

**Universidad Nacional de Córdoba**  
**Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**  
**Carrera de Ciencias Biológicas**

Tesina de Grado para optar por el título de Bióloga

**“Sistema reproductivo y nicho de polinización de dos especies simpátricas de *Glandularia* (Verbenaceae)”**

**Tesinista:** Prof. Liliana A. Aguirre

**Directora:** Dra. Marcela Moré

**Co-directora:** Dra. M. Eugenia Drewniak

**Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (CONICET-UNC)**

**Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral**



I M B I V



Córdoba, República Argentina

Junio de 2023

Tesina de Grado para optar por el título de Bióloga

**“Sistema reproductivo y nicho de polinización de dos especies simpátricas de *Glandularia* (Verbenaceae)”**



**Alumna:** Prof. Liliana A. Aguirre

**Directora:** Dra. Marcela Moré

**Co-directora:** Dra. M. Eugenia Drewniak

**Tribunal examinador**

Nombre y Apellido: Dra. Adriana I. Zapata

Firma:

DRA. ADRIANA INÉS ZAPATA  
PROFESORA TITULAR  
INTRODUCCIÓN A LA BIOLOGÍA  
FCEFYN - UNC

Nombre y Apellido: Dr. Franco E. Chiarini

Firma:

Nombre y Apellido: Dra. Silvina Córdoba

Firma:

**SILVINA A. CORDOBA**  
Dra. En Ciencias Biológicas

Calificación: .....

Fecha: 26 / 06 / 2023

*A mi madre:*

*“Por ser tan luchadora y enseñarme que, con esfuerzo,  
perseverancia y resiliencia, se llega al objetivo”.*

## *Agradecimientos*

A Marcela Moré y Eugenia Drewniak, que incondicionalmente me brindaron todo su apoyo en cada momento, para motivarme a continuar con mis estudios y finalizar así el logro de este trabajo. Su paciencia, su tiempo y energía entregada durante este proceso, fueron inmensos. Me enseñaron un mundo de conocimientos que aportaron y aportarán a mi formación tanto en lo personal como en lo profesional. Gracias de todo corazón.

A Constanza Maubecin, por abrirme las puertas del laboratorio, en la primera instancia de ayudantía de investigación, y guiar mis primeros pasos hacia el maravilloso mundo de la lupa, que junto a Andrea Cocucci y Alicia Sércic, con toda su humildad y predisposición, me guiaron a descubrir mi pasión.

Eran incansables mis preguntas a Adriana Zapata, Hernán Becaccece y Eugenia, respecto a cada mariposa que encontraba, que, con paciencia, me enseñaron cada detalle, alentándome a seguir investigando.

Al Instituto Multidisciplinario de Biología Floral (CONICET-UNC), por los recursos de laboratorio brindados, desde el microscopio, lupa, cámara fotográfica, material bibliográfico, hasta los alfileres entomológicos.

Al equipo de Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral, que me brindaron tanto afecto y cariño y me hicieron sentir como en mi hogar. Amables, dispuestos, cálidos, alegres y divertidos, que le dieron ese toque mágico de convivencia.

Fue tan grande la gratificación que encontré, al descubrir la relación de las especies de plantas con los polinizadores, que quería llenar mi pueblo con canteros sólo de “verbena” y “chuscos”, y lograr comprender a través de ellos la importancia de la Ciencia Ciudadana.

A mi amado esposo Carlos Belli, compañero y cazador de mariposas, que sin su paciencia y ayuda, no hubiera sido posible mi tarea a campo. Gracias por todo.

A mis amigas del alma, Ana María Lema Rivas y Carolina Otero, por confiar en el logro de este trabajo y darme ese empujón a seguir, siempre para adelante. A mi amigo Carlos Aspitia “Vampi” por aguantar mis locuras. A mis compañeros/as de la Facultad de Ciencias

Exactas Físicas y Naturales, por tantas horas y mates compartidos.

A la Universidad Nacional de Córdoba, por la formación de tan valiosos recursos humanos e impartir nuevos conocimientos, que me enseñaron a superar los miedos y enfrentar cada desafío nuevo de conocimiento.

Pero por sobre todo a mi Padre, físicamente ausente, que fue el motor para emprender mis estudios superiores. A mi madre, que con tanto esfuerzo y sacrificio luchó para que pudiera avanzar en mi carrera y me daba aliento cada vez que aflojaba. A mi hermano, por estar allí siempre.

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	<b>7</b>
<b>Summary</b> .....	<b>8</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Materiales y Métodos</b> .....	<b>12</b>
2.1 Sistema de estudio.....	12
2.2 Sitio de estudio .....	13
2.3 Sistema reproductivo de <i>G. peruviana</i> y <i>G. venturii</i> .....	14
2.4 Caracterización del ensamble de polinizadores efectivos y cuantificación de tasas de visita.....	16
2.5 Nicho de polinización realizado de las especies de <i>Glandularia</i> .....	17
2.6 Medición de rasgos funcionales.....	18
2.6.1 <i>Caracterización del fenotipo floral: atracción y       ajuste morfológico flor-polinizador</i> .....	18
2.6.2 <i>Longitud de probóscide del ensamble de polinizadores</i> .....	20
2.7 Aislamiento reproductivo en <i>G. peruviana</i> y <i>G. venturii</i> .....	21
2.7.1 <i>Mecánico</i> .....	21
2.7.2 <i>Etológico</i> .....	21
<b>3. Resultados</b> .....	<b>22</b>
3.1 Sistema reproductivo de <i>G. peruviana</i> y <i>G. venturii</i> .....	22
3.2 Nicho de polinización realizado: ensamble de polinizadores efectivos y tasas de visita .....	23
3.3 Rasgos funcionales y mecanismos de aislamiento reproductivo entre ambas especies de <i>Glandularia</i> .....	24
<b>4. Discusión</b> .....	<b>28</b>
<b>5. Conclusiones</b> .....	<b>35</b>
<b>6. Referencia Bibliografía</b> .....	<b>36</b>
<b>7. Anexo</b> .....	<b>40</b>

## **Sistema reproductivo y nicho de polinización de dos especies simpátricas de *Glandularia* (Verbenaceae)**

### **RESUMEN**

El sistema reproductivo, los rasgos florales y el ensamble de polinizadores están estrechamente relacionados y son componentes esenciales del nicho de polinización de las angiospermas. En este trabajo, se evaluó si el nicho de polinización realizado de dos especies simpátricas de *Glandularia* cuyas flores presentan igual arquitectura floral, pero difieren en la coloración de la corola y el largo del tubo corolino, se particiona por el uso diferencial de las especies de polinizadores presentes en la comunidad. El estudio se realizó en una comunidad del Bosque Chaqueño Serrano de las Sierras Chicas en la localidad de La Granja (Córdoba, Argentina), donde *G. peruviana* y *G. venturii* crecen en parches mixtos. Se efectuó un ensayo de sistema reproductivo con dos tratamientos, para conocer si ambas especies dependen de la visita de polinizadores en la formación de frutos y semillas. Se caracterizaron los componentes del nicho de polinización (rasgos florales y el ensamble de polinizadores) con el fin de determinar si la divergencia en el fenotipo floral fomenta la especialización en el uso de polinizadores. En particular, se evaluó si el ajuste funcional flor-polinizador actúa como una barrera mecánica que promueve la interacción sólo con aquellos polinizadores con aparatos bucales de un largo tal que le permite acceder al néctar. Los resultados del sistema reproductivo mostraron que ambas especies de *Glandularia* dependen de la visita de polinizadores para la producción de frutos y semillas. El ensamble de polinizadores se conformó por 15 especies de mariposas pertenecientes a cinco familias: HesperIIDae (4 spp.), Lycaenidae (1 spp.), Nymphalidae (5 spp.), Pieridae (4 spp.) y Riodinidae (1 spp.). De estas especies, nueve visitaron a *G. peruviana*, doce a *G. venturii* y seis especies fueron comunes a ambas. Se detectó una superposición parcial del nicho de polinización de ambas especies. Mecanismos de aislamiento mecánico y etológico, reducen parcialmente el flujo de polen interespecífico mediado por las especies de mariposas del ensamble presente en la comunidad. Estos resultados sugieren que el solapamiento parcial del nicho de polinización entre especies simpátricas, podría haber generado el intercambio de polen interespecífico que condujo a la formación de híbridos naturales que esporádicamente se observaron en la comunidad estudiada.

**Palabras clave:** aislamiento floral, ajuste morfológico flor-polinizador, ensamble de polinizadores, *Glandularia peruviana*, *Glandularia venturii*, interacción planta-polinizador, sistema reproductivo, nicho de polinización.

## SUMMARY

The reproductive system, floral traits and pollinator assemblage are closely related and are essential components of the pollination niche of angiosperms. In this work, we assessed whether the realised pollination niche in two sympatric species of *Glandularia*, whose flowers have the same floral architecture but differ in corolla colouration and corolla tube length, is partitioned by the differential use of pollinator species present in the community. The study was conducted in a community of the mountain Chaco woodlands of “Sierras Chicas” in the locality of La Granja (Córdoba, Argentina) where *G. peruviana* and *G. venturii* grow in mixed patches. A two-treatment reproductive system test was carried out to determine whether both species depend on pollinator visits for fruit and seed formation. Components of the pollination niche (floral traits and pollinator assemblage) were characterised to determine whether divergence in floral phenotype promotes specialisation in pollinator use. In particular, we assessed whether flower-pollinator functional fit acts as a mechanical barrier that promotes interaction only with those pollinators with mouthparts of a length that allows access to nectar. Results from the reproductive system showed that both *Glandularia* species depend on pollinator visits for fruit and seed production. The pollinator assemblage consisted of 15 butterfly species belonging to five families: HesperIIDae (4 spp.), Lycaenidae (1 spp.), Nymphalidae (5 spp.), Pieridae (4 spp.) and Riodinidae (1 spp.). Of these species, nine species visited *G. peruviana*, twelve visited *G. venturii* and six species were common to both. A partial overlap of the pollination niche of both species was detected. Mechanical and ethological isolation mechanisms partially reduce the interspecific pollen flow mediated by the butterfly species of the assemblage present in the community. These results suggest that the partial overlap of the pollination niche between sympatric species could have generated the interspecific pollen exchange that led to the formation of natural hybrids that were sporadically observed in the studied community.



**Key words:** Floral isolation, flower-pollinator morphological trait matching, pollinator assemblage, *Glandularia peruviana*, *Glandularia venturii*, plant-pollinator interaction, reproductive system, pollination niche.

## 1. INTRODUCCIÓN

El aislamiento reproductivo determina la integridad genética entre especies de plantas estrechamente relacionadas que coexisten y dependen de la visita de polinizadores para formar frutos, ya que impide los cruzamientos interespecíficos (Dobzhansky, 1970). En especies de plantas simpátricas que florecen sincrónicamente, el éxito reproductivo puede reducirse si los polinizadores que visitan las flores de una determinada especie, depositan polen heteroespecífico en los estigmas (Moreira-Hernández y Muchhala, 2019). En estas especies, pueden presentarse diferentes estrategias que previenen el depósito de polen impropio en los estigmas. Así, el aislamiento reproductivo precigótico puede ser mecánico, cuando diferentes arquitecturas y/o tamaños florales determinan un depósito diferencial de polen sobre el cuerpo del polinizador, o etológico, cuando la divergencia en rasgos florales, como el color de la corola, promueve la visita diferencial de grupos de polinizadores con diferentes habilidades sensoriales y cognitivas (Grant, 1994; Hodges y Arnold, 1994; García *et al.*, 2022).

La divergencia en los rasgos florales (*e.g.* color, tamaño o forma) podría aliviar la competencia entre especies de plantas simpátricas, si fomenta la especialización en el uso de polinizadores (Pauw, 2013). De este modo, la divergencia en el fenotipo floral (*i.e.* rasgos individuales o la combinación de ellos), promovería el entrecruzamiento selectivo entre individuos manteniendo el aislamiento reproductivo entre las especies coexistentes (Willmer, 2011; van der Niet *et al.*; 2014). Sin embargo, en ciertas ocasiones estas barreras precigóticas pueden fallar y ocurrir transferencia interespecífica de polen, aún entre especies que son polinizadas por diferentes grupos funcionales (*e.g.* Sérsic *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 2016; Rubini-Pisano, 2019). De esta manera, la ausencia de barreras postcigóticas que prevengan la fecundación y desarrollo del embrión, puede conducir a la formación de híbridos naturales (Arnold, 1997; Antinao Canelo, 2019).

Las plantas con flores presentan diversas estrategias reproductivas, que se extienden desde la reproducción asexual (propagación sin la producción de semillas), hasta la reproducción sexual (multiplicación mediante la unión de gametas). La producción de

semillas puede darse por autogamia (la flor se poliniza con su propio polen) o por exogamia (la flor solo se poliniza con polen de otros individuos). Es frecuente que el sistema reproductivo varíe entre poblaciones de una especie, y se presume que podría estar vinculado a influencias ecológicas específicas como la variación en la disponibilidad de los animales polinizadores entre sitios y estaciones (Whitehead *et al.*, 2018). Por su parte, los polinizadores también exhiben tanto diferencias morfológicas como conductuales (*e.g.* estrategias de forrajeo y preferencias florales), las que se reflejarían en su eficiencia y efectividad en el servicio de polinización (Salinas-Sánchez, 2014 y referencias allí citadas). Se considera que los vectores de polen son un componente crítico del nicho de las plantas con flores, ya que la mayoría de las especies dependen de la polinización biótica para la reproducción y la persistencia de sus poblaciones (Johnson, 2010).

El sistema reproductivo, los rasgos florales y el ensamble de polinizadores están estrechamente relacionados y son componentes esenciales del nicho de polinización de las plantas (Antinao Canelo, 2019). El nicho de polinización realizado, está conformado por las interacciones planta-polinizador que efectivamente ocurren a nivel de la comunidad. Estas se ven afectadas tanto por la competencia entre las especies de plantas, por la abundancia de polinizadores disponibles, como por las preferencias, comportamiento y eficiencia de los diferentes tipos de polinizadores. El solapamiento del nicho de polinización entre especies hermanas que coexisten (*i.e.* al compartir un vector que deposite polen heteroespecífico en los estigmas) podría ocasionar que las barreras reproductivas sean débiles, dando la oportunidad de formar híbridos (Antinao Canelo, 2019; Phillips *et al.*, 2020).

El color, tamaño y morfología de las flores afectan el proceso de polinización tanto por la atracción diferencial que ejercen, como por el encaje funcional, ya que influyen en el modo en el que el polinizador accederá a la recompensa y determinan en qué región del cuerpo se depositará el polen (Fenster *et al.*, 2004; Kaczorowski *et al.*, 2012). Las capacidades sensoriales y el comportamiento de los polinizadores constituyen un ambiente de selección clave ya que la partición del nicho de polinización refuerza el aislamiento reproductivo entre especies coexistentes a nivel comunitario (Schiestl y Johnson 2013; Phillips *et al.*, 2020).

Bajo este escenario, se estudia el sistema reproductivo y nicho de polinización de dos especies de *Glandularia* J. F. Gmel. que crecen en simpatria en un amplio rango de distribución en Argentina, *Glandularia peruviana* (L.) Small y *Glandularia venturii*

(Moldenke) Botta. En comunidades naturales es común observar parches mixtos de las dos especies en flor, pero solo en raras ocasiones se ha detectado la presencia de unos pocos individuos que muestran fenotipos vegetativos y florales intermedios que se presume serían híbridos naturales entre ambas especies (Aguirre LA y Drewniak ME, observaciones personales en las localidades de La Granja y La Calera respectivamente). Existe evidencia que *G. peruviana* es auto-incompatible en algunas poblaciones del centro de Argentina (Imhof *et al.*, 2010) y es visitada por diferentes especies de mariposas diurnas (Drewniak *et al.*, 2022) pero se desconoce el sistema reproductivo de *G. venturii* y el ensamble de polinizadores. Las inflorescencias de copa plana de muchas especies de verbenáceas son frecuentemente polinizadas por mariposas, ya que les brindan una plataforma de aterrizaje que les permite asentarse para libar (Willmer, 2011). Aunque se conoce que las mariposas tienen la capacidad de responder al color y aprender nuevas asociaciones entre el color y las recompensas del néctar (Weiss, 1997; Briggs *et al.*, 2018), la mayoría de las investigaciones se basan en observaciones de una o unas pocas especies de mariposas criadas en cautiverio y en condiciones experimentales utilizando flores artificiales.

En base a los antecedentes expuestos, se propone evaluar si el nicho de polinización en estas dos especies de verbenáceas, cuyas flores presentan similar arquitectura floral, pero difieren en la coloración de la corola y en el largo del tubo corolino, se particiona por el uso diferencial de las especies de polinizadores presentes en la comunidad. Para esto se plantean los siguientes objetivos particulares: i) Determinar si *G. peruviana* y *G. venturii* dependen de la visita de polinizadores para su éxito reproductivo, ii) Caracterizar los componentes del nicho de polinización (rasgos florales y ensamble de polinizadores) de *G. peruviana* y *G. venturii* y iii) Establecer si existen mecanismos de ajuste funcional flor-polinizador (barrera mecánica) y/o de comportamiento diferencial de visita de los polinizadores efectivos (barrera etológica). Si ambas especies presentan un sistema auto-incompatible, se espera que las plantas produzcan frutos y semillas al ser visitadas por el ensamble de polinizadores locales, mientras aquellas en las que los polinizadores sean excluidos no los produzcan. Se espera que las diferencias en rasgos florales entre *G. peruviana* y *G. venturii*, promuevan el aislamiento reproductivo mecánico evitando la transferencia de polen impropio (*i.e.* ajuste funcional entre el largo del tubo floral y la probóscide de los polinizadores) y/o etológico (comportamiento diferencial de visita de los integrantes del ensamble de polinizadores como consecuencia de diferentes preferencias). En el caso de encontrar un solapamiento en los nichos de polinización, las especies de

*Glandularia*, aunque tengan rasgos florales distintos, compartirían polinizadores, lo que podría ocasionar el transporte de polen inter-específico, y eventualmente conducir a la formación de híbridos naturales.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Sistema de estudio

Se estudió el sistema reproductivo y nicho de polinización de dos especies del género *Glandularia* J. F. Gmel. Este género de la familia Verbenaceae se distribuye exclusivamente en América y está conformado aproximadamente por 84 especies, con 36 especies presentes en Argentina. Las flores se disponen en espigas densas multifloras con un raquis alargado en la fructificación (Múlgura *et al.*, 2012). Las especies de *Glandularia* presentan flores perfectas, de corolas hipocrateriformes, de limbo extendido y pentálobado. El androceo está formado por cuatro estambres didínamos con apéndices glandulares, adnatos en la mitad superior del tubo corolino. El gineceo está formado por un ovario bicarpelar, bilocular, con 2 óvulos por carpelo con estilo filiforme y estigma bilobado. El fruto es seco, y a la madurez se divide en 4 clusas cilíndricas de ápice redondeado, por lo que cada fruto produce un máximo de 4 semillas (Múlgura *et al.*, 2012).

Las dos especies aquí estudiadas, coexisten en un amplio rango de distribución (Múlgura *et al.*, 2012). *Glandularia peruviana* conocida como "verbena roja" o "margarita punzó", es una especie nativa de muy amplia distribución en el centro y norte de la Argentina. Habita en suelos con afloramientos rocosos, pedregosos y arenosos, en bordes de camino y campos abiertos, hasta los 1000 m de altura (Múlgura *et al.*, 2012). Es una hierba perenne, rastrera y con inflorescencias terminales de entrenudos cortos. Presenta flores de color rojo carmín con la boca del tubo corolino rodeada de pilosidad blanca (Fig. 1A). Florece desde septiembre hasta marzo (Sérsic *et al.*, 2021). Por su parte, *G. venturii*, conocida como "primavera" o "yerba del incordio", es endémica del centro y noroeste de Argentina donde habita en suelos arenosos, pedregosos y laderas rocosas, entre los 350 y 3500 m (Múlgura *et al.*, 2012). Es una hierba perenne, rastrera y con inflorescencias erectas en espiga densa. Se caracteriza por la pubescencia hispido-glandulosa en tallos, hojas, brácteas y cálices. Presenta flores de color lila o violeta con la boca del tubo corolino rodeada de abundante pilosidad blanca (Fig. 1B). Florece desde septiembre hasta marzo

(Sérsic *et al.*, 2021). En la comunidad estudiada, también se observaron tres individuos con características vegetativas y florales intermedias entre ambas especies que crecían en parches donde estaban presentes individuos de las dos especies de *Glandularia*, y que podrían ser híbridos naturales (O'Leary N., comunicación personal). Estos individuos presentaron variación en el color de las flores al ojo humano desde rosa pálido hasta rosa intenso. De aquí en adelante estos individuos serán mencionados como híbridos naturales, aunque es necesario realizar estudios genéticos y citogenéticos para confirmarlo.



**Figura 1: Sistema de estudio: A:** Vista general de *Glandularia peruviana*. **B:** Vista general de *Glandularia venturii*. Los círculos muestran una inflorescencia de *G. peruviana* y *G. venturii*.

## 2.2 Sitio de estudio

El estudio se realizó en una comunidad del Bosque Chaqueño Serrano de las Sierras Chicas en la localidad de La Granja (provincia de Córdoba, Argentina) (31° 0' 56,13" S; 64° 16' 14,32" O, 750 m) donde *G. peruviana* y *G. venturii* coexisten (Fig. 2A). La localidad presenta el período de máximas precipitaciones desde septiembre a marzo con un promedio anual de 725 mm y una temperatura media anual de 13,9 °C (Giorgis *et al.*, 2011). Se consideraron dos puntos de muestreo, el primero ubicado en un ambiente modificado cerca de la ruta, y el segundo, ubicado a una distancia de 1,4 km del primero, en un ambiente sin modificar. Estos puntos se seleccionaron por estar presentes las dos especies conformando parches mixtos. El trabajo se realizó durante el pico del período de floración de las dos especies, comprendido entre octubre 2016 y marzo 2017.

Con respecto a la riqueza de lepidópteros diurnos en ambientes serranos del centro de Argentina, se han reportado la presencia de 136 especies (Núñez-Bustos y Volkmann, 2011). Estudios recientes, en una superficie más reducida de Bosque Serrano en Río Ceballos, Córdoba, se encontraron 53 especies (Beccacece *et al.*, 2012).

## 2.3 Sistema reproductivo de *G. peruviana* y *G. venturii*

Con el fin de determinar en qué medida el éxito reproductivo de *G. peruviana* y *G. venturii* depende de la visita de polinizadores, se realizaron dos tratamientos: i) autopolinización espontánea (AE) y ii) polinización libre (PL). El tratamiento AE consistió en excluir a los polinizadores mediante el embolsado de pimpollos a punto de abrir, utilizando bolsa de tela voile. Por su parte, en el tratamiento PL se marcaron inflorescencias abiertas que estaban a disposición de los polinizadores en condiciones naturales (Fig. 2A).

Durante la época de floración, se realizaron de forma simultánea los dos tratamientos en cada individuo, tanto en *G. peruviana* (N=11) como en *G. venturii* (N=12). Se seleccionaron en cada individuo, 3 botones florales y se aplicó AE y en 3 inflorescencias abiertas PL.

Transcurrido el tiempo de fructificación (unos 20-25 días), se colectaron las inflorescencias maduras de cada tratamiento y se colocaron en sobres de papel previamente etiquetados (Fig. 2B). En el laboratorio, bajo la lupa, se contó por cada inflorescencia, el número de frutos y flores. El número total de flores por inflorescencia se calculó contando tanto el número de flores, el número de brácteas que aún permanecían en el raquis y el número de cicatrices que dejaban las brácteas secas ya caídas. En cada tratamiento se

registró el número de flores por inflorescencia que formaron y no formaron frutos y el número total de semillas formadas por fruto y por inflorescencia (Fig. 2C-D).

Se calcularon dos variables de éxito reproductivo: i) proporción de fructificación (número total de frutos producidos / número total de flores) y ii) número de semillas totales por fruto. Se calculó el promedio de la proporción de fructificación (PF) y el promedio de semillas formadas por fruto (PS) para AE y PL de ambas especies de *Glandularia*. Se asumió que la proporción de fructificación es un estimador de la intensidad de la polinización y el número medio de semillas por fruto es un estimador de la calidad del cruzamiento (Issaly *et al.*, 2020).

Las diferencias en cada una de las variables del éxito reproductivo (PF y PS) entre tratamientos (AE y PL) para cada especie de *Glandularia*, se analizaron mediante la prueba estadística no paramétrica de *Wilcoxon* para muestras apareadas. Se usó esta prueba ya que la distribución de los errores no es normal (prueba de Shapiro-Wilks,  $p < 0,05$ ). Esta comparación pareada permitió evaluar el grado de dependencia de cada especie de *Glandularia* del ensamble de los polinizadores presentes en la comunidad para la formación de frutos y semillas. La significancia entre las diferencias en la proporción de fructificación y promedio de semillas por fruto entre *Glandularia peruviana* y *G. venturii*, se examinó mediante una prueba de *Wilcoxon* para muestras independientes. Estos análisis se realizaron con el programa estadístico Infostat versión libre (Di Rienzo *et al.*, 2020).

Se evaluó el grado de auto-incompatibilidad de las dos especies de *Glandularia* estudiadas, a través del índice de auto-incompatibilidad (ISI). El ISI se estimó como la relación entre el éxito reproductivo que resultó de la autopolinización espontánea (AE) versus polinización libre (PL) (Ruiz-Zapata y Arroyo, 1978). Se calculó tanto para la proporción de fructificación como para la proporción de semillas. Los valores de este índice varían entre 0 (completamente auto-incompatibles) y 1 (completamente auto-compatibles).



**Figura 2: Sistema reproductivo:** **A:** Tratamiento de autopolinización espontánea (AE) y polinización libre (PL) en *G. venturii*. **B:** Recolección de inflorescencia madura para contabilizar frutos formados por inflorescencia en la madurez. **C:** Brácteas con y sin frutos formados en una inflorescencia madura. **D:** Semillas de un fruto tetra-seminado de *G. venturii*, se observan dos semillas desarrolladas (derecha) y dos no desarrolladas (izquierda).

## 2.4 Caracterización del ensamble de polinizadores efectivos y cuantificación de tasas de visita

Se registró el elenco de polinizadores de cada especie, mediante observaciones directas en días soleados entre las 10 y 17 hs, por ser la franja horaria de mayor actividad de los visitantes diurnos durante el periodo de floración de ambas especies de *Glandularia* (Drewniak, 2022). La determinación de las especies de polinizadores efectivos (*i.e.* aquellos visitantes florales que se posaban en la flor y libaban néctar introduciendo su aparato bucal en el tubo corolino, promoviendo la remoción del polen de las anteras y



depositándolo luego en el estigma), fue confirmada con la toma de fotografías y videos. Se capturaron 47 ejemplares representativos del elenco de polinizadores con una red entomológica (37 capturados mientras visitaban flores de *G. peruviana* y 10 mientras visitaban flores de *G. venturii*), que luego en el laboratorio se acondicionaron e identificaron taxonómicamente con ayuda de bibliografía especializada.

En total se realizaron 16 hs de registro visual a lo largo de la temporada de floración en *G. venturii* y *G. peruviana*, con N=20 y N=18 periodos de observación de 20 minutos respectivamente. Se cuantificó la cantidad total de inflorescencias y el número de flores abiertas por inflorescencia de cada especie de *Glandularia*. Se registró la identidad de los polinizadores y el número de flores visitadas en parches donde crecían individuos de las dos especies.

Se calculó la tasa de visita floral como el cociente entre el número de flores visitadas por cada especie de polinizador y el número total de flores observadas en cada período de observación. Las observaciones de tasa de visita se realizaron en un total de 5741 flores (1156 inflorescencias) en *G. venturii* y 2419 flores (537 inflorescencias) en *G. peruviana*. Se calculó el promedio de visita total por flor (*i.e.* incluyendo a todos los visitantes del ensamble) y el promedio de cada especie de polinizador (Anexo Tabla 1). La significancia entre las diferencias en la tasa de visita entre *Glandularia peruviana* y *G. venturii*, tanto de todo el ensamble, como la de aquellas especies que visitaron ambas especies, se examinó mediante una prueba de *Wilcoxon* para muestras independientes, como se implementa en el programa estadístico Infostat versión libre (Di Rienzo *et al.* 2020).

## **2.5 Nicho de polinización realizado en las especies de *Glandularia***

A partir de los valores obtenidos de la tasa de visita (ver sección 2.4), se construyó una matriz de interacción cuantitativa planta-polinizador, donde los vectores fila representan las especies de *Glandularia* (i) y los vectores columna representan las especies de polinizadores locales (j). Así, cada celda de la matriz representa la interacción ( $N_{ij}$ ) entre una especie de polinizador y una especie de *Glandularia*, y que está dada por la tasa de visita promedio por flor por período de observación. Esta matriz se representó gráficamente como una red bipartita que facilita la visualización de las interacciones que realmente ocurren en la comunidad (Jordano *et al.*, 2009). La red de interacción cuantitativa *Glandularia*-polinizador se graficó utilizando la función *plotweb* del paquete ‘bipartite’ (v.2.18) (Dormann *et al.*, 2009) del programa estadístico R 4.2.2 (R Core Team, 2022).

Todos los análisis realizados con el programa R se hicieron a través de la interfaz gráfica RStudio Versión 1.6.0 (RStudio Team, 2020).

Con los valores de las tasas de visitas a las flores, se calculó el índice de similitud proporcional (SP) del ensamble de polinizadores efectivos (Smith *et al.*, 2008), para analizar en qué grado *G. peruviana* y *G. venturii* se superponen en el uso de las especies de polinizadores del ensamble presente en la comunidad estudiada. Este índice tiene en cuenta tanto la cantidad de especies compartidas del ensamble como su frecuencia de visita. PS se calcula como  $1 - \frac{1}{2} \sum (P_{ai} - P_{bi})$ , donde  $P_{ai}$  y  $P_{bi}$  son las proporciones del total de tasas de visita realizada por la *i*-ésima especie de polinizador del ensamble a las especies de planta *a* (*G. peruviana*) y *b* (*G. venturii*), respectivamente. Los valores de PS varían de 0 a 1, valores cercanos a 1 indican superposición en el nicho de polinización (*i.e.* una mayor similitud proporcional) y valores cercanos a 0 indican una partición del nicho de polinización (*i.e.* una menor similitud proporcional) de las especies de *Glandularia*.

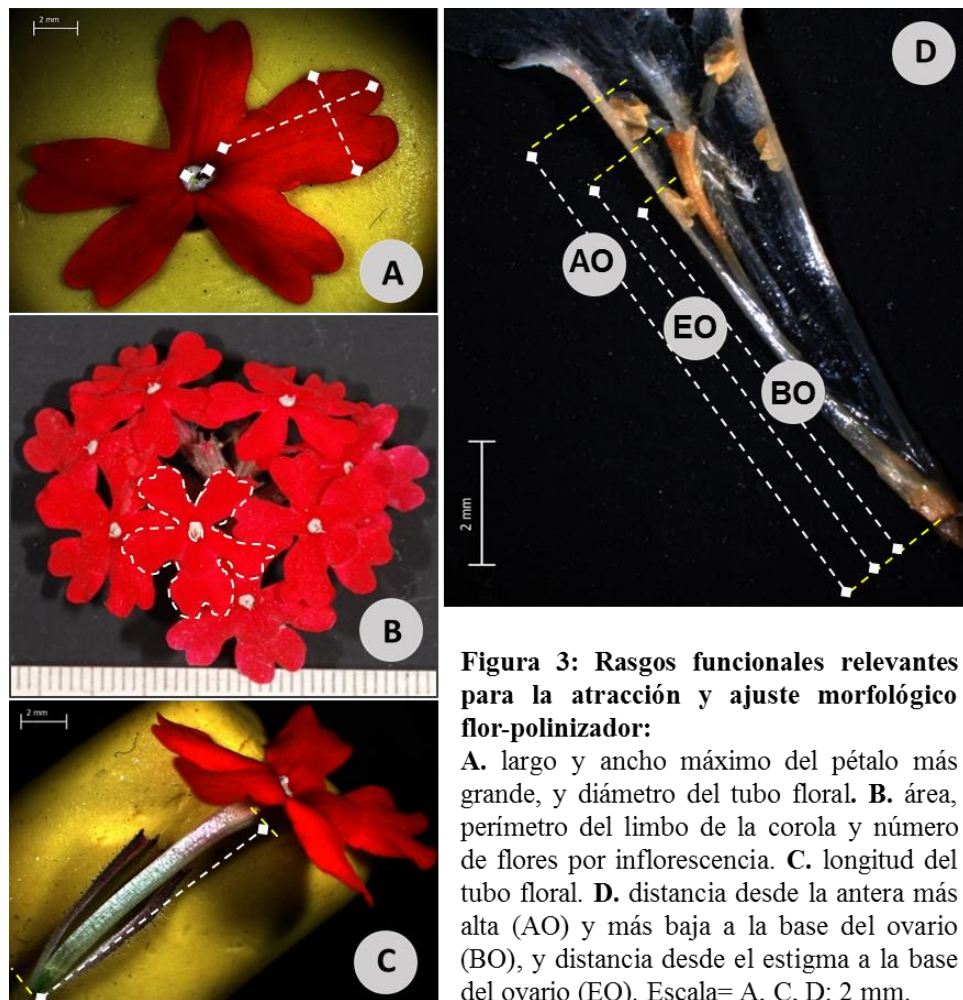
A nivel de especies, se obtuvo el grado (*i.e.* número de enlaces de cada especie), y la dependencia (d) de las especies de *Glandularia* (P) por las especies del ensamble de polinizadores, se calcula como  $d_{ij}^P = N_{ij}/N_i$  donde ( $N_{ij}$ ) es el número de interacciones observadas entre una especie de polinizador (*j*) y una especie de *Glandularia* (*i*) y  $N_i$  indica el número total de interacciones registrada por la especie de planta (*i*). Con la suma de dependencia de cada *Glandularia*, se obtuvo la fuerza de la especie de polinizador (Jordano *et al.*, 2009). Las métricas fueron calculadas con el paquete ‘bipartite’ (v.2.18) (Dormann *et al.*, 2008).

## 2.6 Medición de rasgos funcionales

### 2.6.1 Caracterización del fenotipo floral: atracción y ajuste morfológico flor-polinizador

Con el fin de caracterizar los rasgos del fenotipo floral que podrían estar asociados a la polinización, se seleccionaron inflorescencias, de *G. peruviana* (N=12) y de *G. venturii* (N=9). De ellas, se colectaron tres flores y se conservaron en tubos eppendorf con alcohol 70%. En el laboratorio, se extendió cada flor sobre una cápsula de Petri y se fotografiaron junto a una escala de referencia, flores en vista superior, lateral y por corte longitudinal, bajo lupa estereoscópica (Leica M420) con cámara digital Sony CCD Iris. Posteriormente, sobre la base de imágenes digitales, se caracterizaron los siguientes rasgos florales: i) largo y ancho máximo del pétalo más grande, ii) área y perímetro del limbo de la corola, iii) número de flores por inflorescencia, iv) longitud y diámetro de la boca del tubo corolino,

v) distancia desde la antera más alta y más baja a la base del ovario y vi) distancia desde el estigma a la base del ovario. Las variables i, ii y iii, se seleccionaron por su importancia en la atracción visual, como superficie de aterrizaje y en el comportamiento de alimentación de los potenciales polinizadores. Mientras que las variables iv, v y vi se eligieron por su importancia en el ajuste morfológico con el aparato bucal de los polinizadores, ya que determinan la efectiva remoción y posterior depósito de polen. Las mediciones se realizaron con el programa Sigma Scan Pro versión 5.0 (SPSS Inc., Chicago, USA; Tiff *et al.*, 1996) (Fig. 3). Se analizó si existen diferencias significativas entre los valores promedios de cada una de las variables del fenotipo floral medidos entre las dos especies de *Glandularia*, mediante una prueba de *Wilcoxon* para muestras independientes, como se implementa en el programa estadístico Infostat versión libre (Di Rienzo *et al.*, 2020).

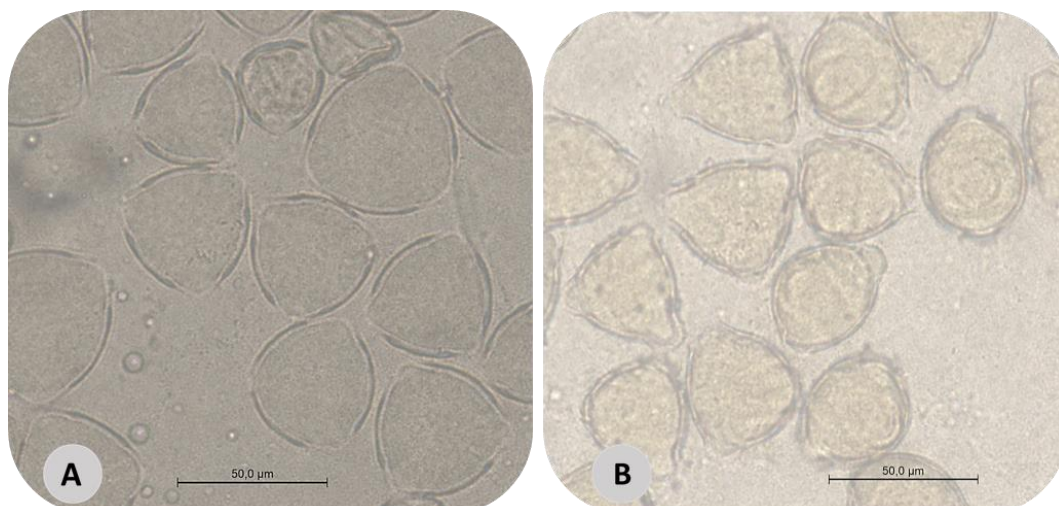


### 2.6.2 Longitud de probóscide de ejemplares representativos

A los ejemplares capturados de las especies que visitaron las flores de *Glandularia*, se le ablandaron las probóscides con vapor de agua y se desenrollaron con ayuda de una aguja histológica sobre una cápsula de Petri. Las probóscides extendidas se fotografiaron junto a una escala de referencia, bajo lupa estereoscópica (Leica M420) con una cámara digital Sony CCD Iris y se midió su longitud utilizando el programa Sigma Scan Pro versión 5.0 (SPSS Inc., Chicago, USA; Tiff *et al.*, 1996) (Fig. 4A). Por su parte, se observó la presencia o ausencia de polen en la probóscide (Fig. 4B). Para confirmar el transporte de polen de las especies de *Glandularia* en la probóscide de los individuos capturados se realizó un análisis palinológico mediante preparaciones semi-permanentes en gelatina glicerizada selladas con parafina (Moré *et al.*, 2014). Las preparaciones se observaron en Microscopio Zeiss Axiophot (Karl Zeiss, Oberkochen, Alemania), con una cámara de fotos (Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, Suiza) y se registró la presencia de los granos de polen de las dos especies de *Glandularia* mediante la comparación con muestras de polen de referencia, obtenidas de plantas presentes en el sitio de muestreo (Fig. 5A-B). Dado que algunos de los ejemplares capturados originalmente fueron deteriorados por derméstidos, no se logró realizar el análisis palinológico de todas las especies del ensamble.



**Figura 4: Aparato bucal y granos de polen. A:** Probóscide extendida de *Ortilia ithra* sin polen (capturada sobre *G. peruviana*). **B:** granos de polen depositados sobre la probóscide de *Vanessa braziliensis* (capturada sobre *G. peruviana*). Escalas= A: 1mm; B: 0,5 mm.



**Figura 5: Muestras de polen de referencia: A:** muestra de referencia de granos de polen de *G. venturii*, aumento 20X. **B:** muestra de referencia de granos de polen de *G. peruviana*, aumento 20X. Escalas= A y B: 50 micrómetros.

## 2.7 Aislamiento reproductivo en *G. peruviana* y *G. venturii*

El análisis de los rasgos funcionales (sección 2.6) y la representación gráfica de la red de interacción *Glandularia*-polinizador (sección 2.5), permitió analizar si existen mecanismos de ajuste funcional flor-polinizador y/o comportamiento diferencial de visita de polinizadores efectivos en *G. peruviana* y *G. venturii*.

### 2.7.1 Aislamiento mecánico

Se analizó si el valor promedio de la longitud de probóscide, tanto del ensamble como de cada especie de polinizador que visitó a cada especie de *Glandularia*, fue similar al valor promedio de la longitud del tubo corolino y distancias operativas de las flores.

### 2.7.2 Aislamiento etológico

Se visualizó, mediante el gráfico de la red de interacción *Glandularia*-polinizadores, si las especies que componen el ensamble de polinizadores visitan diferencialmente a las especies de *Glandularia*, con el fin de analizar si hay especies de mariposas que prefieren visitar flores de una especie en particular o visitan a ambas especies.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Sistema reproductivo de *G. peruviana* y *G. venturii*

La formación de frutos y semillas en las dos especies de *Glandularia* estudiadas ocurrió casi exclusivamente en el tratamiento de polinización libre (PL). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las dos medidas del éxito reproductivo, proporción de fructificación (PF) y proporción de semillas (PS), entre los dos tratamientos para ambas especies (Tabla 1). La PF no difirió significativamente entre las dos especies de *Glandularia*, tanto en el tratamiento de AE (W=118,5; p= 0,3079) como en el tratamiento de PL (W=116,0; p= 0,3248). Tampoco difirieron significativamente las semillas formadas por fruto, en el tratamiento de AE (W= 111,5; p= 0,1212), como en el tratamiento de PL (W= 125,5; p= 0,6666).

El promedio total de flores por inflorescencia, fue mayor en el tratamiento (PL) en cada especie *Glandularia*, con respecto al tratamiento (AE), (*G. peruviana*, PL= 16,50 ± 4,38; AE= 13,03 ± 4,16; N= 11) y (*G. venturii*, PL= 37,79 ± 13,10; AE= 32,04 ± 10,86; N= 12). *G. venturii*, presentó casi el doble de flores por inflorescencia que *G. peruviana* en ambos tratamientos. El número total promedio de semillas por inflorescencia en *G. venturii* fue casi tres veces mayor que en *G. peruviana* en ambos tratamientos (PL= 80,19 ± 41,17; AE= 3,06 ± 6,54) y (PL= 29,85 ± 17,96; AE= 0,08 ± 0,17) respectivamente.

Ambas especies resultaron auto-incompatibles. En *G. peruviana* el índice de auto-incompatibilidad (ISI) fue de 0,02 en la proporción de fructificación (PF) y de 0,05 en la proporción de semillas (PS), mientras que en *G. venturii* fue de 0,05 en PF y de 0,37 en PS.

**Tabla 1: Sistema reproductivo de *G. peruviana* y *G. venturii*:** Se muestran, para las dos variables de éxito reproductivo consideradas, el promedio y la diferencia promedio con sus respectivos desvíos estándares, entre los dos tratamientos del sistema reproductivo (autopolinización espontánea y polinización libre). Todas las diferencias son estadísticamente significativas de acuerdo a la prueba de *Wilcoxon* de muestras apareadas. Abreviaturas= AE: autopolinización espontánea. PL: polinización libre.

Especie	Sistema reproductivo				
	Proporción de fructificación				
	AE	PL	PL - AE	Z	p
<i>G. peruviana</i> (n=11)	0,01 ± 0,01	0,51 ± 0,21	0,51 ± 0,22	2,93	<0,0001
<i>G. venturii</i> (n=12)	0,03 ± 0,07	0,61 ± 0,25	0,58 ± 0,25	3,06	<0,0001

Especie	Semillas por fruto				
	AE	PL	PL - AE	Z	p
	<i>G. peruviana</i> (n=11)	0,18 ± 0,40	3,30 ± 0,80	3,12 ± 0,88	2,93
<i>G. venturii</i> (n=12)	1,31 ± 1,69	3,49 ± 0,52	2,18 ± 1,73	2,75	0,0016

### 3.2 Nicho de polinización realizado: ensamble de polinizadores efectivos y tasas de visita

El ensamble de polinizadores efectivos que visitó a las especies de *Glandularia* en la comunidad estudiada, se conformó por 15 especies de mariposas diurnas pertenecientes a cinco familias: Hesperidae, Lycaenidae, Nymphalidae, Pieridae y Riodinidae (Anexo: Tabla 1). Se registraron 21 interacciones entre las 15 especies de mariposas y las dos especies de *Glandularia*, de las 30 posibles en la red. El grado de *G. venturii* fue 12 y el de *G. peruviana* nueve (Anexo: Tabla 2). Seis especies de mariposas fueron compartidas por ambas especies, *Abaeis deva*, *Dione vanillae maculosa*, *Lerodea eufala*, *Ortilia ithra*, *Tatochila autodice* y *Vanessa braziliensis*, seis especies visitaron exclusivamente a *G. venturii*, *Heliopetes americanus bellatrix*, *Heliopetes domincella*, *Hylephila phyleus*, *Strymon bazochii*, *Vanessa carye* y *Tatochila mercedis vanvolxemii* y tres especies visitaron exclusivamente a *G. peruviana*, *Aricoris indistincta*, *Euptoieta hortensia* y *Phoebis neocypris* (Fig. 6). Esto se vio reflejado en el índice de similitud proporcional (SP) que indicó una superposición parcial en el uso de polinizadores entre las dos especies de *Glandularia* (SP = 0,55).

La tasa de visita promedio total (*i.e.* incluyendo a todo el ensamble de polinizadores), fue baja y no difirió significativamente entre *G. peruviana* y *G. venturii* (prueba de Wilcoxon: W=368,00; p=0,6192; Anexo: Tabla 1). Con respecto a las especies que

visitaron a ambas especies, *Tatochila autodice*, mostró la mayor tasa de visita. Esta especie de polinizador registró una tasa de visita significativamente superior (*i.e.* el doble) en *G. peruviana* ( $W=426,00$ ;  $p=0,0278$ ; Anexo: Tabla 1). De las otras especies compartidas, no se encontraron diferencias significativas, aunque se observó la tendencia de que *Abaeis deva* visitó más frecuentemente las flores de *G. peruviana* que de *G. venturii*, mientras que *Ortilia ithra*, *Vanessa braziliensis*, *Dione vanillae maculosa* y *Lerodea eufala* visitaron más frecuentemente flores de *G. venturii*. De las tres especies que visitaron solamente a *G. peruviana*, *Phoebis neocypris* registró el mayor porcentaje de visita (6,23%), mientras que *Euptoieta hortensia* y *Aricoris indistincta*, registraron porcentajes de visita menor al 2%. También, se observó, que *Tatochila mercedis vanvolxemii*, fue una de las seis especies que visitaron exclusivamente a *G. venturii*, con mayor porcentaje de visita (4,78%), mientras que *Hylephila phyleus* y *Heliopetes domicella* no superaron el 4% y *Strymon bazochii*, *Heliopetes americanus bellatrix* y *Vanessa carye* con valores menores al 1% en el porcentaje de visita. (Anexo: Tabla 1).

De las especies compartidas de mariposas entre las especies de *Glandularia*, *Tatochila autodice* registró el mayor valor de dependencia. Se observó la mayor dependencia de *G. peruviana* por la especie *Tatochila autodice* y *Abaeis deva*, mientras que *G. venturii*, mostró mayor dependencia por *Dione vanillae maculosa* y *Vanessa braziliensis*. Las otras dos especies compartidas, *Lerodea eufala* y *Ortilia ithra* mostraron valores de dependencia bajos. El resto de las especies de polinizadores del ensamble, mostraron valores menores a 0,063 de dependencia. *Tatochila autodice*, presentó además para ambas *Glandularia*, la mayor fuerza de interacción de todo el ensamble. (Figura 6, Anexo: Tabla 2).

Por otro lado, además de las 15 especies polinizadoras registradas en el ensamble, se observó sobre las flores de unos pocos individuos de *G. venturii*, y por fuera de los periodos de observación de las tasas de visita, coleópteros de la familia Labridae y dípteros de la familia Syrphidae.

### **3.3 Rasgos funcionales y mecanismos de aislamiento reproductivo entre ambas especies de *Glandularia***

Se encontraron diferencias significativas en las mediciones de los rasgos florales entre las dos especies de *Glandularia* (Anexo: Tabla 3). En el caso de los rasgos florales

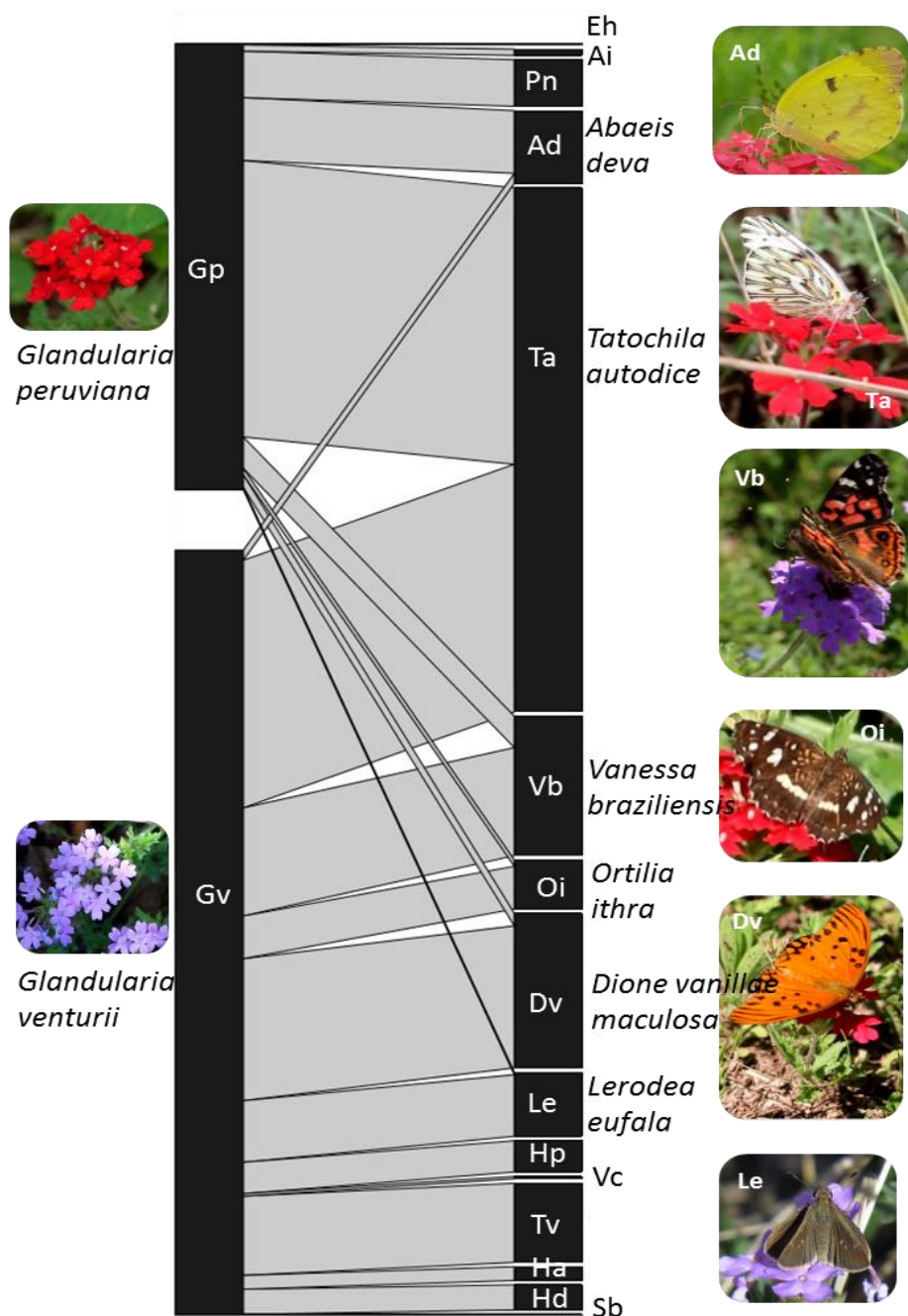


que se seleccionaron por su importancia en la atracción de polinizadores, *G. peruviana* presentó flores con pétalos más largos y anchos, limbo con mayor área y perímetro en comparación con *G. venturii*. Con respecto a los rasgos florales que se seleccionaron por su importancia en el ajuste morfológico con el aparato bucal de los polinizadores, *G. peruviana* presentó tubos corolinos más largos y una mayor distancia de las anteras y el estigma a la base del ovario, con respecto a *G. venturii* (Anexo: Tabla 3).

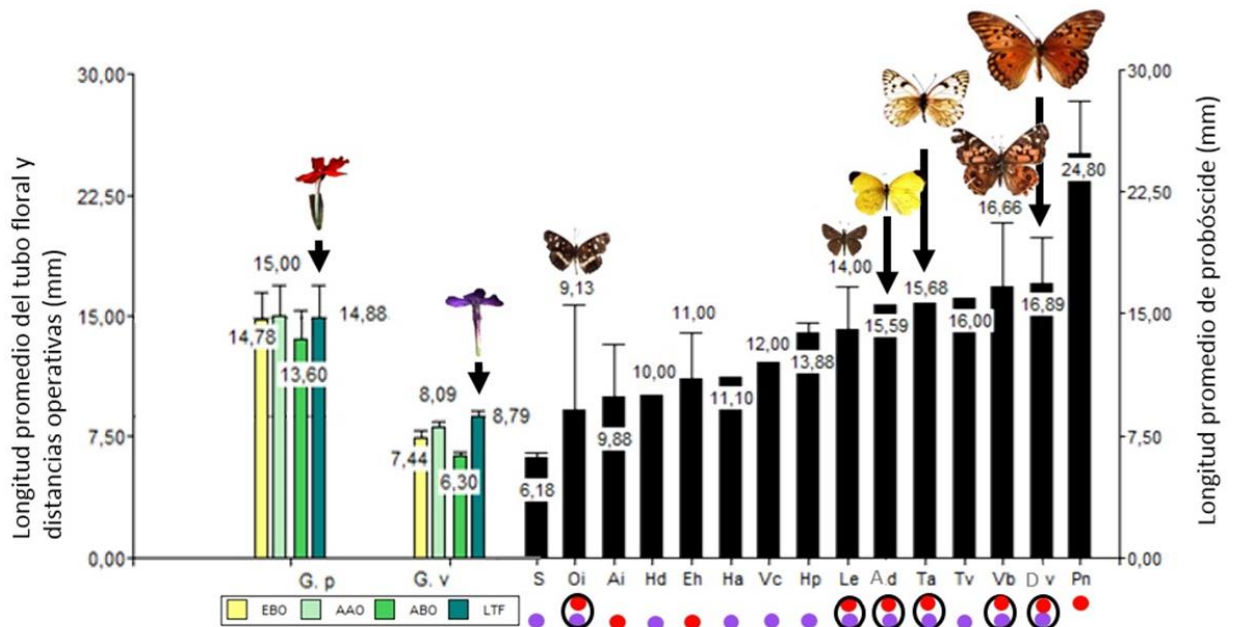
El promedio de los valores de las probóscides del ensamble de las especies de mariposas que visitaron a *G. peruviana* ( $14,85 \pm 4,62$  mm; N= 9), se aproximó a la longitud promedio del tubo corolino ( $14,88 \pm 1,95$  mm; N= 12). Sin embargo, la longitud promedio de las probóscides del ensamble de mariposas que visitaron a *G. venturii* ( $13,09 \pm 3,41$  mm; N=12) fue mayor que la longitud promedio del tubo corolino ( $8,79 \pm 0,35$  mm; N= 9) (Figs. 7).

Se observó que, de las seis especies de mariposas compartidas por ambas especies, *Tatochila autodice*, *Abaeis deva*, *Vanessa braziliensis* y *Dione vanillae maculosa*, presentaron una longitud promedio de probóscide mayor ( $16,21 \pm 0,67$  mm) a la longitud promedio del tubo corolino de *G. peruviana*. En tanto que, *Lerodea eufala* y *Ortilia ithra*, la longitud promedio de ambas proboscides, fue menor ( $11,57 \pm 3,44$  mm) (Fig. 7). Respecto a las tres especies que visitaron sólo a *G. peruviana*, en *Phoebis neocypris*, la longitud promedio de probóscide fue casi el doble del promedio del tubo corolino, mientras que en *Euptoieta hortensia* y *Aricoris indistincta*, demostraron probóscides más cortas. Por otro lado, se observó que en *Heliopetes americanus bellatrix*, *Heliopetes domicella*, *Hylephila phyleus*, *Vanessa carye* y *Tatochila mercedis vanvolxemii* que visitaron exclusivamente a *G. venturii*, el valor medio de probóscide ( $12,60 \pm 2,38$  mm), superó la longitud del valor promedio del tubo corolino de *G. venturii*, y solamente *Strymon bazochii*, que también visitó a esta especie en particular, mostró una probóscide menor en promedio, respecto al largo del tubo corolino.

Mediante registro fotográfico, fue posible constatar en seis especies de mariposas, la presencia/ausencia de polen de *Glandularia* en la probóscide. Se confirmó la presencia de polen en dos de tres individuos de *Tatochila autodice*, en dos de cuatro individuos de *Dione vanillae*, en un individuo de *Abaeis deva* y en tres individuos de *Vanessa braziliensis*. No se detectó polen de *Glandularia* en dos individuos de *Aricoris indistincta* y en uno de *Ortilia ithra*. En las restantes especies del ensamble de polinizadores, no fue posible realizar dicho registro de transporte de polen.



**Figura 6: Red de interacción *Glandularia*-polinizadores.** Las barras de la izquierda representan a *G. peruviana* y *G. venturii*, mientras que las barras de la derecha representan a las quince especies de mariposas polinizadoras. El largo de cada barra horizontal es proporcional a la suma de las interacciones de cada especie con respecto al total de interacciones observadas en la red. Las especies que interactúan están unidas por líneas grises, cuyo ancho es proporcional al número de interacciones (bandas más anchas indican una mayor fuerza de interacción). Se ilustran a la derecha de la figura, las seis especies de polinizadores que visitaron a ambas especies de *Glandularia*. Abreviaturas= Ai: *Aricoris indistincta*; Eh: *Euptoieta hortensia*; Pn: *Phoebis neocypris*; Hd: *Heliopetes domicella*; Tv: *Tatochila mercedes vanvolxemii*; Sb: *Strymon bazochii*; Vc: *Vanessa carye*; Hp: *Hylephila phyleus*; Ha: *Heliopetes americanus bellatrix*.



**Figura 7: Ajuste morfológico flor-polinizador.** Las barras negras muestran la longitud media de la probóscide de las 15 especies que conforman el ensamble de polinizadores. Las barras amarillas y las gamas de verde claro, muestran la longitud promedio de las distancias operativas y las barras verde oscuro, muestran la longitud media del tubo floral de las especies de *Glandularia*, *G. peruviana* y *G. venturii*. Los círculos representan la especie de *Glandularia* visitada (*G. peruviana* en rojo y *G. venturii* en lila). Abreviaturas= Ai: *Aricoris indistincta*; Eh: *Euptoieta hortensia*; Ph: *Phoebis neocypris*; Ed: *Abaeis deva*; Ta: *Tatochila autodice*; Oi: *Ortilia ithra*; Dv: *Dione vanillae maculosa*; Vb: *Vanessa braziliensis*; Le: *Lerodea eufala*; Tv: *Tatochila mercedis vanvolxemii*; S: *Strymon bazochii*; Vc: *Vanessa carye*; Hp: *Hylephila phyleus*; Hd: *Heliopetes domicella*; Ha: *Heliopetes americanus bellatrix*. EBO: distancia desde el estigma a la base del ovario; AAO: distancia de la antera más alta a la base del ovario; ABO: distancia desde la antera más baja a la base del ovario; LTF: longitud del tubo corolino; G.p: *Glandularia peruviana*; G.v: *Glandularia venturii*.

## DISCUSIÓN

### **¿Dependen ambas especies de la visita de polinizadores para la producción de frutos y semillas?**

El estudio del sistema reproductivo de *Glandularia peruviana* y de *G. venturii* en este trabajo confirmó que ambas especies son auto-incompatibles y dependen de la visita de mariposas para la producción de frutos y semillas. Se desconocía el sistema reproductivo, dependencia de polinizadores para reproducirse y grado de auto-incompatibilidad de *Glandularia venturii*. En el caso de *G. peruviana*, un estudio previo menciona que individuos de los que no se reporta su procedencia son auto-incompatibles (Imhof *et al.*, 2010). Las flores autopolinizadas de forma manual no produjeron frutos, mientras que un 46% de las flores polinizadas con polen de otros individuos produjeron frutos, y la proporción de semillas formadas por óvulos fue de 0,71, por lo que el éxito reproductivo fue del 33% (Imhof *et al.*, 2010). Estos resultados concuerdan, en parte, con los obtenidos en el presente trabajo, donde el porcentaje de frutos formados en el tratamiento de PL de *G. peruviana* fue del 51%. Sin embargo, si se estima el éxito reproductivo como [(número de frutos obtenidos / número de flores polinizadas) x (número promedio de semillas obtenidas por fruto / número promedio de óvulos por ovario)] (Dafni, (1992), se obtiene un 42 % de éxito reproductivo, con un número promedio de semillas formadas por óvulo de 0,83. Estos datos sugieren que el ensamble de mariposas polinizadoras sería más eficiente que los ensayos realizados por polinización manual.

El promedio de la proporción de frutos formados en el tratamiento PL, fue similar en *G. peruviana* ( $0,51 \pm 0,21$ ) y *G. venturii* ( $0,61 \pm 0,25$ ), lo que concuerda con la observación de tasas de visita del ensamble de polinizadores similares y relativamente bajas registradas en ambas especies. Aunque en el presente estudio, no se realizó suplementación con polen exógeno, la baja proporción de frutos formados en el tratamiento de PL sugiere una limitación de polen, dado que la proporción de fructificación suele ser un buen estimador de la intensidad de la polinización (Issaly *et al.*, 2020). La limitación de polen puede ocurrir cuando los polinizadores presentes en la comunidad son escasos y la proporción de flores visitadas es baja, o cuando la cantidad de polen depositada en los estigmas no es la suficiente o es incompatible para fecundar todos los óvulos (Willmer, 2011). Esto último, podría deberse a la heterogeneidad espacial de la distribución de las plantas de ambas especies. Durante la temporada de floración en la comunidad estudiada, las plantas de *G.*

*peruviana* crecían en parches más extensos, muy cercanos entre sí, mientras que las plantas de *G. venturii*, se encontraban más aisladas. Dado que ambas especies se reproducen vegetativamente por el crecimiento de estolones, pudo haber ocurrido que las flores de *G. peruviana* hayan sido todas genéticamente iguales y por ende hayan recibido una mayor proporción de polen autoincompatible, reflejando menor proporción de frutos con respecto a *G. venturii*.

A pesar de que *G. venturii* presentó casi el doble de flores por inflorescencia que en *G. peruviana*, en ambos tratamientos, la proporción de fructificación no difirió significativamente. Existe cierta evidencia empírica, de que la tasa de visitas de polinizadores por flor, disminuye en niveles bajos y particularmente altos de abundancia de plantas, lo que sugiere el potencial de competencia entre especies de plantas que comparten polinizador y, por lo tanto, un beneficio probable en la partición del nicho de polinización (Philips *et al.*, 2020). Sería interesante confirmar si bajo un escenario de mayor tasa de visita la proporción de frutos formados se incrementaría en las dos especies de *Glandularia* estudiadas. Además, la realización de ensayos de suplementación de los estigmas con polen de otros individuos permitiría confirmar si se incrementa la producción de frutos.

Con respecto a la formación promedio de semillas formadas por fruto, la cantidad promedio de semillas en el tratamiento PL fue casi similar en *G. peruviana* y en *G. venturii*. Dado que la cantidad de semillas es estimador de la calidad del cruzamiento (Issaly *et al.*, 2020), los resultados aquí obtenidos sugieren que la calidad de la polinización fue similar en ambas especies.

Finalmente, cabe mencionar que durante los muestreos se observó la presencia tanto de huevos de *Strymon bazochii* (Lycaenidae) depositados sobre inflorescencias de *G. peruviana* y *G. venturii* como de larvas de distintos estadios, alimentándose de frutos y flores. Este hallazgo confirma que los adultos de *S. bazochii* utilizan a ambas especies como plantas hospedadoras (Aguirre *et al.*, 2018). A futuro sería interesante indagar en qué medida esta especie, cuyas larvas actúan como herbívoros, pero cuyos adultos visitan las flores y eventualmente podrían polinizar las flores de *G. venturii*, afecta el éxito reproductivo de las especies de *Glandularia*. Numerosos trabajos muestran que los herbívoros pueden afectar el éxito reproductivo tanto de forma directa (*e.g.* disminución de la producción de frutos y semillas, por consumo del área foliar y/o de las flores) como indirecta (*e.g.* los herbívoros inducen cambios en los rasgos florales, como emisión de

volátiles que modifican la preferencia del polinizador) (Mothershead y Marquis, 2000). Diferentes autores han reportado que la acción combinada de especies que tienen un rol ecológico dual en el sistema, *i.e.* actúan como herbívoros en el estado larval y como polinizadores en el estado adulto, influyen en la evolución de rasgos relacionados a la polinización (revisado por Jacobsen y Raguso 2018).

### **¿Se superponen *G. peruviana* y *G. venturii* en la utilización de polinizadores?**

Se detectó una superposición parcial en el uso de las especies de polinizadores. De las 15 especies de mariposas presentes en la comunidad, seis visitaron las flores de ambas especies de *Glandularia*. Esto fue confirmado tanto por las observaciones directas de visitas en las flores y el registro fotográfico, como así también, al analizar la carga polínica transportada en las probóscides de los individuos representativos capturados. Esta superposición en el nicho de polinización, sugiere un flujo interespecífico de polen entre ambas especies, que podría eventualmente, haber conducido a la formación de individuos híbridos. En el sitio de estudio se observaron tres individuos que presentaron características vegetativas (hábito rastrero y hojas con borde aserrado, similares a *G. venturii*) y florales (flores hipocrateriformes con corolas de color rosado) intermedias entre las dos especies de *Glandularia* aquí estudiadas, los cuales podrían ser potenciales híbridos naturales.

Se registraron cinco especies de mariposas visitando las flores rosadas de los potenciales híbridos, *Vanessa carye*, *Strymon bazochii*, *Heliopetes americanus bellatrix*, *Tatochila autodice*, *Dione vanillae maculosa*. Estas dos últimas, fueron visitantes florales frecuentes en ambas especies. Se constató que, en estos potenciales híbridos, se formaron frutos que en algunos casos desarrollaron cuatro semillas, y en otros casos solo dos de cuatro. En base a lo anterior, sería interesante indagar sobre el sistema reproductivo, ensamble de polinizadores y viabilidad de estos individuos híbridos. Para esto, podrían utilizarse polvos fluorescentes de diferentes colores como análogos de polen (Rubini-Pisano, 2019) y el registro de visitas secuenciales para estimar la constancia de visita de las diferentes especies de polinizadores (Briggs *et al.* 2018). El uso de polvos fluorescentes permitiría evaluar cuán lejos es transportado el polen por las mariposas, si los estigmas se saturan con polen auto-incompatible y si hay transporte interespecífico de polen a los estigmas entre las especies parentales (*G. peruviana* a *G. venturii*) y retrocruza con los individuos híbridos, entre otras cosas. Futuros estudios son necesarios para poder confirmar

el origen híbrido de estos individuos, y si ambas especies actuarían como dadoras y receptoras de polen o el flujo de polen se da en un solo sentido (Arnold 1997).

Al caracterizar los componentes principales del nicho de polinización realizado *sensu* Phillips *et al.*, (2020), se registraron 21 interacciones de 30 posibles, con nueve interacciones del nicho de polinización fundamental que no sucedieron entre las 15 especies de polinizadores y las dos especies de *Glandularia*. Como menciona Jordano *et al.*, (2003), *no todas las interacciones posibles son realmente observables en la naturaleza, siempre existirán “interacciones prohibidas”*. Una de las posibles causas sobre la ausencia de interacciones entre algunas de las especies, podría ser un desajuste fenológico entre la floración de las especies de *Glandularia* y la eclosión de las mariposas adultas. Las interacciones no observadas también podrían explicarse a un desajuste morfológico entre el largo del tubo floral y la longitud de la probóscide de las especies de mariposas. Aquellos individuos con las probóscides demasiado cortas para acceder al néctar en la base del tubo corolino, aprenden a asociar el color de las flores con la ausencia de recompensa y evitan visitarlas (ver próxima sección).

### **¿Existen mecanismos que promuevan el aislamiento reproductivo mecánico y/o etológico entre las especies de *Glandularia* estudiadas?**

El largo del tubo corolino, es un rasgo directamente relacionado con el acceso al néctar y con el ajuste mecánico entre la flor y la parte del cuerpo del polinizador que hace contacto con el estigma y las anteras en el proceso de polinización (Grant 1994, Salinas Sánchez, 2014). Se espera que el néctar oculto dentro de tubos corolinos largos sea accesible solo para los animales con partes bucales tan o más largas que la profundidad de la estructura que contiene el néctar (Stang *et al.*, 2009). La teoría de forrajeo óptimo (Rodríguez-Gironés y Santamaría, 2006), postula que la variabilidad en la longitud del tubo de la corola y de la probóscide de los polinizadores a nivel comunitario, debería conducir a la partición de recursos, en la que polinizadores de probóscide larga se especializarían en libar el néctar en flores de tubos corolinos largos, y polinizadores de probóscide corta en hacerlo en flores de corola con tubos cortos. Esto conduciría tanto a una convergencia de los rasgos flor-polinizador como a la especialización en las interacciones.

En este contexto, se observó una partición parcial en el uso de los polinizadores que se ajustarían, en promedio, al largo del tubo floral de las dos especies de *Glandularia*. Las

nueve especies de mariposas del ensamble que visitaron a *G. peruviana*, presentaron un promedio de longitud de probóscide similar al promedio del tubo floral, por lo que accederían a la recompensa. Asimismo, las 12 especies de mariposas del ensamble que visitaron a *G. venturii*, presentaron un promedio de longitud de probóscide mayor que el tubo corolino, y también alcanzarían la recompensa floral.

De igual manera, si se analiza el ensamble de las seis especies de mariposas que visitaron a ambas especies de planta, por el promedio de probóscide, llegarían a obtener la recompensa floral, promoviendo un ajuste funcional *Glandularia*-polinizador, como ha sido reportado en otros sistemas de estudio (Sazatornil *et al.*, 2016, Phillips *et al.*, 2020). Sin embargo, *Dione vanillae maculosa* y *Vanessa braziliensis*, mostraron un comportamiento diferencial de visita por *G. venturii*, más que por *G. peruviana*, a pesar de tener un largo de probóscide similar al largo del tubo corolino de *G. peruviana* y casi el doble de la longitud promedio del tubo floral de *G. venturii*. Esto último, si bien podría atribuirse a la mayor tasa de visita, la misma, no aseguraría la eficiencia de estas mariposas como polinizadoras, si bien se observó que estas especies de mariposas transportaban polen en su probóscide, no se pudo corroborar su eficiencia como polinizadores (*i.e.* cuantos granos de polen son removidos y depositados cuando las mariposas visitan las flores) por lo cual, el polen transportado podría haber sido de otras especies de plantas que se encuentran coexistiendo en la comunidad, lo cual llevaría a la disminución de la calidad del cruzamiento.

Del mismo modo, *Lerodea eufala*, a pesar de tener una probóscide similar al largo del tubo corolino de *G. peruviana*, presentó un comportamiento preferencial por *G. venturii*, pero esta especie de *Glandularia*, depende menos de este polinizador y también de *Ortilia ithra*, pero a diferencia de la anterior, presentó un largo de probóscide similar al tubo de las flores de *G. venturii*. Estudios previos, demostraron que *Dione vanillae maculosa*, obtuvo un patrón de comportamiento diferencial hacia las flores de *G. peruviana* y no a las flores de *G. venturii* (Drewniak *et al.* 2020). Por su parte, *Tatochila autodice* y *Abaeis deva*, demostraron que tuvieron un comportamiento preferencial y un ajuste entre el largo de probóscide y el largo del tubo corolino de *G. peruviana*, lo que podría atribuirse los mayores valores de tasas de visita (en *Tatochila autodice* el doble) a las flores de esta especie de *Glandularia* y mayor valor de dependencia por estas dos especies de polinizadores (*Tatochila autodice* obtuvo el doble). Por los mayores valores observados de



tasa de visita y dependencia (el doble), *Tatochila autodice*, podría atribuirse el mayor valor de fuerza de interacción de todo el ensamble de polinizadores. En este caso, posiblemente sería esta especie de polinizador uno de los principales impulsores de la hibridación de plantas porque sus elecciones de alimentación pueden determinar la frecuencia y distribución de los genotipos híbridos (Arnold, 1997). Sin embargo, esta evidencia no sería suficiente para mencionar a esta especie de polinizador como responsable de la formación del híbrido encontrado en la comunidad estudiada, debido a que, en este trabajo, no se realizó el análisis cualitativo de eficiencia de los visitantes florales (cantidad de polen depositado durante una visita), a pesar de que si se tuvo en cuenta el análisis cuantitativo, como el número de visitas. Finalmente, *Phoebis neocypris*, la especie que presentó la probóscide más larga de todo el ensamble, casi el doble de la longitud promedio del tubo corolino de *G. peruviana*, visitó solamente flores de esta especie, pero con un porcentaje bajo de visita (menor a 6,5%). A pesar de que, *Eupoietia hortensia* y *Aricoris indistincta*, visitaron sólo a esta especie, pero con el promedio del largo de probóscide aproximado al valor del largo del tubo floral de *G. venturii*, eligen visitar a *G. peruviana*, aunque con valores menores de tasa de visita (menor 2 %)

En cuanto a las especies de mariposas que sólo eligieron visitar a *G. venturii*, fue el caso de *Tatochila mercedis vanvolxemii*, a pesar de tener el doble de la longitud de probóscide que el tubo corolino de *G. venturii*, visitó a estas flores con valores menores al 5%, mientras que *Hylephila phyleus* y *Heliopetes domicella* por el promedio de probóscide podrían tener un mejor ajuste con el largo del tubo floral de *G. peruviana*. *Heliopetes americanus bellatrix* y *Vanessa carye*, si bien se ajustarían más al largo del tubo corolino de *G. venturii* por el promedio de la longitud de probóscide, tuvieron valores de visita menores al 1%. En el caso de *S. bazochii*, a pesar de que la longitud de probóscide es menor al del tubo floral de *G. venturii*, podría acceder a la recompensa si el néctar sube por capilaridad. La baja tasa de visita observada, menor al 1% en esta especie en particular, y lo observado en el momento de colecta de los tratamientos AE y PL en flores de *G. peruviana* (presencia de huevos y larvas), harían suponer que *S. bazochii* también visita a esta especie, aunque no se la observó libando en el periodo de observación, pero sí oviponiendo sobre el botón floral de la inflorescencia, por lo que se podría suponer un desacople en la fenología de la floración y eclosión de las mariposas adultas. Por el contrario, si no hubiera un desacople, estas especies de mariposas, por el largo de probóscide, no podrían acceder a la recompensa del néctar en flores de *G. peruviana*, pero

sí podrían visitar a esta especie atraídas por fragancias florales para ser utilizadas como plantas hospedadoras.

Varios autores han informado la presencia de tricomas glandulares secretores de aceite esencial en Verbenaceae, incluyendo a *Lantana camara* L. que en los tricomas glandulares de las hojas, producen un aceite esencial rico en mono y sesquiterpenos, que podrían jugar un papel fundamental en la atracción de los polinizadores y dispersores de frutos y semillas. En cambio, los metabolitos secundarios secretados por las células (idioblastos), probablemente proporcionan una defensa química para los tejidos jóvenes contra los herbívoros, actuando como elementos disuasorios o inhibidores de la oviposición (Moura *et al.*, 2005, y referencias allí citadas). Se podría indagar a futuro, si estas especies de *Glandularia* poseen compuestos orgánicos volátiles (COVs), que cumplan la función opuesta a la anterior, de ser utilizadas como señales por especies de polinizadores que son atraídos para oviponer, como ha sido reportado para otras especies del género *Oenothera* (Balbuena *et al.* 2022). para comprender el papel de las especies de polinizadores, como sería el caso de *Strymon bazochii*, que puede tener una preferencia de color o de fragancia floral o ambas asociadas, hacia alguna especie de *Glandularia* para utilizarla como planta hospedadora. Un estudio previo, demostró que *Dione vanillae maculosa* tiene aprendizaje asociativo de una mayor recompensa (cantidad de azúcar por flor) con el color rojo que presentan las flores de *Glandularia peruviana* (Drewniak *et al.*, 2020).

Por lo mencionado anteriormente, no se estaría cumpliendo para nuestro estudio, la teoría de forrajeo óptimo y por lo tanto, los polinizadores, al tener preferencias conductuales, pueden ser una barrera de aislamiento precigótico (van der Niet *et al.*, 2014). A futuro se podrían realizar estudios de composición química de fragancias florales entre las especies de *Glandularia*, para conocer si es una variable que influye en el aislamiento etológico o en el comportamiento de forrajeo.

## CONCLUSIONES

Los datos analizados y los resultados obtenidos, apoyan la hipótesis planteada, sugiriendo que ambas especies de *Glandularia* presentan un sistema auto-incompatible, y dependen de vectores de polen para la producción de frutos y semillas. La proporción de frutos formados y la cantidad de semillas por fruto no difirió significativamente entre tratamientos y entre especies de *Glandularia*, lo que sugiere que poseen un sistema reproductivo similar.

Sin embargo, ambas especies también fueron polinizadas por especies de mariposas exclusivas, lo que evidenció un aislamiento reproductivo parcial, dado por un mecanismo de ajuste funcional entre el largo del tubo corolino y el largo promedio de la probóscide de cada ensamble de polinizadores, flor-polinizador (barrera mecánica) y/o de comportamiento diferencial de visita de los polinizadores efectivos entre ambas especies que podría ser consecuencia de diferentes preferencias de las mariposas (barrera etológica).

Los resultados obtenidos sugieren un solapamiento parcial en el nicho de polinización de las dos especies de *Glandularia*. A pesar de presentar diferencias significativas en las medidas de los rasgos florales y en el color de la corola, ambas especies compartieron seis especies de polinizadores, lo que pudo haber ocasionado el transporte de polen inter-específico que condujo a la formación de potenciales individuos híbridos con características fenotípicas intermedias en la comunidad.

## Referencias bibliográficas

- Aguirre, L. A., Drewniak, M. E., Beccacece, H. M., Zapata, A. I. (2018). Ciclo biológico de *Strymon bazochii* (Lepidoptera: Lycaenidae) sobre *Glandularia* spp. En: X Congreso Argentino de Entomología. Libro de resúmenes. Chacras de Coria. Mendoza. Argentina. Pág. 150.
- Antinao Canelo, C. A. (2019). Sistemas reproductivos y nicho de polinización en cuatro taxones de *Eriosyce* (Cactaceae) que co-ocurren en la costa de Chile central. Tesis de Maestría, Universidad de Concepción (Chile). 73 pp.
- Arnold, M. L. (1997). *Natural hybridization and evolution*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp 215.
- Balbuena, M. S., Broadhead, G. T., Dahake, A., Barnett, E., Vergara, M., Skogen, K. A., Raguso, R. A. (2022). Mutualism has its limits: consequences of asymmetric interactions between a well-defended plant and its herbivorous pollinator. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 377: 20210166.
- Beccacece, H. M., Zapata, A. I., Villafañe, N. A., Drewniak, M. E. (2012). Ártidos nocturnos (Lepidoptera: Erebidae: Arctiinae) del Bosque Serrano de Córdoba, Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 71: 99-103.
- Briggs, H. M., Graham, S., Switzer, C. M., Hopkins, R. (2018). Variation in context-dependent foraging behavior across pollinators. *Ecology and Evolution*, 8: 7964-7973.
- Campbell, D. R., Jürgens, A., Johnson, S. D. (2016). Reproductive isolation between *Zaluzianskya* species: the influence of volatiles and flower orientation on hawkmoth foraging choices. *New Phytologist*, 210: 333-342.
- Dafni, A. (1992). *Pollination ecology, a practical approach*. Oxford University Press, Oxford.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C. W. InfoStat versión. (2020). Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Dobzhansky, T. (1970). *Genetics of the Evolutionary Process*. New York: Columbia University Press, 505 pp.
- Dormann, C.F., Fründ, J., Blüthgen, N., Gruber, B. (2009). Indices, graphs and null models: Analyzing bipartite ecological networks. *Open Ecology Journal*. 2:7-24.
- Drewniak, M. E., Briscoe, A. D., Cocucci, A. A., Beccacece, H. M., Zapata, A. I., Moré, M. (2020). From the butterfly's point of view: learned colour association determines differential pollination of two co-occurring mock verbains by *Agraulis vanillae* (Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 130: 715-725.

- Fenster, C. B., Armbruster, W. S., Wilson, P., Dudash, M. R., Thomson, J. D. (2004). Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review in Ecology, Evolution and Systematics*, 35: 375-403.
- García, Y., Ostevik, K. L., Anderson, J., Rausher, M. D., Parachnowitsch, A. L. (2022). Floral scent divergence across an elevational hybrid zone with varying pollinators. *Ecology*, 1-13.
- Giorgis, M. A.; Cingolani, A. M.; Chiarini, F.; Chiapella, J.; Barboza, G.; Espinar, L.A.; Morero, R.; Diego E. Gurvich, Paula A. Tecco, Rosa Subils, Marcelo Cabido. (2011). Composición florística del Bosque Chaqueño Serrano de la provincia de Córdoba, Argentina. *Kurtziana*, 36: 9-43.
- Grant, V. (1994). Modes and origins of mechanical and ethological isolation in angiosperms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 3-10.
- Imhof, L., Borja, M. Facciuto, G. (2010). Breeding system of *Glandularia* species native to Argentina. *Acta Horticulturae*, 855: 149-152.
- Hodges, S. A., Arnold, M. L. (1994). Floral and ecological isolation between *Aquilegia formosa* and *Aquilegia pubescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 2493– 2496.
- Issaly, E. A., Sérsic, A. N., Pauw, A., Cocucci, A. A., Traveset, A., Benitez-Vieyra, S. M., Paiaro, V. (2020). Reproductive ecology of the bird-pollinated *Nicotiana glauca* across native and introduced ranges with contrasting pollination environments. *Biological Invasions*, 22: 485-498.
- Jacobsen, D. J., Raguso, R. A. (2018). Lingering effects of herbivory and plant defenses on pollinators. *Current Biology*, 28(19), R1164-R1169.
- Johnson, S. D. (2010). The pollination niche and its role in the diversification and maintenance of the southern African flora. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365: 499-516.
- Jordano, P., Vázquez, D., Bascompte J. (2009). Redes complejas de interacciones mutualistas planta-animal. En: Medel R., Aizen M. y Zamora R. Eds. *Ecología y evolución de interacciones planta-animal*, pp 17-41. Editorial Universitaria. Santiago de Chile.
- Kaczorowski, R. L., Seliger, A. R., Gaskett, A. C., Wigsten, S. K., Raguso, R. A. (2012). Corolla shape vs. size in flower choice by a nocturnal hawkmoth pollinator. *Functional Ecology*, 26: 577-587.
- Moré, M., Benitez-Vieyra, S., Sérsic, A. N., Cocucci, A. A. (2014). Patrones de depósito de polen sobre el cuerpo de los polinizadores en comunidades esfingófilas de Argentina subtropical. *Darwiniana Nueva Serie*, 2: 174-196.

- Moreira-Hernández, J. I., Muchhala, N. (2019). Importance of pollinator-mediated interspecific pollen transfer for angiosperm evolution. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 50: 191-217.
- Mothershead, K., & Marquis, R. J. (2000). Fitness impacts of herbivory through indirect effects on plant–pollinator interactions in *Oenothera macrocarpa*. *Ecology*, 81: 30-40.
- Moura, M. Z. D., Isaias, R. M. S., Soares G. L. G. 2005. Ontogenesis of internal secretory cells in leaves of *Lantana camara* (Verbenaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 148: 427-431.
- Múlgura, M. E., O’Leary, N., Rotman, A. (2012). *Flora Argentina*, vol. 14, Dicotyledonae: Verbenaceae. Buenos Aires: Estudio Sigma. 220 págs.
- Núñez-Bustos, E., Volkmann, L. (2011). Mariposas diurnas escasas y asociadas a determinados ambientes de montaña de Argentina central con nuevos registros para el área de estudio (Lepidoptera: Papilionoidea y Hesperioidea). *SHILAP Revista de Lepidopterología* 39: 245-262.
- van der Niet, T., Peakall, R., Johnson, S. D. (2014). Pollinator-driven ecological speciation in plants: new evidence and future perspectives. *Annals of Botany*, 113: 199-212.
- Pauw, A. (2013). ¿Can pollination niches facilitate plant coexistence? *Trends in Ecology and Evolution*, 28: 30-37.
- Phillips, R. D., Peakall, R., Van der Niet, T., Johnson, S. D. (2020). Niche perspectives on plant–pollinator interactions. *Trends in Plant Science* 25: 779-793.
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.r-project.org/>
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Rodríguez-Gironés, M. A., Santamaría, L. (2006). Models of optimal foraging and resource partitioning: deep corollas for long tongues. *Behavioral Ecology*, 17: 905-910.
- Rubini Pisano, A. Moré, M., Cisternas, M. A., Raguso, R. A., Benitez- Vieyra, S. (2019). Breakdown of species boundaries in *Mandevilla*: floral morphological intermediacy, novel fragrances and asymmetric pollen flow. *Plant Biology*, 21: 206-215.
- Salinas Sánchez, P. P. (2014). Selección fenotípica en un sistema generalista: *Alstroemeria ligtu* var. *Simsii* y sus polinizadores. Tesis de grado en Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción, Chile. 73 pp.
- Sazatornil, F. D., Moré, M., Benitez- Vieyra, S., Cocucci, A. A., Kitching, I. J., Schlumpberger, B. O., Oliveira P. E., Sazima, M., Amorim, F. W. (2016). Beyond neutral and forbidden links: morphological matches and the assembly of mutualistic hawkmoth–plant networks. *Journal of Animal Ecology*, 85: 1586-1594.

- Schiestl, F. P., Johnson, S. D. (2013). Pollinator-mediated evolution of floral signals. *Trends in Ecology & Evolution*, 28: 307-315.
- Sérsic, A. N., Mascó M., Noy-Meir I. (2001). Natural hybridization between species of *Calceolaria* with different pollination syndromes in southern Patagonia, Argentina. *Plant Systematics and Evolution*, 230: 111– 124.
- Sérsic, A. N., Cocucci, A. A., Benitez-Vieyra S., Cosacov A. A., Díaz, L., Glinos E., Grosso, N., Lazarte, C., Medina M., Moré, M., Moyano, M., Nattero, J., Paiaro, V., Trujillo, C., Wiemer, P. (2021). *Flores del centro de Argentina I*. Ediciones Ecoval. 354 pp.
- Smith, S. D., Hall, S. J., Izquierdo, P. R., Baum, D. A. (2008). Comparative pollination biology of sympatric and allopatric Andean *Iochroma* (Solanaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 95: 600-617.
- Stang, M., Klinkhamer, P. G., Waser, N. M., Stang, I., van der Meijden, E. (2009). Size-specific interaction patterns and size matching in a plant–pollinator interaction web. *Annals of Botany* 103: 1459-1469.
- Tiff, T., Pcx, B. (1996). SigmaScan Pro. *Physics World*, 5, 9.
- Weiss, M. R. (1997). Innate colour preferences and flexible colour learning in the pipevine swallowtail. *Animal Behaviour*, 53: 1043-1052.
- Whitehead, M. R., Lanfear, R., Mitchell, R. J., Karron, J. D. (2018). Plant mating systems often vary widely among populations. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 6: 1-9.
- Willmer, P. (2011). *Pollination and floral ecology*. Princeton University Press, 778 pp.

## ANEXO

**Tabla 1: Composición del ensamble de polinizadores, tasa y porcentaje de visita en *Glandularia peruviana* y *G. venturii*.** Las tasas de visitas de aquellas especies de polinizadores que visitaron ambas especies de *Glandularia* (celdas grises), fueron comparadas mediante una prueba de *Wilcoxon* para muestras independientes. En negrita se muestran las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Familia - Especie (Polinizadores)	Tasa de visita promedio por cada especie de polinizador (N° flores visitadas . N° total flores observadas <sup>-1</sup> . 20 <sup>-1</sup> min) y porcentaje de visitas				W	p-valor
	<i>Glandularia peruviana</i> (N=18) períodos de observación		<i>Glandularia venturii</i> (N=20) períodos de observación			
<b>Hesperiidae</b>						
<i>Heliopetes americanus bellatrix</i> (Plötz, 1884)	0,0000 ± 0,0000	0	0,0008 ± 0,0037	0,63 %		—
<i>Heliopetes domicella</i> (Erichson, [1849])	0,0000 ± 0,0000	0	0,0044 ± 0,0100	3,36 %		—
<i>Hylephila phyleus</i> (Drury, 1773)	0,0000 ± 0,0000	0	0,0100 ± 0,0100	3,84 %		—
<i>Lerodea eufala</i> (W. H. Edwards, 1869)	0,0005 ± 0,0014	0,33 %	0,0100 ± 0,0300	8,18 %	W=303,00	p=0,0598
<b>Lycaenidae</b>						
<i>Strymon bazochii</i> (Godart, [1824])	0,0000 ± 0,0000	0	0,0002 ± 0,0010	0,16 %		—
<b>Nymphalidae</b>						
<i>Dione vanillae maculosa</i> (Stichel, 1908)	0,0100 ± 0,0300	6,07 %	0,0200 ± 0,0600	17,49 %	W=333,50	p=0,4729
<i>Euptoieta hortensia</i> (Blanchard, 1852)	0,0002 ± 0,0010	0,15 %	0,0000 ± 0,0000	0		—
<i>Ortilia ithra</i> (W. F. Kirby, 1900)	0,0031 ± 0,0100	1,99 %	0,0100 ± 0,0100	3,95 %	W=329,00	p=0,3883
<i>Vanessa braziliensis</i> (Moore, 1883)	0,0100 ± 0,0200	3,89 %	0,0200 ± 0,0400	14,54 %	W=325,00	p=0,2610
<i>Vanessa carye</i> (Hübner, 1812)	0,0000 ± 0,0000	0	0,0002 ± 0,0009	0,15 %		—
<b>Riodinidae</b>						
<i>Aricoris indistincta</i> (Lathy, 1932)	0,00300 ± 0,0100	1,97 %	0,0000 ± 0,0000	0		—
<b>Pieridae</b>						
<i>Abaeis deva</i> (Doubleday, 1847)	0,0300 ± 0,0600	17,17 %	0,0100 ± 0,0400	6,92 %	W=390,50	p=0,0689
<i>Phoebis neocypres</i> (Hübner, [1823])	0,0100 ± 0,0300	6,23 %	0,0000 ± 0,0000	0		—
<i>Tatochila autodice</i> (Hübner, 1818)	0,1000 ± 0,0700	<b>62,21 %</b>	0,0500 ± 0,0700	<b>36,03 %</b>	W=426,00	<b>p=0,0278*</b>
<i>Tatochila mercedis vanvolxemii</i> (Capronnier, 1874)	0,0000 ± 0,0000	0	0,0100 ± 0,0200	4,78 %		—
<b>Total por especie (Glandularia)</b>	0,1500 ± 0,1000		0,1300 ± 0,0800		W=368,00	p=0,6192



**Tabla 2: Grado y dependencia de *Glandularia peruviana* y *G. venturii* por las distintas especies de mariposas.** Las celdas en gris indican las seis especies de mariposas que fueron compartidas por ambas especies de *Glandularia*. En negrita, se observa a la especie de polinizador con mayor fuerza de interacción de todo el ensamble.

Polinizadores	Fuerza de dependencia		Fuerza de interacción de la especie	Grado
	<i>G. venturii</i>	<i>G. peruviana</i>		
<i>Heliopetes americanus bellatrix</i> (Plötz, 1884)	0,0062	0	0.0062	1
<i>Heliopetes domicella</i> (Erichson, [1849])	0,0335	0	0.0335	1
<i>Hylephila phyleus</i> (Drury, 1773)	0,0384	0	0.0384	1
<i>Lerodea eufala</i> (W. H. Edwards, 1869)	0,0818	0,0032	0.0850	2
<i>Strymon bazochii</i> (Godart, [1824])	0,0016	0	0.0016	1
<i>Dione vanillae maculosa</i> (Stichel, 1908)	0,1748	0,0607	0.2355	2
<i>Euptoieta hortensia</i> (Blanchard, 1852)	0	0,0015	0.0015	1
<i>Ortilia ithra</i> (W. F. Kirby, 1900)	0,0394	0,0199	0.0593	2
<i>Vanessa braziliensis</i> (Moore, 1883)	0,1453	0,0388	0.1841	2
<i>Vanessa carye</i> (Hübner, 1812)	0,0015	0	0.0015	1
<i>Aricoris indistincta</i> (Lathy, 1932)	0	0,0197	0.0197	1
<i>Abaeis deva</i> (Doubleday, 1847)	0,0692	0,1717	0.2409	2
<i>Phoebis neocypres</i> (Hübner, [1823])	0	0,0623	0.0623	1
<i>Tatochila autodice</i> (Hübner, 1818)	0,3603	0,6221	<b>0.9824</b>	2
<i>Tatochila mercedis vanvolxemii</i> (Capronnier, 1874)	0,0478	0	0.0478	1

**Tabla 3: Rasgos florales que influyen en la atracción visual, superficie de aterrizaje y en el comportamiento de alimentación de los potenciales polinizadores.** Abreviaturas= **LPG:** largo máximo del pétalo más grande; **APG:** ancho máximo del pétalo más grande; **ACO:** área de la corola; **PCO:** perímetro de la corola. En negrita se muestran las variables con importancia en el ajuste morfológico con el aparato bucal de los polinizadores. Abreviaturas= **LTF:** longitud del tubo floral; **DTF:** diámetro del tubo floral; **ABO:** distancia desde la antera más baja, a la base del ovario; **AAO:** distancia desde la antera más alta, a la base del ovario; **ESO:** distancia desde el estigma, a la base del ovario. Los valores son promedios de tres flores por inflorescencia  $\pm$  desvío estándar. Se muestran las diferencias significativas de la prueba de *Wilcoxon* para muestras independientes ( $p < 0,05$ ).

<b>Rasgos florales</b>			
<b>Variable de fenotipo floral</b>		<b>Diferencia de media entre variable de fenotipo floral de cada <i>Glandularia</i></b>	
<i>Glandularia peruviana</i> (N=12) Media $\pm$ D.E	<i>Glandularia venturii</i> (N=9) Media $\pm$ D.E	W	p-valor
LPG (mm) 7,15 $\pm$ 1,35	LPG (mm) 4,06 $\pm$ 0,45	W=45,00	p=0,0001
APG (mm) 5,11 $\pm$ 1,04	APG (mm) 3,72 $\pm$ 0,49	W=53,00	p=0,0011
ACO (mm <sup>2</sup> ) 105,01 $\pm$ 36,66	ACO (mm <sup>2</sup> ) 45,54 $\pm$ 10,28	W=45,00	p=0,0001
PCO (mm) 71,57 $\pm$ 14,36	PCO (mm) 43,81 $\pm$ 5,34	W=45,00	p=0,0001
<b>LTF (mm) 14,88 <math>\pm</math> 1,95</b>	<b>LTF (mm) 8,79 <math>\pm</math> 0,36</b>	W=45,00	p=0,0001
<b>DTF (mm) 1,65 <math>\pm</math> 0,29</b>	<b>DTF (mm) 1,26 <math>\pm</math> 0,08</b>	W=53,00	p=0,0011
<b>ABO (mm) 13,60 <math>\pm</math> 1,76</b>	<b>ABO (mm) 6,30 <math>\pm</math> 0,26</b>	W=45,00	p=0,0001
<b>AAO (mm) 15,00 <math>\pm</math> 1,91</b>	<b>AAO (mm) 8,09 <math>\pm</math> 0,30</b>	W=45,00	p=0,0001
<b>ESO (mm) 14,78 <math>\pm</math> 1,65</b>	<b>ESO (mm) 7,44 <math>\pm</math> 0,45</b>	W=45,00	p=0,0001

**Tabla 4:** Longitud promedio de probóscide de las especies del ensamble de polinizadores de *G. peruviana* y *G. venturii* presentes en la comunidad estudiada.

<b>Familia - Especie (Polinizadores)</b>	<b>Longitud de proboscide</b> Media ± D.E	<b>N° de individuos</b>
<b>Hesperiidae</b>		
<i>Heliopetes americanus bellatrix</i> (Plötz, 1884)	11,10	1
<i>Heliopetes domicella</i> (Erichson, [1849])	10,00	1
<i>Hylephila phyleus</i> (Drury, 1773)	13,88 ± 0,53	2
<i>Lerodea eufala</i> (W. H. Edwards, 1869)	14,00 ± 2,65	3
<b>Lycaenidae</b>		
<i>Strymon bazochii</i> (Godart, [1824])	6,18 ± 0,26	2
<b>Nymphalidae</b>		
<i>Dione vanillae maculosa</i> (Stichel, 1908)	16,89 ± 2,78	2
<i>Euptoieta hortensia</i> (Blanchard, 1852)	11,00 ± 2,83	2
<i>Ortilia ithra</i> (W. F. Kirby, 1900)	9,13 ± 6,46	3
<i>Vanessa braziliensis</i> (Moore, 1883)	16,66 ± 3,99	2
<i>Vanessa carye</i> (Hübner, 1812)	12,00	1
<b>Riodinidae</b>		
<i>Aricoris indistincta</i> (Lathy, 1932)	9,88 ± 3,25	3
<b>Pieridae</b>		
<i>Abaeis deva</i> (Doubleday, 1847)	15,59	1
<i>Phoebis neocypres</i> (Hübner, [1823])	24,80 ± 3,25	2
<i>Tatochila autodice</i> (Hübner, 1818)	15,68	1
<i>Tatochila mercedis vanvolxemii</i> (Capronnier, 1874)	16	1