

## VARIACIÓN GEOGRÁFICA DE LA RECOMPENSA FLORAL DE *CALCEOLARIA POLYRHIZA* (CALCEOLARIACEAE): INFLUENCIA DE FACTORES BIÓTICOS Y ABIÓTICOS

ANDREA COSACOV<sup>1,2</sup>, ANDREA A. COCUCCI<sup>1</sup> y ALICIA N. SÉRSIC<sup>1</sup>

**Summary:** Geographic variation of floral reward in *Calceolaria polyrhiza*: influence of biotic and abiotic factors. The study of intraspecific differentiation of floral characters involved in plant-pollinator interaction, and of its relationship with biotic and abiotic factors is essential to elucidate the factors affecting biological adaptation and specialization. Systems involving oil-secreting plants and oil-collecting bees are considered one of the most specialized plant-pollinator mutualisms. In this study, using thin layer chromatography (TLC), we analyze composition of floral oils in 12 natural populations of *Calceolaria polyrhiza*, a species endemic to Patagonia. For each sampling site we obtained data on pollinators and on edaphic and climatic variables. Through a Partial Least Square analysis (PLS) we investigated which factors best explained variation among populations in floral reward. Results indicate that mainly pollinators, but also rainfall and availability of nutrients in the soil, explain the variation of floral reward composition at geographic scale.

**Key words:** Non-volatile oils, floral reward, *Calceolaria*, *Centris*, *Chalepogenus*, Patagonia.

**Resumen:** Indagar sobre la diferenciación interpoblacional de caracteres florales implicados en la interacción planta-polinizador, y sobre su relación con la divergencia de polinizadores a escala geográfica, es fundamental para dilucidar los factores que influyen en los procesos de adaptación y especialización biológica. Los sistemas conformados por plantas secretoras de aceites florales y abejas colectoras son considerados entre los sistemas más especializados dentro de los mutualismos planta-polinizador. En este trabajo estudiamos, mediante cromatografías en capa delgada, cómo varía la composición química de los aceites florales en 12 poblaciones naturales de *Calceolaria polyrhiza*, una especie endémica de Patagonia. Para cada sitio se obtuvo información de parámetros edáficos, climáticos y de los polinizadores, y mediante un análisis de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS), se indagó qué factores explican mejor la variación en la composición de la recompensa floral. Los resultados indican que los polinizadores principalmente, pero también las precipitaciones y la disponibilidad de nutrientes en el suelo, serían factores que explican la variación de la recompensa floral a escala geográfica.

**Palabras clave:** Aceites no volátiles, recompensa floral, *Calceolaria*, *Centris*, *Chalepogenus*, Patagonia.

### INTRODUCCIÓN

Los sistemas conformados por plantas secretoras de aceites florales (i.e. ácidos grasos saturados)

y abejas colectoras son considerados entre los más especializados dentro de los mutualismos planta-polinizador (Steiner & Whitehead, 1990, 1991; Johnson & Steiner, 2000). El propio 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 (Vogel, 1974; Buchmann, 1987; Neff, 2008), 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 (Buchmann, 1987; Alves-dos-Santos *et al.*,

<sup>1</sup> Laboratorio de Biología Floral, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), CONICET-Universidad Nacional de Córdoba, Casilla de Correo 495, 5000 Córdoba, Argentina.

<sup>2</sup> Dirección de correo: acosacov@efn.uncor.edu  
Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral, Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), CONICET-Universidad Nacional de Córdoba, Casilla de Correo 495, 5000 Córdoba, Argentina. Tel: 0054-351-4331056 int. 29, Fax: 0054-351-4332104.

2002; Sérsic, 2004). Desde el punto de vista de las plantas, en general las especies productoras de aceites requieren de estas abejas para reproducirse sexualmente (Molau, 1988; Machado, 2004; Sérsic, 2004).

Trabajos previos han abordado diversos aspectos de estas interacciones especialistas, como la correspondencia morfológica entre las flores y los polinizadores más frecuentes (Steiner & Whitehead, 1991; Johnson & Steiner, 1997, 2000; Sérsic, 2004), la estructura de los órganos colectores de las abejas y los diferentes tipos y localización del tejido secretor (Neff & Simpson, 1981; Cocucci *et al.*, 2000), la dependencia de las especies de plantas hacia los polinizadores para reproducirse sexualmente (Cocucci, 1991; Machado *et al.*, 2002; Sérsic, 2004), la pérdida de los elaióforos y el consecuente cambio en el sistema de polinización, a nivel poblacional (Cappellari *et al.*, 2011) y en un contexto filogenético (Cosacov *et al.*, 2009; Renner & Schaefer, 2010; Chauveau *et al.*, 2011), y la variación del éxito reproductivo y de los caracteres florales en relación a la variación del ensamble de polinizadores a escala geográfica (Cosacov *et al.*, 2008). Por otra parte, varios trabajos han comparado la composición química de los aceites florales entre especies en distintas familias de plantas productoras de aceites (Silvera, 2002; Seipold *et al.*, 2004; Sérsic, 2004; Stpiczynska & Davies, 2008; Dumri *et al.*, 2008), y entre nidos de distintas especies de abejas colectoras (e.g. Vinson *et al.*, 2006), encontrando variación en la composición y en el grado de complejidad de los mismos.

A pesar de que la recompensa floral juega un rol crítico en los mutualismos planta-polinizador, y que se ha propuesto sería un rasgo fisiológico que estaría bajo presiones selectivas mediadas por los requerimientos nutricionales y ecológicos de los polinizadores (Simpson & Neff, 1981; Baker & Baker, 1990; Gerlach & Schill, 1991; Petanidou, 2005; Petanidou *et al.*, 2006), sólo dos trabajos han estudiado la posible relación entre los polinizadores principales de cada especie y la diferenciación interespecífica en la composición de los aceites florales (Silvera, 2002; Sérsic, 2004). La diferenciación interespecífica en la composición de los aceites florales podría tener su origen en la formación de ecotipos a nivel intraespecífico, producto de procesos de adaptación local de las distintas poblaciones a los respectivos ensambles de polinizadores (e.g. Waser

& Campbell, 2004; Medel *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta el momento ningún trabajo ha indagado sobre la variabilidad intraespecífica (i.e. entre poblaciones) de la composición química de los aceites florales.

La variación geográfica de la recompensa floral podría estar relacionada a ensambles de polinizadores espacialmente variables como lo demuestran numerosos trabajos previos (e.g. Medel *et al.*, 2003; Petanidou *et al.*, 2006). Además, dado que la producción de recompensa floral demanda un importante consumo de agua y nutrientes (Buchmann, 1987; Galen, 1999), las características de la misma podrían variar geográficamente como consecuencia de la reasignación de recursos de la planta frente a condiciones estresantes (Chapin, 1991; Galen, 1999, 2000; Carroll *et al.*, 2001). Es por esto que es importante considerar la variación de factores alternativos a los polinizadores, como los factores climáticos y/o edáficos, al momento de indagar sobre la estructura y posibles causas de la variación geográfica de caracteres con importancia en la interacción planta-polinizador (Anderson & Johnson, 2008; Pérez-Barrales *et al.*, 2009).

*Calceolaria polyrhiza* Cav. es una hierba perenne, endémica de Patagonia. Al igual que la gran mayoría de las especies del género, *C. polyrhiza* ofrece aceites no volátiles como recompensa floral en lugar del néctar, habitual en la gran mayoría de las Angiospermas. En su rango de distribución esta especie habita una amplia diversidad de áreas ecológicas que difieren tanto en las condiciones edáficas y climáticas, como en la fauna polinizadora, por lo que se trata de un sistema adecuado para explorar el rol de los polinizadores y del ambiente físico en la diferenciación intraespecífica. En particular se indagó: a) si la composición de los aceites florales (evaluada cualitativamente) varía entre poblaciones naturales de la especie estudiada, y b) si la variación interpoblacional de las recompensas florales está asociada a la variación de los ensambles de polinizadores y/o a factores físicos, tanto climáticos (precipitaciones y temperatura) como edáficos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Especie y área de estudio*

*Calceolaria polyrhiza* se distribuye aproximadamente desde los 35° hasta los 52° latitud Sur y ocupa

alturas desde el nivel del mar hasta cerca de los 3000 m (Ehrhart, 2000). En su rango de distribución la precipitación promedio anual varía entre 141-1033 mm y la temperatura promedio anual, entre 4,6 – 13,7°C, por lo que habita en ambientes muy heterogéneos. La especie interactúa sólo con dos especies de abejas colectoras de aceites, *Centris cineraria* Smith y *Chalepogenus caeruleus* Friese, cuyas abundancias relativas están espacialmente diferenciadas (Cosacov, 2010). El presente estudio se realizó en 12 poblaciones representativas del ambiente biótico y abiótico en el que se encuentra la especie (Fig. 1).

#### Extracción y cromatografía de los aceites florales

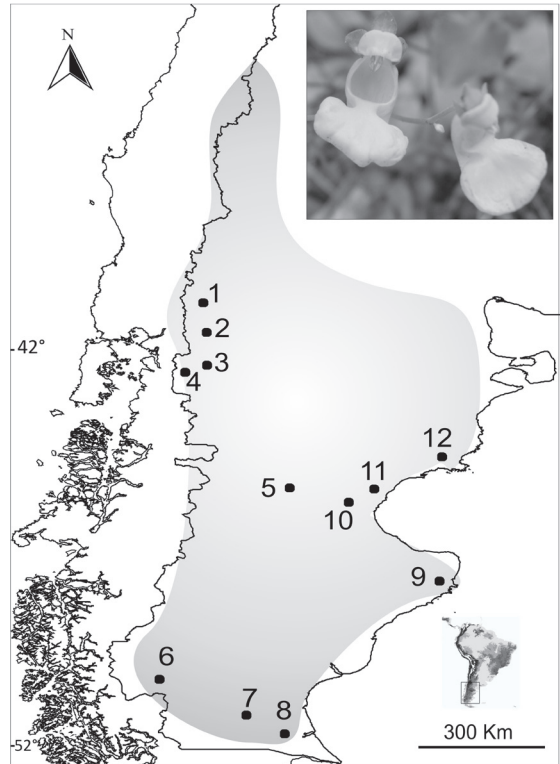
En cada sitio se coleccionaron entre 50-90 flores de 30-60 individuos (distanciados al menos por 5 m para evitar muestrear clones o individuos emparentados). Se disectó el apéndice de la corola, que porta al elaióforo, de todas las flores recolectadas y se realizó un eluido de los aceites en cloroformo. Los fragmentos se sumergieron en el solvente durante 2-3 minutos, agitando para facilitar la elusión. Los extractos recogidos en viajes de campaña fueron sellados *in situ* con calor en microcapilares de vidrio. Posteriormente, se realizaron cromatografías en capa delgada siguiendo el método desarrollado por Vogel (1974). Los extractos se sembraron a 5 cm del margen inferior en placas cromatográficas de gel de sílice premoldeadas de la marca Reichelt Chemie Technik. Se realizaron las corridas a 24° C con una mezcla de cloroformo-etanol-ácido acético glacial-metanol (96:4:2:1) por una longitud total de 12,5 cm, lo que demora aproximadamente 60 minutos. Se revelaron con vapores de I<sub>2</sub> y posteriormente con una solución de ácido sulfúrico-metanol (1:1) colocándolas en estufa a 150° C por el lapso de una hora.

#### Distancias geográficas entre poblaciones

En cada población se registraron las coordenadas geográficas utilizando un geoposicionador satelital (GPS). A partir de esta información se calcularon las distancias interpoblacionales (en km) como la menor distancia en línea recta a partir de los puntos georeferenciados de cada sitio, utilizando el programa TrackMaker (Ferreira Junior, 2004).

#### Variables climáticas y edáficas

A partir del registro de las coordenadas



**Fig. 1.** Localización de las 12 poblaciones naturales de *Calceolaria polyrhiza* incluidas en el presente estudio. En gris se muestra la distribución de la especie. El número de las poblaciones se corresponde con la Tabla 1.

geográficas de cada sitio, y mediante la información disponible en la base mundial de datos climáticos WorldClim (<http://www.worldclim.org/>; Hijmans *et al.*, 2005), se obtuvieron variables de temperatura y de precipitación para cada localidad. Esta base de datos tiene disponibles 19 capas “bioclimáticas” de una resolución de un kilómetro cuadrado que pueden ser utilizadas en sistemas de información geográfica (GIS). Estas variables incluyen tendencias anuales (por ej. temperatura media anual), estacionalidad (por ej. rango anual de temperatura) y condiciones ambientales extremas (por ej. temperatura del mes más frío y del mes más cálido). Se seleccionaron diez variables: temperatura y precipitación media anual, y temperatura y precipitación media del trimestre más cálido, más frío, más seco y más húmedo (Tabla 1). Esta información se resumió en los dos primeros ejes de un análisis de componentes principales (PCA) y se obtuvieron dos nuevas

**Tabla 1.** Coordenadas geográficas, área ecológica, y parámetros climáticos y edáficos de las 12 poblaciones de *Calceolaria polyrhiza* estudiadas. Se indican las temperaturas (°C) y precipitaciones (mm) promedio: anuales (TA, PA), de la estación más húmeda (TEH, PEH), más seca (TES, PES), más cálida (TEC, PEC) y más fría (TEF, PEF); parámetros químicos de las muestras de suelo, C= carbono orgánico (%), N= nitrógeno total (%), K= potasio (pcmol/kg), P=fósforo disponible (mg/kg), Limo= limo total (%), Arena= arena total (%); polinizador (ABE) más frecuente registrado en cada sitio, *Chalepogonus caeruleus* (CHA), *Centris cineraria* (CEN).

Pob	Sitio	Latitud	Longitud	Altitud msnm	Ecorregión	VARIABLES CLIMÁTICAS												VARIABLES EDÁFICAS					ABE	
						TA	TEH	TES	TEC	TEF	PA	PEH	PES	PEC	PEF	pH	C	N	K	P	Limo	Arena		
1	Colonia Suiza	-41,179	-71,431	1085	Bosque Andino-patagónico	6,4	1,2	11,8	11,8	1,2	954	436	104	436	104	436	5,1	6,49	0,32	0,2	2	20	78,4	CHA
2	Pitriquitrón	-41,972	-71,479	1200	Bosque Andino-patagónico	5,8	1,2	10,3	11,3	0,4	886	398	97	394	98	394	5,6	2,97	0,27	0,4	8	23,8	72,2	CHA
3	Chollia a	-42,463	-71,606	580	Bosque Andino-patagónico	7,5	2,8	12,9	12,9	2,2	963	439	113	421	113	421	5,1	8,27	0,58	0,1	7	8	77,4	CHA
4	Chollia b	-42,440	-71,726	560	Bosque Andino-patagónico	7	2,3	12,4	12,4	1,7	949	428	113	413	113	413	5,3	11,47	0,79	0,5	10	25,3	63,7	CHA
5	Los Manantiales	-46,474	-69,510	726	Meseta Central	8,4	2,6	14,5	14,5	2	141	51	21	46	21	46	7,3	0,52	0,07	0,8	40	10,4	63,6	CEN
6	PN Los Glaciares	-50,490	-72,655	222	Pastizal Subandino	7,4	4,5	11,5	12,1	2,3	533	163	108	114	147	147	6	5,34	0,46	1	70	20,4	67,6	CEN
7	Las Horquetas	-51,381	-70,241	86	Matorral de mata negra	6,9	11,8	5,1	11,8	1,4	171	51	32	51	39	6,4	1,16	0,12	1,4	106	15,2	77,8	CEN	
8	Güer-Aike	-51,616	-69,626	36	Estepa Magallánica Seca	7,1	11,8	5,4	11,8	1,7	217	70	36	70	46	6	1,91	0,19	0,8	74	17,2	75,3	CEN	
9	Pto. Deseado	-47,750	-65,917	9	Estepa gramínea-arbustiva del Golfo de San Jorge	10,1	4,9	10,4	15,1	4,4	217	77	40	48	63	6,8	2,97	0,27	0,6	83	40	51	CEN	
10	Ruta 26	-45,824	-67,972	677	Estepa Arbustiva del Golfo de San Jorge	8,9	3,5	11,9	14,8	3	175	64	30	57	6,65	1,35	0,1	0,7	57	16,25	77,45	CEN		
11	La Begonia	-45,652	-67,616	404	Estepa Arbustiva del Golfo de San Jorge	10,4	7,3	13,2	16,1	4,7	196	74	33	34	6,6	0,91	0,06	0,5	138	7,1	84,9	CEN		
12	Lochiel	-44,705	-66,119	348	Estepa gramínea-arbustiva del Golfo de San Jorge	11,2	8	11,2	16,9	5,4	181	73	26	36	5,9	3,34	0,26	2,1	57	32,1	56,9	CEN		

variables que fueron utilizadas en los subsiguientes análisis (ver más abajo): “precipitación” (PR), eje 1 del PCA que resumió un 65% de la variación total y estuvo principalmente correlacionado con la precipitación media anual, y “temperatura” (TM), eje 2 del PCA que resumió el 24% de la variación, y se correlacionó principalmente con la temperatura media anual.

Para la caracterización del gradiente edáfico, en cada sitio se obtuvo una única muestra compuesta de 5-6 submuestras colectadas en distintas partes del sitio, desde la superficie hasta los 15-20 cm de profundidad. En el Laboratorio de Suelos del Consejo Agrario de la Provincia de Santa Cruz, se realizaron análisis químicos estándar que permitieron obtener las siguientes variables edáficas: pH, porcentaje de limo total y de arena total, porcentaje de carbono orgánico (C) y nitrógeno total (N), y concentración de potasio (K) y fósforo disponible (P) (Tabla 1). Para resumir esta información se realizó un PCA con dichas variables en el que el eje 1 y 2 resumieron el 90% de la variación en las condiciones edáficas. El eje 1, resumió el 58% de la variación y estuvo asociado a la concentración de nitrógeno y carbono orgánico (97%), por lo que se denominó “nutrientes” (NT), mientras que el eje 2, denominado “K”, resumió el 31% de la variación y estuvo principalmente correlacionado con la variación del potasio y porcentaje de arena total (81%).

#### *Polinizadores*

En función de un estudio previo en el que se identificó al polinizador más frecuente de cada población, mediante métodos directos, indirectos y modelado de la distribución potencial de las especies de abejas (Cosacov, 2010) se construyó una variable categórica con valores 1 y 2 de acuerdo a si en la población predominaron las visitas de *Centris cineraria* o *Chalepogenus caeruleus*, respectivamente.

#### *Análisis estadístico de los datos*

A partir del patrón de manchas obtenido de las cromatografías se elaboró una matriz de presencia/ausencia de cada mancha en las respectivas poblaciones, y se construyó una matriz de diferenciación interpoblacional (1- Jaccard) en la composición de aceites. Para visualizar el patrón de agrupamiento de las poblaciones se realizó un

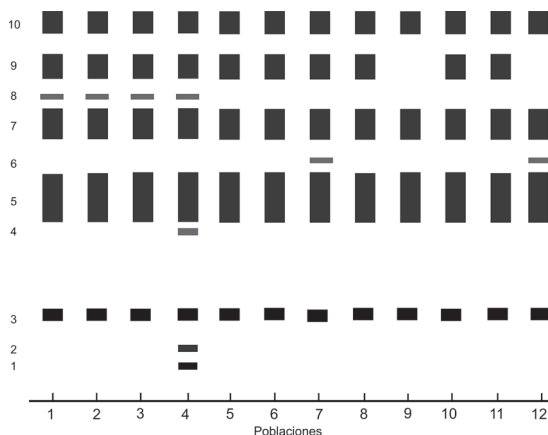
análisis jerárquico de conglomerados utilizando la estrategia de encadenamiento promedio (UPGMA). Para determinar si esta diferenciación en la composición de los aceites florales se encuentra asociada a la distancia geográfica entre poblaciones, se realizó una prueba de Mantel utilizando la matriz de distancias geográficas y la matriz de distancias de Jaccard. Posteriormente, la matriz de distancias en la composición de los aceites fue sometida a un análisis de coordenadas principales (PCoA; Gower, 1966), lo que permitió transformar dicha matriz en 11 variables independientes (ya que los vectores son ortogonales entre ellos) que resumen la variación en la composición de los aceites florales. En los subsiguientes análisis se trabajó con los 4 primeros ejes ya que resumieron el 99% de la variación total.

Para evaluar la posible influencia de factores bióticos (polinizadores) y abióticos (variables climáticas y edáficas) sobre la composición de los aceites florales, se realizó una regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS). Este análisis es particularmente apropiado cuando son varias las variables predictoras, están correlacionadas entre sí y además el número de casos es relativamente bajo (Haelein & Kaplan, 2004). El análisis, que generaliza y combina Componentes Principales con una Regresión Lineal, básicamente consiste en encontrar ejes, “variables latentes”, que maximicen la variación de la matriz de variables dependientes, asociada a la variación de la matriz de variables predictoras. Los análisis se realizaron con el programa Infostat/P v2010 (Di Rienzo *et al.*, 2010).

## RESULTADOS

#### *Composición química de la recompensa floral*

La cromatografía de capa delgada reveló un total de 10 bandas diferentes, observándose que existe variación interpoblacional en la composición de los aceites florales. Los triglicéridos más lipofílicos (bandas 4-10) fueron detectados en la parte superior, mientras que los más hidrofílicos en la parte inferior (bandas 1-3). Las bandas 3, 5, 7, 9 y 10 fueron las más intensas y más distribuidas en las distintas muestras. En particular cuatro de ellas (bandas 3, 5, 7, 10) estuvieron presentes en todas las poblaciones, mientras que las bandas 6 y 8 estuvieron presentes en dos y cuatro poblaciones, respectivamente (Fig. 2). El agrupamiento de las



**Fig. 2.** Patrón de bandas obtenido de cromatografías en capa delgada de aceites florales de 12 poblaciones de *Calceolaria polyrhiza*. El número de cada banda se indica a la izquierda.

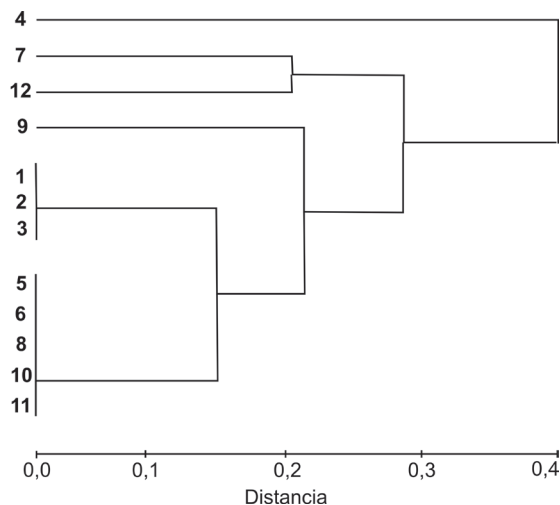
poblaciones en función de su similitud se muestra en la Fig. 3 donde se distinguen dos grupos de poblaciones que presentan patrones idénticos: por un lado las poblaciones 1, 2 y 3, y por el otro, las poblaciones 5, 6, 8, 10 y 11. Se observa que la banda 8 es exclusiva de las poblaciones en las que la especie de polinizador predominante es *Ch. caeruleus* (poblaciones 1, 2, 3 y 4; Tabla 1 & Fig. 2). Sin embargo, estas poblaciones no aparecen formando un único grupo, ya que la población 4 posee 3 bandas exclusivas (1, 2 y 4), siendo la población más diferente entre todas las analizadas (Fig. 2 & 3).

#### Variables climáticas y edáficas

Las poblaciones muestreadas se encuentran a una distancia promedio de 598 km, y la distancia máxima del área muestreada es de 1169 km. Las poblaciones incluidas en este estudio presentan condiciones climáticas y edáficas muy diferentes (Tabla 1). Por ejemplo, la temperatura y precipitación media anual de los sitios muestreados varía entre 5,8-11°C y 141-963 mm anuales, respectivamente, mientras que la disponibilidad de nitrógeno y carbono orgánico en el suelo varía entre 0,06-0,79 y 0,91-11,47, respectivamente.

#### Polinizadores

A partir de observaciones de visitas y/o capturas de las abejas con polen de *C. polyrhiza* pudo

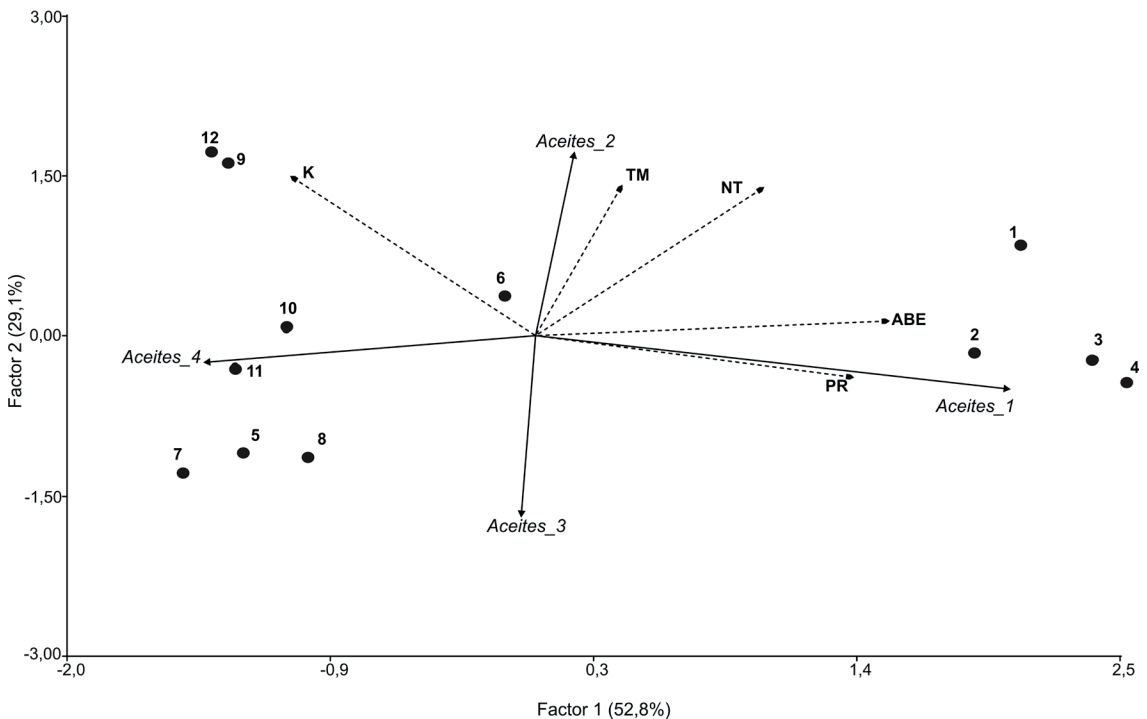


**Fig. 3.** Dendrograma. Agrupación de 12 poblaciones de *Calceolaria polyrhiza* según la similitud en la composición de los aceites florales, analizados mediante cromatografía en capa delgada.

caracterizarse a los polinizadores más frecuentes en cada uno de los 12 sitios estudiados (Tabla 1). En los sitios donde estos registros se realizaron durante dos floraciones, los datos fueron consistentes entre años (Cosacov, 2010). Se observa que *Ch. caeruleus* es el polinizador más frecuente en las poblaciones localizados hacia el NO del rango de distribución, en la ecoregión de Bosques Andinos principalmente, mientras que *C. cineraria* predomina en la región de la Estepa Patagónica.

#### Patrón geográfico de variación y su relación con factores bióticos y abióticos

La diferenciación interpoblacional en la composición de los aceites florales presenta un patrón geográfico ya que mostró una asociación significativa con las distancias geográficas interpoblacionales ( $Z=0,34$ ;  $P=0,005$ ). Por otra parte, el análisis de PLS mostró que las dos primeras variables latentes explicaron el 81,9% de la variación (Fig. 4). La primera variable latente resumió el 52,8% de la variación, y estuvo principalmente asociada a la variable polinizador ( $F= 32,63$ ;  $P=0,0004$ ) y al gradiente de precipitaciones ( $F=10,86$ ;  $P=0,0093$ ), mientras que la segunda variable latente explicó el 29,1% de la variación y estuvo asociada al gradiente de temperatura ( $F=8569,98$ ;  $P < 0,0001$ ) y a ambas variables edáficas (NT y K,  $F=403,59$  y  $F=914,64$ , respectivamente;  $P < 0,0001$ ).



**Fig. 4.** Gráfico triplot de las dos primeras variables latentes obtenidas en el análisis de mínimos cuadrados parciales (PLS) realizado con cuatro variables que resumen la variación en la composición de los aceites florales (Aceites\_1, 2, 3 y 4) de 12 poblaciones (círculos) de *Calceolaria polyrhiza*, cuya numeración se corresponde con la Tabla 1. Las flechas punteadas indican la magnitud y dirección del cambio de las variables predictoras polinizador (ABE), concentración de nitrógeno y carbono en el suelo (NT), concentración de potasio y arena en el suelo (K), precipitaciones (PR) y temperatura (TM), que explican significativamente la estructura de la variación de la composición de los aceites florales a escala geográfica.

## DISCUSIÓN

En este trabajo, aunque caracterizado de manera cualitativa, se reporta por primera vez la variabilidad intraespecífica en la composición química de los aceites florales, y su relación con la variación de variables abióticas (clima y suelo) y del ensamble de polinizadores en todo el rango de distribución de una especie. Los resultados muestran que en el sistema estudiado hay variación interpoblacional en la composición química de los aceites florales. El patrón de bandas obtenido es consistente con lo reportado para otras especies de *Calceolaria* (Sérsic, 2004) y sugiere que los aceites florales de *C. polyrhiza* constituyen una mezcla compleja de diferentes fracciones lipídicas. La mayoría de las bandas observadas en la cromatografía se registraron

en al menos tres poblaciones, excepto por tres bandas únicas que fueron registradas en una misma población (población 4), localizada en la ecorregión de Bosque Andino-Patagónico. Esta población presenta rasgos florales (diseños de máculas y forma de la corola) significativamente diferentes a las demás poblaciones (Strelin, 2009), y dado que es muy similar en sus características climáticas, edáficas y topográficas a la población 3, tal diferenciación podría deberse a procesos históricos ya que existen evidencias de aislamiento y persistencia *in situ* en esta localidad durante los períodos glaciares (Cosacov *et al.*, 2010). Estudios futuros que evalúen simultáneamente la influencia de factores históricos y ecológicos sobre la variación fenotípica permitirán evaluar esta hipótesis.

La caracterización del ensamble de polinizadores

y de las condiciones climáticas y edáficas de las poblaciones estudiadas de *C. polyrhiza* dan cuenta de los ambientes heterogéneos, incluso contrastantes, en los que se distribuye la especie, y los resultados obtenidos sugieren que tanto la identidad del polinizador principal como el gradiente de precipitaciones explicarían la mayor parte de la variación geográfica en la composición de los aceites. Es decir, la formación de grupos de poblaciones de acuerdo a su similitud en la composición de los aceites florales fue en parte explicada por la identidad del polinizador predominante en las respectivas poblaciones, sugiriendo que la similitud bioquímica podría estar mediada por las abejas colectoras que polinizan a *C. polyrhiza* en su rango de distribución. Dado que ambas especies de abejas difieren significativamente en su tamaño corporal, tamaño de sus nidos y cantidad de huevos (Michener, 2007; Neff, 2008) es probable que las mismas difieran en sus requerimientos energéticos (Buchmann, 1987), y por lo tanto ejerzan presiones selectivas diferenciales.

Por otra parte, el gradiente de precipitaciones tuvo una importancia similar a la de los polinizadores como factor explicativo de la variación geográfica, por lo que la variación en la recompensa floral también podría ser sólo consecuencia de factores abióticos (i.e. disponibilidad diferencial de recursos), y la abundancia relativa de las distintas especies de polinizadores simplemente ser el resultado de un proceso ecológico de preferencia de los polinizadores sobre los distintos ecotipos florales, pero no la fuerza evolutiva que subyace la variación geográfica de la recompensa floral (e.g. Medel *et al.*, 2007; Anderson & Johnson, 2008); alternativamente, ambos factores (polinizadores y precipitaciones) podrían estar influyendo simultáneamente sobre el rasgo floral estudiado siendo la composición química de los aceites el resultado de un compromiso entre el beneficio que implica atraer a ciertos polinizadores y el costo de producir la recompensa (Galen, 1999, 2000). Si bien la influencia de factores abióticos sobre la composición de los aceites florales no había sido previamente evaluada, estudios en especies que producen néctar como recompensa han informado correlaciones significativas entre la composición química y/o volumen del néctar, con gradientes de precipitación (e.g. Villareal &

Freeman, 1990; Carroll *et al.*, 2001). Dado que desde un punto de vista químico la secreción de lípidos es energéticamente más costosa que la producción de polen o néctar (Buchmann, 1987), es muy probable que la disponibilidad de recursos en las distintas poblaciones sea un factor causante de la variación geográfica en la composición de los aceites florales. Futuros trabajos que serán realizados desde una aproximación experimental permitirán esclarecer estos aspectos.

Si bien este estudio es el primero en analizar a escala geográfica la composición de los aceites florales, existen dos trabajos previos (Silvera, 2002; Sérsic, 2004) que evalúan la relación entre la composición química de los aceites florales y el ensamble de polinizadores. En especies del género *Calceolaria* se encontró cierta asociación entre la diferenciación interespecífica de los aceites florales con sus afinidades filogenéticas y no con el polinizador más frecuente de cada especie (Sérsic, 2004), mientras que Silvera (2002) en consistencia con los resultados del presente trabajo, muestra que la diferenciación en la composición de los aceites florales entre especies de orquídeas neotropicales estaría explicada por las diferencias en el ensamble de polinizadores (ensambles donde predominaban especies de *Centris* vs. *Paratetrapedia*) y no por las relaciones filogenéticas entre las mismas.

## CONCLUSIONES

Indagar sobre la diferenciación interpoblacional de caracteres florales implicados en la interacción planta-polinizador -como las características de las recompensas florales- y evaluar su relación con la variación de polinizadores y de factores abióticos en el rango de distribución de una especie, contribuye a dilucidar los factores que estarían involucrados en procesos evolutivos como especialización y adaptación biológica (Gould & Johnston, 1972; Thompson, 1994; Herrera *et al.*, 2006; Kay & Sargent, 2009). Los resultados del presente trabajo dan cuenta de la influencia tanto de los polinizadores como de la disponibilidad de recursos (agua y nutrientes) en la configuración del patrón de variación de los aceites florales a escala geográfica. Sin embargo, dado que la variación correlacionada no es evidencia de causalidad, futuros trabajos que indaguen



desde una aproximación experimental diversos aspectos de esta interacción altamente especializada, contribuirán a dilucidar los mecanismos que subyacen a los patrones encontrados.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Rosa Kofalt, Gabriel Oliva y personal de INTA-Santa Cruz por su colaboración en el trabajo de campo, a Santiago Benitez-Vieyra por sugerencias sobre los análisis estadísticos, a Rodrigo Medel y a un revisor anónimo por los comentarios y lectura crítica del manuscrito. CONICET, FONCyT y SECyT-UNC brindaron apoyo financiero para realizar el presente trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- ALVES-DOS-SANTOS, I., G. A. R. MELO & J. G. ROZEN. 2002. Biology and immature stages of the bee tribe Tetrapediini (Hymenoptera: Apidae). *Am. Museum Nov.* 3377: 1-45.
- ANDERSON, B. & S. D. JOHNSON. 2008. The Geographical mosaic of coevolution in plant-pollinator mutualism. *Evolution* 62: 220-225.
- BAKER, H. G. & I. BAKER. 1990. The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator types. *Isr. J. Bot.* 39: 157-166.
- BUCHMANN, S. L. 1987. The ecology of oil flowers and their bees. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18: 343-369.
- CAPPELLARI, S. C., A. H. MUHAMMAD, A. J. MARSAIOLI, R. TIDON & B.B. SIMPSON. 2011. *Pterandra pyroidea*: a case of pollination shift within Neotropical Malpighiaceae. *Ann. Bot.* 107: 1323-1334.
- CARROLL, A. B., S. G. PALLARDY & C. GALEN. 2001. Drought stress, plant water status, and floral trait expression in fireweed, *Epilobium angustifolium* (Onagraceae). *Amer. J. Bot.* 88: 438-446.
- CHAPIN, F. S. 1991. Integrated responses of plants to stress. *BioScience* 41: 29-36.
- CHAUVEAU, O., L. EGGERS, C. RAQUIN, A. SILVÉRIO, S. BROWN, A. COULOUX, C. CRUAUD, E. KALTCHUK-SANTOS, R. YOCKTENG, T. T. SOUZA-CHIES & S. NADOT. 2011. Evolution of oil-producing trichomes in *Sisyrinchium* (Iridaceae): insights from the first comprehensive phylogenetic analysis of the genus. *Ann. Bot.* 107: 1287-1312.
- COCUCCI, A. A. 1991. Pollination biology of *Nierembergia* (Solanaceae). *Plant Syst. Evol.* 174: 17-35.
- COCUCCI, A. A., A. SÉRSIC & A. ROIG-ALSINA. 2000. Oil-Collecting structures in Tapinotaspidiini: Their diversity, function and probable origin (Hymenoptera: Apidae). *Mitt. Münch. Ent. Ges.* 90: 51-74.
- COSACOV, A., J. NATTERO & A. A. COCUCCI. 2008. Variation of pollinator assemblages and pollen limitation in a locally specialized system: the oil-producing *Nierembergia liniariifolia* (Solanaceae). *Ann. Bot.* 102: 723-734.
- COSACOV, A., A. N. SÉRSIC, V. SOSA, J. A. DENOVA, S. NYLINDER & A. A. COCUCCI. 2009. New insights into the phylogenetic relationships, character evolution, and phylogeographic patterns of *Calceolaria* (Calceolariaceae). *Amer. J. Bot.* 96: 2240-2255.
- COSACOV, A. 2010. Patrones de variación de caracteres fenotípicos y frecuencias génicas en el rango de distribución de la especie endémica de Patagonia *Calceolaria polyrhiza*: su relación con variables ambientales, polinizadores y factores históricos. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- COSACOV, A., A. N. SÉRSIC, V. SOSA, L. A. JOHNSON & A. A. COCUCCI. 2010. Multiple periglacial refugia in the Patagonian steppe and post-glacial colonization of the Andes: the phylogeography of *Calceolaria polyrhiza*. *J Biogeogr.* 37: 1463-1477.
- DI RIENZO J. A., F. CASANOVES, M. G. BALZARINI, L. GONZALEZ, M. TABLADA & C. W. ROBLEDO. Infostat versión 2010. Grupo Infostat, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- DUMRI, K., L. SEIPOLD, J. SCHMIDT, G. GERLACH, S. DÖTTERL, A. G. ELLIS & L. A. WESSJOHANN. 2008. Non-volatile floral oils of *Diascia* spp. (Scrophulariaceae). *J. Phytochem.* 69: 1372-1383.
- EHRHART, C. 2000. Die Gattung *Calceolaria* (Scrophulariaceae) in Chile. *Bibli. Bot.* 153: 1-283.
- FERREIRA JÚNIOR, O. 2004. GPS Trackmaker v. 12.2. Bello Horizonte, Brasil.
- GALEN, C. 1999. Why Do Flowers Vary? The functional ecology of variation in flower size and form within natural plant populations. *BioScience* 49: 631-640.
- GALEN, C. 2000. High and dry: drought stress, sex-allocation trade-offs, and selection on flower size in the alpine wildflower *Polemonium viscosum* (Polemoniaceae). *Amer. Nat.* 156: 72-83.
- GERLACH, G. & R. SCHILL. 1991. Composition of orchid scents attracting euglossine bees. *Bot. Acta* 104: 379-391.
- GOULD, S.J. & R.F. JOHNSTON. 1972. Geographic variation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 3: 115-151.
- GOWER, J. C. 1966. Some distance properties of

- latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* 53: 325-38.
- HAELEIN, M. & A. M. KAPLAN. 2004. A Beginner's Guide to Partial Least Squares Analysis. *Understand stat.* 3: 283-297.
- HERRERA, C. M., M. C. CASTELLANOS & M. MEDRANO. 2006. Geographical context of floral evolution: towards an improved research programme in floral diversification. In Harder L. D & S. C. H. Barrett (eds.), *Ecology and evolution of flowers*, pp. 278-294. Oxford University, Oxford.
- HIJMANS, R. J., S. E. CAMERON, J. L. PARRA, P. G. JONES & A. JARVIS. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* 25: 1965-1978.
- JOHNSON, S. D. & K. E. STEINER. 1997. Long-Tongued Fly Pollination and Evolution of Floral Spur Length in the *Disa draconis* Complex (Orchidaceae). *Evolution* 51: 45-53.
- JOHNSON, S. D. & K. E. STEINER. 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends Ecol. Evol.* 15: 140-143.
- KAY, K. M. & R. D. SARGENT. 2009. The role of animal pollination in plant speciation: integrating ecology, geography, and genetics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 40: 637-656.
- MACHADO, I. C. 2004. Oil-collecting bees and related plants: a review of the studies in the last twenty years and case histories of plants occurring in NE Brazil. In Freitas M. & J. O. P. Pereira (eds.), *Solitary bees, conservation, rearing and management for pollination: a contribution to the International Workshop on Solitary Bees and their Role in Pollination*, pp. 252-282. Imprensa Universitaria, Fortaleza.
- MACHADO, I. C., S. VOGEL & A. V. LOPES. 2002. Pollination of *Angelonia cornigera* Hook. (Scrophulariaceae) by long-legged oil-collecting bees in NE Brazil. *Pl. Biol.* 4: 352-359.
- MEDEL, R., C. BOTTO-MAHAN & M. K. ARROYO. 2003. Pollinator-mediated selection on the nectar guide phenotype in the Andean monkey flower, *Mimulus luteus*. *Ecology* 84: 1721-1732.
- MEDEL, R., A. VALIENTE, C. BOTTO-MAHAN, G. CARVALLO, F. PÉREZ, N. POHL & L. NAVARRO. 2007. The influence of insects and hummingbirds on the geographical variation of the flower phenotype in *Mimulus luteus*. *Ecography* 30: 812-818.
- MICHENER, C. D. 2007. The bees of the world, 2nd ed. John Hopkins University Press, Baltimore.
- MOLAU, U. 1988. Scrophulariaceae – Part I. Calceolariae. *Flora Neotropica Monogr.* 47: 1-326.
- NEFF, J. L. 2008. Components of nest provisioning behavior in solitary bees (Hymenoptera: Apoidea). *Apidologie* 39: 30-45.
- NEFF, J. L. & B. B. SIMPSON. 1981. Oil-collecting structures in the Anthophoridae (Hymenoptera): morphology, function, and use in systematic. *J. Kansas Entomol. Soc.* 54: 95-123.
- PÉREZ-BARRALES, R., R. PINO, R. G. ALBALADEJO & J. ARROYO. 2009. Geographic variation of flower traits in *Narcissus papyraceus* (Amaryllidaceae): do pollinators matter? *J. Biogeogr.* 36: 1411-1422.
- PETANIDOU, T. 2005. Sugars in Mediterranean floral nectars: an ecological and evolutionary approach. *J. Chem. Ecol.* 31: 1065-1088.
- PETANIDOU, T., A. VAN LAERE, W. N. ELLIS & E. SMETS. 2006. What shapes amino acid and sugar composition in Mediterranean floral nectars? *Oikos* 115: 155-169.
- RENNER, S. S. & H. SCHAEFER. 2010. The evolution and loss of oil-offering flowers: new insights from dated phylogenies for angiosperms and bees. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 365: 423-435.
- SEIPOLD, L., G. GERLACH & L. WESSJOHANN. 2004. A new type of floral oil from *Malpighia coccigera* (Malpighiaceae) and chemical considerations on the evolution of oil flowers. *Chem. Biodiv.* 1: 1519-1528.
- SÉRSIC, A. N. 2004. Reproductive biology of the genus *Calceolaria*. *Stapfia* 82: 1-121.
- SILVERA, K. 2002. Adaptive radiation of oil-reward compounds among neotropical orchid species (Oncidiinae). PhD thesis, University of Florida, USA.
- SIMPSON, B. B. & J. L. NEFF. 1981. Floral rewards: Alternatives to pollen and nectar. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 68: 301-22.
- STEINER, K. E. & V. B. WHITEHEAD. 1990. Pollinator adaptation to oil-secreting flowers - Rediviva and Diascia. *Evolution* 44: 1701-1707.
- STEINER, K. E. & V. B. WHITEHEAD. 1991. Oil flowers and oil bees: further evidence for pollinator adaptation. *Evolution* 45: 1493-1501.
- STPICZYNSKA, M. & K. L. DAVIES. 2008. Elaiophore structure and oil secretion in flowers of *Oncidium trulliferum* Lindl. and *Ornithophora radicans* (Rchb.f.) Garay & Pabst (Oncidiinae: Orchidaceae). *Ann. Bot.* 101: 375-384.
- STRELIN, M.M. 2009. Estudio del polimorfismo de *Calceolaria polyrhiza* Cav. utilizando caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- THOMPSON, J. N. 1994. The coevolutionary process. University of Chicago Press, Chicago.
- VILLAREAL, A. G. & C. E. FREEMAN. 1990. Effects of temperature and water stress on some floral nectar characteristics in *Ipomopsis longiflora*

A. Cosacov *et al.* - Variación geográfica de *Calceolaria polyrhiza*

- (Polemoniaceae) under controlled conditions. *Bot. Gaz.* 151: 5-9.
- VINSON, S. B., G. W. FRANKIE & H. J. WILLIAMS. 2006. Nest liquid resources of several cavity nesting bees in the genus *Centris* and the identification of a preservative, levulinic acid. *J. Chem. Ecol.* 32: 2013-2021.
- VOGEL, S. 1974. Ölblumen und Ölsammelnde Bienen. *Abh. Akad. Wiss. Lit., Math. Naturwiss. Kl.* 7: 285-547.
- WASER, N. M. & D. R. CAMPBELL. 2004. Ecological speciation in flowering plants. In: DIECKMANN, U., M. DOEBELI, M. J. METZ & D. TAUTZ (eds), *Adaptive speciation*, pp. 264-277. Cambridge University Press, Cambridge.

Recibido el 27 de octubre de 2011, aceptado el 11 de junio de 2012.

