sería interesante evaluar a futuro cómo se asocia el color de las flores con otros rasgos florales como la cantidad y concentración de néctar en las diferentes poblaciones nativas e introducidas, a la vez que analizar conjuntamente la selección que los polinizadores ejercen sobre dichos rasgos florales. Estos estudios permitirán complementar los análisis que se llevaron a cabo en este trabajo y obtener más evidencias acerca de la influencia de la mirada de los distintos visitantes florales sobre la variación del color de las flores de *N. glauca*.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aizen, M.A., Morales C.L, y Morales J.M. (2008) Invasive mutualists erode native pollination webs. *PLOS Biology*, 6: 396-403.
- Anderson, M.J. 2005. Permutational multivariate analysis of variance. *Auckland (New Zealand): Department of Statistics, University of Auckland*. 26:32–46.
- Ashworth, L. Aguilar R, Martén-Rodríguez S, Lopezaraiza-Mikel M y et al. (2015) Pollination syndromes: a global pattern of convergent evolution driven by the most effective pollinator. *In Evolutionary biology: biodiversification from genotype to phenotype*, 203-224.
- Benitez-Vieyra S., De Ibarra, N. H., Wertlen, A. M. y Cocucci, A. A. (2007). How to look like a mallow: evidence of floral mimicry between Turneraceae and Malvaceae. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1623), 2239-2248.
- Bergamo P. J., Rech, A. R., Brito, V. L. y Sazima, M. (2016). Flower colour and visitation rates of *Costus arabicus* support the ‘bee avoidance’ hypothesis for red-reflecting hummingbird-pollinated flowers. *Functional Ecology*, 30(5), 710-720.
- Bradshaw, H. D. y Schemske, D. W. (2003). Allele substitution at a flower colour locus produces a pollinator shift in monkeyflowers. *Nature*, 426(6963), 176-178.
- Briscoe, A. D. y Chittka, L. (2001). The evolution of color vision in insects. *Annual review of entomology*, 46(1), 471-510.
- Bossdorf, O., Auge, H., Lafuma, L., Rogers, W. E., Siemann, E. y Prati, D. (2005). Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia*, 144(1), 1-11.
- Campbell, D.R., Bischoff, M., Lord, J.M. y Robertson, A.W. (2012) Where have all the blue flowers gone: pollinator responses and selection on flower colour in New Zealand *Wahlenbergia albomarginata*. *Journal of Evolutionary Biology*, 25: 352-364.
- Charles, H. y Dukes, J.S. (2007) Impacts of invasive species on ecosystem services. *Nentwig W (Ed) Biological invasions*. 217-237.
- Chen, D. M. y Goldsmith, T. H. (1986). Four spectral classes of cone in the retinas of birds. *Journal of Comparative Physiology A*, 159(4), 473-479.
- Chen, Z., Niu, Y., Liu, C. Q. y Sun, H. (2020a). Red flowers differ in shades between pollination systems and across continents. *Annals of Botany*. 20: 1–12.

- Chen, Z., Liu, C. Q., Sun, H. y Niu, Y. (2020b). The ultraviolet colour component enhances the attractiveness of red flowers of a bee-pollinated plant. *Journal of Plant Ecology*. 13:354–360.
- Chittka, L. (1992). The colour hexagon: a chromaticity diagram based on photoreceptor excitations as a generalized representation of colour opponency. *Journal of Comparative Physiology A*, 170(5), 533-543.
- Chittka, L. y Wells, H. (2004). Color vision in bees: mechanisms, ecology and evolution. *Complex worlds from simpler nervous systems*, 165-191.
- Chittka, L. y Kevan P.G. (2005). Flower colors as advertisement. In *Practical pollination Biology. Enviroquest*, 157 - 206.
- Chittka, L. y Thomson, J. D. (2001). *Cognitive ecology of pollination: animal behaviour and floral evolution. Cambridge University Press.*
- Coimbra, G., Araujo, C., Bergamo, P. J., Freitas, L. y Rodríguez-Gironés, M. A. (2020). Flower conspicuousness to bees across pollination systems: a generalized test of the bee-avoidance hypothesis. *Frontiers in plant science*, 11.
- Cuthill, I.C., Bennett A.T, Partridge J.C. y Maier E.J. (1999) Plumage reflectance and the objective assessment of avian sexual dichromatism. *The American Naturalist*, 153: 183-200.
- Cronk, Q. y Ojeda, I. (2008). Bird-pollinated flowers in an evolutionary and molecular context. *Journal of experimental botany*, 59(4), 715-727.
- Defrize, J., Théry, M. y Casas, J. (2010). Background colour matching by a crab spider in the field: a community sensory ecology perspective. *Journal of Experimental Biology*, 213(9), 1425-1435.
- Dyer, A.G., Boyd-Gerny, S. McLoughlin, S. Rosa, M.G.P., Simonov, V. y Wong B.B.M. (2012). Parallel evolution of angiosperm colour signals: common evolutionary pressures linked to hymenopteran vision. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 279: 3606-3615.
- Dyer, A. G. y Chittka, L. (2004). Fine colour discrimination requires differential conditioning in bumblebees. *Naturwissenschaften*, 91(5), 224-227.
- Dlugosch, K.M. y Parker, I.M. (2008). Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology*, 17: 431-449.
- Endler, J. A. (2000). Evolutionary implications of the interaction between animal signals and the environment. *Animal Signals*, 11-46.

- Fleming, T. H. y Muchhala, N. (2008). Nectar-feeding bird and bat niches in two worlds: pantropical comparisons of vertebrate pollination systems. *Journal of Biogeography*, 35(5), 764-780.
- Gawryszewski, F. M. (2017). Colour vision models: a practical guide, some simulations, and colourvision R package. *bioRxiv*, 103754.
- García, M., Benítez-Vieyra, S., Sérsic, A. N., Pauw, A., Cocucci, A. A., Traveset, A., y Paiaro, V. (2020). Is variation in flower shape and length among native and non-native populations of *Nicotiana glauca* a product of pollinator-mediated selection? *Evolutionary Ecology*, 1-21.
- Geerts, S. y Pauw, A. (2009) African sunbirds hover to pollinate an invasive hummingbird-pollinated plant. *Oikos* 118: 573-579.
- Geng, Y. P., Pan, X. Y., Xu, C. Y., Zhang, W. J., Li, B., Chen, J. K., ... y Song, Z. P. (2007). Phenotypic plasticity rather than locally adapted ecotypes allows the invasive alligator weed to colonize a wide range of habitats. *Biological Invasions*, 9(3), 245-256.
- Goodspeed, T. H. (1954). The genus *Nicotiana*; origins, relationships and evolution of its species in the light of their distribution, morphology and cytogenetics. 583.79 G66.
- Grotewold, E. (2006) The genetics and biochemistry of floral pigments. *Annual Review of Plant Biology* 57: 761-780.
- Hackett, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C., Braun, E. L., Braun, M. J. y Huddleston, C. J. (2008). A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science*, 320(5884), 1763-1768.
- Henze, M. J., Lind, O., Mappes, J., Rojas, B. y Kelber, A. (2018). An aposematic colour-polymorphic moth seen through the eyes of conspecifics and predators—Sensitivity and colour discrimination in a tiger moth. *Functional Ecology*, 32(7), 1797-1809.
- Herrera, G., Zagal, J. C., Diaz, M., Fernández, M. J., Vielma, A., Cure, M., ... y Palacios, A. G. (2008). Spectral sensitivities of photoreceptors and their role in colour discrimination in the green-backed firecrown hummingbird (*Sebanoides sebanoides*). *Journal of Comparative Physiology A*, 194(9), 785.
- Harder, L.D. y Johnson S.D. (2009). Darwin's beautiful contrivances: evolutionary and functional evidence for floral adaptation. *New Phytologist* 183: 530-545.
- Hierro, J.L., Maron, J.L. y Callaway, R.M. (2005). A biogeographical approach to plant invasions: the importance of studying exotics in their introduced and native range. *Journal of Ecology*, 9: 5–15.

- Heystek, A., Geerts, S., Barnard, P. y Pauw, A. (2014). Pink flower preference in sunbirds does not translate into plant fitness differences in a polymorphic *Erica* species. *Evolutionary ecology*, 28(3), 457-470.
- Issaly, E. A., Sérsic, A. N., Pauw, A., Cocucci, A. A., Traveset, A., Benitez-Vieyra, S. M. y Paiaro, V. (2020). Reproductive ecology of the bird-pollinated *Nicotiana glauca* across native and introduced ranges with contrasting pollination environments. *Biological Invasions*, 22(2), 485-498.
- Johnson, S.D., von Witt C.G. y Anderson, B. (2020). Floral colour variation in *Drosera cistiflora* is associated with switches in beetle pollinator assemblages. *Frontiers in plant science*, 11.
- Kaczorowski, R. L., Blumenfeld, G., Koplovich, A. y Markman, S. (2014). Color and side preferences in Palestine sunbirds (*Nectarinia osea*). *Israel Journal of Ecology & Evolution*, 60(1), 35-40.
- Kelber, A. (1997). Innate preferences for flower features in the hawkmoth *Macroglossum stellatarum*. *Journal of Experimental Biology* 200: 827-836.
- Kelber, A. y Henique, U. (1999). Trichromatic colour vision in the hummingbird hawkmoth, *Macroglossum stellatarum* L. *Journal of Comparative Physiology A*, 184(5), 535-541.
- Kelber, A., Vorobyev, M. y Osorio, D. (2003). Animal colour vision - behavioural tests and physiological concepts. *Biological Reviews*, 78(1), 81-118.
- Koski, M. H. y Galloway, L. F. (2020). Geographic variation in floral color and reflectance correlates with temperature and colonization history. *Frontiers in plant science*, 11, 991.
- Lunau, K., Papiorek, S., Eltz, T. y Sazima, M. (2011). Avoidance of achromatic colours by bees provides a private niche for hummingbirds. *Journal of Experimental Biology*, 214(9), 1607-1612.
- Landi, M., Tattini, M. y Gould, K. S. (2015). Multiple functional roles of anthocyanins in plant-environment interactions. *Environmental and Experimental Botany*, 119: 4-17.
- Lee, C.E. (2002). Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 386-391.
- Maia, R. y White, T. E. (2018). Comparing colors using visual models. *Behavioral Ecology*, 29(3), 649-659.
- Maia, R., Gruson, H., Endler, J.A. y White, T.E. (2019). Pavo 2: New tools for the spectral and spatial analysis of colour in R. *Methods in Ecology and Evolution*, 10:1097–1107.

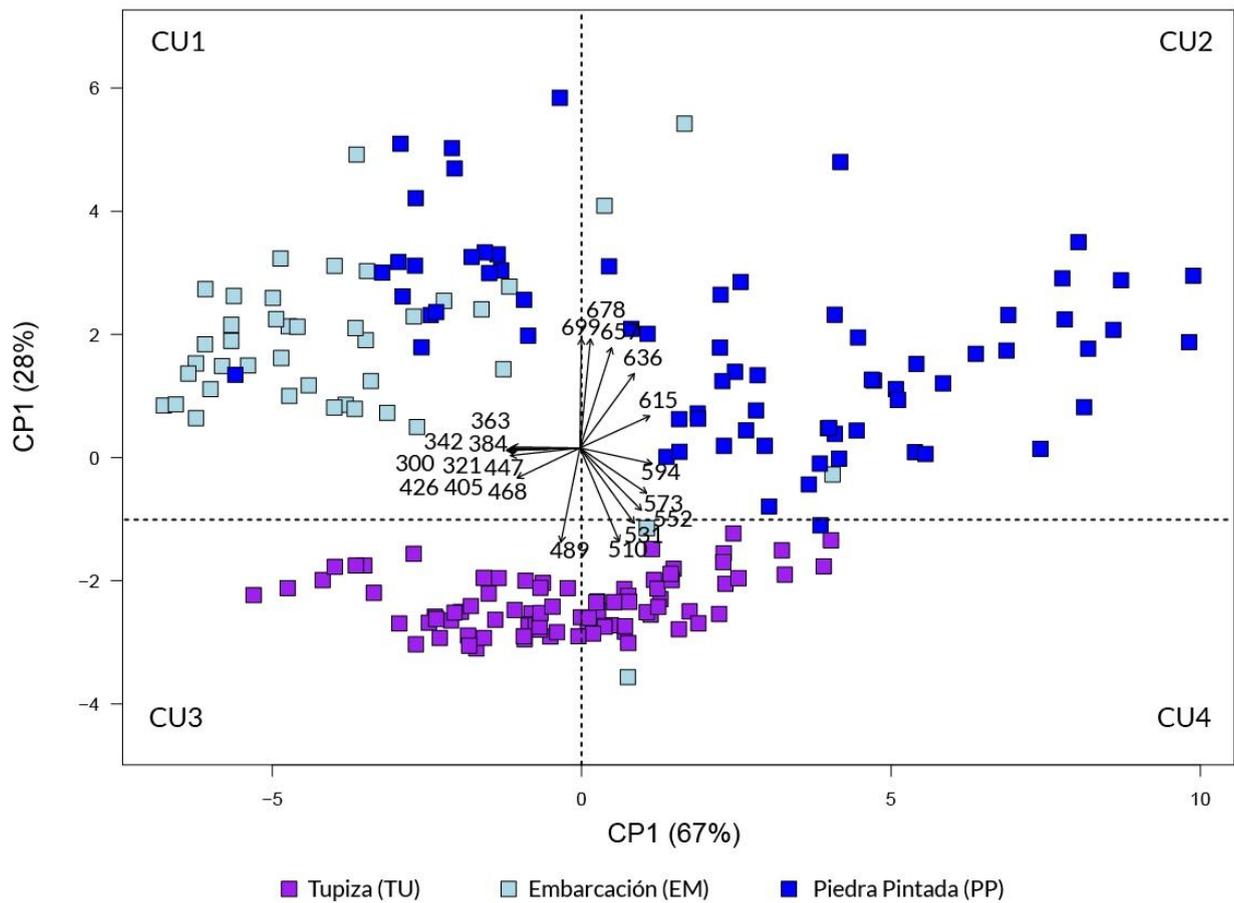
- Makino, T. T. y Yokoyama, J. (2015). Nonrandom composition of flower colors in a plant community: mutually different co-flowering natives and disturbance by aliens. *PLoS One*, 10(12), e0143443.
- Martínez-Harms, J., Palacios, A. G., Márquez, N., Estay, P., Arroyo, M. T. y Mpodozis, J. (2010). Can red flowers be conspicuous to bees? *Bombus dahlbomii* and South American temperate forest flowers as a case in point. *Journal of Experimental Biology*, 213(4), 564-571.
- Meléndez-Ackerman, E., Campbell, D. R. y Waser, N. M. (1997). Hummingbird behavior and mechanisms of selection on flower color in *Ipomopsis*. *Ecology*, 78(8), 2532-2541.
- Moran, E.V. y Alexander, J.M. (2014). Evolutionary responses to global change: lessons from invasive species. *Ecology Letters*, 17: 637-649.
- Nattero, J. y Cocucci, A.A. (2007). Geographical variation in floral traits of the tree tobacco in relation to its hummingbird pollinator fauna. *Biological Journal of the Linnean Society*, 90: 657-667.
- Nattero, J., Sérsic A.N. y Cocucci, A.A. (2010). Patterns of contemporary phenotypic selection and flower integration in the hummingbird-pollinated *Nicotiana glauca* between populations with different flower-pollinator combinations. *Oikos* 119: 852-863.
- Niovi Jones, K. y Reithel, J.S. (2001). Pollinator-mediated selection on a flower color polymorphism in experimental populations of *Antirrhinum* (Scrophulariaceae). *American Journal of Botany*, 88: 447-454.
- Ng, J. y Smith, S. D. (2016). How to make a red flower: the combinatorial effect of pigments. *AoB Plants*, 8.
- Ödeen, A. y Håstad, O. (2010). Pollinating birds differ in spectral sensitivity. *Journal of Comparative Physiology A*, 196: 91-96.
- Ohashi, K., Makino, T. T. y Arikawa, K. (2015). Floral colour change in the eyes of pollinators: testing possible constraints and correlated evolution. *Functional Ecology*, 29(9), 1144-1155.
- Ollerton, J., Watts, S., Connerty, S., Lock, J., Parker, L., Wilson, I., ... y Geerts, S. (2012). Pollination ecology of the invasive tree tobacco *Nicotiana glauca*: comparisons across native and non-native ranges. *Journal of Pollination Ecology*, 9.
- Olsson, P., Lind, O. y Kelber, A. (2018). Chromatic and achromatic vision: parameter choice and limitations for reliable model predictions. *Behavioral Ecology*, 29(2), 273-282.

- Paine, K. C., White, T. E. y Whitney, K. D. (2019). Intraspecific floral color variation as perceived by pollinators and non-pollinators: evidence for pollinator-imposed constraints?. *Evolutionary Ecology*, 33(4), 461-479.
- Papiorek, S., Junker, R. R., Alves-dos-Santos, I., Melo, G. A., Amaral-Neto, L. P., Sazima, M. y Lunau, K. (2016). Bees, birds and yellow flowers: Pollinator-dependent convergent evolution of UV patterns. *Plant Biology*, 18(1), 46-55.
- Peach, K., Liu, J. W. y Mazer, S. J. (2020). Climate predicts UV floral pattern size, anthocyanin concentration, and pollen performance in *Clarkia unguiculata*. *Frontiers in plant science*, 11, 847.
- Peitsch, D., Fietz, A., Hertel, H., de Souza, J., Ventura, D. F. y Menzel, R. (1992). The spectral input systems of hymenopteran insects and their receptor-based colour vision. *Journal of Comparative Physiology A*, 170 (1), 23-40.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Raine, N.E., y Chittka, L. (2007). The adaptive significance of sensory bias in a foraging context: floral colour preferences in the bumblebee *Bombus terrestris*. *PLoS ONE*, 2:e556.
- Rauscher, M.D. (2008). Evolutionary transitions in floral color. *International Journal of Plant Sciences* 169: 7-21.
- Raven, P. H. (1972). Why are bird-visited flowers predominantly red?. *Evolution*, 26(4), 674-674.
- Renoult, J.P., Thomann, M., Schaefer, H.M. y Cheptou, P.O. (2013). Selection on quantitative colour variation in *Centaurea cyanus*: the role of the pollinator's visual system. *Journal of Evolutionary Biology* 26: 2415-2427.
- Richardson, D.M. y Pyšek, P. (2012). Naturalization of introduced plants: ecological drivers of biogeographical patterns. *New Phytologist* 196: 383-396.
- Sakai, A. K., Allendorf, F. W., Holt, J. S., Lodge, D. M., Molofsky, J., With, K. A. y McCauley, D. E. (2001). The population biology of invasive species. *Annual review of ecology and systematics*, 32(1), 305-332.
- Santos, E. L., Maia, B. H. L. N. S., Ferriani, A. P., y Teixeira, S. D. (2017). Flavonoids: Classification, biosynthesis and chemical ecology. *InTech*. 6: 482.
- Scogin, R. (1988). Floral anthocyanidins of bird-visited flowers. *Botanical Gazette*, 149(4), 437-442.

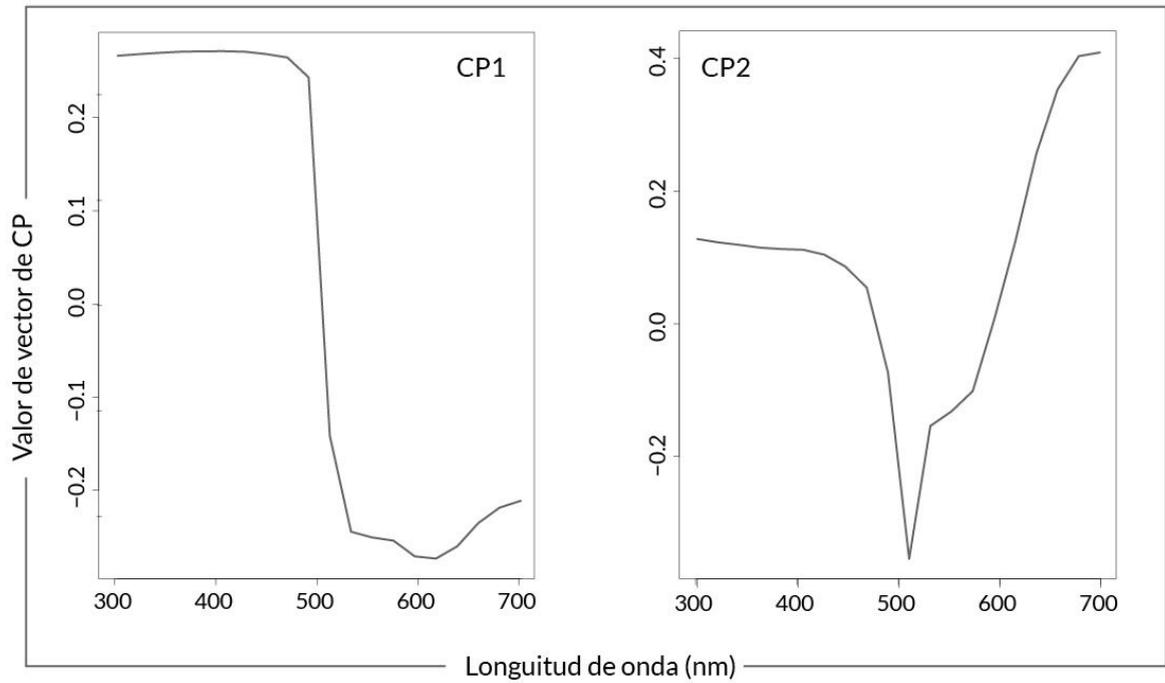
- Schemske, D.W. y Bierzychudek, P. (2001). Perspective: evolution of flower color in the desert annual *Linanthus parryae*: Wright revisited. *Evolution*, 55: 1269-1282.
- Schiestl, F.P. y Johnson, S.D. (2013). Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in Ecology and Evolution*, 28: 307-315.
- Schoen, D. J., Giannasi, D. E., Ennos, R. A. y Clegg, M. T. (1984). Stem color and pleiotropy of genes determining flower color in the common morning glory. *Journal of Heredity*, 75(2), 113-116.
- Schueller, S. K. (2007). Island–mainland difference in *Nicotiana glauca* (Solanaceae) corolla length: a product of pollinator-mediated selection?. *Evolutionary Ecology*, 21(1), 81-98.
- Shrestha, M., Dyer, A. G., Boyd-Gerny, S., Wong, B. B. y Burd, M. (2013). Shades of red: bird-pollinated flowers target the specific colour discrimination abilities of avian vision. *New Phytologist*, 198(1), 301-310.
- Sekor, M.R. y Franks, S.J. (2018). An experimentally introduced population of *Brassica rapa* (Brassicaceae). Phenotypic selection over three years following colonization of a novel environment. *Plant Ecology and Evolution* 151: 209-218.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1995). *Biometry*, 3 edn. Freeman and Company, New York.
- Skorupski, P. y Chittka, L. (2010). Differences in photoreceptor processing speed for chromatic and achromatic vision in the bumblebee, *Bombus terrestris*. *Journal of Neuroscience*, 30(11), 3896-3903.
- Stevens, M., Stoddard, M. C. y Higham, J. P. (2009). Studying primate color: towards visual system-dependent methods. *International Journal of Primatology*, 30(6), 893-917.
- Stiles, F. G. (1976). Taste preferences, color preferences, and flower choice in hummingbirds. *The Condor*, 78(1), 10-26.
- Stiles, F. G. (1981). Geographical aspects of bird-flower coevolution, with particular reference to Central America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 323-351.
- Stoddard, M.C. y Prum, R.O. (2008). Evolution of avian plumage color in a tetrahedral colorspace: A phylogenetic analysis of new world buntings. *The American Naturalist* 171: 755-776.
- Stoddard, M. C., Eyster, H. N., Hogan, B. G., Morris, D. H., Soucy, E. R. y Inouye, D. W. (2020). Wild hummingbirds discriminate nonspectral colors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(26), 15112-15122.

- Stout, J. C. y Tiedeken, E. J. (2017). Direct interactions between invasive plants and native pollinators: evidence, impacts and approaches. *Functional Ecology*, 31(1), 38-46.
- Strauss, S. Y. y Whittall, J. B. (2006). Non-pollinator agents of selection on floral traits. *Ecology and evolution of flowers*, 120-138.
- Telles, F. J., Lind, O., Henze, M. J., Rodríguez-Gironés, M. A., Goyret, J. y Kelber, A. (2014). Out of the blue: the spectral sensitivity of hummingbird hawkmoths. *Journal of Comparative Physiology A*, 200(6), 537-546.
- Telles, F. J., Kelber, A. y Rodríguez-Gironés, M. A. (2016). Wavelength discrimination in the hummingbird hawkmoth *Macroglossum stellatarum*. *Journal of Experimental Biology*, 219(4), 553-560.
- Telles, F. J., González, F. G., Rodríguez-Gironés, M. A. y Freitas, L. (2019). The effect of a flower-dwelling predator on a specialized pollination system. *Biological Journal of the Linnean Society*, 126(3), 521-532.
- Traveset, A. y Richardson, D.M. (2014). Mutualistic interactions and biological invasions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45: 89-113.
- Van der Niet, T. y Johnson, S.D. (2012). Phylogenetic evidence for pollinator-driven diversification of angiosperms. *Trends in Ecology and Evolution*, 27: 353-361.
- Vilà, M., Espinar, J. L., Hejda, M., Hulme, P. E., Jarošík, V., Maron, J. L. y Pyšek, P. (2011). Ecological impacts of invasive alien plants: a meta-analysis of their effects on species, communities and ecosystems. *Ecology letters*, 14(7), 702-708.
- Vorobyev, M. y Osorio, D. (1998). Receptor noise as a determinant of colour thresholds. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 265: 351-358.
- Wyszecki, G. y Stiles, W. S. (1982). *Color science (Vol. 8)*. New York: Wiley.
- Zhu, C., Gerjets, T. y Sandmann, G. (2007). *Nicotiana glauca* engineered for the production of ketocarotenoids in flowers and leaves by expressing the cyanobacterial crtO ketolase gene. *Transgenic Research*, 16(6), 813-821.

7. ANEXOS



Anexo I. Variación en la reflectancia de la corola de *Nicotiana glauca* según un análisis de componentes principales (ACP) de los datos espectrales de las flores de las tres poblaciones nativas (A). Se representan los dos primeros ejes del ACP. Cada punto corresponde al promedio por individuo y los diferentes colores representan las poblaciones. Las flechas corresponden a las variables originales (intervalos de longitud de onda de 21 nm) para facilitar la interpretación del ACP. Las líneas de punto separan los cuatro cuadrantes (CU1, CU2, CU3, CU4). Cada cuadrante representa las cuatro categorías de color: rojas que reflejan UV (C1), rojas que absorben UV (C2), amarillas que reflejan UV (C3) y amarillas que absorben UV (C4).



Anexo 2. Relación entre los autovectores del componente principal 1 (CP1) y componente principal 2 (CP2) del Análisis de Componentes Principales (ACP) y los datos espectrales de las flores entre los 300 y los 700 nm de las siete poblaciones estudiadas