



I M B I V

TESINA DE GRADO

Patrones de selección fenotípica en los parentales e híbridos de *Calceolaria polyrhiza* y *Calceolaria uniflora* y su relación con las diferencias en el ajuste flor-polinizador en una zona híbrida.

Alumna: Estévez Manso Galán, Lucía

Director: Cocucci, Andrea

Codirectora: Sérsic, Alicia

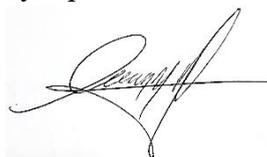


Patrones de selección fenotípica en los parentales e híbridos de *Calceolaria polyrhiza* y *Calceolaria uniflora* y su relación con las diferencias en el ajuste flor-polinizador en una zona híbrida.

TRIBUNAL EXAMINADOR

• Nombre y Apellido: SOSA, CLAUDIO

Firma:



• Nombre y Apellido: SCALDAFERRO, MARISEL

Firma:



• Nombre y Apellido: ASTEGIANO, JULIA

Firma:



• Calificación:.....

• Fecha: 17 de diciembre de 2021

Índice

Resumen	4
Introducción	5
Hipótesis.....	9
Objetivo general	10
Materiales y métodos	10
Obtención de muestras	10
Variación fenotípica	11
Análisis bayesiano espacial.....	13
Medidas de éxito reproductivo.....	14
Selección fenotípica	14
Resultados	15
Altura de la planta y distancia operativa	15
Forma floral.....	16
Análisis bayesiano espacial.....	18
Selección fenotípica	19
Diferenciales lineales de selección.....	19
Diferenciales cuadráticos de selección.....	21
Diferenciales correlacionales de selección.....	23
Gradientes lineales de selección.....	25
Gradientes cuadráticos de selección.....	25
Gradientes correlacionales de selección.....	26
Discusión.....	26
Agradecimientos	29
Bibliografía citada.....	30
Apéndice 1	33
Apéndice 2	33

Resumen

Las zonas híbridas son franjas geográficas donde dos especies se entrecruzan sexualmente y generan individuos con características fenotípicas intermedias, los híbridos, que pueden entrecruzarse entre ellos y a su vez hacerlo con individuos de las especies parentales. Estas zonas pueden originarse por un proceso de especiación simpátrica en la misma zona híbrida o, que se hayan originado primero por un proceso de especiación alopátrica seguido de un contacto secundario. El rango fenotípico ampliado en zonas híbridas representa una oportunidad de estudio para indagar sobre la diferenciación adaptativa entre especies. Existen dos especies de *Calceolaria* que se solapan en ciertas áreas de su distribución geográfica, una polinizada por abejas y otra por aves: *C. polyrhiza* y *C. uniflora*, respectivamente. En este trabajo se determinó, si en estas áreas de solapamiento se produjeron eventos de hibridación introgresiva, donde los individuos con características fenotípicas intermedias fueron favorecidos respecto a los extremos, debido al servicio combinado de dichos polinizadores. A lo largo de una transecta y en puntos georreferenciados, se obtuvo información fenotípica y de éxito reproductivo de 198 individuos. Se utilizaron tres rasgos relevantes en la interacción flor-polinizador (altura de la planta, distancia operativa y forma de la flor) como variables predictoras del éxito reproductivo mediado por aves, abejas y por la combinación de ambos. Como conclusión de los efectos directos e indirectos de los rasgos, resulta que por un lado, los individuos con características fenotípicas intermedias para la altura fueron favorecidos respecto a los de alturas extremas, debido al servicio combinado de dichos polinizadores. Pero por otro lado, para la distancia operativa y la forma floral sucede lo contrario: los individuos con fenotipos extremos fueron favorecidos respecto a los que poseen características intermedias de los rasgos, debido al servicio especializado y opuesto de los polinizadores. Esto significa que nuestros resultados no apoyan a la hipótesis de partida. Los patrones observados en estos últimos rasgos mencionados respaldan lo contrario, es decir, que los fenotipos intermedios no gozan de un beneficio reproductivo, ni por efecto de las dos clases de polinizadores individualmente, ni por el de ellos combinados. El patrón disruptivo observado indica que extremos en el rango fenotípico de los individuos, semejantes a alguna de las dos formas parentales, son favorecidos en desmedro de los híbridos.

Palabras claves: *Calceolaria uniflora*, *Calceolaria polyrhiza*, zona híbrida, enjambre híbrido, polinizadores, éxito reproductivo, morfometría geométrica, selección fenotípica direccional, selección fenotípica estabilizadora, selección fenotípica disruptiva, refuerzo de selección.

Introducción

Las zonas híbridas consisten en franjas geográficas donde dos especies o razas parentales se entrecruzan sexualmente y generan individuos híbridos, los que a su vez se cruzan con otros individuos híbridos y con individuos de las especies parentales. Este proceso se conoce como hibridación introgresiva (Anderson y Hubrich 1938, Anderson 1949). La introgresión da lugar a una colección continua de variantes genéticas y fenotípicas intermedias entre las dos especies o razas parentales, conocida como enjambre híbrido (Cockayne y Allan 1926, Kalinowski y Powell 2015). Consecuentemente, la introgresión produce rangos fenotípicos y genéticos ampliados respecto a poblaciones parentales puras. Las zonas híbridas son una evidencia de que las especies intervinientes no están completamente aisladas reproductivamente. Pueden ser primarias o secundarias, respectivamente, según que las especies parentales se hayan originado por un proceso de especiación simpátrica incipiente en la misma zona híbrida o, que se hayan originado primero por un proceso de especiación alopátrica seguido de un contacto secundario posterior a la especiación (Hewitt 1988, Swenson 2008). Un aspecto de gran relevancia en estas zonas, es el éxito reproductivo de los híbridos respecto a las razas parentales. Se considera zona de tensión, cuando los híbridos son reproductivamente inferiores, por ejemplo, por estar mal adaptados a cierta condición ecológica (Key 1968, Hewitt 1988).

El rango fenotípico ampliado en zonas híbridas, representa una oportunidad de estudio para indagar sobre la divergencia adaptativa entre especies (Swenson 2008). Ello es generalmente más difícil en poblaciones no híbridas, donde el rango fenotípico suele ser mucho más restringido, producto de los procesos de selección natural estabilizadora y direccional, que resultan en la erosión de la variación genética y fenotípica (Fenster et al. 2004). La especiación simpátrica y la alopátrica, son consideradas importantes procesos de la diversificación de plantas y animales que pueden manifestarse en las zonas híbridas. Con independencia de su origen primario o secundario, las zonas híbridas pueden utilizarse como modelo de una población en proceso de divergencia adaptativa. Por esto mismo, pueden usarse como experimentos naturales que simulan el nacimiento de especies, y proporcionan la oportunidad de responder interrogantes relevantes sobre las causas promotoras de la divergencia genética y fenotípica entre poblaciones, y eventualmente sobre la especiación (Key 1968, Hewitt 1988, Swenson 2008).

Una pregunta clásica, que aún no ha sido suficientemente esclarecida, es si la divergencia en fenotipos florales y su multiplicidad de variaciones, es promovida por la evolución adaptativa ejercida por polinizadores funcionalmente especializados. Si cada polinizador promueve selección direccional en sentidos opuestos, el efecto sumado de los dos resultaría en un patrón de selección disruptiva, ya que se favorecerían los extremos opuestos de la variación de un rasgo (Fenster et al. 2004, Mayer et al. 2011). La reducción de la aptitud híbrida generaría una selección favorable a la evolución de barreras reproductivas precigóticas más fuertes entre las especies

parentales (Hopkins y Rausher 2012). Este proceso podría verse eventualmente acentuado por el de refuerzo de selección, mediante el cual las especies previenen la hibridación y mantienen los límites entre especies distintas (Van der Niet et. al 2014). Pocos estudios han demostrado convincentemente la ocurrencia de este proceso. Más aún, alternativamente se ha propuesto que el proceso inverso sería más plausible, ya que los fenotipos intermedios en el rango de variación serían favorecidos respecto a los extremos, porque gozarían de los servicios de polinización combinados de distintos polinizadores. Esta ventaja, además, podría asegurar la reproducción si polinizadores funcionalmente distintos fluctúan en su abundancia en el espacio y el tiempo (Waser et al. 1996). Es decir, plantas con flores adaptadas a un sólo grupo funcional de polinizadores, podrían ver comprometido su éxito reproductivo a largo plazo, si las poblaciones de estos polinizadores se extinguieran localmente o si las plantas se dispersaran a regiones donde estos polinizadores faltan. En cambio, plantas con fenotipos universalmente adaptados a distintos grupos funcionales de polinizadores, podrían siempre encontrar polinizadores alternativos si las poblaciones de otros grupos funcionales disminuyeran en ciertos tiempos y lugares. Consecuentemente, la superioridad híbrida tendería a excluir a las formas parentales y a favorecer el predominio de un fenotipo funcionalmente generalista. Este patrón se manifestaría como selección estabilizadora.

Responder esta pregunta, demanda conocimiento sobre los patrones de selección fenotípica del enjambre híbrido en su conjunto, incluyendo individuos parentales e híbridos como una sola población local. Según nuestro conocimiento, esto ha sido realizado en un solo caso involucrando fenotipos florales. Schemske y Bradshaw (1999) crearon una población de híbridos a partir de cruzamientos experimentales entre dos especies de *Mimulus*, una polinizada por picaflores y otra por abejorros. Luego, los trasplantaron a ambientes naturales donde se encontraban ambos polinizadores y realizaron las observaciones pertinentes. Para realizar tales estudios, debe cumplirse que los rasgos en cuestión sean heredables y que haya presencia de variación, tanto del fenotipo como de la aptitud entre los individuos de la población en estudio. Además, debe contemplarse que los efectos selectivos de los polinizadores sobre un rasgo pueden estar indirectamente influidos por otros rasgos seleccionados simultáneamente o de manera correlacionada con el primero (Brodie et al. 1995).

Existen dos especies de *Calceolaria* que se solapan en ciertas áreas de su distribución geográfica, una polinizada por abejas y otra por aves. El género *Calceolaria* L. perteneciente a la familia Calceolariaceae, se encuentra altamente diversificado y representa uno de los sistemas de plantas-polinizadores más especializados. De 248 especies, unas 200 producen aceites florales buscados por un grupo de abejas especialistas en dicho recurso (Cosacov et al. 2009). Además, presenta unas pocas especies que poseen otras estrategias de polinización: algunas dependen de la autogamia (aproximadamente el 2% de las especies), otras de la polinización por abejas

recolectoras de polen (aproximadamente el 18%) y por último, al menos una especie, *C. uniflora*, es ornitófila. Las flores de *Calceolaria* presentan dos labios, uno superior que normalmente cubre y protege las piezas fértiles, y un labio inferior que tiene la particularidad de ser sacciforme. Las especies oleíferas muestran un apéndice en el labio inferior de su corola que se pliega, en mayor o menor medida, en el interior de dicho labio. Su superficie inferior está cubierta por un cojín de pelos glandulares capitados, llamado elaióforo. La distancia existente entre las piezas fértiles y el elaióforo, es lo que se denomina distancia operativa. Ésta resulta importante en la transferencia de polen entre flores por influir en el ajuste del polinizador con la flor. El éxito reproductivo de estas abejas depende de la interacción con las plantas productoras de aceites, ya que el único alimento que reciben sus larvas es una mezcla de los aceites florales con polen, por lo que se trata de un recurso crucial para la supervivencia de estos insectos. También se ha observado que varias de estas abejas utilizan los aceites para impermeabilizar sus nidos y probablemente como alimento de los adultos. Desde el punto de vista de las plantas, en general las especies productoras de aceites, requieren de estas abejas para reproducirse sexualmente. Trabajos previos han abordado diversos aspectos de estas interacciones especialistas: la correspondencia morfológica entre las flores y los polinizadores más frecuentes, la estructura de los órganos recolectores de las abejas y los diferentes tipos y localización del tejido secretor, la dependencia de las especies de plantas hacia los polinizadores para reproducirse sexualmente, la pérdida de los elaióforos y el consecuente cambio en el sistema de polinización y la variación del éxito reproductivo y de los caracteres florales en relación a la variación del ensamble de polinizadores a escala geográfica (Vogel 1974, Cocucci y Vogel 2001, Sérsic 2004, Ferreiro et al. 2017, Cosacov et al. 2009).

Calceolaria polyrhiza Cav. posee flores amarillas, con un labio corolino inferior de unos 20 mm de largo, curvo e inflado, donde se encuentra el elaióforo. Existe una corta distancia operativa entre las anteras y el elaióforo, ajustado al tamaño de las abejas polinizadoras (Fig. 1). Estas flores interactúan sólo con dos especies de abejas recolectoras de aceites, *Centris cineraria* y *Chalepogenus caeruleus*, cuyas abundancias relativas están espacialmente diferenciadas (Cosacov 2014). *Chalepogenus caeruleus* es el polinizador más frecuente en las poblaciones localizadas hacia el Noroeste del rango de distribución, en la ecoregión de Bosques Andinos principalmente, mientras que *C. cineraria* predomina en la región de la Estepa Patagónica (Cosacov et al. 2012). En las zonas más australes *C. polyrhiza* representa prácticamente la única fuente de aceite para *C. cineraria*. Por lo tanto, la asociación entre estas dos especies es, al menos en dicha zona, altamente especializada para ambas partes de la interacción.



Figura 1. Flor de *Calceolaria polyrhiza* siendo visitada por *Centris cineraria*. Nótese la abeja introduciendo las patas delanteras al interior de la corola donde se encuentra el elaióforo y simultáneamente contactando la cabeza con las piezas fértiles de la flor.

Calceolaria uniflora Lam. presenta flores mayores (26-29 mm de longitud), de coloración predominantemente rojiza; el labio inferior es recto, inflado solo en el extremo, que desarrolla un lóbulo carnoso (cuerpo nutricional), no rebatido y de color blanco. Presenta un elaióforo reducido y de más difícil acceso a las abejas. Además, aunque una abeja se posara en dicho cuerpo, no llegaría a tocar las anteras y cumplir con el proceso de polinización. Ciertas aves (agachonas, zorzales y varias especies de la familia Emberizidae) al picotear o desgarrar el cuerpo nutricional para comerlo, hacen que las anteras versátiles depositen el polen sobre las plumas de la parte delantera de la cabeza del ave (Fig. 2). Así, la polinización se produce utilizando la faz dorsal del ave (Sérsic y Cocucci, 1996). Por lo que se sabe hasta ahora, la polinización de plantas en la estepa patagónica por aves frugívoras y granívoras, parece estar restringida a esta especie de *Calceolaria* que ofrece el cuerpo nutricional, y a algunas especies de *Anarthrophyllum* que sirven de fuente de néctar (Paiaro et al. 2017).



Figura 2. Vista de una flor de *Calceolaria uniflora* siendo visitada por *Zonotrichia capensis*. Nótese en las flores los cuerpos nutricios y partes del labio inferior desgarrados y, en el ave, una parte de una flor en el pico y una mancha de polen sobre la parte dorsal de la cabeza.

En la zona híbrida de *C. polyrhiza* y *C. uniflora* tuvo lugar una extensa introgresión, generando un amplio enjambre de variantes intermedias que coexisten con las parentales (Sérsic et al. 2001). Bajo los supuestos de que tanto las aves como las abejas recolectoras de aceite se encuentran presentes en esta zona híbrida y de que hay variabilidad en el fenotipo y en el éxito reproductivo entre los individuos del enjambre híbrido, se buscará averiguar qué tipo de selección se está promoviendo y cómo es la respuesta del fenotipo floral.

Hipótesis

En las áreas de solapamiento de la distribución geográfica de *C. uniflora* y *C. polyrhiza* se producen eventos de hibridación introgresiva donde los individuos con características fenotípicas intermedias son favorecidos respecto a los extremos, porque gozan de los servicios combinados de distintos polinizadores.

Se espera una selección fenotípica estabilizadora en el enjambre híbrido, debido a la combinación de los servicios de distintos polinizadores sobre rasgos intermedios.

Objetivo general

Identificar qué patrón de selección fenotípica existe en el enjambre híbrido entre *C. polyrhiza* y *C. uniflora*, inferido a partir de la variación natural de los rasgos florales y su relación con el éxito reproductivo promovido por los distintos polinizadores. Para alcanzar este objetivo, es necesario cumplir con los siguientes **objetivos específicos**:

- Identificar si existe una estructuración espacial en la variación fenotípica del enjambre híbrido.
- Determinar si, como prerrequisito de la ocurrencia de selección fenotípica, existe variabilidad en el éxito reproductivo.
- Analizar si, y según qué patrones, las variaciones de los rasgos fenotípicos se asocian con el éxito reproductivo de forma conjunta.
- Averiguar cuál es el efecto directo que cada rasgo fenotípico ejerce de manera aislada, sobre el éxito reproductivo de los individuos.

Materiales y métodos

Obtención de muestras

Se disponen de datos inéditos de muestreos realizados durante el mes de diciembre del 2012 por Alicia Sérsic y Andrea Cocucci en la localidad de Verdadera Argentina (Provincia de Santa Cruz, 50,9023 S; 72,1773 W), donde se encuentra el enjambre híbrido entre *C. polyrhiza* y *C. uniflora*. El muestreo se realizó a lo largo de una transecta de aproximadamente 900 m de longitud, en una ladera que abarca fenotipos de individuos parentales e híbridos (Fig. 3). El fenotipo parental *C. polyrhiza* se encontraba ubicado en la parte baja de la ladera, luego a alturas superiores se encontró una amplia gama de fenotipos intermedios, y por último, el fenotipo parental *C. uniflora* se encontraba en lo más alto de la ladera. A lo largo de la transecta y en puntos georreferenciados, se obtuvo información fenotípica y de éxito reproductivo de 198 individuos. En el sitio conviven las dos clases de animales, aves y abejas recolectoras de aceites, que son conocidas como polinizadoras de las especies parentales del enjambre.

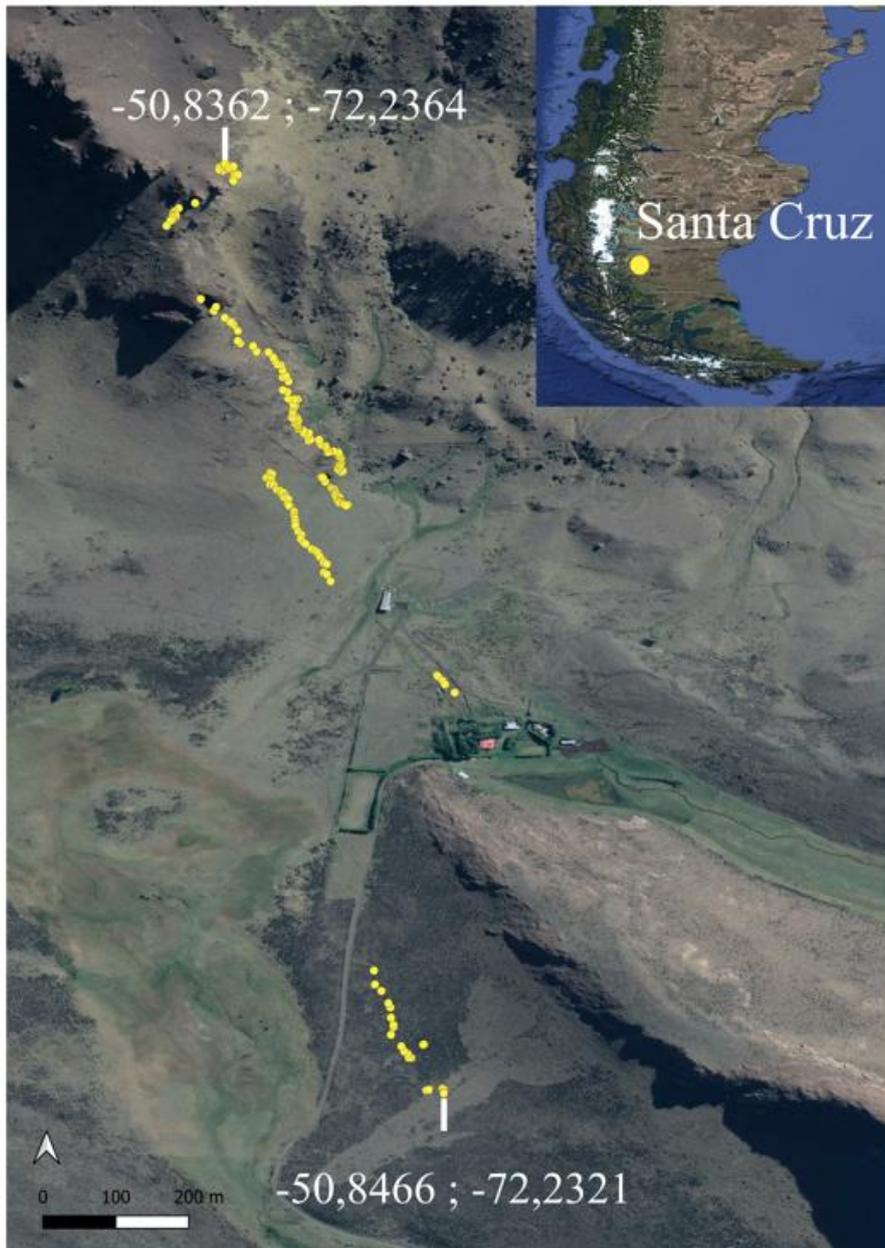


Figura 3. Área de estudio con su rango de coordenadas; el recuadro inserto muestra su ubicación en la Provincia de Santa Cruz; los puntos corresponden a cada uno de los individuos muestreados a lo largo de la transecta.

Variación fenotípica

En el sitio de estudio se tomaron medidas lineales de la distancia al suelo de la flor más elevada de cada individuo, y se tomaron fotografías escaladas de flores recién cosechadas dispuestas de perfil, con una cámara fotográfica Nikon D90 con objetivo NIKKOR MICRO de 105 mm montada sobre un estativo. En total se obtuvieron 198 fotografías (de una flor por cada individuo).

Con el fin de capturar la variación morfológica del enjambre a lo largo de la transecta, de manera que represente rangos de rasgos relevantes en la interacción flor-polinizador, se tomaron medidas lineales y de forma sobre las fotografías. En el último caso, se utilizó la morfometría geométrica, ya que permite obtener información de configuraciones complejas, eliminando la influencia del tamaño y de manera que pueda reducirse en pocas dimensiones. Esta aproximación, consiste en establecer landmarks (hitos) sobre las fotografías que capturen los rasgos relevantes de la forma. Las posiciones relativas de las coordenadas de los landmarks o configuraciones de landmarks, se utilizan para representar la forma de cada flor (Fig. 4).

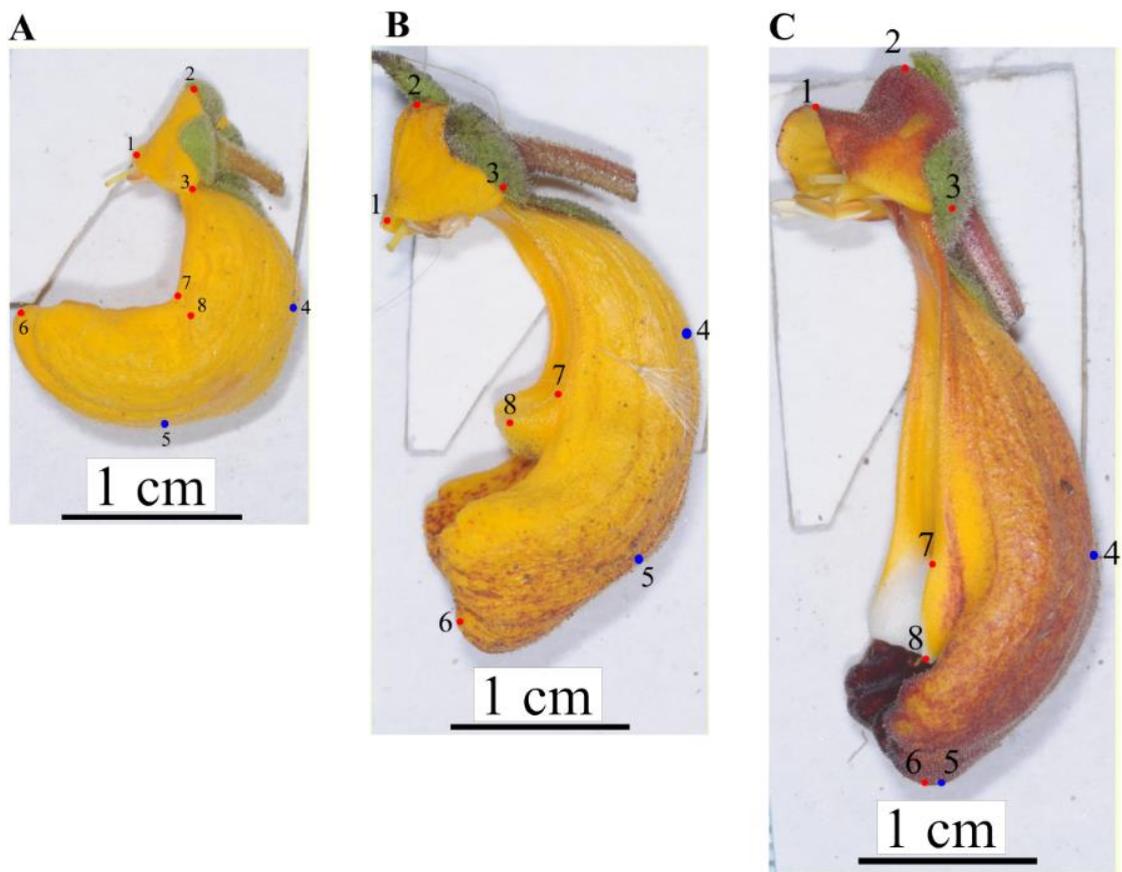


Figura 4. Landmarks homólogos ubicados en las flores de tres individuos con fenotipos distintos: A) fenotipo parental *C. polyrhiza*, B) fenotipo híbrido y C) fenotipo parental *C. uniflora*. Los landmarks anatómicos se presentan en color rojo y los landmarks matemáticos en color azul.

En las fotografías se colocaron 8 landmarks homólogos (Zelditch et al. 2012) utilizando el programa tpsDig2 (Rohlf 2004). Los landmarks con el mismo número se reconocen como homólogos a lo largo de todos los individuos en la muestra, y esta homología puede deberse a una correspondencia respaldada por la geometría (landmarks de tipo II o matemáticos) o a una homología biológica (landmarks de tipo I o anatómicos; van der Molen et al. 2007, Bookstein

1997). Se determinaron 6 landmarks anatómicos y 2 matemáticos (Fig. 4; Apéndice 1). La ubicación de los landmarks, se seleccionó con el objetivo de captar la mayor variación de los aspectos relevantes de las estructuras florales implicadas en el proceso de polinización, y en la interacción física entre flores y polinizadores.

Las configuraciones de landmarks obtenidas para cada flor se sometieron al método de Procrustes, que permite corregir los efectos de la traslación, la rotación y la escala. De esta manera, se pudieron obtener aspectos de la forma que son independientes de estos otros factores que afectan la configuración (Zelditch et al. 2012). Luego, fueron representadas mediante análisis de componentes principales (PCA). El PCA es una técnica utilizada en morfometría geométrica, que permite identificar los rasgos dominantes de la variación de la forma, indicando la cantidad de variación asociada a cada componente principal (PC). Esta metodología, permite explorar los principales ejes de variación morfológica en un espacio tangente, observar las tendencias de variación entre y dentro de los grupos y reducir la dimensionalidad de los datos (Zelditch et al. 2012). Además, utilizando herramientas gráficas, se pueden representar las variables de la forma en grillas que muestran el cambio del espacio físico, respecto a la forma consenso, obtenida minimizando la suma de cuadrados de las distancias Procrustes entre todas las muestras disponibles (Rohlf y Slice 1990). El factor de escala de los gráficos de cada PC es la magnitud del cambio de forma medido como una distancia Procrustes. Esto permite visualizar los principales cambios en forma entre las especies. El procesado de las coordenadas de los landmarks y los análisis posteriores se realizaron utilizando el programa MorphoJ (Klingenberg 2011).

La distancia operativa (DO), se registró a partir de la base de datos morfogeométrica, como la distancia euclídea entre los landmarks uno y siete a partir de las coordenadas de Procrustes corregidas por el tamaño del centroide.

Análisis bayesiano espacial

Para conocer cómo se estructura espacialmente la variación fenotípica entre individuos en función de la distancia fenotípica y la distancia geográfica, se realizó un análisis bayesiano espacial con el programa Geneland v4.0.3 y el método Monte Carlo de cadenas de Markov (Guillot et al 2005). Para la distancia fenotípica, se utilizó el PC1 del análisis de componentes principales y para la distancia geográfica, las coordenadas de cada uno de los individuos muestreados. En el análisis se corrieron 5 réplicas independientes, y se evaluaron las probabilidades de pertenencia a cada agrupamiento ($K=3$). Esto confiere a cada individuo, una probabilidad posterior de ser asignado en una agrupación K , sin un conocimiento *a priori* sobre las unidades poblacionales o de sus límites geográficos.

Medidas de éxito reproductivo

En los mismos individuos de la transecta, se obtuvieron medidas de éxito reproductivo que permitieran diferenciar la acción de las aves y de las abejas recolectoras de aceites. Para este propósito, se aprovechó la circunstancia de que las aves y las abejas dejan señas particulares cada vez que visitan las flores. Las aves remueven parcial o totalmente el lóbulo corolino, que sirve de cuerpo nutricional, y las abejas dejan sobre la corola marcas de uñas cuando se posan sobre el labio inferior y se aferran para poder manipular la glándula oleífera. Con el fin de responder a la predicción de selección estabilizadora mediada por la acción combinada de ambas clases de polinizadores, aves y abejas recolectoras de aceites, se utilizó como tercera medida de éxito reproductivo, a la suma de las visitas por ambos animales.

Selección fenotípica

Una de las condiciones para que pueda actuar la selección, es que haya variación en los rasgos fenotípicos y en el éxito reproductivo de los individuos de una población. Debido a esto, lo primero que se estimó fue la oportunidad de selección (I) que actúa sobre cada rasgo, esto es, la varianza del éxito reproductivo mediado por aves o por abejas, y por la combinación de ambas (Brodie et al. 1995). El valor resultante es interpretado como un límite a la acción de la selección, o como potencial de acción de la selección. Posibles diferencias en I, entre medidas de éxito reproductivo, se pusieron a prueba con el estadístico F para varianza con la función `var.test()` en R.

Los patrones de selección fenotípica fueron estimados tanto para las medidas de éxito reproductivo separadamente de aves y abejas, como para la suma de ambas (Emel et al. 2017). La altura de las plantas, la distancia operativa y el principal eje morfométrico del PCA, fueron utilizados como variables predictoras de ambas medidas de éxito reproductivo. Como el número de flores por individuo es distinto a través de la población, esta variable fue utilizada como contrapeso (offset) para dar cuenta de las diferencias en réplicas entre individuos (Zuur et al. 2009). Para evaluar la magnitud de la selección que actúa sobre los rasgos fenotípicos, se siguió el modelo estándar propuesto por Lande and Arnold (1983). Primero, los rasgos fueron estandarizados a media de cero y desvío estándar igual a uno. Esto permitirá llevar los valores de los datos a una escala uniforme para poder comparar la intensidad de la selección. Por otro lado, cada una de las tres medidas de éxito reproductivo fueron relativizadas a la media poblacional. Esta transformación sirve para estimar la contribución de cada fenotipo a la generación siguiente, en forma comparativa a otros fenotipos. También evita el efecto de los posibles cambios en el

tamaño poblacional entre las generaciones. Luego de esto, se calcularon los diferenciales de selección lineales (s_i), cuadráticos (c_i) y correlacionales (c_{ii}), que representan la selección directa e indirecta sobre cada rasgo específico. Éstas son estimaciones del cambio fenotípico esperado de una generación a la siguiente, en los parámetros poblacionales de posición (media) y dispersión (varianza). Además, se estimaron los gradientes de selección para determinar la magnitud y signo de la selección sobre cada rasgo (β_i , γ_{ii}) o sobre rasgos correlacionados (γ_{ij}), independientemente de los efectos indirectos de otros rasgos medidos. Los gradientes ponen en evidencia el efecto directo de la selección sobre cada rasgo (gradientes lineales y cuadráticos) y sobre combinación de pares de rasgos (gradientes correlacionales), descontando los efectos indirectos de otros rasgos u otras combinaciones de rasgos. La significancia de los diferenciales y gradientes se calcularon sobre la base de modelos inflados en cero, que son útiles en situaciones como la presente, donde se encuentra una amplia presencia de ceros en la muestra. En nuestro caso de estudio, hay una gran cantidad de flores sin signos de visitas por aves o abejas, es decir con éxito reproductivo nulo. Este modelo distingue entre un proceso binomial (diferencias en visitas a individuos), y un proceso de Poisson (diferencias en el número de flores visitadas por individuo). Para este fin se utilizó la función *zeroinfl* del paquete *pscl* (Zeileis et al. 2008).

Cuando los rasgos fenotípicos estuvieron significativamente afectados por la selección fenotípica, según la medida de éxito reproductivo combinada de aves y abejas, se realizaron regresiones no paramétricas utilizando splines cúbicos. Esto, con el objetivo de visualizar las asociaciones uni y multivariadas entre fenotipo y éxito reproductivo. Para estimar los splines cúbicos se utilizó el paquete *mgcv* (Wood 2008, 2017). La selección correlacionada entre dos rasgos, cuando significativa, se visualizó graficando superficies o paisajes de éxito reproductivo utilizando ajustes de splines en capa delgada (TPS, por sus siglas en inglés), una versión tridimensional de los splines cúbicos, utilizando el paquete *fields* (Nychka et al. 2017).

Todos los análisis aquí descritos se realizaron con el programa R (R Core Team 2021).

Resultados

Altura de la planta y distancia operativa

Los fenotipos extremos están representados por plantas relativamente altas con flores de distancia operativa corta, idénticos o similares a *C. polyrhiza*, y plantas bajas con flores de distancias operativas largas, idénticos o similares a *C. uniflora*. La altura de la planta y la distancia operativa muestran distribuciones bimodales, esto es mayor frecuencia de individuos que presentan valores extremos de los rasgos y menor cantidad en valores cercanos a la media. La

distribución es marcadamente asimétrica para la altura de la planta con una frecuencia mayor para plantas bajas (Fig. 5).

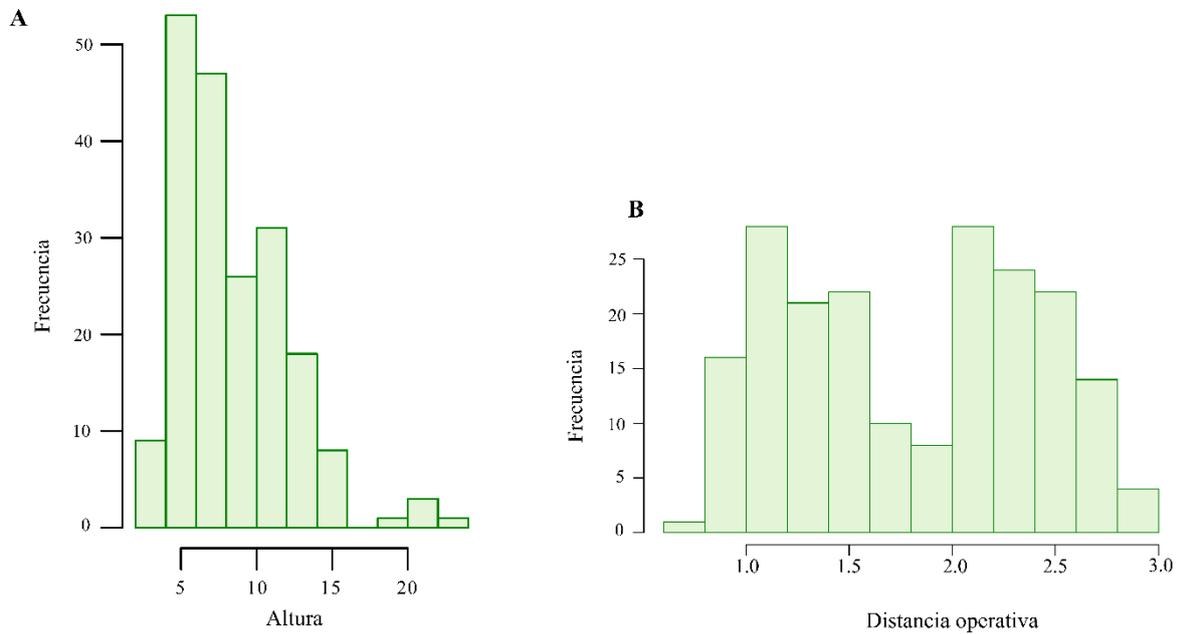


Figura 5. Histograma de frecuencias de: A) Altura de la planta (cm) y B) Distancia operativa (cm).

Forma floral

Según el análisis de morfometría geométrica, la mayor parte de la variabilidad morfológica es explicada por el eje morfológico PC1 (83,84%), y una parte menor, por el eje morfológico PC2 (7,88%). Se observa que los valores más bajos del eje PC1 representan una morfología floral similar a *C. uniflora* (labio inferior recto e inflado solo en el extremo, con cuerpo nutricio desplegado hacia afuera), los valores más altos representan una morfología floral similar a *C. polyrhiza* (labio inferior curvo e inflado, con elaióforo plegado hacia el interior) y los valores intermedios abarcan un amplio rango de morfología híbrida (Fig. 6).

Sobre el PC2 se puede diferenciar que los valores más bajos representan individuos con morfologías florales similares a *C. polyrhiza* y *C. uniflora*, mientras que sus valores más altos corresponden a morfologías florales híbridas. Teniendo en cuenta la baja proporción de variación en la forma que explica este eje y que no permite distinguir adecuadamente entre formas parentales, la representación morfogeométrica de la forma se refiere, en lo sucesivo, solamente al eje PC1.

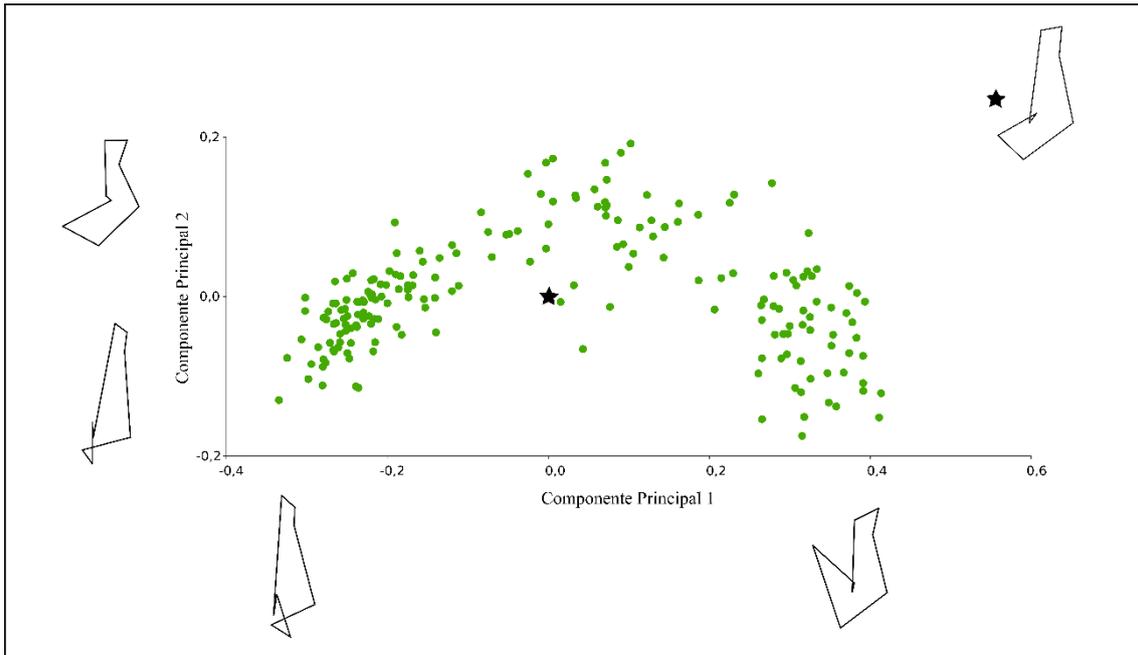


Figura 6. Variación de la forma floral a lo largo de los ejes PC1 y PC2. Cada punto representa a un individuo y su ubicación representa la desviación respecto a la forma consenso (indicada con una estrella, ubicada en las coordenadas 0,0).

Los histogramas de frecuencias para el eje morfológico PC1 muestran una distribución bimodal, al igual que los rasgos mencionados anteriormente. Esto significa que hay mayor frecuencia de individuos que presentan valores extremos de los rasgos y menor frecuencia en valores medios (Fig. 7).

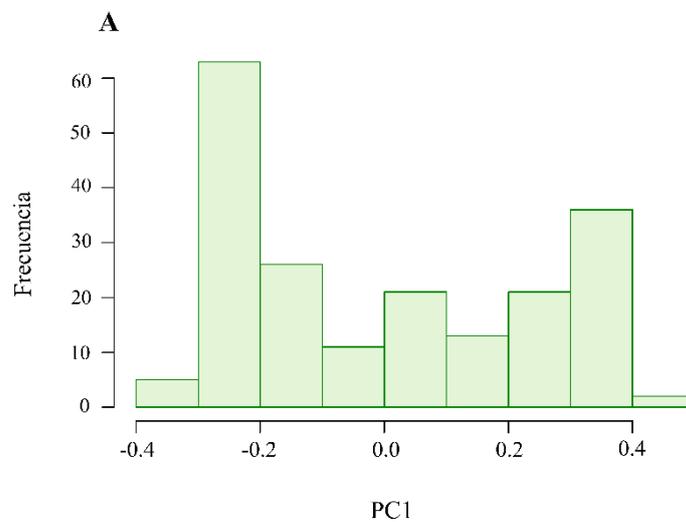


Figura 7. Histograma de frecuencias del eje morfológico PC1.

Análisis bayesiano espacial

Este análisis reconoció una estructura geográfica en la distribución del fenotipo compuesta por un mínimo de tres grupos, que representaron los dos fenotipos parentales y un fenotipo híbrido. El grupo afín a la especie parental *C. uniflora* se encuentra en el sector norte de la transecta y el afín a *C. polyrhiza*, se restringe al sector sur (Fig. 8). La probabilidad posterior de pertenencia al fenotipo híbrido es máxima en una franja latitudinalmente estrecha, de aproximadamente 100 m de ancho (Fig. 9).

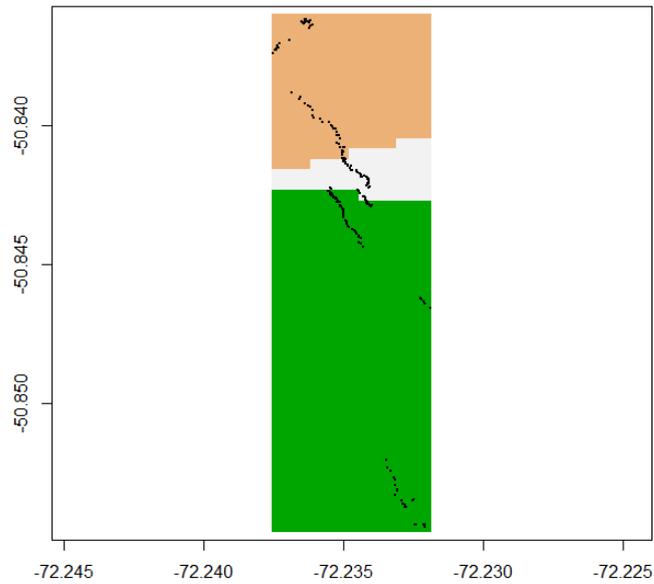


Figura 8. Representación gráfica de la distribución espacial de los tres grupos fenotípicos distinguidos. El grupo afín a la especie parental *C. uniflora* se encuentra en el sector norte de la transecta (color salmón) y el afín a *C. polyrhiza* se restringe al sector sur (color verde). El fenotipo híbrido se ubicó en el medio de estos dos (color blanco).

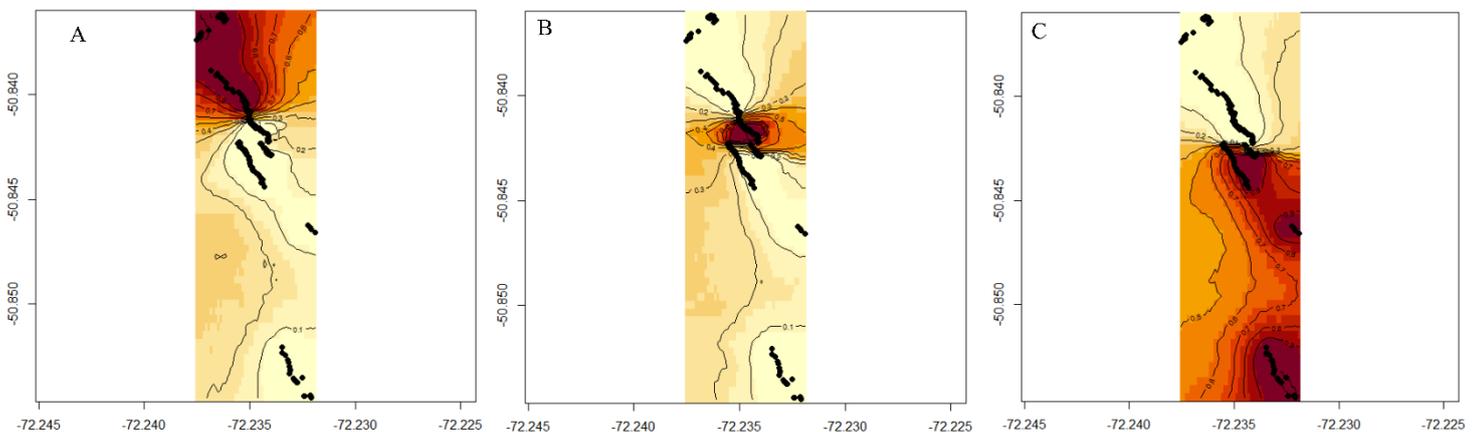


Figura 9. Mapas de probabilidad posterior de pertenencia de los individuos muestreados a cada uno de los grupos definidos por los morfotipos (A. grupo fenotipo *C. uniflora*; B. grupo híbrido, C. grupo *C. polyrhiza*). Los colores indican: rojo: alta probabilidad de pertenencia (>0,90), naranja: probabilidad media (entre 0,9 y 0,50), amarillo: baja probabilidad (<0,50). Los puntos negros representan los individuos muestreados.

Selección fenotípica

Se obtuvo una oportunidad de selección distinta de cero para el éxito reproductivo mediado por aves (1,019), por abejas (26,923) y para la combinación de ambos (0,976). Esto significa que en la población estudiada existe suficiente variabilidad como para que se produzca selección fenotípica. La oportunidad de selección asociada a la polinización por abejas es significativamente mayor que la asociada a las otras dos medidas (Fig 10).

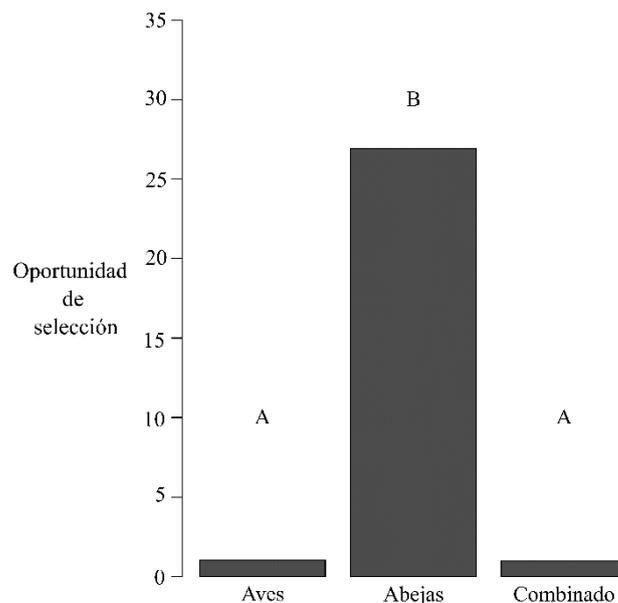


Figura 10. Oportunidad de selección para las tres medidas de éxito reproductivo. Letras distintas señalan diferencias significativas entre medidas de éxito reproductivos.

Diferenciales lineales de selección

Los resultados muestran diferenciales lineales significativos para los tres rasgos en el componente de frecuencia de los errores. Para la DO y el PC1 estos diferenciales fueron significativos, a su vez, para el componente de ocurrencia, con la medida de éxito reproductivo

debida a aves y a la combinada. El signo y la magnitud de los diferenciales difirió marcadamente según la medida de éxito reproductivo tomada. Los diferenciales obtenidos de la selección fenotípica mediada por abejas fueron siempre de signo opuesto que los obtenidos con las otras dos medidas de éxito reproductivo (Fig. 11).

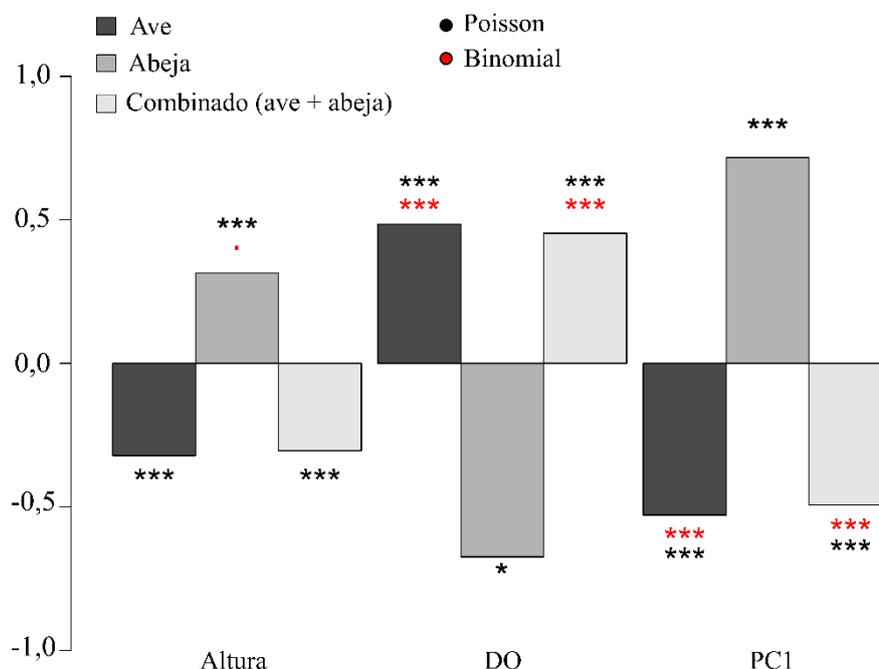


Figura 11. Diferenciales lineales de selección. Referencias: Altura (distancia al suelo de la flor más elevada de la planta), DO (distancia operativa de la flor), PC1 (primer componente principal de un eje morfogeométrico representativo de la forma de la corola).

Teniendo en cuenta la medida de éxito reproductivo debida a aves y la combinada, la altura muestra un valor negativo (-0,32 y -0,30 respectivamente), indicando una tendencia a reducir el valor medio del rasgo, y por lo tanto, una selección direccional hacia valores más pequeños. Por otro lado, la DO posee valores positivos para ambas medidas de éxito reproductivo (0,49 y 0,45 respectivamente) lo que estaría marcando un aumento en el valor medio del rasgo, y consecuentemente una selección direccional hacia valores más grandes. Contrariamente, en el caso del eje morfológico PC1 sus valores asociados a estas dos medidas de éxito reproductivo son negativos (-0,53 y -0,49 respectivamente), por lo que ejerce una selección direccional hacia valores más pequeños en la forma de la flor, más similares al fenotipo *C. uniflora*.

Por otro lado, teniendo en cuenta el éxito reproductivo mediado por abejas, la altura y el eje morfológico PC1 tienen valores asociados positivos (0,32 y 0,72 respectivamente), lo cual

estaría marcando un aumento en el valor medio de los rasgos y por lo tanto una selección direccional hacia valores más grandes, es decir tendiendo al fenotipo *C. polyrhiza*. Contrariamente en el caso de la DO, su valor asociado es negativo (-0,67) y estaría marcando una tendencia a reducir el valor medio del rasgo, por lo que ejerce una selección direccional hacia valores más pequeños.

Diferenciales cuadráticos de selección

Los tres rasgos experimentan un efecto significativo, o marginalmente significativo, de la selección ejercida por aves, abejas y por ambos animales en forma combinada, según el componente de frecuencia del modelo inflado en cero. La ocurrencia de polinización revela efectos selectivos significativos o marginalmente significativos, con las medidas de éxito reproductivo mediada por aves o por la combinación de ambas clases de animales, para los rasgos DO y eje morfogeométrico PC1. Con la medida de éxito reproductivo mediado por abejas, el componente de ocurrencia solamente tiene efectos marginalmente significativos para la altura de la planta (Fig. 12).

La selección asociada a la altura muestra un diferencial negativo para las tres medidas de éxito reproductivo: -0,08 para la polinización mediada por aves, -0,05 para la polinización mediada por abejas y -0,08 para la polinización combinada de ambos animales. Esto marca un patrón estabilizador, es decir que los individuos con valores medios de los rasgos se verían favorecidos respecto a aquellos con valores extremos. Por el contrario, la selección asociada a la DO, muestra diferenciales positivos para el éxito reproductivo mediado por aves (0,03), por abejas (1,20) y por la combinación de ambos (0,06). Lo mismo sucede con la selección asociada al eje morfológico PC1, que muestra diferenciales positivos para las tres medidas de éxito reproductivo: 0,00 para aves, 2,62 para abejas y 0,07 para la combinación. Esto significa que los individuos con valores extremos de ambos rasgos, se ven favorecidos respecto a aquellos con valores medios, por lo que la selección ejercida es disruptiva con las tres medidas de éxito reproductivo (Fig.13).

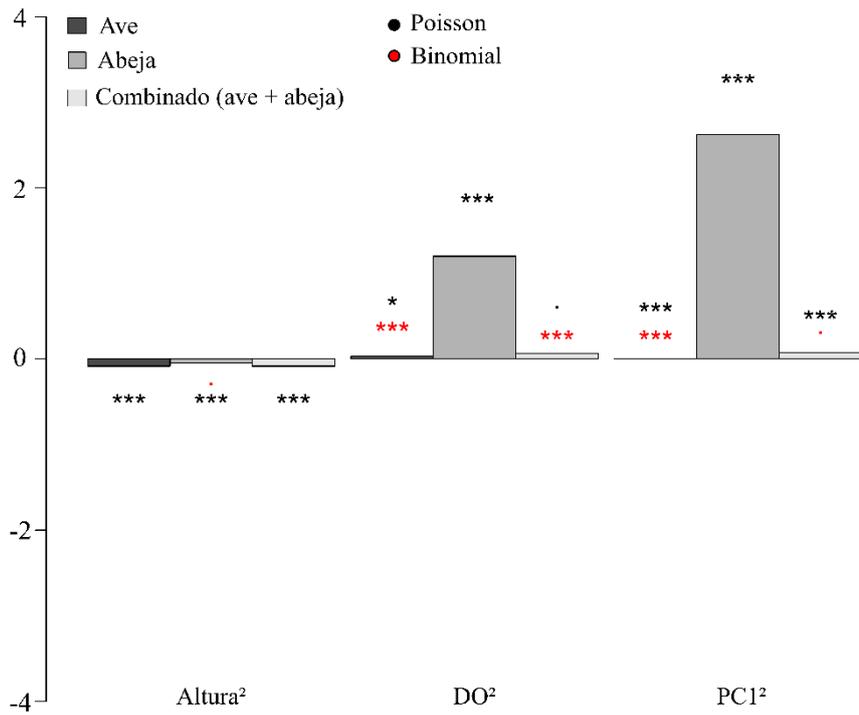


Figura 12. Diferenciales cuadráticos de selección. Referencias: Altura (distancia al suelo de la flor más elevada de la planta), DO (distancia operativa de la flor), PC1 (primer componente principal de un eje morfogeométrico representativo de la forma de la corola).

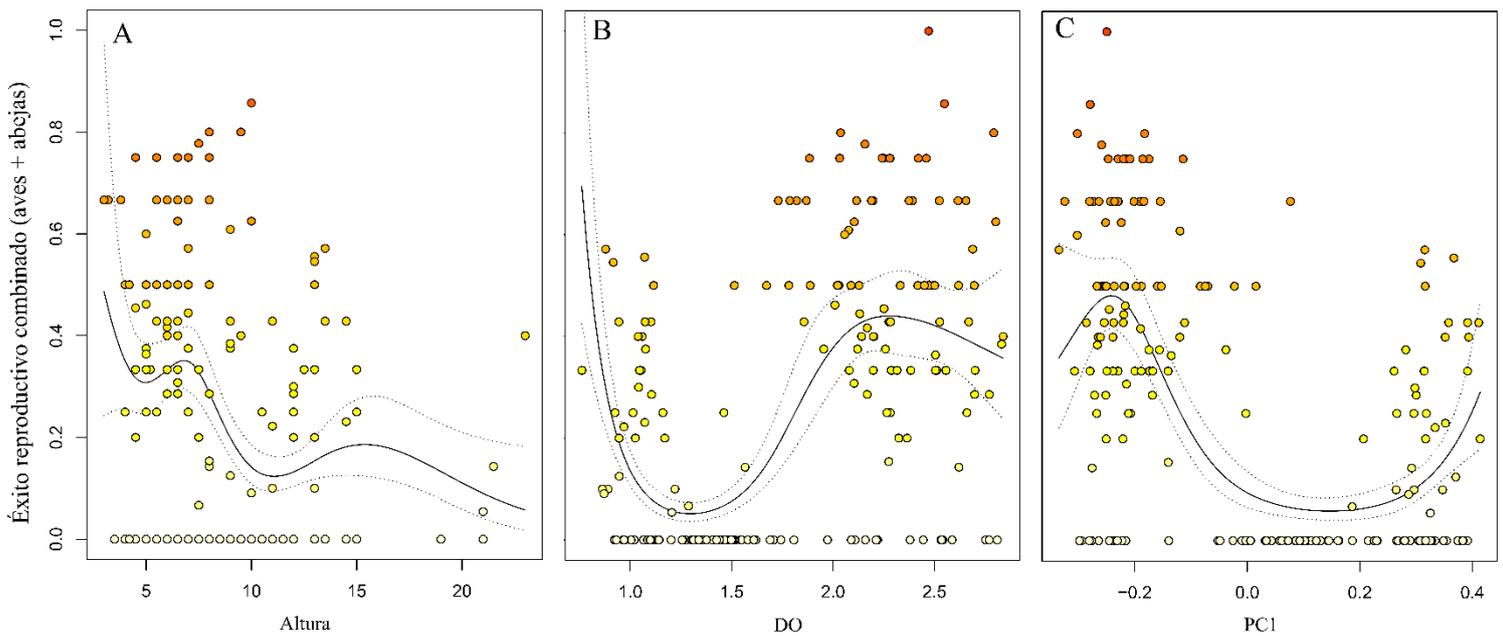


Figura 13. Patrones de selección a partir del éxito reproductivo combinado sobre: A) Altura, B) DO (distancia operativa de la flor) y C) Eje morfológico PC1 (primer componente principal de un eje morfogeométrico representativo de la forma de la corola).

Diferenciales correlacionales de selección

Los resultados muestran diferenciales correlacionales significativos, de signo y magnitud marcadamente distintos entre todos los pares de rasgos, con las tres medidas de éxito reproductivo, en el componente de frecuencia del modelo inflado en cero (Fig 14). Con el componente binomial los diferenciales correlacionales fueron significativos o marginalmente significativos, solamente con las medidas de éxito reproductivo debida a aves y a la combinación de los dos animales. En tanto, con la medida del éxito reproductivo promovido por abeja, los diferenciales no fueron significativos según el componente binomial, en ninguno de los rasgos.

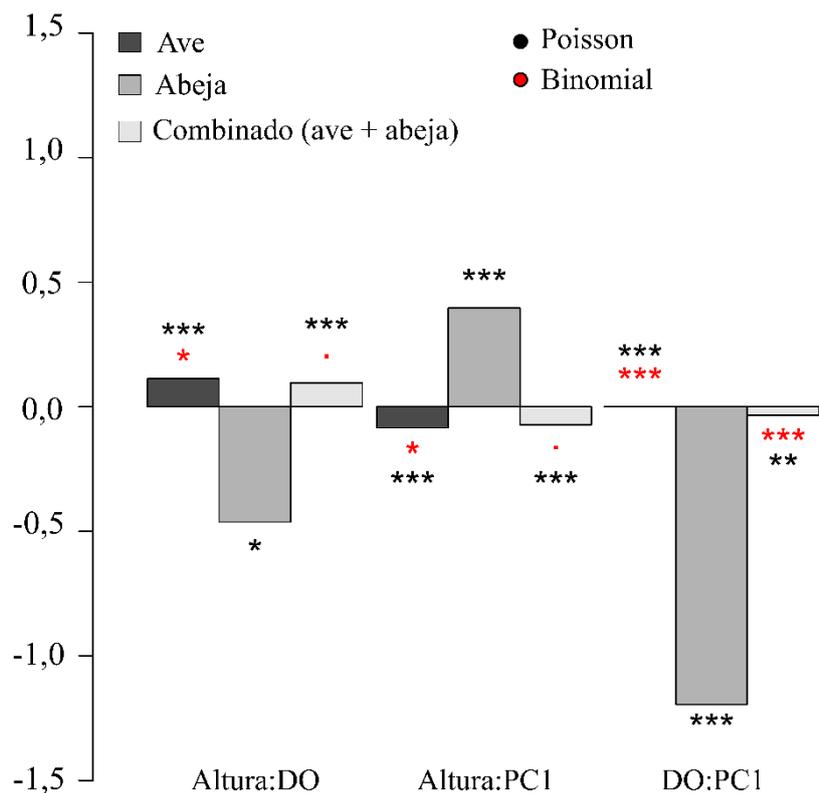


Figura 14. Diferenciales correlacionales de selección. Referencias: Altura (distancia al suelo de la flor más elevada de la planta), DO (distancia operativa de la flor), PC1 (primer componente principal de un eje morfogeométrico representativo de la forma de la corola).

Teniendo en cuenta la medida de éxito reproductivo debida a las aves, existe un gradiente correlacional positivo entre los rasgos altura y la DO (0,11), y entre la DO y el eje morfológico PC1 (0,00). También existe un gradiente correlacional negativo entre la altura y el eje morfológico PC1 (-0,08).

Por otro lado, para la medida de éxito reproductivo debido a las abejas, existe una correlación negativa entre la altura y la DO (-0,46), así como entre el eje morfológico PC1 con la DO (-1,20), y una correlación positiva entre la altura y el eje morfológico PC1 (0,40).

Finalmente, teniendo en cuenta la medida de éxito reproductivo debida al efecto combinado de aves y abejas, existe un gradiente correlacional positivo entre los rasgos altura y la DO (0,10) y un gradiente correlacional negativo entre la altura y el eje morfológico PC1 (-0,07), y entre la DO y el eje morfológico PC1 (-0,03). Las superficies de selección correlacionada se pueden observar en la Figura 15.

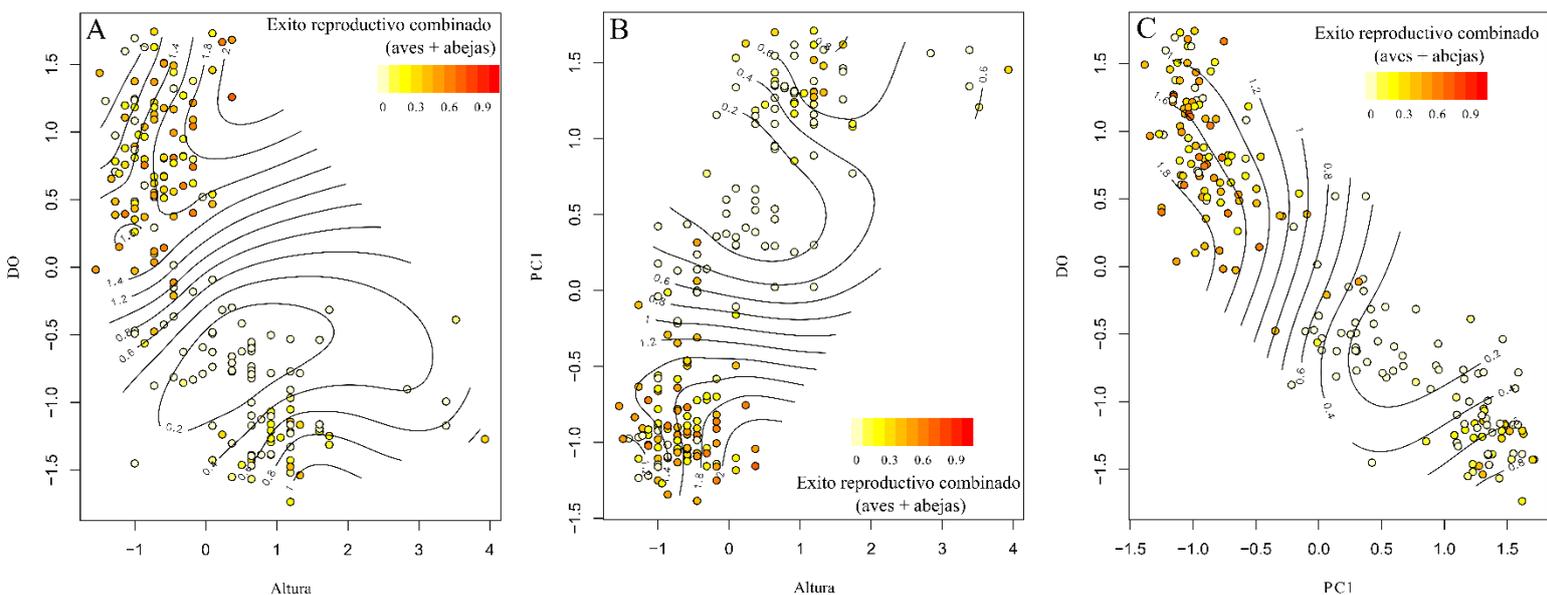


Figura 15. Superficies de selección correlacionada A) entre la DO y la altura, B) entre el eje morfológico PC1 y la altura, C) entre la DO y el eje morfológico PC1. Cada punto representa un individuo y su color demuestra la proporción de flores visitadas por aves y abejas.

Gradientes lineales de selección

Únicamente los rasgos DO y el eje morfológico PC1 muestran un efecto directo significativo en los modelos de selección a través del éxito reproductivo mediado por aves y por la combinación de los dos polinizadores. Esto es, sólo según el componente de frecuencia del modelo inflado en cero. Ningún rasgo muestra efectos directos significativos, a través de la ocurrencia o no de polinización, para las tres medidas de éxito reproductivo.

La DO muestra gradientes negativos asociados tanto al éxito reproductivo mediado por aves como a la combinación de los dos polinizadores (-0,12 y -0,02 respectivamente). A su vez, el eje morfológico PC1 también muestra gradientes negativos asociados a las dos medidas de éxito reproductivo (-0,81 y -0,13 respectivamente). Esto significa que se produciría una disminución en el valor medio de ambos rasgos y, por lo tanto, selección direccional negativa.

Gradientes cuadráticos de selección

La DO ejerce un efecto directo significativo en la ocurrencia o no de la polinización por aves, pero no en la frecuencia. Su valor negativo (-0,19) estaría indicando que los individuos con valores medios del rasgo se ven favorecidos respecto a aquellos con valores extremos. Contrariamente, la altura solamente ejerce un efecto directo en la frecuencia de flores visitadas por aves, pero no en su ocurrencia. Su valor negativo (-0,07) también estaría ejerciendo selección estabilizadora. El eje morfológico PC1 no tiene un efecto significativo ni en la ocurrencia, ni en la frecuencia de la polinización por aves.

Por otra parte, sólo la DO ejerce un efecto directo significativo en la ocurrencia de la polinización por abejas. Su valor negativo (-0,02) estaría ejerciendo selección estabilizadora.

Finalmente, teniendo en cuenta la combinación de los dos polinizadores, los tres rasgos ejercen un efecto directo y significativo en la ocurrencia de la polinización, pero sólo la DO y el eje morfogeométrico PC1 son significativos en la frecuencia de la polinización. La altura muestra un gradiente negativo (-0,08), lo que estaría indicando que los individuos con valores medios del rasgo se ven favorecidos respecto a aquellos con valores extremos. Contrariamente, la DO y el eje morfogeométrico PC1 muestran gradientes positivos (0,06 y 0,07 respectivamente) por lo que los individuos con valores extremos del rasgo se ven favorecidos respecto a aquellos con valores medios.

Gradientes correlacionales de selección

La combinación de los rasgos altura y eje morfológico PC1, produjeron un efecto significativo directo en el modelo de selección, a través de la ocurrencia o no y la frecuencia de visitas por aves. A su vez, la combinación entre el eje morfológico PC1 y la DO produjeron un efecto selectivo directo significativo en la ocurrencia de la polinización por aves y no en su frecuencia.

Por otra parte, la DO y el eje morfológico PC muestran en combinación con la altura, efectos significativos directos y de gran magnitud en los modelos de selección, a través de la visita por abejas. Pero, en este caso, sólo se puede asegurar que los gradientes son significativos para la frecuencia de visitas. No hay datos suficientes para demostrar su significancia en la ocurrencia del evento.

Teniendo en cuenta la combinación de los dos polinizadores, todas las combinaciones de rasgos produjeron un efecto directo significativo, aunque no del mismo signo, tanto para la ocurrencia o no de visitas, como para la frecuencia. En el caso de la combinación entre la altura y la DO, el efecto fue positivo (0,10), por lo que estarían favoreciendo la selección disruptiva; al contrario de las combinaciones entre altura y eje morfológico PC1, y entre altura y DO, que resultaron negativas (-0,07 y -0,03, respectivamente), las cuales estarían favoreciendo la selección estabilizadora de dichos rasgos.

Discusión

Los presentes resultados muestran efectos significativos de la variación de los rasgos sobre el éxito reproductivo mediado por abejas y por aves, ya sea separada o conjuntamente. Tanto las visitas por aves, como por abejas y la combinación de estas, ejercen selección direccional significativa sobre los tres rasgos que mejor describen la variación del fenotipo, a lo largo del enjambre híbrido. Las aves y las abejas ejercen efectos selectivos directos e indirectos de sentidos opuestos sobre estos tres rasgos, según lo demuestran los diferenciales significativos de signos contrarios. Mediante la visita por aves, los valores medios, tanto de la altura de la planta como del principal eje morfogeométrico que resume la forma floral, tienden a disminuir, mientras que los de la distancia operativa tienden a aumentar por efecto de la selección. Esto significa que las aves seleccionan en favor de fenotipos florales similares al parental *C. uniflora*. Por otro lado, mediante la visita por abejas sucede lo contrario, los valores medios de la altura y del eje morfogeométrico tienden a aumentar, mientras que los de la distancia operativa tienden a disminuir. Consecuentemente, las abejas seleccionan en favor de fenotipos florales similares al parental *C. polyrhiza*.

La medida de éxito reproductivo combinada, es decir, aquella que considera la suma de ambos servicios de polinización, tiene un efecto prácticamente igual al éxito reproductivo mediado por aves. Esto sucede ya que el número de registros de visitas por aves es ampliamente superior al de abejas, y por lo tanto las primeras terminan ejerciendo el mayor efecto neto de selección. Por otro lado, la gran magnitud de los diferenciales lineales (ya sean positivos o negativos) asociados al éxito reproductivo mediado por abejas, se debe a la mayor oportunidad de selección resultante de la contrastante intensidad de visitas registradas para estos insectos. Sin embargo, su efecto de selección neto sigue siendo mucho menor que el ejercido por las aves por su baja frecuencia.

Las aves y las abejas, tanto por separado como en combinación, ejercen selección disruptiva sobre la distancia operativa y el eje morfogeométrico, como queda en evidencia por los diferenciales cuadráticos significativos. Contrariamente, la altura de la planta está sujeta a selección estabilizadora a través del éxito de ambos polinizadores tanto separadamente como de forma combinada.

Como conclusión de los efectos directos e indirectos de los rasgos sobre el éxito reproductivo mediado por aves y abejas, tanto de manera separada como combinada, resulta que la hipótesis de partida es solamente respaldada para el caso de la altura de la planta. En cambio, la hipótesis resulta ser falsa para los otros dos rasgos, distancia operativa y eje morfogeométrico. Los patrones observados en estos rasgos respaldan lo contrario, es decir, que los fenotipos intermedios no gozan de un beneficio reproductivo, ni por efecto de las dos clases de polinizadores individualmente, ni por el de ellos combinados. El patrón disruptivo observado indica que extremos en el rango fenotípico del enjambre, semejantes a alguna de las dos formas parentales, son favorecidos en desmedro de los híbridos. Más aún, ambas clases de polinizadores, separadas o de manera conjunta, están favoreciendo distintas combinaciones de rasgos, como queda revelado por los diferenciales correlacionales significativos entre todas las combinaciones de pares de rasgos. Las aves favorecen fenotipos que combinan alturas bajas, distancias operativas grandes y valores bajos del eje morfogeométrico, mientras que las abejas favorecen las combinaciones opuestas. Ello sugiere que, a pesar de la selección estabilizadora sobre la altura, los individuos están siendo seleccionados integradamente. De esta manera son favorecidos fenotipos extremos, también dentro de espacios multidimensionales, que incluyen aspectos combinados de altura, ajuste y forma.

El vínculo directo entre variaciones de los rasgos y del éxito reproductivo se exploró estudiando los gradientes de selección, de manera que el efecto de cada rasgo o combinación de rasgos se presenta libre de la influencia de cualquier otro rasgo o combinación. Dicho análisis, muestra que los efectos disruptivos revelados por los diferenciales cuadráticos serían en realidad,

atribuibles al efecto directo de la selección correlacionada sobre algunas combinaciones de pares de rasgos. Esto resulta en parte, de diferencias en ocurrencia e intensidad de visitas (componentes binomial y Poisson) de ambas clases de polinizadores, en favor de individuos con valores consistentemente altos o bajos en altura y el eje morfogeométrico, pero en desmedro de individuos con valores intermedios de ambos rasgos. Por otro lado, a través de la ocurrencia o no de visitas (componente binomial), se favorecen combinaciones con valores extremos y opuestos en distancia operativa y eje morfogeométrico, nuevamente perjudicando a individuos con combinaciones intermedias. Los efectos correlacionados, que tienen valores altos en los gradientes, siempre mayores en magnitud que los gradientes lineales y cuadráticos, serían los principales responsables directos de los patrones puestos en evidencia por los diferenciales. Los rasgos individualmente experimentan efectos selectivos directos de menor magnitud, y a veces contrarios, a los evidenciados en los diferenciales. Así, la selección estaría actuando sobre fenotipos integrados, favoreciendo más combinaciones de valores de ciertos rasgos, que valores de rasgos individuales. Esos fenotipos divergentes corresponden en este caso a ecotipos de polinización.

El único estudio similar que según nuestro conocimiento se ha realizado sobre la selección del fenotipo floral en enjambres híbridos (Schemske y Bradshaw, 1999), encontró, en consistencia con los presentes resultados, selección direccional en sentidos opuestos, según que ésta fuera ejercida por alguna de las dos clases de polinizadores, picaflores o abejorros. Sin embargo, no se exploró la existencia de patrones de selección disruptiva o correlacional. Como en dicho estudio se detectaron patrones opuestos de selección, dependiente de la clase de polinizador simultáneamente sobre varios caracteres, es probable que la selección disruptiva y correlacional también tuviera lugar. Cabe aclarar que el estudio realizado por estos autores fue llevado adelante con individuos híbridos generados en invernadero, mientras que el presente estudio se desarrolló completamente en un enjambre híbrido natural.

Aún no se tiene la certeza si el sistema introgresivo aquí estudiado se habría originado por un proceso primario o secundario, ya que aún no se puede arrojar luz sobre cómo la selección mediada por polinizadores puede haber promovido un proceso de divergencia, ya sea simpátrico o de refuerzo postcontacto. Permitámonos suponer que en el primer caso, pocas mutaciones en genes de gran efecto en una población ajustada a un polinizador, como lo proponen Schemske y Bradshaw (1999), podrían producir fenotipos que quedarán parcialmente aislados por un aumento en beneficios reproductivos conferidos por otro polinizador. En el segundo caso, la tensión de la zona híbrida obraría produciendo el efecto de refuerzo, acentuando la divergencia entre linajes incipientemente aislados por barreras geográficas ahora levantadas. En el sistema de estudio, la especie predominantemente polinizada por aves, *C. uniflora*, se habría originado de ancestros similares a *C. polyrhiza*, es decir, ajustadas a abejas recolectoras de aceites (Cosacov et al. 2009).

En tal escenario la tensión de la zona híbrida promovería especiación simpátrica. Sin embargo, dicha tensión no sería suficiente para un aislamiento precigótico completo, ya que formas híbridas se producirían continuamente por el flujo génico entre los linajes incipientes, generado por ambas clases de polinizadores. En el presente sistema de estudio las aves, por promover un patrón disruptivo asimétrico, serían las principales responsables tanto de ese flujo como de mantener el aislamiento parcial del ecotipo ornitófilo. Los enjambres híbridos naturales entre *C. uniflora* y *C. polyrhiza* se encuentran en varios otros sitios de contacto entre ambas especies, con diferentes configuraciones de aves polinizadoras. Esto abre el interrogante sobre si los patrones de selección encontrados en este trabajo se mantendrían en mayor o menor medida.

En conclusión, los presentes resultados, contrariamente a lo esperado, restan respaldo a la hipótesis de partida, según la cual fenotipos universalmente adaptados a más de una clase de polinizadores estarían favorecidos por la selección, por gozar de los beneficios sumados de todos los polinizadores.

Agradecimientos

-A Juan Pablo Riquez, dueño de Estancia La Verdadera Argentina por permitir realizar la toma de datos de campo en su propiedad y por proporcionar apoyo logístico durante esa tarea. Se recibió apoyo financiero del subsidio PICT-2012-1553 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica otorgado al Dr. Andrea Cocucci.

- A mis directores Andrea Cocucci y Alicia Sérsic, y la mejor ayudante que me pudo tocar, Ana Ibañez. Gracias por confiar en mí, por guiarme en este camino desconocido, por su interés y vocación en la enseñanza, por acercarme al mundo de la investigación. Gracias por todas las reuniones virtuales en pandemia y por las presenciales en el Laboratorio; por la paciencia, el tiempo y la atención que me brindaron. Espero poder devolverles algo de todo lo que me llevo. Cuenten conmigo siempre.

Bibliografía citada

- Anderson, E. 1949. «Introgressive Hybridization.» *Introgressive Hybridization*.
- Anderson, Edgar, y Leslie Hubricht. 1938. «Hybridization in Tradescantia. Iii. the Evidence for Introgressive Hybridization». *American Journal of Botany* 25 (6): 396-402.
- Bookstein, FL (1997). Herramientas morfométricas para datos de puntos de referencia (p. 455).
- Brodie, Edmund D., Allen J. Moore, y Fredric J. Janzen. 1995. «Visualizing and Quantifying Natural Selection». *Trends in Ecology & Evolution* 10 (8): 313-18.
- Cockayne, L., y H. H. Allan. 1926. «The Naming of Wild Hybrid Swarms». *Nature* 118 (2974): 623-24.
- Cocucci, Andrea Arístides, y Stefan Vogel. 2001. «Oil-Producing Flowers of Sisyrinchium Species (Iridaceae) and Their Pollinators in Southern South America». *Flora* 196 (1): 26-46.
- Cosacov, Andrea, Andrea A. Cocucci, y Alicia N. Sérsic. 2014. «Geographical differentiation in floral traits across the distribution range of the Patagonian oil-secreting Calceolaria polyrhiza: do pollinators matter?» *Annals of Botany* 113 (2): 251-66.
- Cosacov, Andrea, Andrea Cocucci, y Alicia Sersic. 2012. «Variación geográfica de la recompensa floral de Calceolaria polyrhiza (Calceolariaceae): Influencia de factores bióticos y abióticos». *Revista de la Sociedad Argentina de Botánica* 47 (diciembre): 363-73.
- Cosacov, Andrea, Alicia N. Sérsic, Victoria Sosa, J. Arturo De-Nova, Stephan Nylinder, y Andrea A. Cocucci. 2009. «New Insights into the Phylogenetic Relationships, Character Evolution, and Phytogeographic Patterns of Calceolaria (Calceolariaceae)». *American Journal of Botany* 96 (12): 2240-55.
- Emel, Sarah L., Steven J. Franks, y Rachel B. Spigler. 2017. «Phenotypic Selection Varies with Pollination Intensity across Populations of Sabatia Angularis». *New Phytologist* 215 (2): 813-24.
- Fenster, Charles B., W. Scott Armbruster, Paul Wilson, Michele R. Dudash, y James D. Thomson. 2004. «Pollination Syndromes and Floral Specialization». *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35 (1): 375-403.
- Ferreiro, G., M. C. Baranzelli, A. N. Sérsic, y A. A. Cocucci. 2017. «Patterns of Phenotypic Selection for Oil and Nectar in Monttea Aphylla (Plantaginaceae) in a Geographic Mosaic of Interactions with Pollinators». *Flora, Patterns and mechanisms in plant-pollinator interactions*, 232 (julio): 47-55.
- Guillot, Gilles, Frédéric Mortier, y Arnaud Estoup. 2005. «Geneland: A Computer Package for Landscape Genetics». *Molecular Ecology Notes* 5 (3): 712-15.

- Hewitt, Godfrey M. 1988. 'Hybrid Zones-Natural Laboratories for Evolutionary Studies'. *Trends in Ecology & Evolution* 3(7):158–67.
- Hopkins, Robin, y Mark D. Rausher. 2012. «Pollinator-Mediated Selection on Flower Color Allele Drives Reinforcement». *Science* 335 (6072): 1090-92.
- Kalinowski, S. T., y J. H. Powell. 2015. «A Parameter to Quantify the Degree of Genetic Mixing among Individuals in Hybrid Populations». *Heredity* 114 (3): 249-54.
- Key, K. H. L. 1968. «The Concept of Stasipatric Speciation». *Systematic Biology* 17 (1): 14-22.
- Klingenberg, C. P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.* 11:353–357
- Lande, Russell, y Stevan J. Arnold. 1983. «The Measurement of Selection on Correlated Characters». *Evolution* 37 (6): 1210-26.
- Mayer, Carolin, Lynn Adler, W. S. Armbruster, Amots Dafni, Connal Eardley, S.-Q. Huang, P. G. Kevan, et al. 2011. «Pollination Ecology in the 21st Century: Key Questions for Future Research». *Journal of Pollination Ecology* 3 (enero): 8-23.
- Nychka, Douglas, Dorit Hammerling, Mitchell Krock, y Ashton Wiens. 2018. «Modeling and Emulation of Nonstationary Gaussian Fields». *Spatial Statistics*, One world, one health, 28 (diciembre): 21-38.
- Paiaro, Valeria, Andrea A. Cocucci, Gabriel E. Oliva, y Alicia N. Sérsic. 2017. «The role of facultatively nectarivorous birds as pollinators of *Anarthrophyllum desideratum* in the Patagonian steppe: a geographical approach». *Ecología Austral* 027 (03): 312-25.
- Rohlf, F. James, y Dennis Slice. 1990. «Extensions of the Procrustes Method for the Optimal Superimposition of Landmarks». *Systematic Biology* 39 (1): 40-59.
- Rohlf, F. J. 2004. tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.0. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook
- Schemske, Douglas W., y H. D. Bradshaw. 1999. «Pollinator Preference and the Evolution of Floral Traits in Monkeyflowers (*Mimulus*)». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (21): 11910-15.
- Sérsic, A. N., y A. A. Cocucci. 1996. «A Remarkable Case of Ornithophily in *Calceolaria*: Food Bodies as Rewards for a Non-Nectarivorous Bird*». *Botanica Acta* 109 (2): 172-76.
- Sérsic, A. N., M. Mascó, y I. Noy-Meir. 2001. «Natural Hybridization between Species of *Calceolaria* with Different Pollination Syndromes in Southern Patagonia, Argentina». *Plant Systematics and Evolution* 230 (1): 111-24.

- Sérsic, A. N. (2004). Pollination biology in the genus *Calceolaria* L.(Calceolariaceae) (Vol. 82). Biology Centre of the Upper Austrian Museums.
- Swenson, N. G. 2008. «The Past and Future Influence of Geographic Information Systems on Hybrid Zone, Phylogeographic and Speciation Research». *Journal of Evolutionary Biology* 21 (2): 421-34.
- Van der Molen, S., Martínez, NA y González, JR (2007). Introducción a la morfometría geométrica: curso teórico práctico. Universitat de Barcelona. Barcelona, España .
- Van der Niet, Timotheüs, Rod Peakall, y Steven D. Johnson. 2014. «Pollinator-driven ecological speciation in plants: new evidence and future perspectives». *Annals of Botany* 113 (2): 199-212.
- Vogel, S. P. 1974 . Ö l Blumen und olsammelnde Bienen. Tropische und Subtropische Pfl anzenwelt 7 : 1 – 267
- Zeileis, Achim, Christian Kleiber, y Simon Jackman. 2008. «Regression Models for Count Data in R». *Journal of Statistical Software* 27 (julio): 1-25.
- Zelditch, M. L., D. L. Swiderski, and H. D. Sheets. 2012. Geometric morphometrics for biologists: a primer. Academic Press.
- Zuur, A., Ieno, EN y Meesters, E. (2009). Guía de un principiante a R . Springer Science & Business Media.
- Waser, N. M., L.s Chittka, M. V. Price, N. M. Williams, and J. Ollerton. 1996. Generalization in Pollination Systems, and Why It Matters. *Ecology* 77(4):1043–60.
- Wood, S. N. (2008). The mgcv package: GAMs with GCV smoothness estimation and GAMMs by REML/PQL. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Wood, S. N. (2017). Mixed GAM computation vehicle with GCV/AIC/REML smoothness estimation (R package).

Apéndice 1

Listado de landmarks usados en los análisis de morfometría geométrica (vista lateral de la flor):

- **Landmarks de tipo I o anatómicos.**

1: punto extremo distal del labio superior.

2: punto extremo proximal del labio superior.

3: unión del labio superior con el inferior.

6: punto extremo distal del labio inferior.

7: inicio de la lengüeta o el cuerpo carnoso.

8: final de la lengüeta o cuerpo carnoso.

- **Landmarks tipo II o matemáticos:**

4: A 90° de la línea imaginaria entre el LM 2 y 7.

5: A 180° de la línea imaginaria entre el LM 2 y 7.

Apéndice 2

Resultados del análisis de diferenciales para el éxito reproductivo mediado por aves.

Aves						
Diferenciales	Rasgo	beta	z (Poi.)	p	z (Bin.)	p
Lineales	Altura	-0.32	-4.10	0.0000	1.13	0.2564
	DO	0.49	4.83	0.0000	-3.01	0.0026
	PC1	-0.53	-5.69	0.0000	2.77	0.0055
Cuadráticos	Altura ²	-0.08	-3.63	0.0003	-1.06	0.2895
	DO ²	0.03	-2.14	0.0324	-2.73	0.0063
	PC1 ²	0.00	-4.79	0.0000	-2.71	0.0067
Correlacionales	Altura:DO	0.11	4.42	0.0000	2.14	0.0322
	Altura:PC1	-0.08	-4.62	0.0000	-2.26	0.0238
	DO:PC1	0.00	3.06	0.0022	2.82	0.0048

Resultados del análisis de diferencias para el éxito reproductivo mediado por abejas.

Abejas						
Diferenciales	Rasgo	beta	z (Poi.)	p	z (Bin.)	p
Lineales	Altura	0.32	2.89	0.0038	1.91	0.0561
	DO	-0.67	-2.62	0.0088	-1.12	0.2632
	PC1	0.72	3.13	0.0018	1.47	0.1428
Cuadráticos	Altura ²	-0.05	3.49	0.0005	1.70	0.0882
	DO ²	1.20	2.95	0.0031	1.52	0.1275
	PC1 ²	2.62	3.42	0.0006	1.41	0.1590
Correlacionales	Altura:DO	-0.46	-2.24	0.0251	-1.33	0.1827
	Altura:PC1	0.40	3.37	0.0008	1.62	0.1047
	DO:PC1	-1,20	-3.03	0.0025	-1.32	0.1860

Resultados del análisis de diferencias para el éxito reproductivo combinado

Aves + abejas						
Diferenciales	Rasgo	beta	z (Poi.)	p	z (Bin.)	p
Lineales	Altura	-0.30	-3.83	0.0001	1.31	0.1903
	DO	0.45	4.52	0.0000	-3.01	0.0026
	PC1	-0.49	-5.34	0.0000	2.87	0.0041
Cuadráticos	Altura ²	-0.08	-3.43	0.0006	-0.92	0.3576
	DO ²	0.06	-1.83	0.0672	-2.64	0.0082
	PC1 ²	0.07	-3.54	0.0004	-1.83	0.0675
Correlacionales	Altura:DO	0.10	3.66	0.0003	1.65	0.0993
	Altura:PC1	-0.07	-4.12	0.0000	-1.95	0.0516
	DO:PC1	-0.03	2.44	0.0149	2.68	0.0074

Resultados del análisis de gradientes para el éxito reproductivo mediado por aves.

Aves						
Gradientes	Rasgos	beta	z (Poi.)	p	z (Bin.)	p
Lineales	altura.1	0.24	1.34	0.1812	-1.22	0.2210
	DO.1	-0.12	-2.01	0.0443	-1.03	0.3049
	PC1.1	-0.81	-3.85	0.0001	0.25	0.8061
Cuadráticos	altura.1^2)	-0.0739	-2.96	0.0030	-1.10	0.2735
	DO.1^2)	-0.1878	-0.49	0.6251	-2.17	0.0297
	PC1.1^2)	0.8773	-0.57	0.5685	-1.46	0.1433
Correlacionales	altura.1:DO.1	1.90	-0.72	0.4727	0.03	0.9758
	altura.1:PC1.1	1.48	-2.11	0.0351	-1.73	0.0834
	DO.1:PC1.1	-1.48	0.72	0.4699	2.46	0.0139

Resultados del análisis de gradientes para el éxito reproductivo mediado por abejas.

Abejas						
Gradientes	Rasgos	beta	z (Poi.)	p	z (Bin.)	p
Lineales	altura.1	-0.08	-0.34	0.7311	0.41	0.6849
	DO.1	0.02	1.23	0.2183	1.36	0.1727
	PC1.1	0.17	1.48	0.1381	1.10	0.2726
Cuadráticos	altura.1^2)	-0.02	0.30	0.7655	-0.04	0.9695
	DO.1^2)	0.00	-2.26	0.0241	-0.76	0.4459
	PC1.1^2)	0.34	0.47	0.6349	-0.69	0.4884
Correlacionales	altura.1:DO.1	1.56	2.02	0.0432	NaN	NaN
	altura.1:PC1.1	1.54	1.70	0.0885	NaN	NaN
	DO.1:PC1.1	-0.83	0.39	0.6944	1.06	0.2906

Resultados del análisis de gradientes para el éxito reproductivo combinado.

Aves + abejas

Gradientes	Rasgo	beta	z		z	
			(Poi.)	p	(Bin.)	p
Lineales	Altura	0.04	1.12	0.2616	-1.11	0.2676
	DO	-0.02	-1.86	0.0628	-0.91	0.3612
	PC1	-0.13	-3.48	0.0005	0.33	0.7406
Cuadráticos	Altura ²	-0.01	-3.28	0.0011	-1.71	0.0864
	DO ²	-0.03	-0.85	0.3939	-2.52	0.0118
	PC1 ²	0.16	0.48	0.6310	-0.44	0.6598
Correlacionales	Altura:DO	1.95	-0.59	0.5526	-0.34	0.7322
	Altura:PC1	1.53	-1.89	0.0588	-2.22	0.0261
	DO:PC1	-1.56	0.26	0.7947	2.93	0.0034