



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE POSIBLES FACTORES PROMOTORES DE
DIVERGENCIA EN LA ESPECIE-ANILLO *EUPHORBIA
TITHYMALOIDES* L. (EUPHORBIACEAE)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

ITZEL AURORA PIÑA DE LA ROSA



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. NATALIA IVALÚ CACHO GONZÁLEZ**

**Ciudad Universitaria, CD.MX.
Agosto 2022**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Piña
de la Rosa
Itzel Aurora
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
314022479

2. Datos del tutor

Dra. en C.
Natalia Ivalú
Cacho
González

3. Datos del sinodal 1

Dra. en C.
Rosalinda
Tapia
López

4. Datos del sinodal 2

Dra. en C.
Sonia
Vázquez
Santana

5. Datos del sinodal 3

Dra. en C.
Susana
Valencia
Avalos

6. Datos del sinodal 4

Dr. en C.
Santiago Alejandro
Ramírez
Barahona

7. Datos del trabajo escrito

Evaluación de posibles factores promotores de divergencia en la especie-anillo

Euphorbia tithymaloides L. (Euphorbiaceae).

72 p

2022

“A veces la única forma de superar la adversidad es imaginarse como sería el mundo si nuestros sueños se hicieran realidad”

- **Arthur Golden**

Agradecimientos académicos

Este proyecto fue financiado por el proyecto CONACYT titulado *Genómica y morfometría de Euphorbia tithymaloides, la única especie-anillo en plantas* (CB2015-00255829). La infraestructura fue proporcionada por el Instituto de Biología, proyectos anteriores (a NIC) y el proyecto CONACYT (INFR2016- 268109).

El Dr. Patrick J. McIntyre enriqueció este trabajo con ideas y discusión, y proporcionó ayuda con scripts de georeferenciación. Los Dres. Carolina Granados Mendoza, Ismael Hinojosa Díaz, Sol Cristans Niizawa y Santiago Ramírez Barahona del taller *Biología integrativa de plantas y sus interactuantes* aportaron elementos de discusión y guía en este proyecto.

El trabajo de campo fue posible gracias a la asistencia en campo y para obtención de permisos de colecta de: Bryan Drew, Marcos Caraballo, Patrick J. McIntyre y de las personas e instituciones que se enlistan a continuación. *Colombia*: Maryu R, Grillo C, A Vasco; *Costa Rica*: F Morales, D Santamaría, R Espinoza, J Hernandez; *Curaçao*: J DeFreitas, D Alberts, E Houtepen, CARMABI; *República Dominicana*: J Salazar, P Feliz, G Feliz, B Peguero, T Clase, Jardín Botánico; *Guadeloupe*: Mike Helion (GWADA Botanica); *Guatemala*: M Pérez, J Morales, A MacVean; *Jamaica*: G Proctor, T Commock, K Campbell, IJ, NEPA; *México*: Carlos Hinostrosa, MEXU, Semarnat; *Puerto Rico*: Yma & Ana Ríos, O Monzón, Para la Natualeza; *USVI*: E Gibny, C Weaver, G Ray, USVI-NP, R Oreilly; *St. Eustatius*: H Madden, CNSI, C Buma, STENAPA; *Turks & Caicos*: B Naqqi Manco; *Venezuela*: O Huber, D Conde, W Díaz, H Vázquez, L Rodríguez, O Hotchke, C Reyes, R Winfield.

Agradecimientos personales

A mi papá, quien siempre ha sabido apoyarme y escucharme, aunque no entienda la mayoría de las cosas que le cuento. Gracias por crecer conmigo y dejarme ser la Barbie bióloga de la familia, te amo infinitamente.

A mi abuelita Juanita hermosa, porque este logro es de ambas, agradezco todos los lunches que con mucho amor y cariño me dejabas todas las mañanas, tu apoyo incondicional y todo el amor que me tienes, definitivamente no estaría aquí sin ti. Gracias por enseñarme tanto y al mismo tiempo interesarte en lo que hago, no hay persona con la que disfrute estas más de lo que disfruto estar contigo, te amo y extraño mucho.

A mis hermanos, quienes siempre han estado ahí para mí y me han acompañado en diferentes procesos a lo largo de la carrera, los amo panchos.

A mi mejor amiga Sofía, gracias por tantos años de amistad, por apoyarme siempre en todo y confiar en mí. Me pone muy nostálgica recordar nuestros sueños de niñas, ver que poco a poco los vamos cumpliendo me hace muy feliz, soy muy afortunada de tenerte en mi vida. Te amo muuuuucho cocochita.

A mi goldi pisioso, por apoyarme siempre y alentarme a ser mejor persona, gracias infinitas por todo el amor y paciencia que me tienes, por confiar en mí y no dejarme rendirme cuando más ganas tuve, te amo con todo mi corazón.

A Carlita Brindis, por ser mi mejor amiga y mi apoyo incondicional desde que la conozco, por enseñarme tantas cosas de la vida y las plantitas, agradezco mucho tu presencia en mi vida y tu apoyo durante todo este proceso, te amo mucho amoy.

A todas las morritas increíbles que conocí en estos seis años de carrera: Vanesad, Marianita, Pauchis, Vero, Vane Mandujano, Luz, Lupita, Soff, Karen, Miri, Pau, Nato, Clauu, Jean, Mónica, Natalia, entre otras. Gracias por permitirme conocerlas, caminar conmigo en esta aventura y por todas las experiencias y aprendizajes, estoy segura que serán biólogas increíbles y no podría sentirme más orgullosa de ustedes. Las quiero muchísimo.

A las tres mujeres más importantes de mi vida: a mi mami, mi Geme y mi Mocho <3, gracias por apoyarme y guiarme en este proceso, por ser como son y por estar en mi vida. Gracias por interesarse por lo que hago, por lo que les cuento y por asociarme con las abejas. Las amo con todo mi corazón.

A Juanito, que siempre me ha tratado con todo el amor y respeto del mundo, gracias por cuidar tan bien de los colibríes que te visitan, y por acordarte de mí cada que ves una abeja. Te quiero muchísimo.

A mis compañeros del CachoLab: Brenn, Clarita, Max y Miguel. Gracias por compartir sus conocimientos conmigo, por enseñarme tantas cosas y por ser mis amigos, definitivamente sin ustedes tampoco hubiera llegado hasta aquí. Los aprecio y quiero muchísimo.

A la Dra. Ivalú, por dejarme formar parte de este proyecto y por recordarme constantemente porque escogí esta carrera. Muchas gracias por todo tu apoyo, tanto académico como personal, lo que me has enseñado y lo que hemos aprendido juntas. Te quiero mucho, y espero algún día poder llegar tan lejos como tú.

A Isra, por darme la oportunidad de trabajar contigo y por compartirme lo que sabes. Gracias por no dejarme rendirme y recordarme que debía echarle ganas y ser muy chingona, te quiero mucho pelón.

A las personas que vayan a leer este trabajo, espero que les sea de gran utilidad y lo disfruten, gracias por consultarlo.

ÍNDICE

RESUMEN	13
INTRODUCCIÓN	14
<i>Aislamiento reproductivo en plantas</i>	<i>14</i>
<i>Euphorbia tithymaloides.....</i>	<i>20</i>
JUSTIFICACIÓN	29
OBJETIVOS.....	30
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS	34
<i>Datos de fenología.....</i>	<i>34</i>
<i>Datos de recompensa floral (néctar)</i>	<i>38</i>
<i>Datos de ocurrencia</i>	<i>40</i>
<i>Datos de visitantes florales.....</i>	<i>40</i>
<i>Análisis estadísticos</i>	<i>41</i>
RESULTADOS	43
<i>Fenología</i>	<i>43</i>
<i>Recompensa floral (néctar).....</i>	<i>47</i>
<i>Patrones geográficos en la recompensa (néctar) en poblaciones naturales</i>	<i>48</i>
<i>Visitación floral en campo</i>	<i>50</i>
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	59
REFERENCIAS.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Barreras que contribuyen al aislamiento reproductivo en plantas, las barreras se enlistan en el orden que actúan (Modificado de Coyne y Orr, 2004).	15
Figura 2. Curvas de densidad fenológica que muestran el inicio de la floración estimado para cada población estudiada de orquídeas (Modificado de Chapurlat et al., 2020).	16
Figura 3. Selección sobre la variación en el color y la forma de las estructuras florales mediada por polinizadores (Modificado de Toon et al., 2014).	17
Figura 4. Formas florales polinizadas por aves. (A) <i>Strelitzia reginae</i> ; (B) <i>Erythrina suberosa</i> ; (C) <i>Babiana ringens</i> con inflorescencias estériles para posarse (flecha); (D) <i>Cadia purpurea</i> , miembro de los Genistioideos con simetría radial con globos de néctar (flecha); (E) <i>Ipomopsis aggregata</i> ; (F) <i>Phygелиus capensis</i> ; (G) <i>Psittacanthus</i> sp.; (H) <i>Fritillaria suberosa</i> con nectarios globosos (flecha blanca) (Modificado de Cronk y Ojeda 2008).	19
Figura 5. Correlación del largo y ancho de los tubos de la corola de una muestra de plantas polinizadas por aves del oeste de América del Norte (Modificado de Cronk y Ojeda, 2008).	19
Figura 6. La distribución de <i>Euphorbia tithymaloides</i> abarca desde Florida, Estados Unidos hasta Brasil y Guyana, así como la mayoría de las islas del Caribe (Mapa: Ivalú Cacho).	21
Figura 7. De acuerdo con el modelo de especies en anillo, una población ancestral ha divergido a lo largo de dos frentes que rodean una barrera de hábitat inadecuado de tal manera que, al reunirse, las poblaciones en los extremos han desarrollado algunas barreras para el flujo génico (Modificado de Cacho y Baum, 2012).	21
Figura 8. Biogeografía histórica de <i>Euphorbia tithymaloides</i> . A. Esta especie expandió su distribución geográfica desde su área de origen en México-Guatemala-Belice hacia el Caribe a lo largo de dos frentes, uno que se extendió a través de las Antillas Mayores y otro que viajó hacia el sur, luego al este y al norte a través del Centro y América del Sur y las Antillas Menores (realizado con información de Cacho et al. 2019). B. Representación de un árbol filogenético de alelos del gen SGN-U342009 que muestra la relación histórica entre frentes geográficos y subespecies. Colores: magenta, <i>Euphorbia personata</i> (especie hermana); verde, <i>E. tithymaloides</i> ssp. <i>tithymaloides</i> (en verde claro, las accesiones de Venezuela); púrpura, <i>E. tithymaloides</i> ssp. <i>parasitica</i> ; azul marino, <i>E. tithymaloides</i> ssp. <i>jamaicensis</i> ; amarillo, <i>E. tithymaloides</i> ssp. <i>bahamensis</i> ; rojo, <i>E. tithymaloides</i> ssp. <i>angustifolia</i> ; cian, <i>E. tithymaloides</i> ssp. <i>padifolia</i> (Tomado de Jacobo-Arteaga et al., 2022).	23
Figura 9. Comparación de formas terminales y forma continental de <i>Euphorbia tithymaloides</i> , las cuales son morfológica y ecológicamente distintas. (a) <i>Euphorbia tithymaloides</i> ssp. <i>tithymaloides</i> ; (b) <i>Euphorbia tithymaloides</i> ssp. <i>angustifolia</i> y (c) <i>Euphorbia tithymaloides</i> ssp. <i>padifolia</i> . Ambas formas terminales coexisten en las Islas Vírgenes (Modificado de Cacho y Baum, 2012).	24

- Figura 10. Divergencia morfológica de *Euphorbia tithymaloides* en poblaciones del continente hacia los dos frentes de distribución, dando origen a las subespecies *E. tithymaloides* spp. *angustifolia* en las Antillas Mayores (frente GA) y *E. tithymaloides* spp. *padifolia* en las Antillas Menores (frente LA) (Figura: Itzel Piña de la Rosa).25
- Figura 11. Representación gráfica del ciatio de *Euphorbia tithymaloides*. Se observan brácteas que conforman al involucre (a) espolonado, formado por la cámara (b) que contiene las glándulas de néctar (c); se muestran también las flores masculinas reducidas (d) y la única flor femenina central, con su único ovario (e) y estilo (f) (Tomado de Cacho y Baum, 2012).26
- Figura 12. Los colibríes son los polinizadores principales de *Euphorbia tithymaloides* (Dressler 1957; Veiga-Blanco et al 2013). Al buscar el néctar almacenado en los ciatios, la barbilla del colibrí hace contacto con los estambres y estigma del mismo (Foto: Rafy Rodríguez).26
- Figura 13. Ciatio de *Euphorbia diazlanana* (izquierda; foto: Pablo Carrillo-Reyes); se aprecia una reducción en el tamaño del ciatio y cambios en la coloración de este en comparación con el ciatio de *E. tithymaloides* (derecha; foto: Ivalú Cacho).27
- Figura 14. Observaciones en campo revelan una gran diversidad de visitantes florales en *Euphorbia tithymaloides* a lo largo de su distribución en el Caribe. Se observan aves pertenecientes a diferentes familias (B, Thraupidae; G, Trochilidae), fásmidos (A), himenópteros (C, D, E, H) y lepidópteros (F e I) (Fotos: Ivalú Cacho).28
- Figura 15. Escenarios hipotéticos de la fenología como un posible factor promotor de la divergencia en *Euphorbia tithymaloides* del continente (ML), Antillas Menores (LA) y Antillas Mayores (GA). (A) El traslape fenológico notable sugiere poca importancia de la fenología como factor promotor de la divergencia. (B) El traslape intermedio puede indicar un posible papel intermedio de la fenología en promover la divergencia en este sistema. (C) La falta de traslape fenológico entre poblaciones de las tres áreas sugiere que la fenología puede estar jugando un papel importante en promover la divergencia en *Euphorbia tithymaloides*.31
- Figura 16. Escenarios hipotéticos de la variación de azúcares totales (concentración o masa total) en el néctar de *Euphorbia tithymaloides* en relación a su área de distribución; continente (ML), Antillas Menores (LA) y Antillas Mayores (GA). (A) Concentraciones de azúcares totales iguales entre las poblaciones sugieren que no existe divergencia con respecto a los polinizadores potenciales que se traduzca en variación en la recompensa. (B) Concentraciones de azúcares totales similares para dos áreas geográficas (ML y LA) pero diferente para una tercera (GA) sugiere que la recompensa puede indicar posibles cambios de polinizadores potenciales en este sistema. (C) Concentraciones de azúcares totales diferentes en néctares de poblaciones filogenéticamente más distantes sugieren un posible papel importante de cambios en los polinizadores como factor promotor de la divergencia en *Euphorbia tithymaloides*.32
- Figura 17. Algunos escenarios hipotéticos sobre la importancia de polinizadores como posibles factores promotores de la divergencia en *Euphorbia tithymaloides* a lo largo de su área de distribución, que abarca áreas continentales (ML), las Antillas Menores (LA) y las Antillas Mayores (GA). (A) Igual frecuencia de visitación del mismo grupo funcional de polinizadores en

las tres áreas geográficas sugiere poca importancia del cambio en los sistemas de polinización como factor promotor de la divergencia. (B) Una misma frecuencia de visitación para un grupo funcional de polinizadores potenciales en dos áreas geográficas (por ejemplo, ML y LA) pero diferente para la tercera (GA) sugiere que un cambio en los polinizadores potenciales puede estar jugando un papel como un posible factor promotor de la divergencia. (C) Diferencias en la frecuencia de visitación de diferentes grupos funcionales de polinizadores potenciales en poblaciones de distintas áreas geográficas sugieren que cambios en los polinizadores potenciales pueden estar promoviendo la divergencia en poblaciones caribeñas de *Euphorbia tithymaloides*.....33

Figura 18. Fases florales de *E. tithymaloides*. A) botones florales, B) femenina F1, C) femenina F2, D) femenina F3, y E) hermafrodita (Fotos: Itzel Piña).34

Figura 19. Mapa de distribución de los individuos que conforman la colección viva de *Euphorbia tithymaloides*, estas poblaciones representan en su mayoría al Continente (Mapa por: Itzel Piña).35

Figura 20. Diagrama de flujo para la obtención de datos de fenología de *Euphorbia tithymaloides* a lo largo de su distribución geográfica, con base en individuos en un jardín común.36

Figura 21. Diagrama de flujo para obtención de datos de fenología de *Euphorbia tithymaloides* a lo largo de su distribución geográfica, con base en especímenes de herbario.37

Figura 22. Diagrama de flujo que ilustra la obtención de datos de volumen y concentración de néctar en individuos de *Euphorbia tithymaloides* en jardín común.....39

Figura 23. Diagrama de flujo que muestra el proceso de obtención de datos de concentración y volumen de néctar de *Euphorbia tithymaloides* en campo.....39

Figura 24. El muestreo fenológico de *Euphorbia tithymaloides* en el Caribe está representado por rombos, círculos y triángulos completos, codificados por colores en función de su área de distribución: verde para el continente, rojo para las Antillas Mayores y azul para las Antillas Menores (n = 693). Las 10 poblaciones naturales incluidas en este estudio con observaciones de recompensa y visitas se encuentran marcadas con estrellas amarillas (Mapa: Itzel Piña).40

Figura 25. Densidad fenológica en poblaciones de *Euphorbia tithymaloides* de jardín común, donde se observa el inicio de la floración estimado para cada población, y una floración constante en los individuos correspondientes a la población de St. Eustatius (ST).43

Figura 26. Las plantas en cultivación del continente (verde) y las Antillas Menores (azul) presentan un traslape en su actividad fenológica de 61.2%; para suavizar la gráfica se utilizó un bandwidth=20.44

Figura 27. Los datos de herbario (estructuras reproductivas) revelan traslape de la actividad fenológica en *Euphorbia tithymaloides* en las tres áreas focales analizadas: continente (verde), Antillas Menores (azul) y Antillas Mayores (rojo); para suavizar la gráfica se utilizó un bandwidth=20.....45

Figura 28. La variación presente en los especímenes de herbario correspondientes al continente (color verde), las Antillas Menores (color azul) y las Antillas Mayores (color rojo) no respalda la hipótesis de divergencia en la fenología entre las poblaciones de *Euphorbia tithymaloides* a través de su área de distribución en el Caribe; para suavizar la gráfica se utilizó un bandwidth=20.46

Figura 29. (A) La concentración (de azúcares en néctar de *Euphorbia tithymaloides* (n=343) coincide con lo reportado en la literatura (n=507) para plantas ornitófilas (gris), y se encuentra hacia el extremo de concentraciones altas (rojo). (B) El volumen del néctar de *E. tithymaloides* es menor a lo reportado en la literatura para plantas ornitófilas.47

Figura 30. La concentración, el volumen y la cantidad de azúcares totales presentes en néctar de poblaciones de *Euphorbia tithymaloides* en función de su distribución geográfica. Los análisis no respaldan la divergencia en la recompensa de néctar entre las poblaciones. Los códigos de color son: rojo, Antillas Mayores (GA); azul, Antillas Menores (LA); y, verde, continente (ML).50

Figura 31. Observaciones de importancia relativa de visitantes florales en 10 poblaciones naturales *Euphorbia tithymaloides* a través de su área de distribución son consistentes con los colibríes como principales polinizadores potenciales.52

Figura 32. Los insectos son comunes en las áreas que ocupan 10 poblaciones naturales *Euphorbia tithymaloides* y responsables de la mayoría de los avistamientos realizados en campo.53

RESUMEN

El estudio de los factores que promueven la divergencia es fundamental para la comprensión de la evolución biológica. Los sistemas en los que la especiación se está dando de forma activa representan oportunidades importantes para el estudio de la divergencia.

La planta *Euphorbia tithymaloides* es un sistema que ha divergido a través de dos frentes geográficos que muestran diferencias morfológicas y genéticas, y que al reencontrarse parecen no exhibir flujo génico directo; es decir, es un sistema que se ajusta al modelo de especie-anillo, en donde la especiación parece estar ocurriendo en tiempo real. La distribución geográfica de *E. tithymaloides* abarca México, Florida, Centroamérica, el norte de Sudamérica y todo el Caribe, y los datos genéticos y morfológicos concuerdan con una colonización desde México-Guatemala hacia el Caribe por medio de dos frentes: uno que se expandió hacia el sur por Centroamérica y luego al este por el norte de Sudamérica, para colonizar las Antillas Menores, y otro que se expandió hacia el este por las Antillas Mayores.

Este trabajo busca evaluar la importancia de la fenología y distintas líneas de evidencia relacionadas con cambios en los sistemas de polinización como posibles factores promotores de la divergencia en *E. tithymaloides* a lo largo de su área de distribución en el Caribe. Éste es el primer estudio en abordar estos aspectos para esta especie de planta.

La actividad fenológica en *E. tithymaloides* en el Caribe se evaluó con datos de especímenes de herbario, bases de datos y observaciones propias. Como un *proxy* para inferir cambios potenciales en los sistemas de polinización de *E. tithymaloides* se analizaron datos de recompensa (néctar) en 10 poblaciones en campo y 6 poblaciones en condiciones de jardín común, así como observaciones de visitación floral en 10 poblaciones naturales representativas del área de distribución de *E. tithymaloides*.

Los resultados revelan traslape (50 – 69%) en la actividad fenológica de los distintos linajes de *E. tithymaloides*. La producción y concentración de azúcares como en la recompensa floral son también similares entre los linajes (para volumen 0.1-9.8 μ L; para concentración 20 – 262.5 °Brix). Los datos de visitación sugieren a los colibríes como principales polinizadores potenciales de esta planta (60 – 97% de visitación) a lo largo de su área de distribución.

En conclusión, este estudio no identifica patrones que sugieran que la fenología o cambios de polinizadores están jugando un papel en la divergencia observada entre las poblaciones de *E. tithymaloides* en el Caribe.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los factores que promueven la divergencia es fundamental para la comprensión de la evolución y la diversidad biológica, pues en última instancia, la mayoría de las especies se originan por medio de un proceso de divergencia que culmina con la especiación (Mayr, 1942; Landis et al., 2022).

Desde los tiempos de Darwin, la investigación teórica y empírica sobre la formación de nuevas especies ha sido uno de los focos principales de la biología evolutiva. Darwin (1859) formuló la teoría de la selección natural, y también estableció que la diversidad biológica, presente y pasada, se ha originado por medio de divergencia evolutiva a partir de un ancestro común; este proceso es conocido como especiación (Coyne y Orr, 2004; Dieckmann et al., 2004; Nosil y Feder, 2012).

La especiación es el resultado de procesos espaciales, ecológicos o reproductivos que implican la aparición de una o un conjunto de barreras que interfieren en el flujo génico entre poblaciones de la especie ancestral haciendo posible su divergencia. Estas poblaciones pueden estar o no aisladas geográficamente, aunque por lo general, el aislamiento geográfico es mucho más eficiente en limitar el flujo génico y, por lo tanto, en promover la divergencia (Schluter, 2000; Coyne y Orr, 2004; Rundle y Nosil, 2005; Butlin et al., 2010).

El estudio de la especiación implica el entendimiento de los factores y mecanismos involucrados en el origen de nuevas especies. En este campo de estudio, el concepto de especie más utilizado es el *concepto biológico de especie* (Biological Species Concept o BSC), popularizado por Dobzhansky y Mayr (1937; 1963). Este concepto de especie establece que las especies biológicas son aquellos grupos de individuos o poblaciones que “*de hecho o potencialmente*” se reproducen entre sí y están reproductivamente aislados de otros grupos de individuos o poblaciones que constituyen especies diferentes (Coyne y Orr, 2004). A diferencia de otros conceptos de especie, este concepto proporciona un contexto concreto sobre el cual se puede poner a prueba la hipótesis de especiación, usando un marco cuantitativo: el aislamiento reproductivo.

Aislamiento reproductivo en plantas

El aislamiento reproductivo se refiere a afectaciones en la capacidad de los individuos de dos o más poblaciones para reproducirse debido a barreras o diferencias de índole diversa, entre ellas geográficas, de comportamiento, fisiológicas o genéticas. Son varios los mecanismos que intervienen en mantener la separación y la individualidad de diferentes acervos genéticos que son incompatibles y/o que están adaptados a diferentes ambientes (Pascarella, 2007; Nosil y Feder, 2012). El aislamiento reproductivo es un componente importante del proceso de especiación y es crítico para

el mantenimiento de la diversidad, ya que la formación de nuevas especies implica la evolución de barreras reproductivas. Se forman nuevas especies cuando los individuos de poblaciones divergentes ya no se reconocen entre sí como parejas potenciales, o cuando las oportunidades de apareamiento o de supervivencia de la descendencia se ven limitadas (Rabosky, 2016).

Diversos factores pueden contribuir al aislamiento reproductivo y promover la divergencia que eventualmente puede llevar a la especiación. En plantas, estos factores incluyen al aislamiento espacio-temporal (cambios en fenología, diferencias en hábitat), la falta de polinizadores en común, la incompatibilidad genética y morfológica, entre otros (Figura 1). Estudios que cuantifican las contribuciones relativas de numerosas barreras al flujo génico, tanto pre-cigóticas como post-cigóticas han revelado consistentemente que las barreras pre-cigóticas son los impedimentos más fuertes para el flujo de genes (Husband, 2003; Ramsey et al., 2003; Hurt et al., 2005; Martin y Willis, 2007) y, por lo tanto, pueden tener mayor impacto que las post-cigóticas. Si la divergencia entre organismos ocurre en presencia de flujo de genes, la fuerza de las barreras pre-cigóticas puede ser fundamental para el establecimiento de linajes evolutivos nuevos.

	Naturaleza de la barrera	Efecto
Pre-cigóticas	Aislamiento de hábitat	Adaptación a diferentes hábitats en la misma área geográfica previene el intercambio de genes
	Aislamiento fenológico	Flujo de genes entre los taxones se impide debido a las diferencias en tiempos de reproducción/floración
	Aislamiento de polinizadores	Flujo de genes entre especies de angiospermas se reduce por interacciones diferenciales con los polinizadores
	Aislamiento mecánico	Copulación o polinización entre los especies se inhibe debido a la incompatibilidad de estructuras reproductivas
	Aislamiento del sistema de apareamiento	Evolución de la autofecundación parcial o completa impide el flujo de genes entre miembros de la población ancestral
Post-cigóticas	Inviabilidad ecológica	Híbridos desarrollados normalmente que sufren una menor viabilidad porque no pueden encontrar un nicho ecológico apropiado
	Inviabilidad híbrida	Híbridos sufren dificultades de desarrollo que causan letalidad total o parcial
	Esterilidad híbrida	Híbridos sufren problemas en el desarrollo del sistema reproductivo, gametos o lesiones fisiológicas que los hacen incapaces de reproducirse exitosamente

Figura 1. Barreras que contribuyen al aislamiento reproductivo en plantas, las barreras se enlistan en el orden que actúan (Modificado de Coyne y Orr, 2004).

La fenología estudia las fases o actividades periódicas y repetitivas del ciclo de vida de las plantas y su variación temporal a lo largo del año. El aislamiento fenológico actúa cuando los individuos de las poblaciones en cuestión presentan diferentes momentos de floración durante el día o el año, imposibilitando la reproducción (Batalha and Mantovani, n.d.; Coyne y Orr, 2004; Wiens, 2004). Dada la naturaleza secuencial en la que las barreras reproductivas actúan en el ciclo de vida de las especies, el aislamiento fenológico puede actuar como una barrera muy importante para prevenir la formación de híbridos viables (Martin y Willis, 2007; Martin et al., 2007).

Por su importancia en la evolución del aislamiento reproductivo, el aislamiento fenológico puede estar bajo selección divergente, dando origen a diferencias notables en el tiempo de floración de las poblaciones en proceso de especiación (Chapurlat et al., 2020). En diez poblaciones de dos especies estrechamente relacionadas de orquídeas del género *Gymnadenia* (seis de *G. conopsea* s.s. y cuatro de *G. densiflora*), se demostró evidencia de selección divergente en el inicio de la floración (con floración temprana en *G. conopsea* s.s. relativa a *G. densiflora*; Figura 2) pero no en la morfología floral (altura, número de flores, tamaño de corola y longitud del espolón). Estos resultados son consistentes con la fenología floral actuando como barrera reproductiva de acción temprana que marca la pauta en la diferenciación entre dos especies de plantas (Chapurlat et al., 2020).

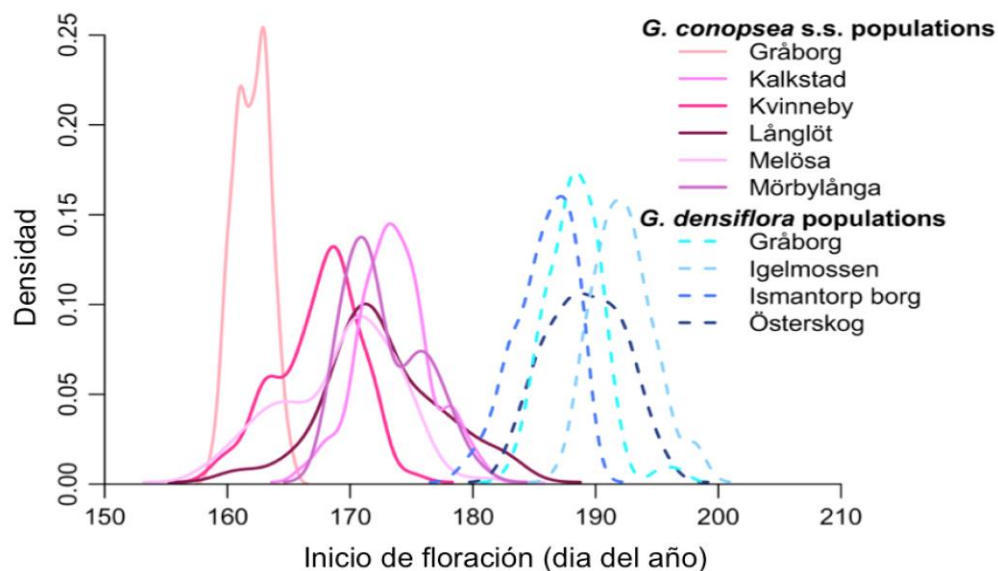


Figura 2. Curvas de densidad fenológica que muestran el inicio de la floración estimado para cada población estudiada de orquídeas (Modificado de Chapurlat et al., 2020).

Una gran diversidad de plantas con flores, correspondientes a distintas familias, son polinizadas por animales, incluidos insectos, aves, murciélagos y otros vertebrados. Se ha planteado que uno de los factores más importantes en promover la divergencia en angiospermas son los cambios en los sistemas de polinización, ya que el flujo de genes entre especies puede reducirse por interacciones diferenciales con sus polinizadores (Coyne y Orr, 2004). Existe evidencia amplia de que las preferencias de los polinizadores por diferentes características florales pueden conducir al aislamiento reproductivo en plantas (Gegear y Burns, 2007; Ollerton et al., 2011). Cuando las interacciones son especializadas, las plantas tienden a presentar conjuntos de características florales que atraen y proporcionan recursos alimenticios para un polinizador particular o un conjunto de estos, a lo que se denomina síndrome de polinización (Proctor et al., 1947; Fenster et al., 2004; Martén-Rodríguez et al., 2009). Los sistemas de polinización también son lábiles y pueden cambiar en función de varios factores, entre ellos la presencia o ausencia de visitantes florales; por ejemplo, en leguminosas australianas se ha documentado que el síndrome de polinización ancestral es por abejas, y las reconstrucciones indican posibles reversiones de los síndromes de polinización de aves a abejas si estas se encuentran disponibles (Toon et al., 2014; Figura 3).

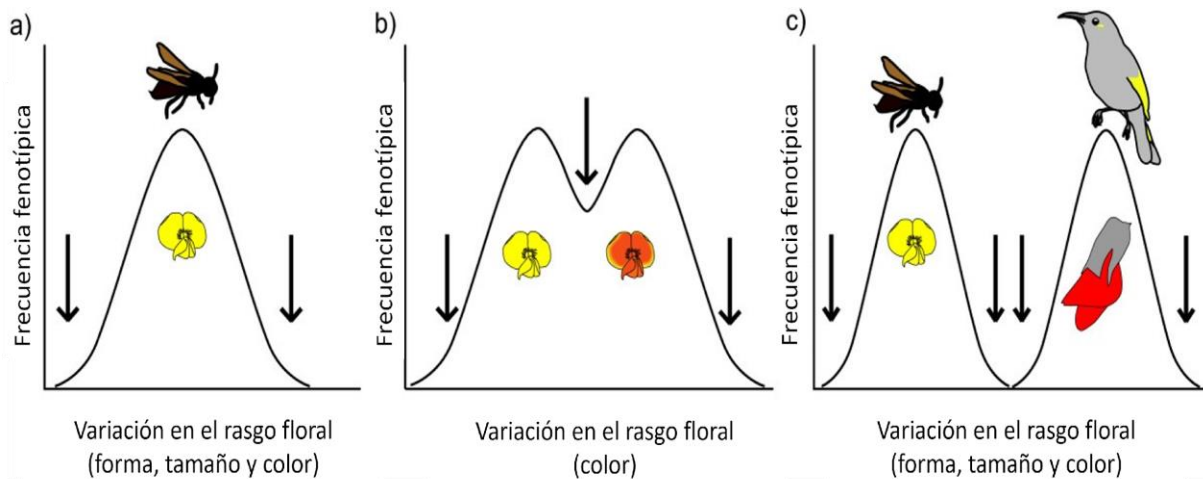


Figura 3. Selección sobre la variación en el color y la forma de las estructuras florales mediada por polinizadores (Modificado de Toon et al., 2014).

La morfología de las flores asociada con la ornitofilia incluye una corola tubular larga y estrecha (generalmente de coloración roja o rojiza) la cual no suele ser atractiva para las abejas. Sin embargo, esta característica puede ser eludida por el robo de néctar (Lara y Ornelas, 2001) si la base del tubo de la corola no está protegida por un cáliz robusto. El tubo de la corola puede curvarse hacia abajo (arqueado) de manera similar a muchos picos de aves (Figuras 4 y 5) y que limita el acceso de los insectos a la recompensa.

Además de la morfología, la recompensa en flores polinizadas por aves, en particular el néctar, es importante. El néctar puede variar en cuanto a su volumen, concentración de azúcares y viscosidad, así como en los tipos de azúcares y la composición de otros elementos, como aminoácidos, minerales, lípidos y compuestos volátiles. La cantidad, la composición y el momento de producción de néctar pueden influir en los polinizadores que atrae una flor y su comportamiento de forrajeo o visita, y todas estas son características con respecto a las cuales puede actuar la selección promoviendo divergencia (Baker y Baker, 1983; Bruneau, 2014). Si bien todas estas características son importantes en la atracción de los visitantes y por lo tanto para el éxito de las interacciones planta-polinizador (Proctor et al., 1947; Baker y Baker, 1983), uno de los patrones más establecidos es una correlación positiva entre los requerimientos energéticos de los polinizadores y el contenido energético global de la recompensa (Heinrich y Raven, 1972; Smith et al., 2008). En un estudio de solanáceas tropicales, se mostró que las plantas que producen una mayor recompensa (que integra volumen y concentración de nectar) tenían mayor probabilidad de ser polinizadas por colibríes que por himenópteros o dípteros, lo cual es consistente con los altos requerimientos energéticos de estas aves (Altshuler et al., 2004). También, en especies mexicanas de *Salvia* (Lamiaceae), se observó que aquellas polinizadas por colibríes, producían néctares con mayor contenido de azúcares que las especies polinizadas por abejas (Benitez-Vieyra et al., 2014).

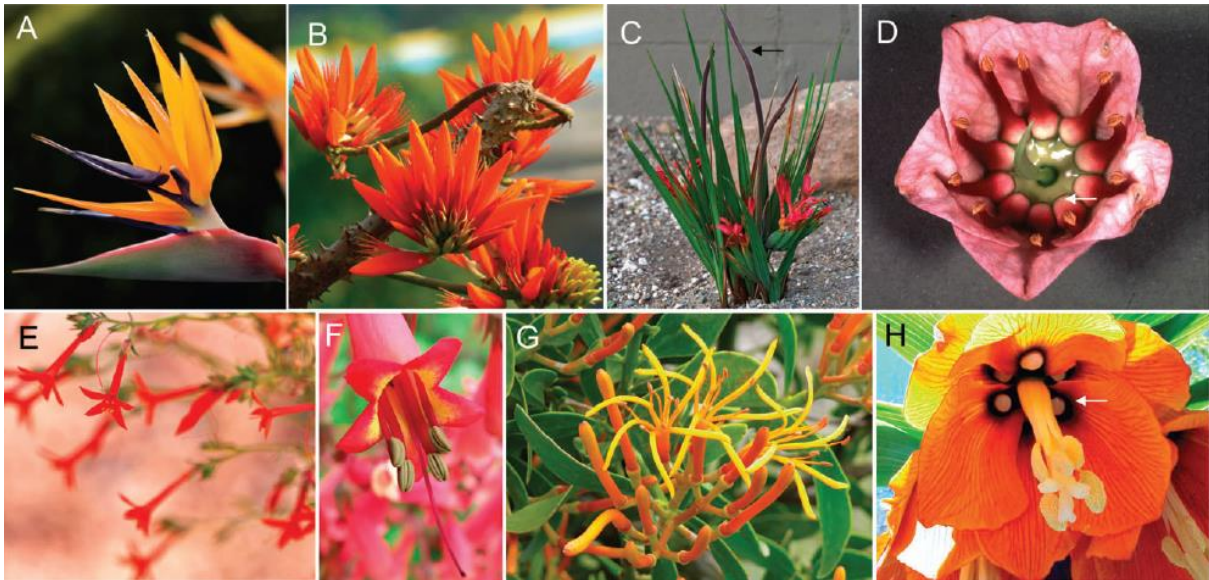


Figura 4. Formas florales polinizadas por aves. (A) *Strelitzia reginae*; (B) *Erythrina suberosa*; (C) *Babiana ringens* con inflorescencias estériles para posarse (flecha); (D) *Cadia purpurea*, miembro de los Genistioides con simetría radial con globos de néctar (flecha); (E) *Ipomopsis aggregata*; (F) *Phygелиus capensis*; (G) *Psittacanthus* sp.; (H) *Fritillaria suberosa* con nectarios globosos (flecha blanca) (Modificado de Cronk y Ojeda 2008).

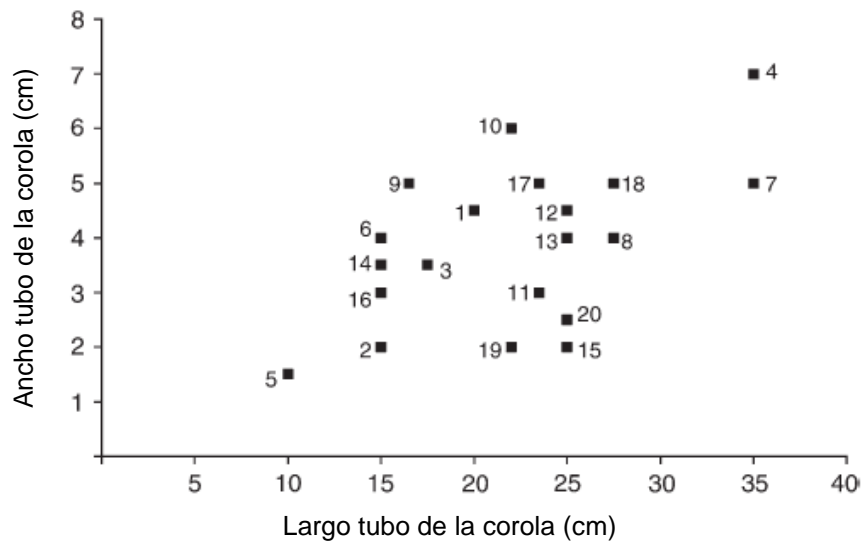


Figura 5. Correlación del largo y ancho de los tubos de la corola de una muestra de plantas polinizadas por aves del oeste de América del Norte (Modificado de Cronk y Ojeda, 2008).

Los néctares de plantas ornitófilas y entomófilas tienden a diferir en composición (Cronk y Ojeda, 2008; de Araújo et al., 2021) y concentración de azúcares. Las concentraciones medias de azúcar en néctares de plantas polinizadas por aves oscilan entre el 20% y el 26% (Pyke y Waser, 1981; Stiles y Freeman, 1993) con extremos entre el 10% y el 34% (Baker, 1975), mientras que las flores polinizadas por abejas presentan concentraciones medias de azúcar que oscilan entre el 20% y 65% (Nicolson, 2002) con extremos entre los 10% y 72% (Roubik y Buchmann, 1984). El volumen del néctar producido a menudo guarda una correlación inversa con la concentración de azúcares que contiene, y generalmente se correlaciona con el tamaño de la flor. De manera consistente con los mayores requerimientos energéticos por aves, las plantas polinizadas por aves tienden a secretar mayores cantidades de néctar en relación a las especies polinizadas por abejas (Baker et al., 1978).

Debido a que la recompensa ofrecida por las plantas a sus polinizadores (principalmente néctar y polen) es un determinante importante de las interacciones planta-polinizador, esta puede usarse para predecir los polinizadores más comunes de una planta (Baker y Baker, 1990; Fenster et al., 2004; Zhao et al., 2016). Si bien muchos estudios han documentado correlaciones entre síndromes de polinización y rasgos del néctar entre especies (Perret et al., 2001; Nicolson, 2002; Goldblatt y Manning, 2006; Martín-Rodríguez et al., 2009; Bruneau, 2014; Tavares et al., 2016; Tiedge y Lohaus, 2017), aún se sabe muy poco sobre la ecología evolutiva del néctar (Parachnowitsch et al., 2019).

Euphorbia tithymaloides

Euphorbia tithymaloides L. es una suculenta perenne y la especie más variable y de distribución geográfica más amplia del clado Pedilanthus del género *Euphorbia* (Euphorbiaceae). Su área de distribución incluye a México, Florida, América Central, el norte de América del Sur y la mayoría de las Islas del Caribe (Dressler, 1957; Cacho et al., 2010; Figura 6). Existe amplia variación morfológica y ecológica entre sus poblaciones, tanto en aspectos vegetativos como reproductivos.

Esta especie es el único sistema en plantas respaldado por datos moleculares como una especie-anillo, es decir, un sistema cuyas poblaciones se encuentran en un proceso de divergencia activa y potencialmente de especiación (Cacho et al., 2010, 2019). Las especie-anillo son complejos de especies con una distribución circular resultante de una expansión geográfica histórica a partir de una población ancestral que amplió su área de distribución a lo largo de dos frentes geográficos cuyas poblaciones terminales se comportan como especies distintas al reunirse (Mayr, 1942; Irwin et al., 2001; Figura 7).

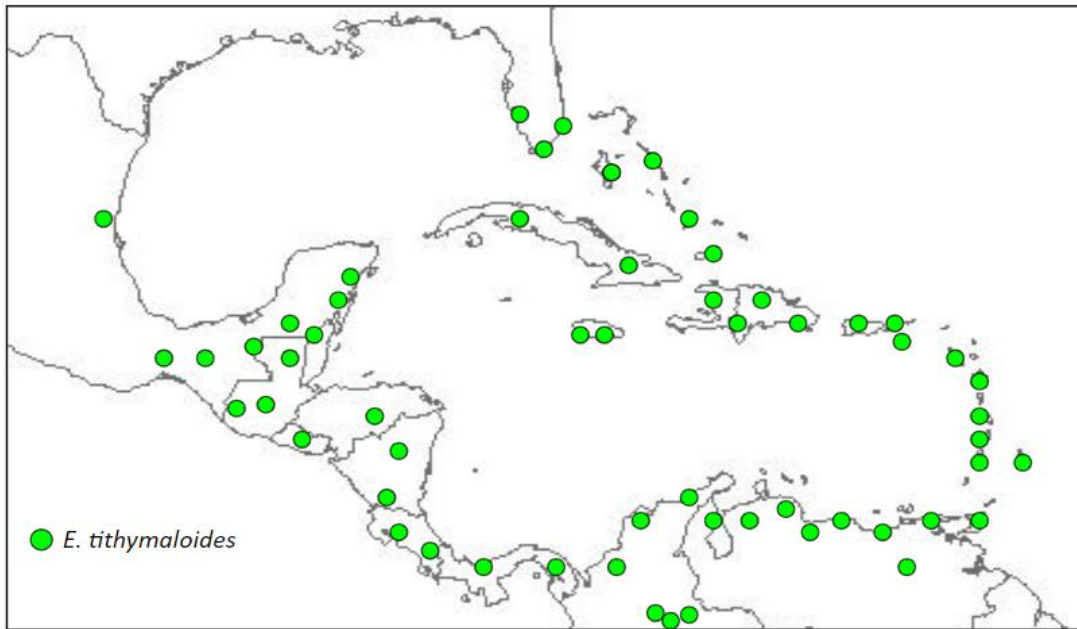


Figura 6. La distribución de *Euphorbia tithymaloides* abarca desde Florida, Estados Unidos hasta Brasil y Guyana, así como la mayoría de las islas del Caribe (Mapa: Ivalú Cacho).

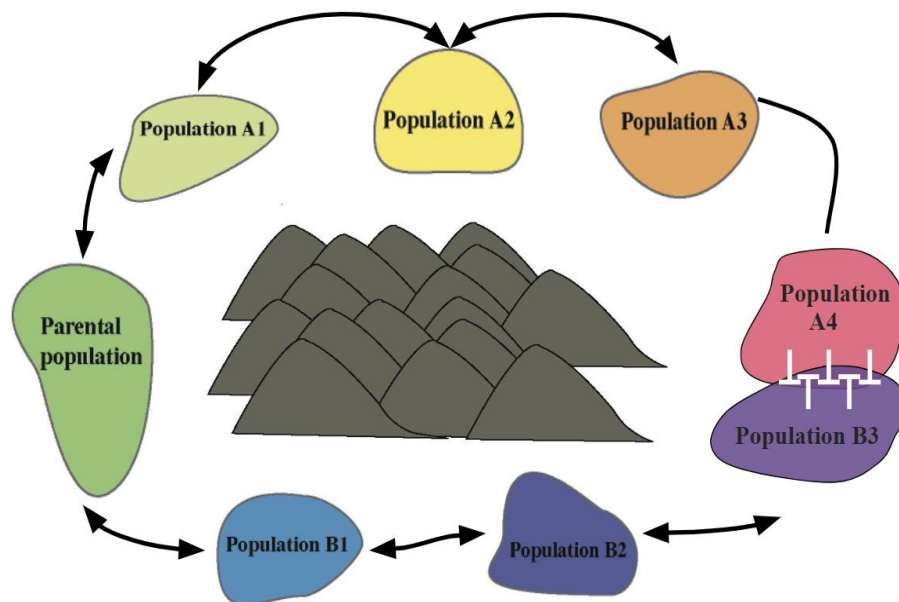


Figura 7. De acuerdo con el modelo de especies en anillo, una población ancestral ha divergido a lo largo de dos frentes que rodean una barrera de hábitat inadecuado de tal manera que, al reunirse, las poblaciones en los extremos han desarrollado algunas barreras para el flujo génico (Modificado de Cacho y Baum, 2012).

La biogeografía histórica de *E. tithymaloides* ha sido tema de interés desde la investigación de Dressler (1957) quien, con base en estudios morfológicos, propuso que esta especie había colonizado las Islas del Caribe desde poblaciones continentales, posiblemente a través de dos frentes geográficos. Posteriormente, estudios filogenéticos basados en dos genes nucleares respaldaron esta hipótesis, si bien con algunas diferencias respecto a lo originalmente propuesto (Dressler, 1957).

La evidencia actual sugiere que la expansión geográfica de *E. tithymaloides* hacia el Caribe continental y sus islas sucedió desde el sureste de México y Guatemala, a través de dos frentes geográficos: uno que se desplazó hacia el este a través de la Península de Yucatán y hacia las Antillas Mayores; y otro que se extendió hacia el sureste, colonizando Centroamérica, el norte de América del Sur y luego hacia el norte a través de las Antillas Menores (Cacho et al., 2019; Jacobo-Arteaga et al., 2022; Figura 8).

Las formas terminales de ambos frentes geográficos coexisten en áreas particulares de las Islas Vírgenes y presentan diferencias tanto morfológicas como genéticas, así como una falta de flujo génico directo (Cacho y Baum, 2012). En el frente de las Antillas Mayores, la forma predominante es un arbusto de tallos delgados y hábito escandente, hojas lanceoladas y tomentosas, con ciatios pequeños y muy cortos; estas características corresponden a lo que Dressler reconoció como la subespecie *E. tithymaloides* ssp. *angustifolia*. La forma característica de las Antillas Menores es un arbusto robusto o árbol pequeño que puede tener un fuste de hasta 7 cm de diámetro, hojas obovadas, crasas y glabras, y ciatios de tamaño regular, aunque también relativamente cortos, a la que Dressler reconoció como *E. tithymaloides* ssp. *padifolia*. En el continente, las plantas de *E. tithymaloides* son arbustos suculentos que ramifican desde la base y mantienen su hábito erecto, con hojas variables, pero siempre elípticas; sus ciatios son marcadamente alargados, con espolones redondeados y de mayor tamaño que los de las poblaciones de las Antillas. Dressler la reconoció a estas poblaciones como *E. tithymaloides* ssp. *tithymaloides* (Figura 9).

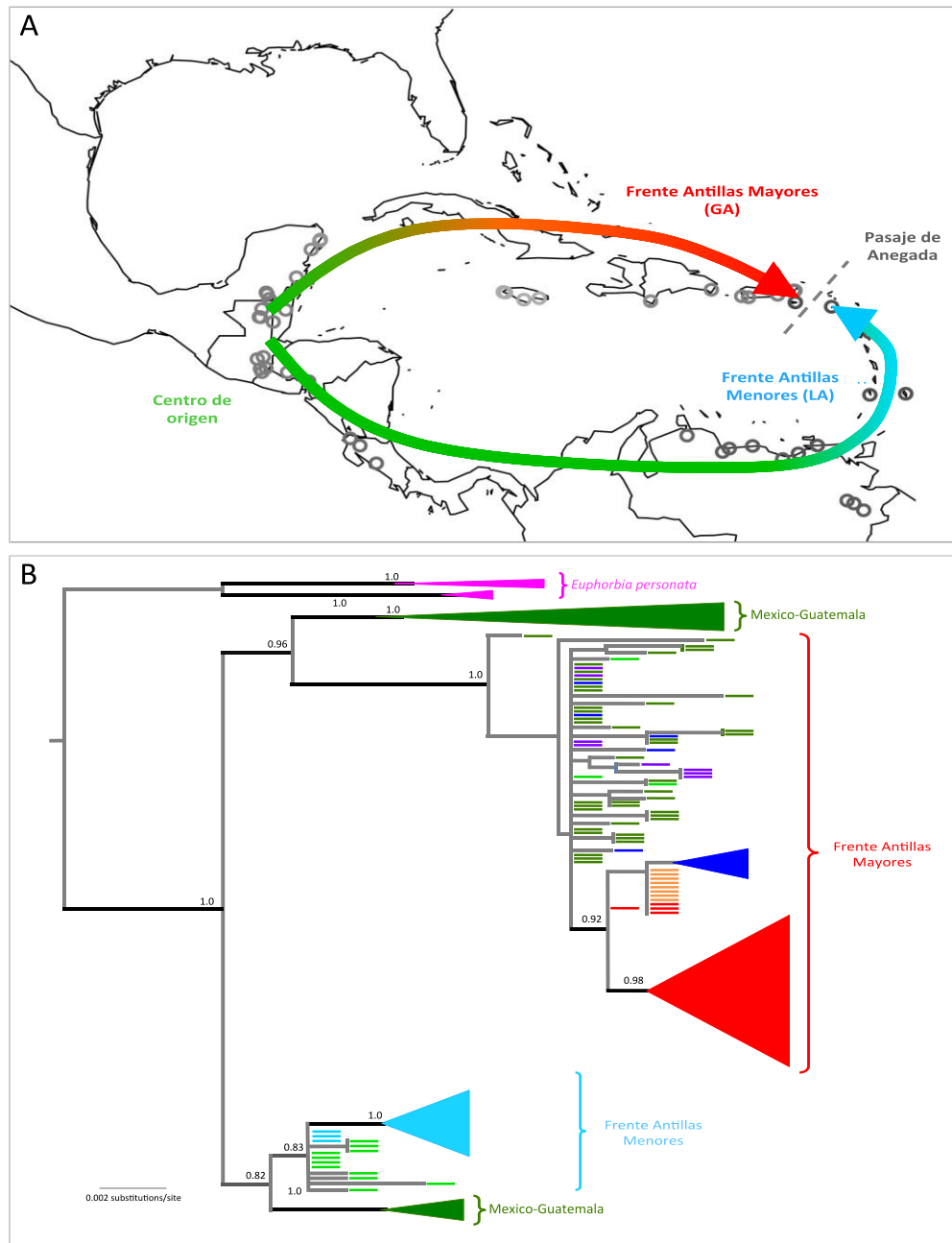


Figura 8. Biogeografía histórica de *Euphorbia tithymaloides*. **A.** Esta especie expandió su distribución geográfica desde su área de origen en México-Guatemala-Belice hacia el Caribe a lo largo de dos frentes, uno que se extendió a través de las Antillas Mayores y otro que viajó hacia el sur, luego al este y al norte a través del Centro y América del Sur y las Antillas Menores (realizado con información de Cacho et al. 2019). **B.** Representación de un árbol filogenético de alelos del gen SGN-U342009 que muestra la relación histórica entre frentes geográficos y subespecies. Colores: magenta, *Euphorbia personata* (especie hermana); verde, *E. tithymaloides* ssp. *tithymaloides* (en verde claro, las accesiones de Venezuela); púrpura, *E. tithymaloides* ssp. *parasitica*; azul marino, *E. tithymaloides* ssp. *jamaicensis*; amarillo, *E. tithymaloides* ssp. *bahamensis*; rojo, *E. tithymaloides* ssp. *angustifolia*; cian, *E. tithymaloides* ssp. *padifolia* (Tomado de Jacobo-Arteaga et al., 2022).

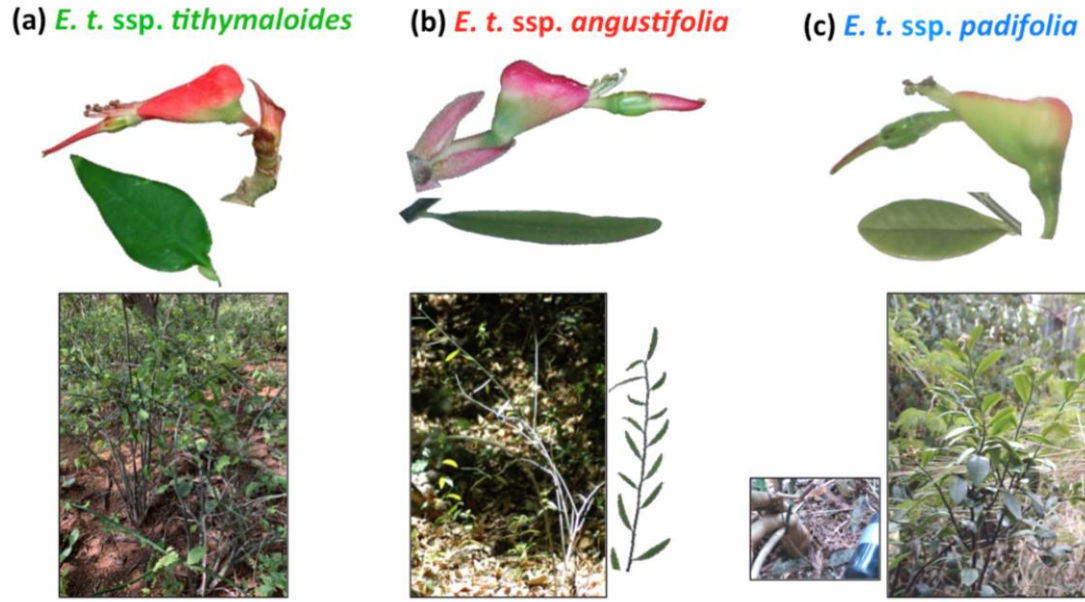


Figura 9. Comparación de formas terminales y forma continental de *Euphorbia tithymaloides*, las cuales son morfológica y ecológicamente distintas. (a) *Euphorbia tithymaloides* ssp. *tithymaloides*; (b) *Euphorbia tithymaloides* ssp. *angustifolia* y (c) *Euphorbia tithymaloides* ssp. *padifolia*. Ambas formas terminales coexisten en las Islas Vírgenes (Modificado de Cacho y Baum, 2012).

La implicación evolutiva de los análisis biogeográficos y filogenéticos es que los individuos de las Antillas Mayores (frente GA, asociados a *Euphorbia tithymaloides* ssp. *angustifolia*) y de las Antillas Menores (frente LA, *E. tithymaloides* ssp. *padifolia*) representan linajes evolutivos independientes que evolucionaron de ancestros que podrían identificarse como pertenecientes a *Euphorbia tithymaloides* ssp. *tithymaloides*, de distribución continental (Figura 10). Los cambios que se han acumulado independientemente en los dos frentes geográficos parecen haber contribuido a una diferenciación suficiente para que las formas terminales puedan persistir en simpatria sin fusionarse, por lo que este sistema representa un modelo útil para estudiar divergencia en tiempo real, entre otras cosas (Cacho y Baum, 2012). De forma importante, los datos genéticos disponibles sugieren que no existe evidencia de flujo génico directo sustancial entre estas dos formas divergentes (Cacho y Baum, 2012; Medina-Rodríguez et al., en prep.).

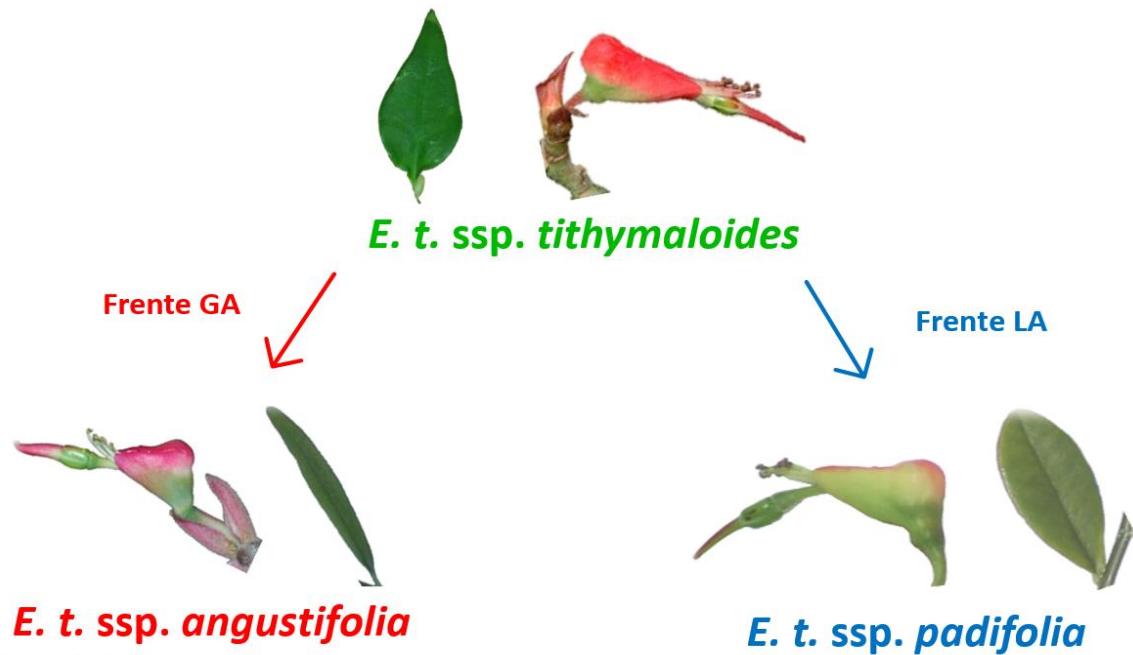


Figura 10. Divergencia morfológica de *Euphorbia tithymaloides* en poblaciones del continente hacia los dos frentes de distribución, dando origen a las subespecies *E. tithymaloides* spp. *angustifolia* en las Antillas Mayores (frente GA) y *E. tithymaloides* spp. *padifolia* en las Antillas Menores (frente LA) (Figura: Itzel Piña de la Rosa).

En *Euphorbia*, las inflorescencias altamente modificadas (llamadas ciatios) se asemejan y funcionan como flores individuales que están compuestas por una flor femenina central reducida a un solo gineceo, rodeada por flores estaminadas reducidas a estambres individuales (Figura 11). En el clado *Pedilanthus* de *Euphorbia*, los ciatios son marcadamente bilaterales, generalmente rojizos y tienen un involucro con una cámara posterior que contiene las flores y las glándulas de néctar; la estructura en su conjunto asemeja a una "zapatilla", de ahí que su nombre común sea "zapatito". El sistema sexual de *E. tithymaloides* es monoico, con unidades florales (ciatios) hermafroditas, comúnmente protóginas, es decir, donde la flor pistilada de la inflorescencia se desarrolla antes que las flores estaminadas (Dressler, 1957; Prenner and Rudall, 2007). Este ciato bilateral y espolonado asemeja a las flores individuales típicas de los grupos polinizados por colibríes, y la polinización en este clado es principalmente efectuada por estas aves (Figura 12), aunque existen excepciones (Dressler, 1957; Sahagún-Godínez y Lomelí-Senci3n, 1997; Cacho et al., 2010).

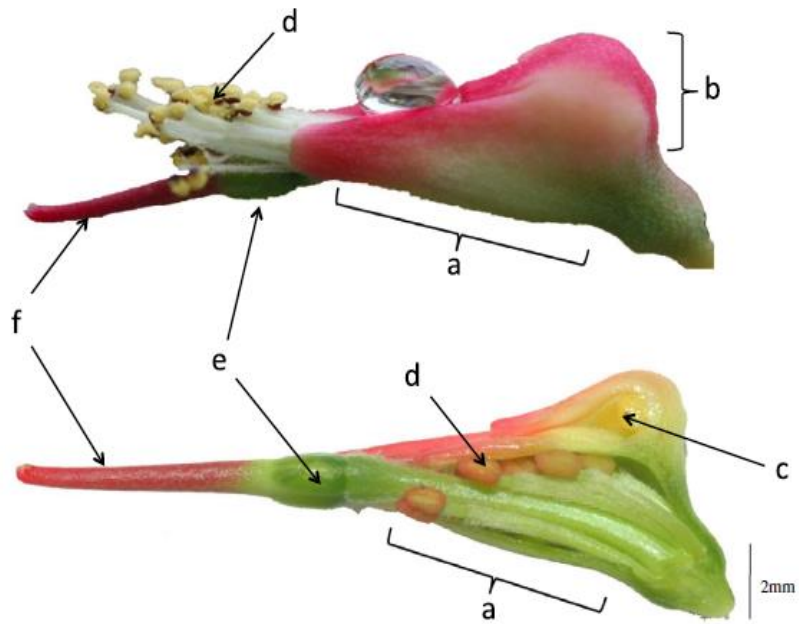


Figura 11. Representación gráfica del ciatio de *Euphorbia tithymaloides*. Se observan brácteas que conforman al involucreo (a) espolonado, formado por la cámara (b) que contiene las glándulas de néctar (c); se muestran también las flores masculinas reducidas (d) y la única flor femenina central, con su único ovario (e) y estilo (f) (Tomado de Cacho y Baum, 2012).



Figura 12. Los colibríes son los polinizadores principales de *Euphorbia tithymaloides* (Dressler 1957; Veiga-Blanco et al 2013). Al buscar el néctar almacenado en los ciatios, la barbilla del colibrí hace contacto con los estambres y estigma del mismo (Foto: Rafy Rodríguez).

En *Euphorbia diazlanana* (Lomelí y Sahagún) Steinmann, un pariente cercano de *E. tithymaloides*, se ha registrado y observado un cambio en el sistema de polinización de aves a insectos, específicamente de colibríes a himenópteros. Se cree que estos cambios de polinizadores en *E. diazlanana* comenzaron con un escenario en el que los insectos eran visitantes oportunistas de los ciatios utilizando el néctar para su alimentación, pero no sirviendo como polinizadores efectivos debido al gran tamaño de los involucros en relación con el tamaño de los himenópteros. Se sugiere que una reducción paedomórfica en el tamaño de los ciatios pudo haber facilitado el cambio en los polinizadores de *E. diazlanana* (Sahagún-Godínez y Lomelí-Sención, 1997), cuyos ciatios hoy día son cortos y chatos (no tubulares) y de coloración verde-amarillenta (Figura 13).



Figura 13. Ciatio de *Euphorbia diazlanana* (izquierda; foto: Pablo Carrillo-Reyes); se aprecia una reducción en el tamaño del ciatio y cambios en la coloración de este en comparación con el ciatio de *E. tithymaloides* (derecha; foto: Ivalú Cacho).

En el único estudio de polinización que existe en *E. tithymaloides*, se analizaron la regulación y reabsorción de néctar en las fases sexuales en una población de esta especie, encontrando que las inflorescencias en fase hermafrodita presentan valores más altos de concentración de néctar, volumen y masa de azúcar que las inflorescencias en fase femenina, concluyendo que estos cambios en la composición

pueden ser detectados por los colibríes al momento de extraer la recompensa (Veiga Blanco et al., 2013). No hay estudios de polinización en *E. tithymaloides* que abarquen su área de distribución en el Caribe, y en particular comparando poblaciones de ambos frentes de expansión geográfica.

La inversión en polen en relación con la producción de óvulos en *E. tithymaloides* a lo largo de su área de distribución es consistente con que esta especie depende de polinizadores para su reproducción en toda su área de distribución en el Caribe (Cacho y José-Zacatula, 2020). Observaciones en campo revelan que existe una amplia diversidad de visitantes de *E. tithymaloides* (Figura 14; Piña de la Rosa et al., en prep.) pero hasta ahora no se han evaluado de manera sistemática las visitas florales, la recompensa y la polinización a lo largo de la distribución geográfica de la especie.



Figura 14. Observaciones en campo revelan una gran diversidad de visitantes florales en *Euphorbia tithymaloides* a lo largo de su distribución en el Caribe. Se observan aves pertenecientes a diferentes familias (B, Thraupidae; G, Trochilidae), fásmidos (A), himenópteros (C, D, E, H) y lepidópteros (F e I) (Fotos: Ivalú Cacho).

JUSTIFICACIÓN

Los aspectos de la biología reproductiva de *E. tithymaloides* han sido poco estudiados de manera detallada; en particular se desconocen los patrones de variación fenológica y de polinizadores potenciales a lo largo de su distribución continental y en el Caribe. Esto es importante porque tanto la separación fenológica como los cambios en los sistemas de polinización pueden promover la divergencia y evolución del aislamiento reproductivo; es decir, contribuir a la especiación en este sistema y por lo tanto al entendimiento del origen de diversidad biológica.

Este trabajo busca realizar una evaluación de posibles factores promotores de divergencia en la especie-anillo *Euphorbia tithymaloides* (Euphorbiaceae), comparando poblaciones de las regiones geográficas focales, con la finalidad de evaluar factores ecológicos como promotores de la divergencia filogenética que se ha documentado entre las poblaciones de las Antillas Mayores y las Antillas Menores. En particular, se pretende evaluar posibles diferencias fenológicas y cambios en sistemas de polinización, a partir de trabajo de campo y observaciones en poblaciones naturales, colecciones vivas *ex situ* y especímenes de herbario.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la variación en la fenología floral y los polinizadores potenciales como posibles promotores de la divergencia de *Euphorbia tithymaloides* a través del Caribe.

Objetivos particulares

1. Documentar y evaluar diferencias en la fenología de poblaciones de *E. tithymaloides* a través de su área de distribución geográfica, con énfasis en las regiones del continente, Antillas Menores y Antillas Mayores.
2. Caracterizar y comparar la producción y concentración de azúcares en el néctar en poblaciones de *E. tithymaloides* representativas de las áreas continental y de las Antillas Mayores y Menores.
3. Sistematizar información de campo sobre la diversidad de visitantes florales en poblaciones de *E. tithymaloides* del continente y de las Antillas Mayores y Menores y evaluar si existen diferencias que sugieran cambios en los sistemas de polinización en estas tres áreas.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN E HIPÓTESIS

Se plantean las siguientes preguntas de investigación:

1. ¿Existen diferencias fenológicas entre poblaciones de *Euphorbia tithymaloides*, o a nivel de las principales regiones geográficas (continente, Antillas Mayores y Antillas Menores)?

Si la fenología juega un papel determinante en la divergencia entre poblaciones de *E. tithymaloides* (es decir, en mantener las poblaciones separadas), entonces se espera encontrar diferencias fenológicas entre poblaciones de *E. tithymaloides* con diferencias morfológicas, o al menos entre las poblaciones más distintas; es decir, al comparar las poblaciones de las Antillas Menores y de las Antillas Mayores.

Con base en lo anterior, se proponen tres escenarios posibles. El escenario A contempla un traslape fenológico alto entre poblaciones y, por tanto, una menor importancia de la fenología como factor promotor de divergencia. El escenario B contempla la posibilidad de que exista un traslape fenológico intermedio entre las poblaciones y, por tanto, una posible importancia intermedia de la fenología como factor promotor de divergencia. Por último, el escenario C contempla la posibilidad de que el traslape fenológico sea nulo entre las poblaciones o áreas geográficas y, por tanto, la posibilidad de que la fenología juegue un papel preponderante como factor promotor de divergencia (Figura 15).

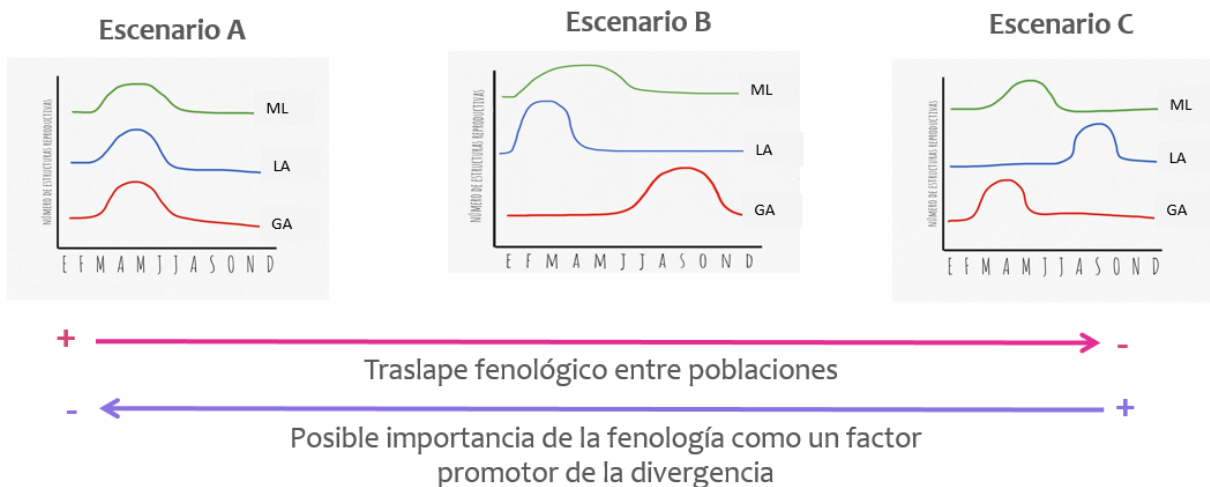


Figura 15. Escenarios hipotéticos de la fenología como un posible factor promotor de la divergencia en *Euphorbia tithymaloides* del continente (ML), Antillas Menores (LA) y Antillas Mayores (GA). (A) El traslape fenológico notable sugiere poca importancia de la fenología como factor promotor de la divergencia. (B) El traslape intermedio puede indicar un posible papel intermedio de la fenología en promover la divergencia en este sistema. (C) La falta de traslape fenológico entre poblaciones de las tres áreas sugiere que la fenología puede estar jugando un papel importante en promover la divergencia en *Euphorbia tithymaloides*.

2. ¿Existen diferencias en la producción y composición del néctar y en los visitantes florales que puedan sugerir cambios en los polinizadores o sistemas de reproducción en distintas poblaciones de *Euphorbia tithymaloides*?

Si la variación en los sistemas de polinización está jugando un papel importante en la divergencia en *E. tithymaloides* (y la recompensa –néctar– refleja los sistemas de polinización), se espera observar patrones geográficos en el volumen y concentración de azúcares del néctar en poblaciones de *E. tithymaloides* al comparar poblaciones de las tres regiones geográficas focales. Asimismo, diferencias en la composición de los visitantes florales en las tres áreas geográficas focales sugerirían posibles cambios en los polinizadores potenciales. Con base en esta hipótesis, se proponen tres posibles escenarios en cuanto a los patrones esperados con datos sobre producción de recompensa y polinizadores potenciales (Figuras 16 y 17).

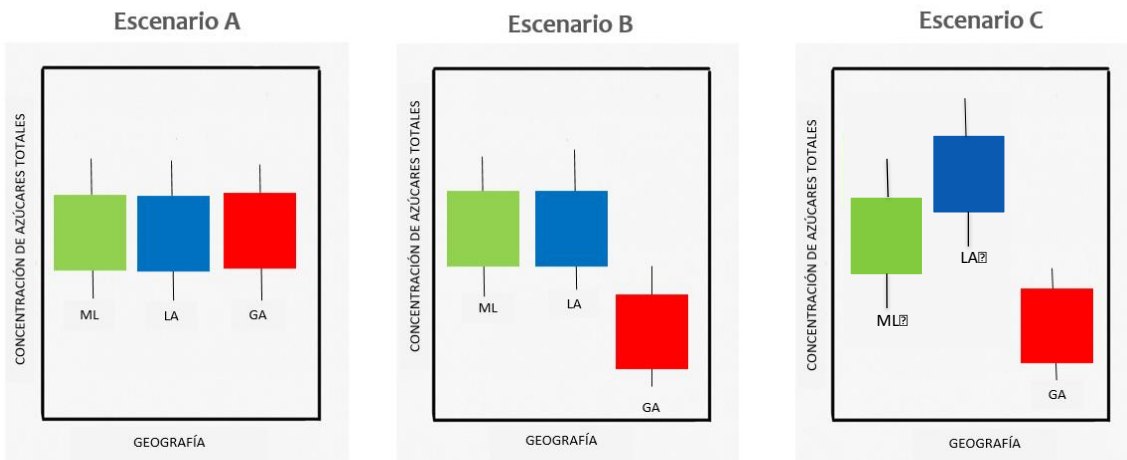


Figura 16. Escenarios hipotéticos de la variación de azúcares totales (concentración o masa total) en el néctar de *Euphorbia tithymaloides* en relación a su área de distribución; continente (ML), Antillas Menores (LA) y Antillas Mayores (GA). (A) Concentraciones de azúcares totales iguales entre las poblaciones sugieren que no existe divergencia con respecto a los polinizadores potenciales que se traduzca en variación en la recompensa. (B) Concentraciones de azúcares totales similares para dos áreas geográficas (ML y LA) pero diferente para una tercera (GA) sugiere que la recompensa puede indicar posibles cambios de polinizadores potenciales en este sistema. (C) Concentraciones de azúcares totales diferentes en néctares de poblaciones filogenéticamente más distantes sugieren un posible papel importante de cambios en los polinizadores como factor promotor de la divergencia en *Euphorbia tithymaloides*.

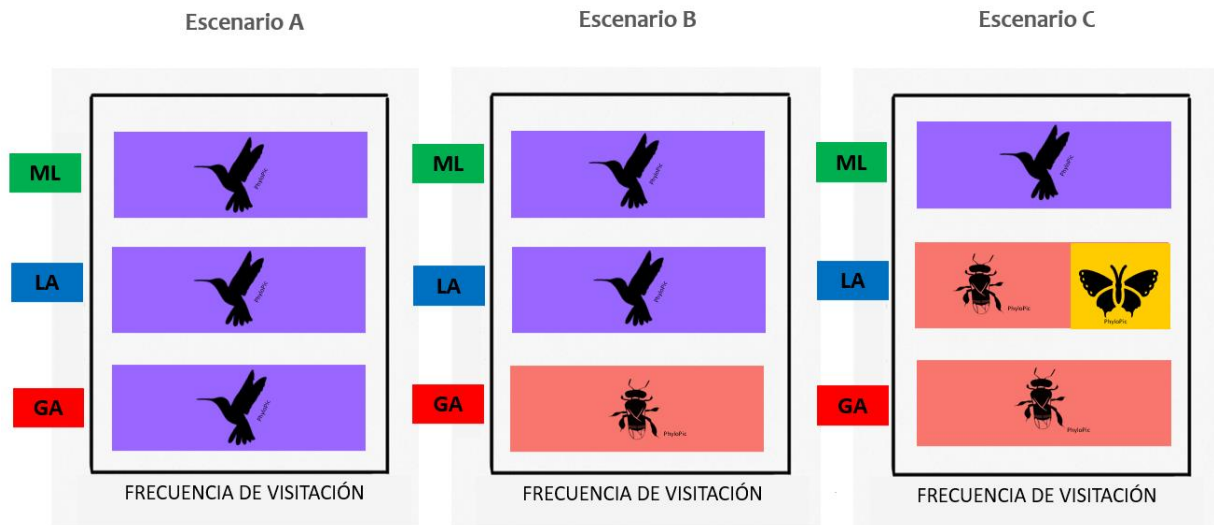


Figura 17. Algunos escenarios hipotéticos sobre la importancia de polinizadores como posibles factores promotores de la divergencia en *Euphorbia tithymaloides* a lo largo de su área de distribución, que abarca áreas continentales (ML), las Antillas Menores (LA) y las Antillas Mayores (GA). (A) Igual frecuencia de visita del mismo grupo funcional de polinizadores en las tres áreas geográficas sugiere poca importancia del cambio en los sistemas de polinización como factor promotor de la divergencia. (B) Una misma frecuencia de visita para un grupo funcional de polinizadores potenciales en dos áreas geográficas (por ejemplo, ML y LA) pero diferente para la tercera (GA) sugiere que un cambio en los polinizadores potenciales puede estar jugando un papel como un posible factor promotor de la divergencia. (C) Diferencias en la frecuencia de visita de diferentes grupos funcionales de polinizadores potenciales en poblaciones de distintas áreas geográficas sugieren que cambios en los polinizadores potenciales pueden estar promoviendo la divergencia en poblaciones caribeñas de *Euphorbia tithymaloides*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Datos de fenología

Floración y fases fenológicas en Euphorbia tithymaloides

Con base en observaciones de campo y en una colección viva donde están representadas varias poblaciones de *E. tithymaloides* (ver más adelante) se determinaron las siguientes fases florales con la finalidad de documentar su fenología y organizar la toma de datos: botón (estilo no visible), femenina F1 (estigma visible pero no totalmente expuesto), femenina F2 (estigma totalmente elongado), femenina F3 (ovario visible, estigma con lóbulos extendidos, anteras no visibles), femenina F4 (ovario fecundado, anteras no visibles), hermafrodita (estigma con lóbulos extendidos, anteras visibles y dehiscentes), y marchita sin fecundar (Figura 18).

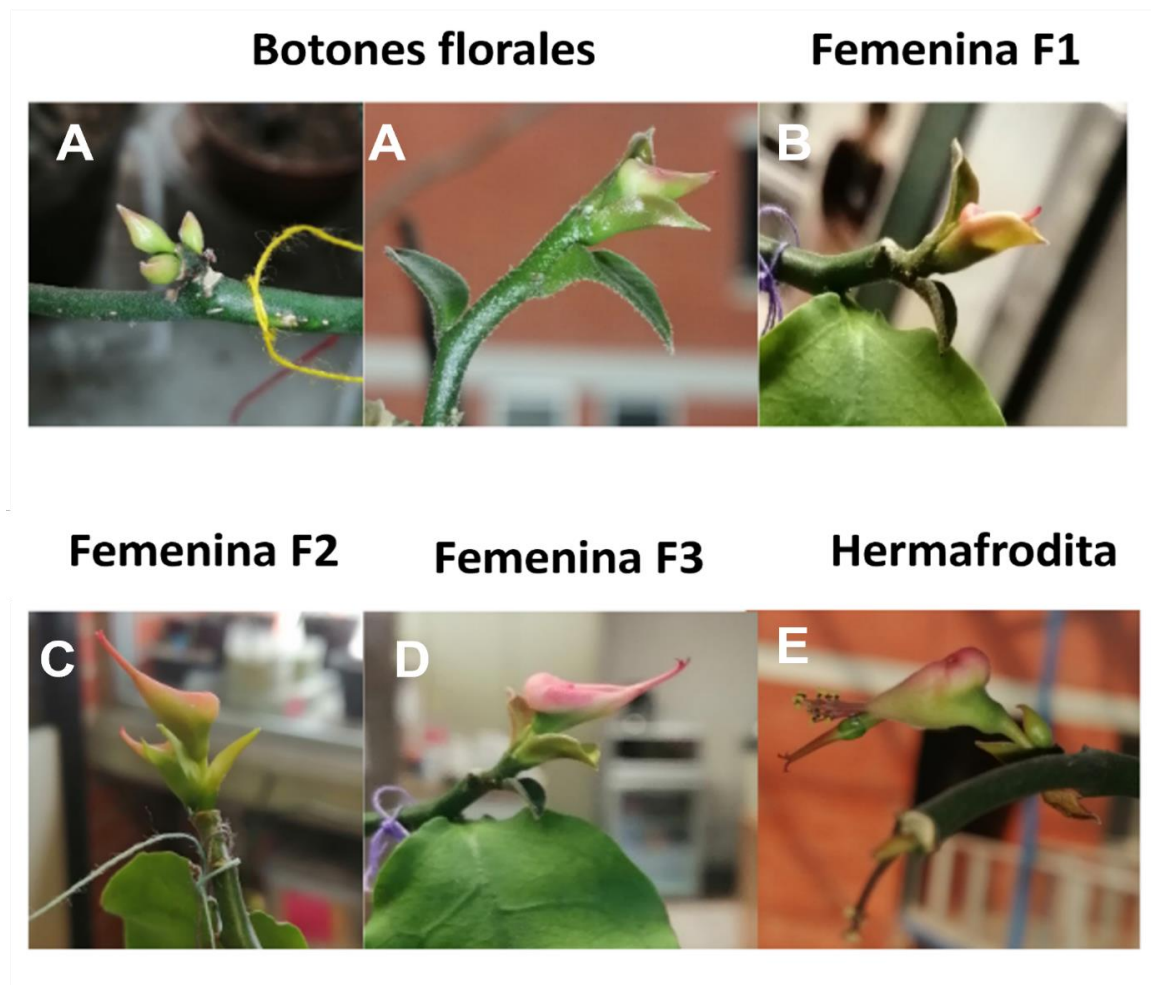


Figura 18. Fases florales de *E. tithymaloides*. A) botones florales, B) femenina F1, C) femenina F2, D) femenina F3, y E) hermafrodita (Fotos: Itzel Piña).

Para cada espécimen, se obtuvieron los siguientes datos: día, mes y año de colecta, si el espécimen era fértil o estéril, y se contabilizaron las unidades florales en las fases definidas previamente (ver figura 18): botón, femenina F1, femenina F2, femenina F3, femenina F4, hermafrodita, fruto visible, fruto maduro y fruto dehiscente (Figura 21).



Figura 21. Diagrama de flujo para obtención de datos de fenología de *Euphorbia tithymaloides* a lo largo de su distribución geográfica, con base en especímenes de herbario.

Visualización de datos de fenología

Para estimar la variación geográfica de la fenología floral, se analizaron por separado los datos de los frentes de colonización (frentes GA y LA) y el continente. La cuantificación de la actividad fenológica de *E. tithymaloides* a lo largo del tiempo se realizó traduciendo las fechas de colecta al número de días transcurridos en un año (el cual denominaremos 'dianio'). Para ello, a cada día se le asignó el valor correspondiente al número del día en cuestión (de 1 a 365 para años normales, y de 1 a 366 para años bisiestos).

Para los datos obtenidos de los especímenes de herbario y reservorios digitales, se realizaron dos gráficas para la fenología de *E. tithymaloides*; en la primera se incluyen todos los datos y en la segunda los datos se visualizan por área geográfica (Continente, Antillas Menores, Antillas Mayores), con la finalidad de comparar los picos de floración y la variación fenológica en las mismas.

Los datos fenológicos de las poblaciones en jardín común se visualizaron en una gráfica por separado. Para este caso, los datos se analizaron por población, con

la finalidad de observar si hay diferencias en la fenología y los picos de floración a nivel poblacional.

Datos de recompensa floral (néctar)

Datos de néctar provenientes de la literatura

Para generar un contexto amplio sobre lo que se sabe de recompensa (néctar) en plantas ornitófilas, se realizó una revisión bibliográfica de la cual se obtuvieron datos de néctar, en particular de concentración total de azúcares y volumen (cuando fue posible). Se revisaron los siguientes 19 estudios: Hainsworth y Wolf, 1976; Bolten y Feinsinger, 1978; Southwick et al., 1981; Lammers y Freeman, 1986; Stiles y Freeman, 1993; Bernardello et al., 1994, 1999, 2000; Forcone et al., 1997; Galetto et al., 1998; Giurfa et al., 1999; Perret et al., 2001; Nicolson, 2002; Galetto y Bernardello, 2003; Wolff, 2006; Chalcoff et al., 2006; Ornelas et al., 2007; Almeida et al., 2013; Rodríguez-Peña et al., 2016.

Néctar en jardín común

Se cuantificó la concentración de azúcares totales y el volumen del néctar (ver más abajo) en individuos pertenecientes a 9 poblaciones en jardín común de *E. tithymaloides* provenientes de 13 localidades (colecciones vivas) utilizando ciatios en fase femenina (fases F2 y F3) o hermafrodita, y procurando realizar mediciones alrededor de las 1400 h para que fueran comparables con las mediciones en campo. El néctar se extrajo del ciatio con ayuda de una micropipeta; la colecta implicaba apretar ligeramente el ciatio con los dedos para introducir la punta de la micropipeta a la zona donde se ubican las glándulas de néctar y de esta manera extraerlo con éxito. El néctar se colocó en un portaobjetos y con ayuda de un capilar y una regla se midió el volumen extraído en milímetros (mm) para cada ciatio; la conversión a microlitros (μl) se realizó posteriormente. En los casos en los que el néctar era demasiado espeso, antes de medir el volumen, éste se diluyó con 5 μl de agua destilada, mismos que se restaron antes de hacer la cuantificación con el capilar.

Para medir la concentración de azúcares totales del néctar (no se identificaron constituyentes individuales), éste se colocó en un portaobjetos y se mezcló con 10-15 μl de agua destilada hasta obtener una muestra homogénea. Las mediciones de concentración de azúcares en grados Brix ($^{\circ}\text{Bx}$) se realizaron con un refractómetro manual (VEE GEE Scientific BTX-1, con escala de Brix 0-32%, +/- 0.2%). Este proceso se ilustra en la Figura 22. Las observaciones se registraron en una base de datos cuyo formato se ilustra en el Anexo 1.

Caracterización de néctar en jardín común

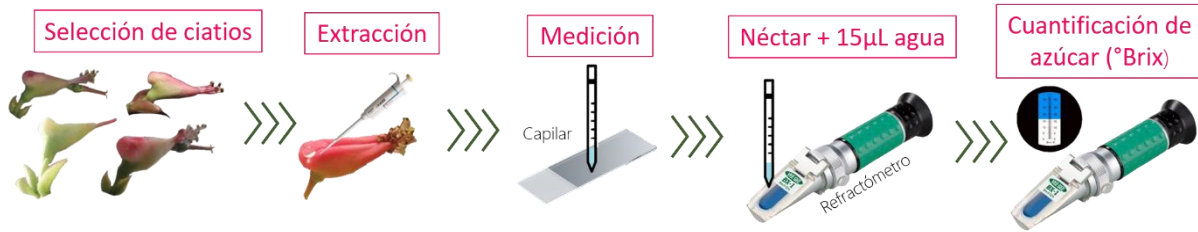


Figura 22. Diagrama de flujo que ilustra la obtención de datos de volumen y concentración de néctar en individuos de *Euphorbia tithymaloides* en jardín común.

Néctar en poblaciones naturales

Para garantizar que las mediciones fueran comparables, los ciatios fueron seleccionados al azar. Los ciatios (F2, F3 o hermafroditas) disponibles se embolsaron durante 24 h previo a la medición del néctar para excluir visitantes que, al extraer néctar, pudieran interferir con las mediciones; y se procuró realizar las mediciones a la misma hora del día, entre 1400 y 1600 h, por ser un horario en el que el acceso a las plantas era logísticamente posible. La exclusión de posibles visitantes se realizó con bolsas de celofán microperforado, el cual garantiza que la exposición a luz natural y temperatura son equivalentes a las condiciones ambientales naturales (Figura 23). La cuantificación de volumen y concentración de azúcares (° Brix) se realizó como se describió anteriormente. Se realizaron mediciones de néctar en 10 localidades de *E. tithymaloides* (Figura 24).

Caracterización de néctar en campo



Figura 23. Diagrama de flujo que muestra el proceso de obtención de datos de concentración y volumen de néctar de *Euphorbia tithymaloides* en campo.

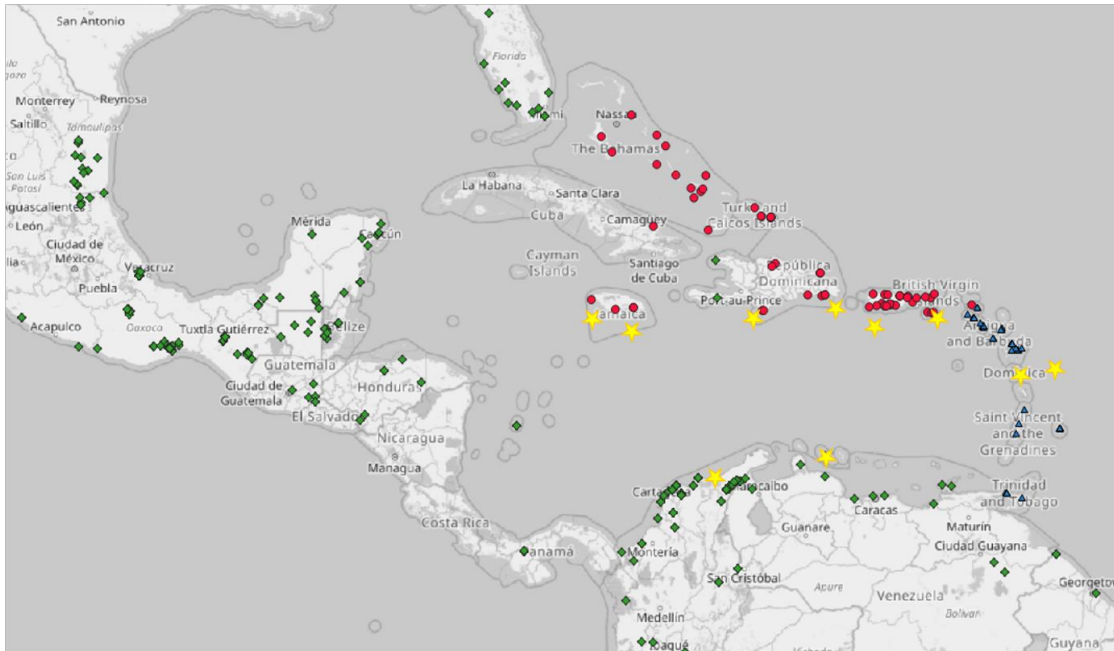


Figura 24. El muestreo fenológico de *Euphorbia tithymaloides* en el Caribe está representado por rombos, círculos y triángulos completos, codificados por colores en función de su área de distribución: verde para el continente, rojo para las Antillas Mayores y azul para las Antillas Menores (n = 693). Las 10 poblaciones naturales incluidas en este estudio con observaciones de recompensa y visitas se encuentran marcadas con estrellas amarillas (Mapa: Itzel Piña).

Datos de ocurrencia

Se georreferenciaron 693 especímenes con base en información de la localidad, datos de las etiquetas de herbario y trabajo de campo, para poder realizar análisis de fenología en función de la geografía del sistema en el Caribe. Para ello se utilizaron herramientas de Google Earth (<https://earth.google.com>) y Google Maps (<https://maps.google.com>), y los datos se curaron mapeando las localidades en QGIS (QGIS 3.16).

Datos de visitantes florales

Se realizaron observaciones de visitación floral en campo en diez poblaciones, estando representadas las tres áreas geográficas focales: Antillas Mayores, Antillas Menores y área continental (Figura 24).

Para la toma de datos, al llegar a la localidad seleccionada por la mañana (o al medio día) se realizaba un reconocimiento del área y bosquejaba un mapa de esta. Posteriormente se identificaban plantas focales y los puntos para los observadores en función del número de personas. Los períodos de observación fueron de duración mínima de 1 h cada uno, y se realizaron de forma escalonada en dos horarios generales: de 1300 – 1900 h (primer día), y de 0600 a 1300 h (segundo día).

La toma de datos de visitación consistió en hora de inicio y final del período de observación, y para cada visita registrada: hora de inicio, número de visitas, si estas fueron cortas (evaluación) o largas (toma de néctar o polen), visitador floral, sexo del visitador floral (si aplicaba) y otras notas.

Análisis estadísticos

Fenología jardín común

Los datos de fenología de poblaciones de *Euphorbia tithymaloides* en jardín común se procesaron y analizaron en conjunto, es decir, para cada mes del año se generó una base de datos y estas se combinaron para añadirles una columna que se tituló “dianio”. Dicha columna contiene el cálculo de los días transcurridos en el año para cada observación. Este cálculo permitió graficar el número de estructuras reproductivas presentes en los individuos de *E. tithymaloides* en función del día del año transcurrido y realizar comparaciones entre los picos de floración de cada una de las poblaciones, pertenecientes a las áreas geográficas focales.

Fenología con base en ejemplares de herbario

Los datos de fenología tomados a partir de ejemplares de herbario de *E. tithymaloides* se procesaron y analizaron en conjunto. Para cada reservorio digital se generó una base de datos las cuales se combinaron para añadirles la columna de dianio y eliminar aquellos registros que no contaran con datos de día/mes/año.

Posteriormente, los datos de actividad fenológica fueron combinados con los datos de geografía para realizar comparaciones en función de las áreas geográficas focales. A partir de estos datos se calculó el traslape fenológico entre cada uno de los picos de floración en función de la geografía de *E. tithymaloides*. El cálculo del traslape fenológico se hizo con funciones de la librería de R *overlapping* (Pastore, 2018) y las gráficas con la librería de *ggplot2* (Wickham, 2016).

Néctar

Los datos de azúcares totales (mg) en el néctar de *E. tithymaloides* se pusieron en contexto con los datos obtenidos de la literatura para especies de plantas con polinización ornitófila utilizando un histograma.

De los datos obtenidos (volumen de néctar y ° Brix), se calculó la cantidad de azúcares totales en el néctar, siguiendo a Ochoa-López et al. (2018):

$$\text{azúcares totales (mg)} = (\text{° Brix} * \mu\text{L}) / 100.$$

Se evaluó que los datos se comportaran bajo los supuestos de normalidad y homocedasticidad (varianzas iguales) utilizando pruebas de Shapiro y Levene respectivamente (Anexo 2). Se aplicaron transformaciones a los datos según fue el caso: logaritmos para la concentración de azúcares (°Brix) y raíz cuadrada para el

volumen y azúcares totales de néctar (μL y mg). Se identificaron posibles valores atípicos (outliers) a partir del examen visual de modelos lineales y su representación gráfica y se evaluaron formalmente mediante la prueba de Rosner, no encontrando valores atípicamente significativos al usar los datos transformados.

Las posibles diferencias en concentración, volumen y azúcares totales de néctar en poblaciones de *E. tithymaloides* con respecto a su geografía se evaluaron con pruebas de varianza (ANOVA; Booth, 2003) y modelos lineales.

Debido a que las condiciones ambientales pueden incidir en los patrones de producción de recompensa, se realizó una ANOVA para evaluar si había diferencias significativas entre los datos de néctar obtenidos de plantas en jardín común y en poblaciones naturales, o si podían analizarse en conjunto. Los resultados sugieren que si bien existe traslape entre los datos de campo y de jardín común, también existen diferencias significativas con respecto a fuente (poblaciones silvestres vs. jardín común) para las tres métricas evaluadas (concentración azúcares $P = 1.064\text{e-}11^{***}$; volumen néctar $P = 8.667\text{e-}07^{***}$; azúcares totales $P = 2.2\text{e-}16^{***}$; Anexo 3).

Debido a lo anterior, se decidió excluir la variación debida a fuente (población silvestre / jardín común) al momento de evaluar la variación en néctar con respecto a la geografía. Para ello, se utilizó como variable de respuesta los residuales de modelos lineales con fuente como variable dependiente ($y \sim \text{fuente}$).

Visitación floral en campo

A partir de datos de número de visitas y de la identidad de los visitantes, se estimó la importancia relativa de visitación floral por cada grupo funcional, para las áreas de continente, Antillas Menores y Antillas Mayores. Los datos se procesaron con funciones base de R y se visualizaron con *ggplot2*.

Todos los análisis y representaciones gráficas se realizaron en la versión 3.6.3 de R (R Core team, 2020), utilizando las paqueterías base, *ggplot2* (Pastore y Calcagní, 2016), *grid* (R Core Team, 2020) y *gridExtra* (Baptiste, 2017).

RESULTADOS

Fenología

Fenología en jardín común

Existe variación en la actividad fenológica entre poblaciones. Las plantas de todas las poblaciones estudiadas exhibieron un periodo de floración general de febrero a junio (día 50 al 180), y algunas hasta el día 360 (Figura 25). La población de St. Eustatius (ST) presenta una floración más constante con respecto a las demás. Al visualizar los datos por área geográfica, no existe evidencia que sugiera diferencias fenológicas entre el continente y las Antillas Menores; no hay datos disponibles en jardín común para las Antillas Mayores (Figura 26).

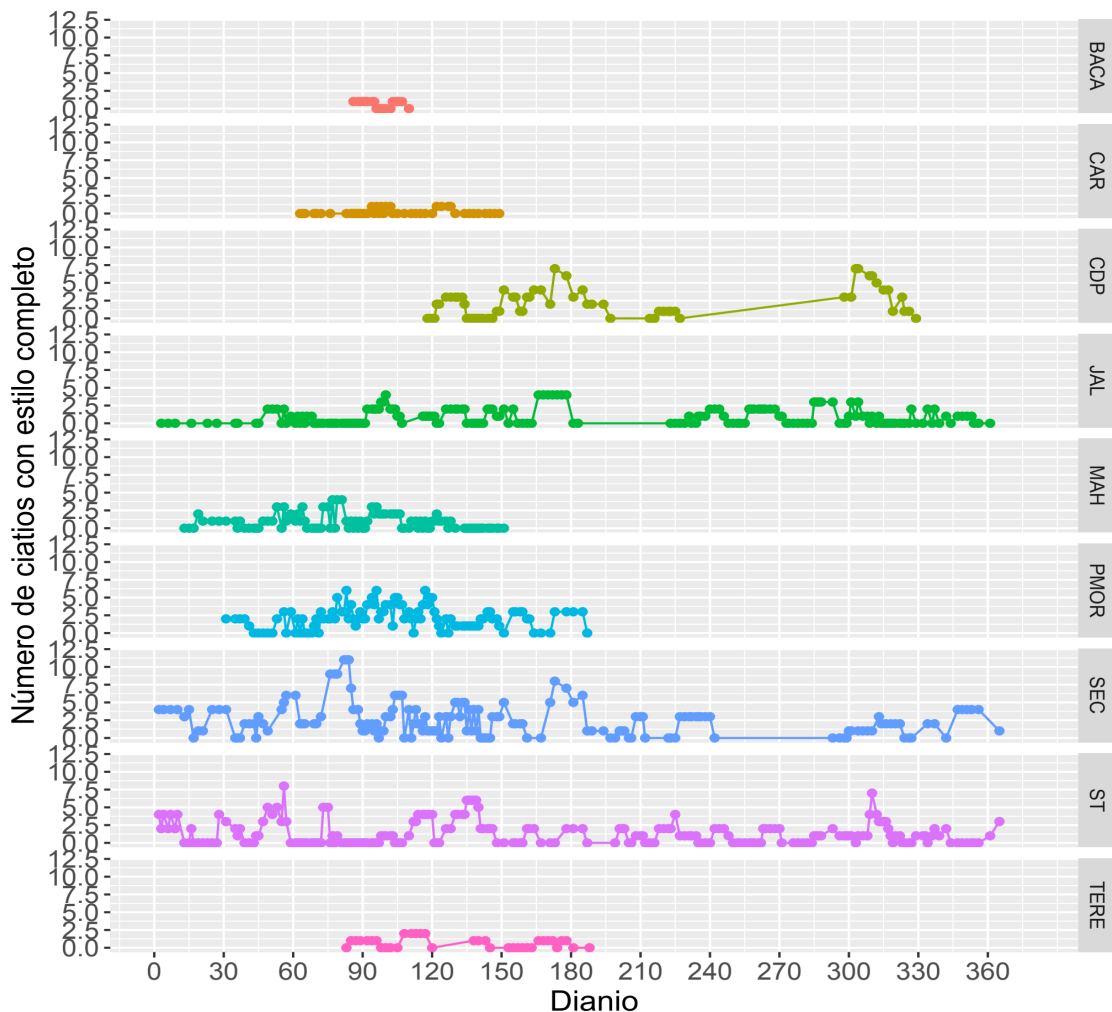


Figura 25. Densidad fenológica en poblaciones de *Euphorbia tithymaloides* de jardín común, donde se observa el inicio de la floración estimado para cada población, y una floración constante en los individuos correspondientes a la población de St. Eustatius (ST).

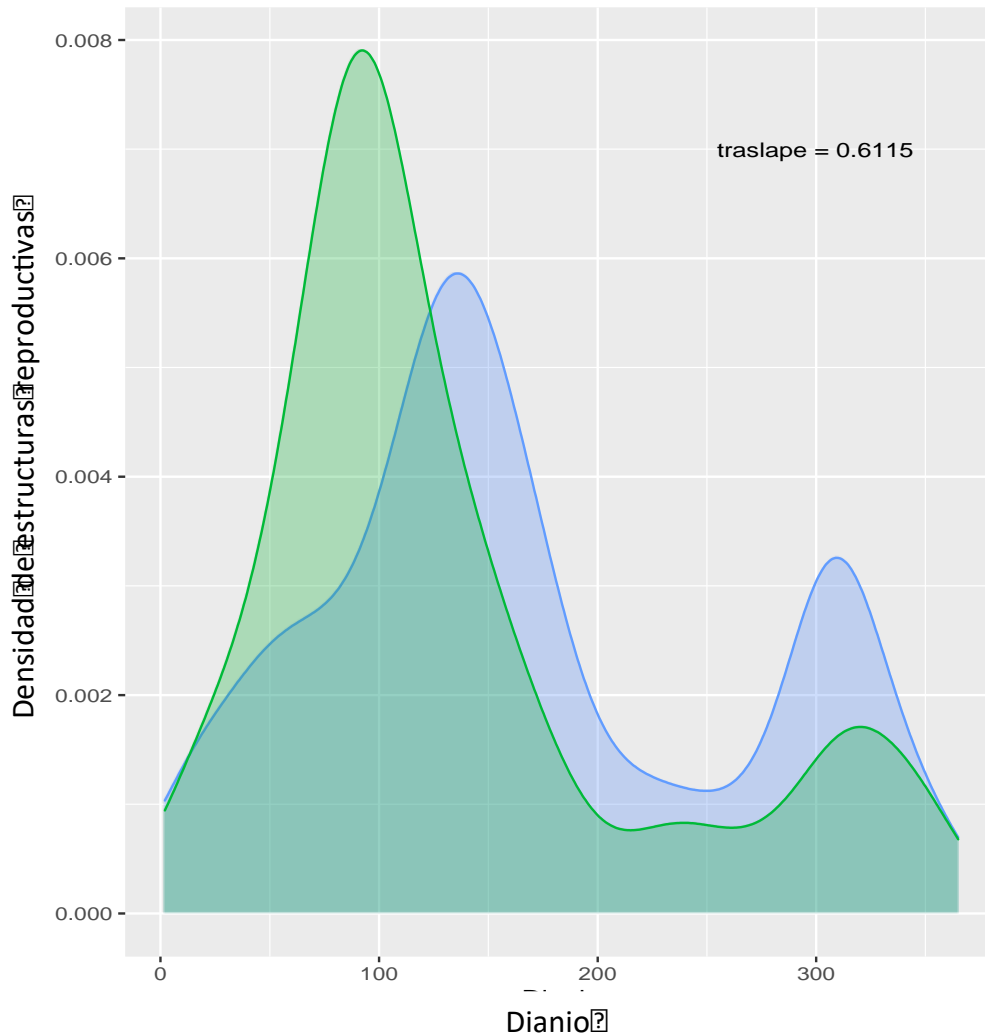


Figura 26. Las plantas en cultivación del continente (verde) y las Antillas Menores (azul) presentan un traslape en su actividad fenológica de 61.2%; para suavizar la gráfica se utilizó un bandwidth=20.

Fenología con datos de herbario

Se obtuvieron 693 registros de *Euphorbia tithymaloides* en el Caribe para los cuales se contaba con estructuras reproductivas y datos completos de fecha y geografía; 81 registros no contaban con latitud/longitud ni suficiente información en la etiqueta para georreferenciarlos, por lo que sólo fueron contemplados en análisis temporales, pero no geográficos.

Los datos de fenología a partir de especímenes de herbario sugieren la presencia de un periodo de floración general de diciembre a marzo (entre los días 300 y 100 del año siguiente) y en las Antillas Menores puede haber dos picos de floración (uno anterior al día 300, y otro alrededor del día 100 del año siguiente). Si bien la

mayor actividad fenológica está concentrada en la época de días cortos del año, existe mayor variación fenológica en el continente (Figuras 27 y 28).

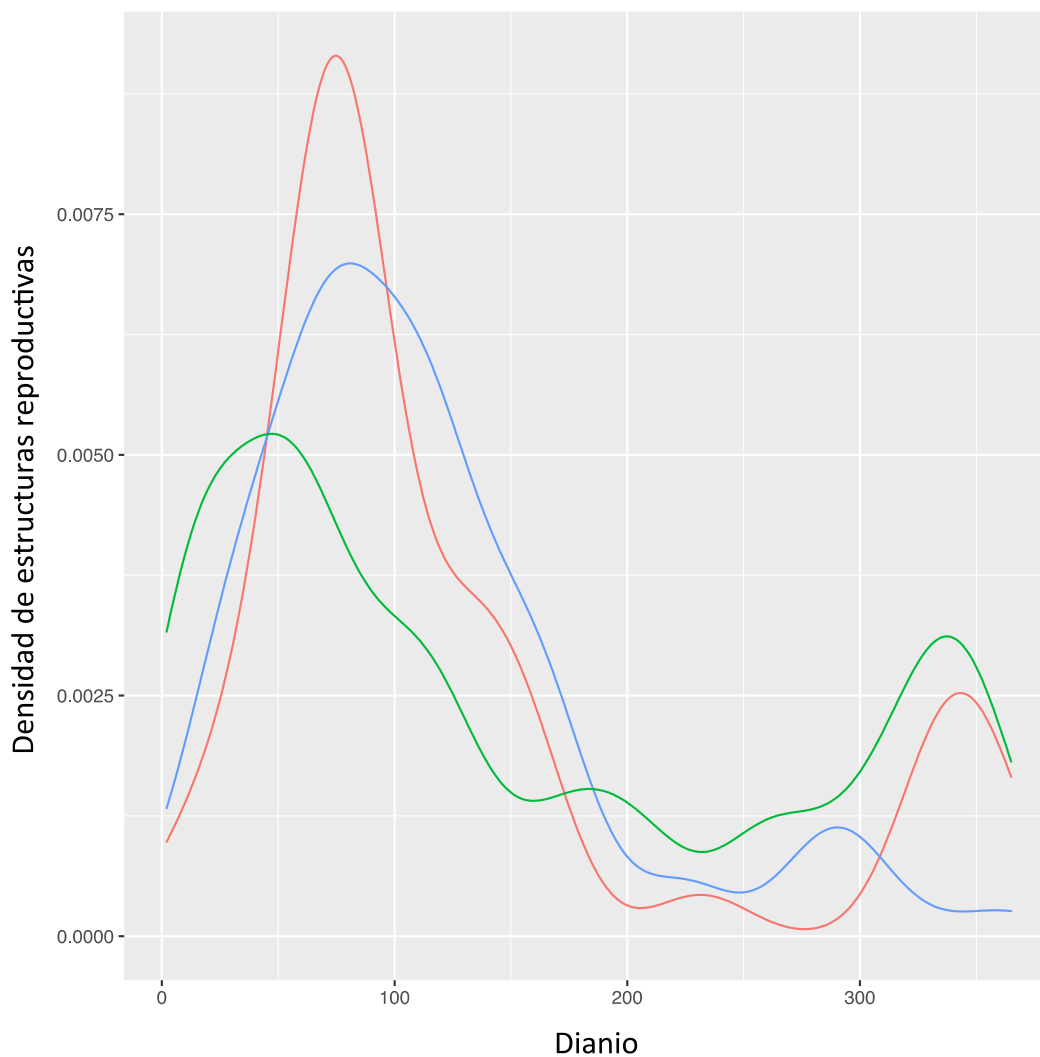


Figura 27. Los datos de herbario (estructuras reproductivas) revelan traslape de la actividad fenológica en *Euphorbia tithymaloides* en las tres áreas focales analizadas: continente (verde), Antillas Menores (azul) y Antillas Mayores (rojo); para suavizar la gráfica se utilizó un bandwidth=20.

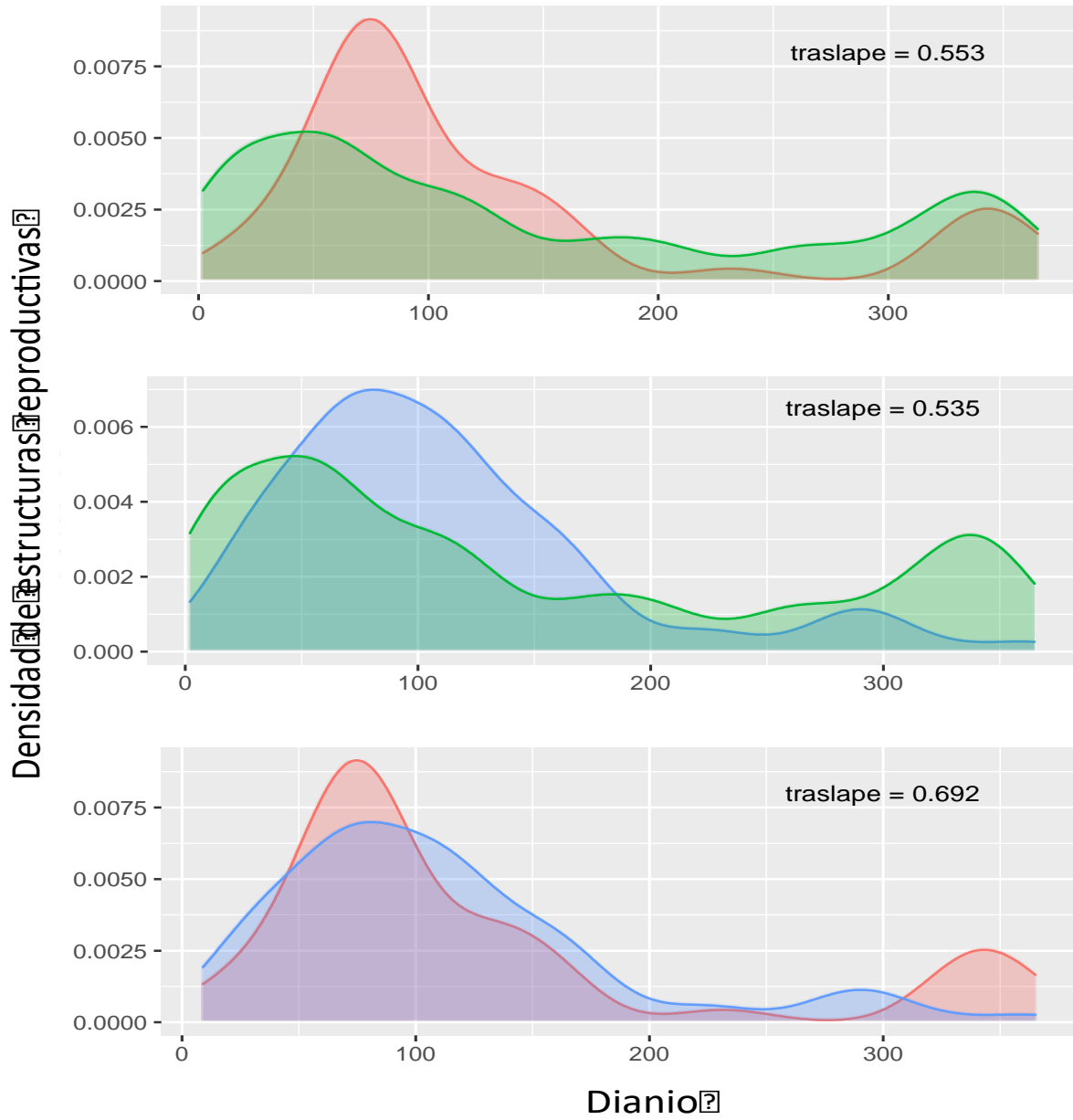


Figura 28. La variación presente en los especímenes de herbario correspondientes al continente (color verde), las Antillas Menores (color azul) y las Antillas Mayores (color rojo) no respalda la hipótesis de divergencia en la fenología entre las poblaciones de *Euphorbia tithymalooides* a través de su área de distribución en el Caribe; para suavizar la gráfica se utilizó un bandwidth=20.

Recompensa floral (néctar)

En un contexto amplio

De la literatura se obtuvieron 507 datos de concentración de azúcares totales y 228 datos de volumen de néctar correspondientes a plantas ornitófilas. La concentración de azúcares totales en el néctar de *Euphorbia tithymaloides* tiende a ser alta respecto a lo reportado para plantas ornitófilas, mientras que el volumen de néctar tiende a ser bajo respecto a lo reportado para este tipo de plantas (Figura 29, Tabla 1).

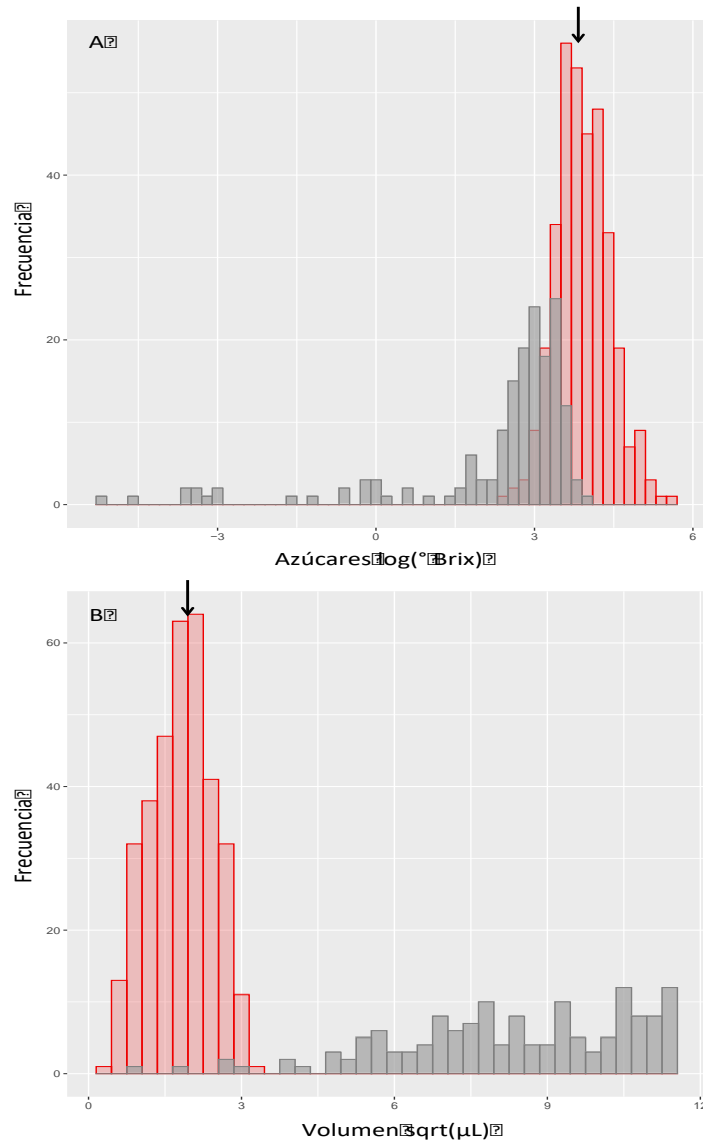


Figura 29. (A) La concentración (de azúcares en néctar de *Euphorbia tithymaloides* ($n=343$) coincide con lo reportado en la literatura ($n=507$) para plantas ornitófilas (gris), y se encuentra hacia el extremo de concentraciones altas (rojo). (B) El volumen del néctar de *E. tithymaloides* es menor a lo reportado en la literatura para plantas ornitófilas.

Tabla 1. La concentración de néctar (A) y el volumen de néctar (B) de *Euphorbia tithymaloides* donde se observan los mínimos y máximos para cada fuente de variación (datos reportados en la literatura y nuestros datos). Q1= primer cuartil, Q3= tercer cuartil.

A. Concentración de azúcares (° Brix)						
Fuente de variación	mínimo	Q1	mediana	media	Q3	máximo
Nuestros datos	2.426	3.566	3.882	3.913	4.251	5.570
Datos literatura	0.7419	2.8332	3.2328	3.1950	2.452	4.337

B. Volumen de néctar (µL)						
Fuente de variación	mínimo	Q1	mediana	media	Q3	máximo
Nuestros datos	0.329	1.398	1.865	1.809	2.236	3.162
Datos literatura	1.000	5.385	7.874	7.591	10.05	11.57

Patrones geográficos en la recompensa (néctar) en poblaciones naturales

Se realizaron 343 mediciones de néctar que incluyeron datos de jardín común (n= 159) y de campo (n=184). Los datos muestran que las plantas de *Euphorbia tithymaloides* en condiciones de jardín común producen entre 0.6 y 10 microlitros de néctar con concentraciones de azúcares entre 20.0 y 262.5 °Brix que equivalen a 0.3 – 6.8 mg de azúcares totales. En las poblaciones de campo, la producción de néctar varía entre 0.1 y 9.8 microlitros, con concentraciones entre 11.31 y 203.5 °Brix, que equivalen a 0.05 – 5.42 mg (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración (grados Brix), volumen (µL) y azúcares totales (mg) de néctar de *Euphorbia tithymaloides* donde observamos los mínimos y máximos para cada sistema (jardín común y campo). Q1= primer cuartil, Q3= tercer cuartil.

Concentración de néctar (Brix)						
Fuente de variación	mínimo	Q1	mediana	media	Q3	máximo
Jardín común	20.48	45.56	59.40	67.33	78.70	262.5
Campo	11.31	31.64	38.85	48.31	57.61	203.5

Volumen de néctar (µL)						
Fuente de variación	mínimo	Q1	mediana	media	Q3	máximo
Jardín común	0.652	2.714	3.913	4.205	5.652	10.00
Campo	0.108	1.385	2.826	3.142	4.402	9.782

Azúcares totales en néctar (mg)						
Fuente de variación	mínimo	Q1	mediana	media	Q3	máximo
Jardín común	0.298	1.476	2.193	2.628	3.430	6.804
Campo	0.054	0.652	1.210	1.349	1.900	5.427

Si bien los análisis de varianza (ANOVA; con base en residuales de modelos para eliminar la variación debida a fuente– campo vs. jardín común) detectan diferencias significativas en el volumen y azúcares totales del néctar de *E. tithymaloides* del continente, Antillas Mayores y Antillas Menores (Tabla 3), la inspección visual de los datos no refleja dichas diferencias (Figura 30, Anexo 4). Las diferencias observadas pueden ser un artefacto de un elevado tamaño de muestra (n=343).

Tabla 3. Resumen de resultados de análisis de varianza comparando la concentración (A), volumen (B) y cantidad de azúcares totales (C) del néctar de poblaciones de *Euphorbia tithymaloides* del continente, Antillas Mayores y Antillas Menores. GL= grados de libertad, SS= suma de cuadrados, MC= media cuadrada, *= significancia.

A. Concentración de azúcares (° Brix)					
Fuente de variación	GL	SS	MC	F	Pr(>F)
Frente geográfico	2	0.913	0.45645	2.0724	0.1275
Residual	340	74.885	0.22025		
B. Volumen de néctar, sqr(µL)					
Fuente de variación	GL	SS	MC	F	Pr(>F)
Frente geográfico	2	3.698	1.84903	10.237	4.819e-05***
Residual	340	61.413	0.18063		
C. Cantidad de azúcares totales en néctar, sqr(mg)					
Fuente de variación	GL	SS	MC	F	Pr(>F)
Frente geográfico	2	3.326	1.66294	5.01	0.0071**
Residual	340	112.855	0.33193		

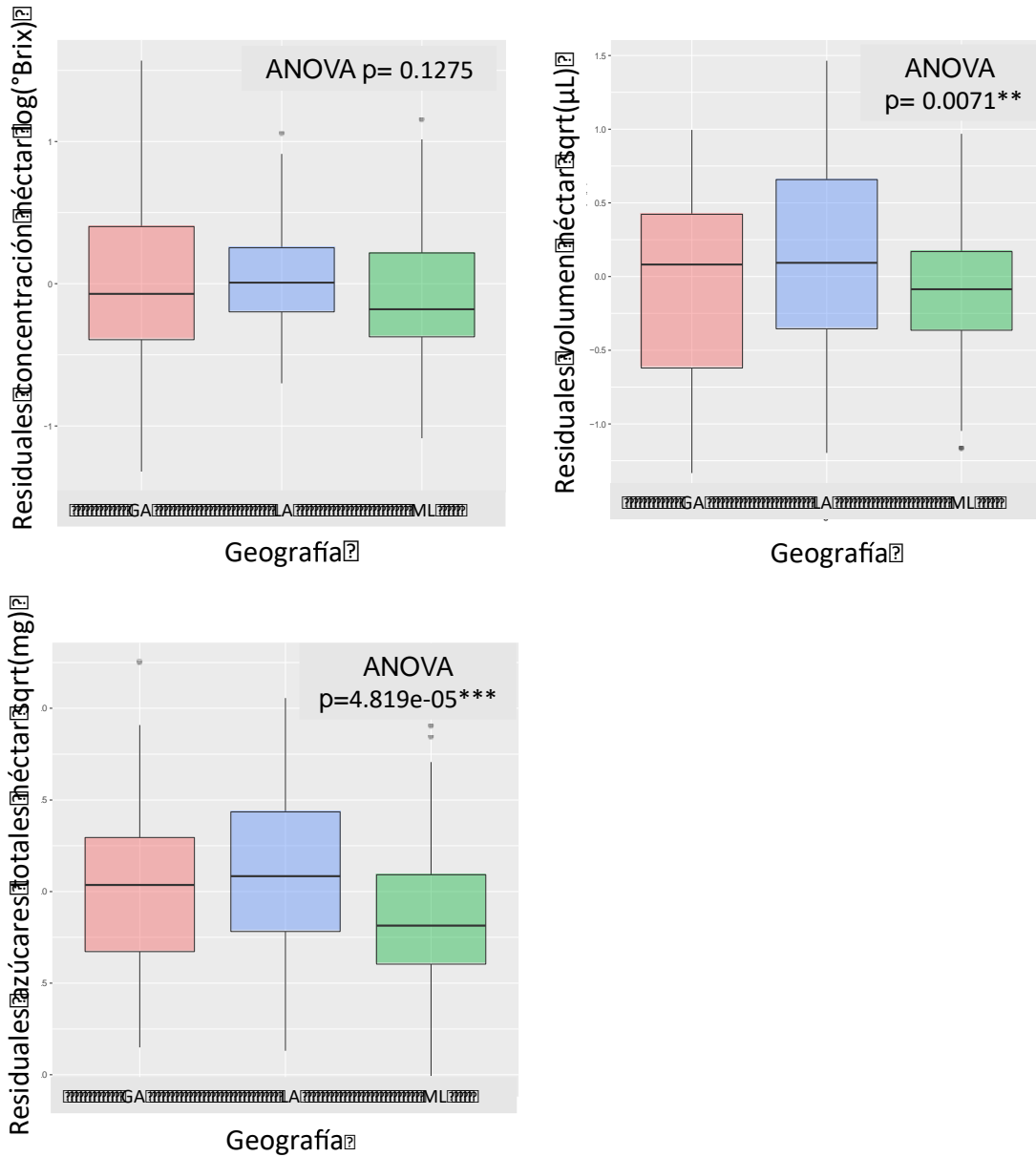


Figura 30. La concentración, el volumen y la cantidad de azúcares totales presentes en néctar de poblaciones de *Euphorbia tithymaloides* en función de su distribución geográfica. Los análisis no respaldan la divergencia en la recompensa de néctar entre las poblaciones. Los códigos de color son: rojo, Antillas Mayores (GA); azul, Antillas Menores (LA); y, verde, continente (ML).

Visitación floral en campo

Se analizaron datos de visitación en campo obtenidos de 10 poblaciones naturales representativas de la distribución geográfica de *Euphorbia tithymaloides* (Figura 24). En total, se registraron 3525 visitas y 128 avistamientos. Se registraron los siguientes visitantes florales, por grupo funcional:

- **Colibríes:** *Mellisuga minima*, *Anthracothorax dominicus*, *Eulampis holosericeus*, *Chlorostilbon maugaeus*, *Chlorostilbon gibsoni*, *Orthorhyncus cristatus*, *Trochilus polytmus*, *Chlorostilbon mellisugus*.
- **Otras aves:** *Coereba flaveola*, *Todus todus*, *Melopyrrha violacea*.
- **Insectos:** abejas, avispas, lepidópteros, hormigas.

Los datos sugieren que los colibríes son los principales visitantes florales (60 – 97% de la visitación) de *E. tithymaloides* en poblaciones naturales representativas de su área de distribución, tanto a nivel global como en las tres áreas geográficas analizadas (Tabla 4, Figura 31), a pesar de que los insectos son comunes en las zonas donde crece *E. tithymaloides* y sobrevuelan estas plantas sin posarse en los ciatios (Figura 32). En las poblaciones de las Antillas, especialmente en las Antillas Mayores y 10% en las Menores), pero su eficacia como polinizadores efectivos sigue sin probarse.

Tabla 4. Resumen de visitación floral en 10 poblaciones naturales *Euphorbia tithymaloides* a lo largo de su área de distribución.

área geográfica	grupo funcional	visitas		avistamientos	
		n	%	n	%
Continente	colibri	130	97%	5	20%
	insecto	4	3%	20	80%
	otras aves	0	–	0	–
subtotal		134		25	
Antillas Menores	colibri	1145	90%	5	14%
	insecto	4	0%	1	3%
	otras aves	130	10%	30	83%
subtotal		1279		36	
Antillas Mayores	colibri	1267	60%	19	28%
	insecto	55	3%	23	34%
	otras aves	790	37%	25	37%
subtotal		2112		67	
TOTAL GLOBAL		3525		128	

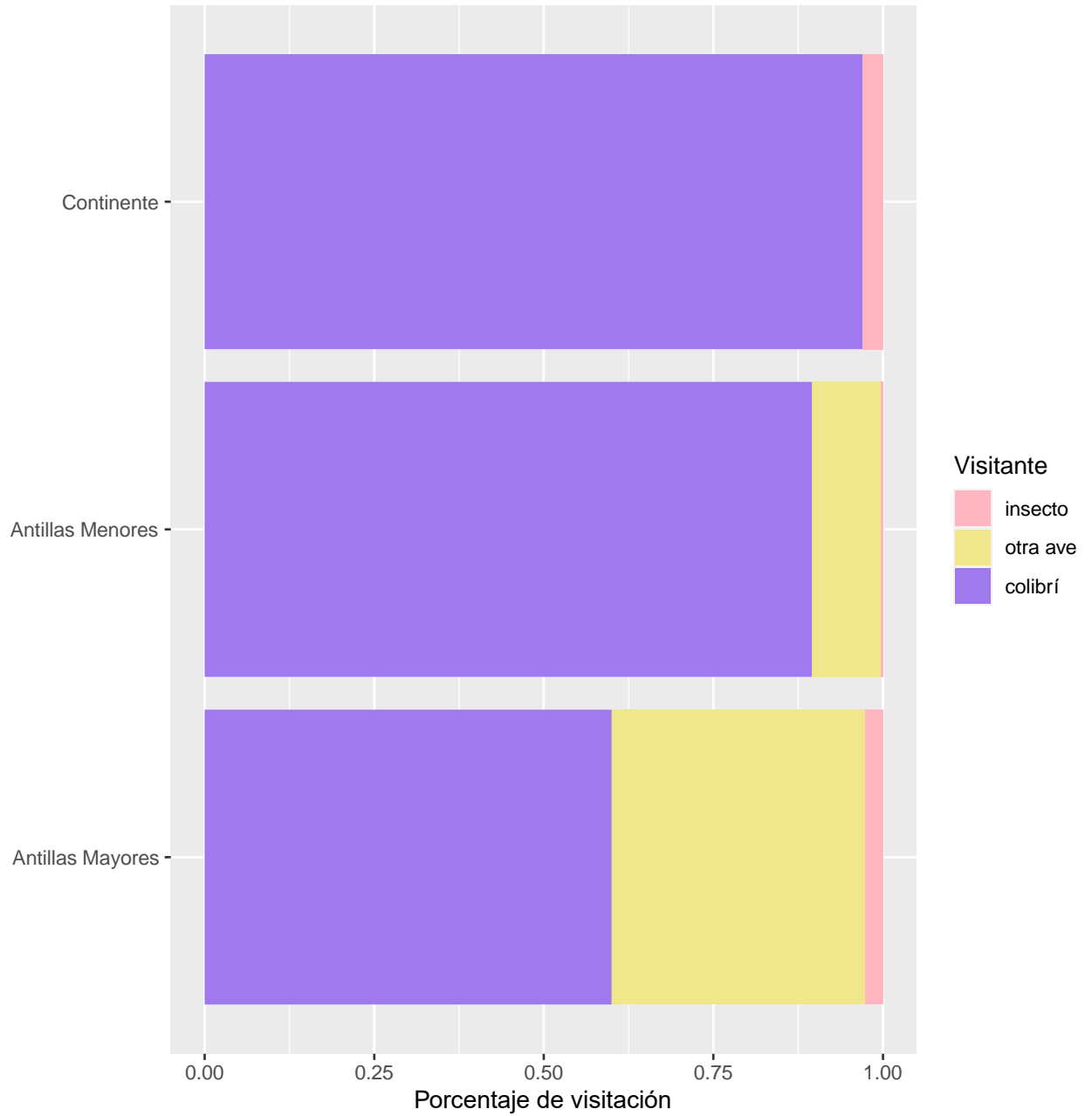


Figura 31. Observaciones de importancia relativa de visitantes florales en 10 poblaciones naturales *Euphorbia tithymalooides* a través de su área de distribución son consistentes con los colibríes como principales polinizadores potenciales.

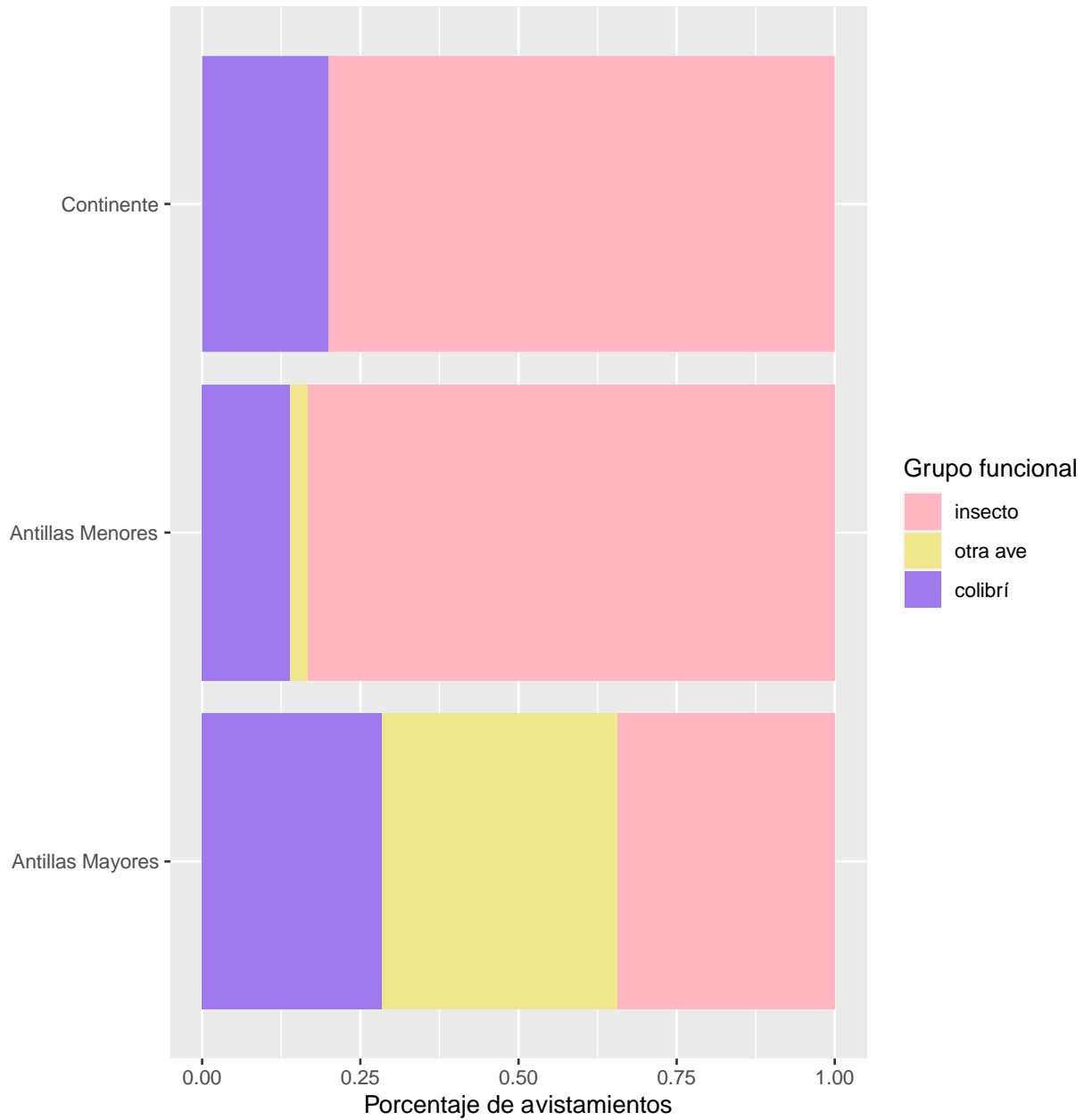


Figura 32. Los insectos son comunes en las áreas que ocupan 10 poblaciones naturales *Euphorbia tithymaloides* y responsables de la mayoría de los avistamientos realizados en campo.

DISCUSIÓN

Este estudio es el primero en evaluar factores promotores de la divergencia en *Euphorbia tithymaloides*, una especie de alta relevancia en biología evolutiva dada la evidencia morfológica, ecológica y genética que sugiere que está en proceso activo de divergencia, e incluso, de posible especiación. En particular, este trabajo evalúa evidencia relacionada a la fenología o cambios en los sistemas de polinización como posibles barreras al flujo génico entre poblaciones de este sistema.

Este trabajo documenta variación de actividad fenológica y en los picos de floración entre poblaciones de *E. tithymaloides*, lo cual es consistente con lo observado en otras especies de amplia distribución y con estructura poblacional marcada (Stiles, 1975; Nuismer y Cunningham, 2005; Chapurlat et al., 2020). La variación fenológica a nivel de población puede ser atribuible a adaptación, diferencias climáticas (Badeck et al., 2004; Anderson et al., 2012) y a la disponibilidad de recursos y a los polinizadores (Santandreu y Lloret, 1999; McDade y Weeks, 2004). En *E. tithymaloides* no hay evidencia de diferencias climáticas marcadas entre sitios ocupados por esta especie en las Antillas Mayores, Antillas Menores y Continente (Jacobo-Arteaga et al., 2022).

Al examinar la fenología en el contexto de la biogeografía histórica de *E. tithymaloides*, no se encuentran diferencias que sugieran que la fenología pueda estar funcionando como una barrera al flujo génico entre poblaciones representativas de las Antillas Mayores y las Antillas Menores, que son los principales linajes evolutivos documentados para esta especie (Cacho y Baum, 2012, 2019; Medina-Rodríguez et al., en prep.). De hecho, el traslape fenológico en *E. tithymaloides* en las tres áreas focales analizadas en este trabajo es sustancial (de 0.53 a 0.69). Esto corresponde al escenario hipotético A planteado en la sección de Hipótesis de este trabajo (Figura 15). Es decir, la fenología no parece estar jugando un papel en promover la divergencia observada entre los linajes de las Antillas Mayores y Menores. Si bien es un factor complejo, es común que las poblaciones de plantas de una especie tiendan a mantener ventanas fenológicas comunes (Bosch et al., 1997; Arceo- et al., 2022).

Entre los factores selectivos más importantes en angiospermas y que se ha documentado que promueven su diversificación, se encuentran los polinizadores (Smith et al., 2008; Lagomarsino et al., 2017). Las plantas responden a los regímenes selectivos impuestos por polinizadores con una serie de atributos florales, entre ellos, la coloración (Rebelo y Siegfried, 1985; Picker y Midgley, 1996; Miller et al., 2011), el tamaño y la simetría florales (Giurfa et al., 1999; Knapp, 2010), la fenología (Elzinga et al., 2007; Chapurlat et al., 2020) y las recompensas florales (Neff y Simpson, 1990; Masierowska, 2012). Aquí, se evaluaron dos líneas de evidencia indirecta sobre los polinizadores como agentes promotores de la divergencia en *E. tithymaloides*. Por un lado, se analizó la producción de recompensa floral (néctar) tanto en poblaciones naturales como en condiciones de jardín común; por otro, se analizaron datos de

visitación floral en poblaciones naturales de *E. tithymaloides*. En ambos casos, se contempló un muestreo lo más representativo posible del área de distribución de esta especie a lo largo del Caribe.

Este trabajo documenta que el néctar de *E. tithymaloides* tiene un contenido alto en azúcares, incluso con respecto a lo reportado en la literatura para plantas ornitófilas (de 3 a 6 °Brix para *E. tithymaloides* y 0.3 a 3°Brix para plantas reportadas en la literatura). Debido a los altos requerimientos energéticos de los colibríes (Heinrich y Raven, 1972; Smith et al., 2008), estos resultados son compatibles con la hipótesis de que los colibríes son los principales polinizadores de *E. tithymaloides* (Dressler, 1957; Cacho et al., 2010). Sin embargo, no es posible descartar una participación potencial de himenópteros como polinizadores a lo largo de la distribución de la *E. tithymaloides*, sobre todo tomando en cuenta que los volúmenes de néctar producidos por esta especie tienden a ser menores que aquellos producidos por plantas ornitófilas en general (aunque estos resultados no fueron ajustados por el tamaño de la unidad floral). Se han documentado casos de transición a polinización por himenópteros han sido documentados en parientes cercanos a esta especie (Sahagún-Godínez y Lomelí-Sención, 1997). Por otro lado, las características florales de *E. tithymaloides* son consistentes con aquellas tradicionalmente relacionadas con polinización por colibríes: unidades florales macroscópicas (en casos de flores individuales pequeñas, inflorescencias macroscópicas), generalmente con coloración roja o rojiza y simetría bilateral que producen néctar en grandes cantidades y en donde se requiere fuerza por parte del polinizador o una estructura alargada para acceder a la recompensa (Dressler, 1957; Veiga Blanco et al., 2013). Existe variación floral en *E. tithymaloides* en cuanto a las dimensiones y forma del ciatio (Cacho et al., 2019) pero no se han reportado casos de pérdida de coloración o de simetría bilateral a través de su distribución que puedan sugerir transiciones a otros polinizadores. Adicionalmente, datos de producción de polen en *E. tithymaloides* son consistentes con reproducción de xenogamia facultativa a lo largo de su área de distribución, y no existe evidencia de transiciones hacia autogamia o autofecundación (Cacho y José-Zacatula, 2020).

En *E. tithymaloides* no encontramos diferencias significativas en el volumen o concentración de azúcares en el néctar que producen las plantas de *E. tithymaloides* de las Antillas Menores y las Antillas Mayores. Es decir, no hay evidencia que sugiera que estos dos linajes difieren en cuanto al grupo funcional de polinizadores y que pudiera explicar la ausencia de flujo génico reportado entre plantas de las Antillas Mayores y Menores (pero ver Medina-Rodríguez, en prep.). Esto corresponde al escenario hipotético A (Figura 16).

El único estudio que existe sobre la polinización en *E. tithymaloides* se enfoca en una única población, para la cual se reportan datos de recompensa floral (producción y concentración de néctar) y tasas de visitación que indican polinización

por colibríes (Veiga Blanco et al., 2013). Los datos de visitación floral en poblaciones naturales analizados en esta tesis reflejan que los colibríes son los principales visitantes florales de *E. tithymaloides* en toda su área de distribución (escenario A en la figura 17). En las poblaciones de las Antillas, especialmente en las Antillas Mayores, se ha observado que otras aves (principalmente *Coereba flaveola*) visitan los ciatios de *E. tithymaloides*, pero su eficacia como polinizadores efectivos sigue sin probarse.

De forma global, esta tesis no encuentra evidencia de que cambios en la fenología o cambios en los polinizadores están actuando como posibles barreras al flujo génico directo entre los linajes principales de *E. tithymaloides*, y por lo tanto actuando como factores promotores de la divergencia en este sistema. Es decir, este estudio sugiere que la divergencia morfológica, ecológica y genética observada entre poblaciones de las Antillas Mayores y Antillas Menores no está siendo determinada por cambios en fenología o polinizadores. Otras posibles explicaciones o factores que podrían estar moldeando la divergencia en este sistema incluyen respuestas a condiciones microclimáticas (p. ej., temperatura local, cantidad de radiación disponible y tipo de suelo) que puedan estar conduciendo a genotipos adaptados localmente (Fournier-Level et al., 2011); o cambios en atributos de los polinizadores principales a lo largo de la distribución geográfica de *E. tithymaloides*.

Son varias las limitaciones de este estudio. En cuanto a la documentación de la fenología con base en datos de herbario, existen huecos geográficos en el muestreo: son pocos o nulos los datos para poblaciones de Centroamérica y Cuba. Una posible explicación es que no existen colectas en época reproductiva para estas áreas. Otra posibilidad es que sí existan esas colectas pero que no hayamos tenido acceso a ellas. Una opción para subsanar esta deficiencia es consultar directamente las colecciones de herbarios locales, que puedan no estar digitalizadas y disponibles en bases de datos. Esto muestra el valor de realizar colectas botánicas a lo largo del tiempo e incluso en los mismos sitios para documentar constancia en comportamiento fenológico. Por otro lado, sería importante ampliar el número de poblaciones representadas en colecciones vivas a partir de las cuales se puedan derivar datos de fenología. Sin embargo, aún ampliando la colección, los datos de fenología obtenidos a partir de plantas en cultivo no necesariamente reflejan el comportamiento de las plantas en condiciones naturales. En algunos casos, está documentado un control genético estricto de la floración (Mitchell-Olds y Schmitt, 2006; Rosas et al., 2014), pero se desconoce si esto es así para *E. tithymaloides*. Otros autores han mostrado que las interacciones bióticas pueden modular la selección en la fenología (Elzinga et al., 2007), cuyo estudio requiere observación directa, manipulación experimental en campo, o ambas.

Los análisis de recompensa floral pueden expandirse de varias formas. Primero, sería importante verificar si el polen de *E. tithymaloides* presenta una recompensa, incluso secundaria o temporal, para himenópteros (principalmente abejas). Es conocido que las abejas además de coleccionar néctar, coleccionan polen y que este comportamiento fluctúa según las necesidades de la colonia (Roulston y Cane, 2000; Nicholls y Hempel de Ibarra, 2017). Por otro lado, es conocido que la composición del néctar (incluyendo distintos tipos de azúcares, así como aminoácidos y otros nutrientes) puede jugar un papel importante en el forrajeo y comportamiento de los visitantes florales (Brandenburg et al., 2009; Tiedge y Lohaus, 2017) y sería importante realizar comparaciones de composición de néctar (p. ej., cuantificar los distintos tipos de azúcares y contenidos de aminoácidos y otros elementos). En estudios futuros resultaría importante también recabar información de un mayor número de poblaciones tanto insulares como continentales; un mayor muestreo geográfico tanto en cuanto a fenología como a documentación de recompensa podría llevar a encontrar diferencias en donde este estudio no las ha encontrado.

Las observaciones de visitación floral analizadas en este estudio son contundentes en cuanto a establecer que los colibríes son los principales visitantes de *E. tithymaloides*. Sin embargo, es necesario evaluar su eficacia como polinizadores efectivos, y si ésta varía en función de la geografía. Asimismo, este estudio es el primero en documentar que *C. flaveola* puede estar jugando un papel importante como polinizador potencial en las Antillas, y es importante evaluar su eficacia como tal, pues esta ave también es un conocido robador de néctar (Stiles y Freeman, 1993; Lasso y Naranjo, 2003; Mata y Bosque, 2004).

Por otro lado, sería importante determinar cuantitativamente la contribución de la fenología y el cambio en los sistemas de polinización como barreras al aislamiento reproductivo en un contexto más amplio. Para ello sería necesario evaluar otras posibles barreras al flujo génico, entre ellas una diversidad de fenómenos pre- y post-cigóticos que puedan estar operando en promover y mantener la divergencia en este sistema (existen dos linajes con flujo génico limitado). Para ello, sería ideal poder realizar cruces experimentales, cuantificando la compatibilidad de individuos de distintas áreas a distintos niveles (p. ej., polen-estigma; polen-óvulo), la frecuencia de fecundación exitosa y la viabilidad de los cigotos producidos (Coyne y Orr, 2004). El conocimiento detallado de la fuerza y naturaleza de estas barreras proporciona información sobre los factores ecológicos y genéticos que influyen directa o indirectamente en la divergencia, y puede ayudar a predecir si los linajes que han evolucionado en *E. tithymaloides* se mantendrán incluso habiendo introgresión o si colapsarán (Martin et al., 2007).

A pesar de las limitaciones discutidas, este trabajo es el primero en proporcionar información detallada acerca de la biología reproductiva de *E. tithymaloides* a través

de su distribución geográfica. Así, este trabajo contribuye a nuestro entendimiento de los procesos que pudieran estar promoviendo la divergencia en esta especie-anillo y al entendimiento del origen de la diversidad biológica en este sistema.

CONCLUSIONES

Este proyecto es el primero en aportar datos sobre fenología, producción de recompensa (néctar) y visitación floral en *Euphorbia tithymaloides* a lo largo de su área de distribución en el Caribe.

La actividad fenológica de *E. tithymaloides* en todas las poblaciones estudiadas abarca un periodo de floración general de febrero a junio (día 50 al 180), y algunas hasta el día 360. Existe traslape sustancial (53 – 69%) en la actividad fenológica (floral) entre las plantas del Continente, Antillas Mayores y Antillas Menores.

El volumen y la concentración de azúcar en el néctar de *E. tithymaloides* varía entre poblaciones naturales y en cultivación (aunque la magnitud de la variación es poca). En condiciones de jardín común se producen entre 0.6 y 10 microlitros de néctar con concentraciones de azúcares entre 20.0 y 262.5 ° Brix que equivalen a 0.3 – 6.8 mg de azúcares. En las poblaciones de campo, la producción de néctar varía entre 0.1 y 9.8 microlitros, con concentraciones entre 11.31 y 203.5 ° Brix, que equivalen a 0.05 – 5.42 mg de azúcares.

Los principales visitantes florales de *E. tithymaloides* son colibríes, y en las Antillas Mayores existe la presencia de *Coereba flaveola*, cuya importancia y eficacia como polinizador debe investigarse.

Los datos de fenología, recompensa y visitación floral no aportan evidencia de que cambios en la fenología o los polinizadores puedan estar actuando como factores promotores o de mantenimiento de la divergencia observada en *E. tithymaloides* a lo largo de su distribución en el Caribe.

Es de gran importancia el estudio de la cuantificación de estas y otras barreras al flujo génico como posibles agentes del aislamiento reproductivo en sublinajes de este sistema, para evaluar sus posibilidades de persistir como tal, divergir en especies distintas, o colapsarse en una especie ampliamente variable en la que los patrones de estructura poblacional y de diversidad morfológica desaparezcan.

REFERENCIAS

- Almeida, O. J. G., J. H. Cota-Sánchez, and A. A. S. Paoli. 2013. The systematic significance of floral morphology, nectaries, and nectar concentration in epiphytic cacti of tribes Hylocereeae and Rhipsalideae (Cactaceae). *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 15: 255–268.
- Altshuler, D. L., R. Dudley, and J. A. McGuire. 2004. Resolution of a paradox: Hummingbird flight at high elevation does not come without a cost. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 17731–17736.
- Anderson, J. T., D. W. Inouye, A. M. McKinney, R. I. Colautti, and T. Mitchell-Olds. 2012. Phenotypic plasticity and adaptive evolution contribute to advancing flowering phenology in response to climate change. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 3843–3852.
- de Araújo, F. P., D. Hoffmann, J. S. Dambolena, L. Galetto, and M. Sazima. 2021. Nectar characteristics of hummingbird-visited ornithophilous and non-ornithophilous flowers from Cerrado, Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 307: 1–10.
- Arceo-, A. S.-M. G., G. C. Albor, and V. P.- Tabla. 2022. Flowering overlap and floral trait similarity help explain the structure of pollination networks. 1–12.
- Badeck, F. W., A. Bondeau, K. Böttcher, D. Doktor, W. Lucht, J. Schaber, and S. Sitch. 2004. Responses of spring phenology to climate change. *New Phytologist* 162: 295–309.
- Baker, H., and I. Baker. 1983. Floral nectar sugar constituents in relation to pollinator type. In C. E. Jones, and R. J. Little [eds.], *Handbook of experimental pollination biology*, 117–141. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Baker, H., and I. Baker. 1990. The predictive value of nectar chemistry to the recognition of pollinator types. *Israel Journal of Plant Sciences* 39: 157–166.
- Baker, H. G. 1975. Sugar concentrations in nectars from hummingbird flowers. *Biotropica* 7: 37.
- Baker, H. G., P. A. Opler, and I. Baker. 1978. A comparison of the amino acid complements of floral and extrafloral nectars. *Botanical Gazette* 139: 322–332.
- Baptiste, A. 2017. gridExtra: Miscellaneous functions for 'grid' graphics. *R packages version 2.3*.
- Batalha, M. A., and W. Mantovani. 2000. Reproductive phenological patterns of cerrado plant species at the pé-de-gigante reserve Pé-de-Gigante Reserve (Santa Rita do Passa Quatro, SP, Brazil): a comparison between the herbaceous and woody floras. *Rev. Bras. Biol.* 60:129-45.
- Benitez-Vieyra, S., J. Fornoni, J. Pérez-Alquicira, K. Boege, and C. A. Domínguez. 2014. The evolution of signal-reward correlations in bee- and hummingbird pollinated species of *Salvia*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281.
- Bernardello, G., L. Galetto, and G. J. Anderson. 2000. Floral nectary structure and nectar chemical composition of some species from Robinson Crusoe Island (Chile). *Canadian Journal of Botany* 78: 862–872.
- Bernardello, G., L. Galetto, and A. Forcone. 1999. Floral nectar chemical composition of some species from Patagonia. II. *Biochemical Systematics and Ecology* 27:

779–790.

- Bernardello, L., L. Galetto, J. Jaramillo, and E. Grijalba. 1994. Floral nectar chemical composition of some species from Reserva Río Guajalito, Ecuador. *Biotropica* 26: 113–116.
- Bolten, A. B., and P. Feinsinger. 1978. Why do hummingbird flowers secrete dilute nectar? *Biotropica* 10: 307.
- Booth, D. E. 2003. Applied Multivariate Analysis. *Technometrics* 45: 174–174.
- Bosch, J., J. Retana, and X. Cerdá 1997. Flowering phenology, floral traits and pollinator composition in a herbaceous Mediterranean plant community. *Oecologia* 109: 583–591.
- Brandenburg, A., A. Dell’Olivo, R. Bshary, and C. Kuhlemeier. 2009. The sweetest thing. Advances in nectar research. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 486–490.
- Bruneau, A. 2014. Evolution and homology of bird pollination syndromes in *Erythrina* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 84: 54–71.
- Butlin, R., J. Bridle, and D. Shluter. 2010. Speciation and patterns of diversity. *Systematic Biology*, 365–367.
- Cacho, N. I., and D. A. Baum. 2012. The Caribbean slipper spurge *Euphorbia tithymaloides*: The first example of a ring species in plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279: 3377–3383.
- Cacho, N. I., P. E. Berry, M. E. Olson, V. W. Steinmann, and D. A. Baum. 2010. Are spurred cyathia a key innovation? Molecular systematics and trait evolution in the slipper spurge (Pedilanthus clade: *Euphorbia*, Euphorbiaceae). *American Journal of Botany* 97: 493–510.
- Cacho, N. I., and D. José-Zacatula. 2020. Geographic patterns in pollen production in the plant ring species *Euphorbia tithymaloides* in the Caribbean. *Systematic Botany* 45: 845–853.
- Cacho, N. I., M. J. Monteverde-Suárez, and P. J. McIntyre. 2019. Convergent evolution in floral morphology in a plant ring species, the Caribbean *Euphorbia tithymaloides*. *American Journal of Botany* 106: 1032–1045.
- Chalcoff, V. R., M. A. Aizen, and L. Galetto. 2006. Nectar concentration and composition of 26 species from the temperate forest of South America. *Annals of Botany* 97: 413–421.
- Chapurlat, E., I. Le Roncé, J. Ågren, and N. Sletvold. 2020. Divergent selection on flowering phenology but not on floral morphology between two closely related orchids. *Ecology and Evolution* 10: 5737–5747.
- Coyne, J. A., and H. A. Orr. 2004. Species: reality and concepts. *Speciation*, 25–54. Sinauer Associates, Inc.
- Cronk, Q., and I. Ojeda. 2008. Bird-pollinated flowers in an evolutionary and molecular context. *Journal of Experimental Botany* 59: 715–727.
- Darwin, C. 1859. On the origin of species. Facsimile of the first edition. Harvard Univ. Press, Cambridge, MA.
- Dieckmann, R. I., M. Doebeli, J. A. Metz, and D. Tautz. 2004. Adaptive speciation. Cambridge University Press.
- Dressler, R. L. 1957. The genus *Pedilanthus* (Euphorbiaceae). CLXXXII Contributions from the Gray Herbarium of Harvard University Herbaria. Cambridge, MA

- Dobzhansky, T.H. 1937. Genetics and the origin of species. Columbia Univ. Press, New York.
- Elzinga, J. A., A. Atlan, A. Biere, L. Gigord, A. E. Weis, and G. Bernasconi. 2007. Time after time: flowering phenology and biotic interactions. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 432–439.
- Fenster, C. B., W. S. Armbruster, P. Wilson, M. R. Dudash, and J. D. Thomson. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35: 375–403.
- Forcone, A., L. Galetto, and L. Bernardello. 1997. Floral nectar chemical composition of some species from Patagonia. *Biochem. Systematics & Ecology* 25: 395–402.
- Fournier-Level, A., A. Korte, M. D. Cooper, M. Nordborg, J. Schmitt, and A. M. Wilczek. 2011. A map of local adaptation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 334: 86–89.
- Galetto, L., and G. Bernardello. 2003. Nectar sugar composition in angiosperms from Chaco and Patagonia (Argentina): An animal visitor's matter? *Plant Systematics and Evolution* 238: 69–86.
- Galetto, L., G. Bernardello, and C. A. Sosa. 1998. The relationship between floral nectar composition and visitors in *Lycium* (Solanaceae) from Argentina and Chile: What does it reflect? *Flora* 193: 303–314.
- Gegear, R. J., and J. G. Burns. 2007. The birds, the bees, and the virtual flowers: Can pollinator behavior drive ecological speciation in flowering plants? *American Naturalist* 170: 551–566.
- Giurfa, M., A. Dafni, and P. R. Neal. 1999. Floral symmetry and its role in plant-pollinator systems. *International Journal of Plant Sciences* 160.
- Goldblatt, P., and J. C. Manning. 2006. Radiation of pollination systems in the Iridaceae of sub-Saharan Africa. *Annals of Botany* 97: 317–344.
- Hainsworth, F. R., and L. L. Wolf. 1976. Nectar characteristics and food selection by hummingbirds. *Oecologia* 113: 101–113.
- Heinrich, B., and P. H. Raven. 1972. The energetics of pollinators may have wide implications. *Science* 176: 597–602.
- Hurt, C. R., M. Farzin, and P. W. Hedrick. 2005. Premating, not postmating, barriers drive genetic dynamics in experimental hybrid populations of the endangered Sonoran topminnow. *Genetics* 171: 655–662.
- Husband, B. C. 2003. Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *New Phytologist* 161: 703–713.
- Irwin, D. E., J. H. Irwin, and T. D. Price. 2001. Ring species as bridges between microevolution and speciation. *Genetica*: 223–243.
- Jacobo-Arteaga, L. E., M. D. Medina-Rodríguez, B. Hernández-Hernández, I. A. Piña de la Rosa, and N. I. Cacho. 2022. Leaf morphospace in *Euphorbia tithymaloides* (Euphorbiaceae) was likely shaped by evolutionary contingencies rather than climate. *Plant Ecology and Evolution*. In press.
- Knapp, S. 2010. On 'various contrivances': Pollination, phylogeny and flower form in the Solanaceae. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365: 449–460.
- Lagamarsino, L. P., E. J. Forrestel, N. Muchhala, and C. C. Davis. 2017. Repeated

- evolution of vertebrate pollination syndromes in a recently diverged Andean plant clade. *Evolution* 71: 1970–1985.
- Lammers, T. G., and C. E. Freeman. 1986. Ornithophily among the Hawaiian Lobelioideae (Campanulaceae): evidence from floral nectar sugar compositions. *American Journal of Botany* 73: 1613–1619.
- Landis, M. ., Quintero, I., Muñoz, M.M., Zapata, F. and Donoghue, M.J. 2022. Phylogenetic inference of where species spread or split across barriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 119: e2116948119.
- Lara, C., and J. Ornelas. 2001. Preferential nectar robbing of flowers with long corollas: Experimental studies of two hummingbird species visiting three plant species. *Oecologia* 128: 263–273.
- Lasso, E., and M. E. Naranjo. 2003. Effect of pollinators and nectar robbers on nectar production and pollen deposition in *Hamelia patens* (Rubiaceae). *Biotropica* 35: 57–66.
- Martén-Rodríguez, S., A. Almarales-Castro, and C. B. Fenster. 2009. Evaluation of pollination syndromes in Antillean Gesneriaceae: Evidence for bat, hummingbird and generalized flowers. *Journal of Ecology* 97: 348–359.
- Martin, N. H., A. C. Bouck, M. L. Arnold, and N. Carolina. 2007. The genetic architecture of reproductive isolation in Louisiana irises: flowering phenology. *Genetics Society of America* 1812: 1803–1812.
- Martin, N. H., and J. H. Willis. 2007. Ecological divergence associated with mating system causes nearly complete reproductive isolation between sympatric mimulus species. *Evolution* 61: 68–82.
- Masierowska, M. 2012. Floral phenology, floral rewards and insect visitation in an ornamental species *Geranium platypetalum* Fisch. and C. A. Mey., Geraniaceae. *Acta Agrobotanica* 65: 23–36.
- Mata, A., and C. Bosque. 2004. Sugar preferences, absorption efficiency and water influx in a Neotropical nectarivorous passerine, the Bananaquit (*Coereba flaveola*). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* 139: 395–404.
- Mayr, E. 1942. Systematics and the origin of species. Columbia U. Press, New York.
- Mayr, E. 1963. Animal species and evolution. Boston, MA: Belknap Press.
- McDade, L. A., and J. A. Weeks. 2004. Nectar in hummingbird-pollinated neotropical plants I: Patterns of production and variability in 12 species. *Biotropica* 36: 196–215.
- Miller, R., S. J. Owens, and B. Rørslett. 2011. Plants and colour: Flowers and pollination. *Optics and Laser Technology* 43: 282–294.
- Mitchell-Olds, T., and J. Schmitt. 2006. Genetic mechanisms and evolutionary significance of natural variation in *Arabidopsis*. *Nature* 441: 947–952.
- Neff, J. L., and B. B. Simpson. 1990. The roles of phenology and reward structure in the pollination biology of wild sunflower (*Helianthus annuus* L., Asteraceae). *Israel Journal of Botany* 39: 197–216.
- Nicholls, E., and N. Hempel de Ibarra. 2017. Assessment of pollen rewards by foraging bees. *Functional Ecology* 31: 76–87.
- Nicolson, S. W. 2002. Pollination by passerine birds: Why are the nectars so dilute? *Comparative Biochemistry and Physiology* 131: 645–652.

- Nosil, P., and J. L. Feder. 2012. Genomic divergence during speciation: Causes and consequences. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367: 332–342.
- Nuismer, S. L., and B. M. Cunningham. 2005. Selection for phenotypic divergence between diploid and autotetraploid *Heuchera grossulariifolia*. *Evolution* 59: 1928–1935.
- Ollerton, J., R. Winfree, and S. Tarrant. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos* 120: 321–326.
- Ornelas, J. F., M. Ordano, A. J. De-Nova, M. E. Quintero, and T. Garland. 2007. Phylogenetic analysis of interspecific variation in nectar of hummingbird-visited plants. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 1904–1917.
- Parachnowitsch, A. L., J. S. Manson, and N. Sletvold. 2019. Evolutionary ecology of nectar. *Annals of Botany* 123: 247–261.
- Pascarella, J. B. 2007. Mechanisms of prezygotic reproductive isolation between two sympatric species, *Gelsemium rankinii* and *G. sempervirens* (Gelsemiaceae), in the southeastern United States. *American Journal of Botany* 94: 468–476.
- Pastore, M. 2018. Overlapping: a R package for Estimating Overlapping in Empirical Distributions. *The Journal of Open Source Software* 3: 1023.
- Pastore, M., and A. Calcagní. 2016. Measuring distributions similarities between samples: A distribution-free overlapping index. *Frontiers in Psychology*: 1089.
- Perret, M., A. Chautems, R. Spichiger, M. Peixoto, and V. Savolainen. 2001. Nectar sugar composition in relation to pollination syndromes in Sinningieae (Gesneriaceae). *Annals of Botany* 87: 267–273.
- Picker, M. D., and J. J. Midgley. 1996. Pollination by monkey beetle (Coleoptera: Scarabaeidae: Hopliini): Flower and colour preferences. *African Entomology* 4: 7–14.
- Prenner, G., and P. J. Rudall. 2007. Comparative ontogeny of the cyathium in *Euphorbia* (Euphorbiaceae) and its allies: Exploring the organ-flower-inflorescence boundary. *American Journal of Botany* 94: 1612–1629.
- Proctor, M., P. Yeo, and A. Lack. 1947. The natural history of pollination. Harper Collins Publishers, London.
- Pyke, G. H., and N. M. Waser. 1981. The production of dilute nectars by hummingbird and honeyeater flowers. *Biotropica* 13: 260.
- Rabosky, D. L. 2016. Reproductive isolation and the causes of speciation rate variation in nature. *Biological Journal of the Linnean Society* 118: 13–25.
- Ramsey, J., H. D. Bradshaw, and D. W. Schemske. 2003. Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution* 57: 1520–1534.
- Rebelo, A. G., and W. R. Siegfried. 1985. Colour and size of flowers in relation to pollination of *Erica* species. *Oecologia* 65: 584–590.
- Rodríguez-Peña, N., K. E. Stoner, C. M. Flores-Ortiz, J. Ayala-Berdón, M. A. Munguía-Rosas, V. Sánchez-Cordero, and J. E. Schondube. 2016. Factors affecting nectar sugar composition in chiropterophilic plants. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 87: 465–473.
- Rosas, U., Y. Mei, Q. Xie, J. A. Banta, R. W. Zhou, G. Seufferheld, S. Gerard, et al. 2014. Variation in *Arabidopsis* flowering time associated with cis-regulatory

- variation in CONSTANS. *Nature Communications* 5: 1–8.
- Roubik, D. W., and S. L. Buchmann. 1984. Nectar selection by *Melipona* and *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) and the ecology of nectar intake by bee colonies in a tropical forest. *Oecologia* 61: 1–10.
- Roulston, T. H., and J. H. Cane. 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Systematics and Evolution* 222: 187–209.
- Rundle, H. D., and P. Nosil. 2005. Ecological speciation. *Ecology Letters* 8: 336–352.
- Sahagún-Godínez, E., and J. A. Lomelí-Senci6n. 1997. *Pedilanthus diazlananus* (Euphorbiaceae): Pollination by hymenopterans in a bird-pollinated genus. *American Journal of Botany* 84: 1584–1587.
- Santandreu, M., and F. Lloret. 1999. Effect of flowering phenology and habitat on pollen limitation in *Erica multiflora*. *Canadian Journal of Botany* 77: 734–743.
- Schluter, D. 2000. Ecological character displacement in adaptive radiation. *American Naturalist* 156.
- Smith, S. D. W., C. An6, and D. A. Baum. 2008. The role of pollinator shifts in the floral diversification of *Lochroma* (Solanaceae). *Evolution* 62: 793–806.
- Southwick, E. E., G. M. Loper, and S. E. Sadwick. 1981. Nectar production, composition, energetics and pollinator attractiveness in spring flowers of Western New York. *American Journal of Botany* 68: 994–1002.
- Stiles, F. G., and C. E. Freeman. 1993. Patterns in floral nectar characteristics of some bird-visited plant species from Costa Rica. *Biotropica* 25: 191.
- Stiles, G. 1975. Ecology, flowering phenology, and hummingbird pollination of some Costa Rican *Heliconia* species. *Ecological Society of America* 56: 285–301.
- Tavares, D. C., L. Freitas, and M. C. Gaglianone. 2016. Nectar volume is positively correlated with flower size in hummingbird-visited flowers in the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Tropical Ecology* 32: 335–339.
- Tiedge, K., and G. Lohaus. 2017. Nectar sugars and amino acids in day- and night-flowering *Nicotiana* species are more strongly shaped by pollinators' preferences than organic acids and inorganic ions. *PLoS ONE* 12: 1–25.
- Toon, A., L. G. Cook, and M. D. Crisp. 2014. Evolutionary consequences of shifts to bird-pollination in the Australian pea-flowered legumes (Mirbelieae and Bossiaeeae). *BMC Evolutionary Biology* 14: 1–11.
- Veiga Blanco, T., L. Galetto, and I. C. Machado. 2013. Nectar regulation in *Euphorbia tithymaloides* L., a hummingbird-pollinated Euphorbiaceae. *Plant Biology* 15: 910–918.
- Wickham, H. 2016. Elegant graphics for data analysis. *Springer-Verlag*.
- Wiens, J. J. 2004. Speciation and ecology revisited: phylogenetic niche conservatism and the origin of species: Phylogenetic niche conservatism and speciation. *Evolution* 58(1): 193-197.
- Wolff, D. 2006. Nectar sugar composition and volumes of 47 species of Gentianales from a southern Ecuadorian montane forest. *Annals of Botany* 97: 767–777.
- Zhao, Z., N. Lu, and J. K. Conner. 2016. Adaptive pattern of nectar volume within inflorescences: Bumblebee foraging behavior and pollinator-mediated natural selection. *Scientific Reports* 6: 34499.

ANEXOS

Anexo 1. Formatos toma de datos

Para organizar y recabar la información de las observaciones de fenología y néctar se utilizaron los siguientes formatos para la toma de datos (Figuras S1, S2).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
1	n	año	mes	día	clave_planta	cluster_clave	cluster_nflor	clave_flor	boton	ciatio_chiquito	estilo_visible	estilo_completo	anteras_visibles	polen_expuesto	fruto_inmaduro	fruto_maduro	fruto_dehiscete	polinizada_si_no
2																		
3																		
4																		
5																		
6																		
7																		
8																		
9																		
10																		
11																		
12																		
13																		
14																		
15																		

Figura S1. Formato utilizado para la toma de datos de actividad fenológica en poblaciones de *Euphorbia tithymaloides*.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1	n_ord	clave_poblacion	planta	inflorescencia o cluster	ciatios/cluster	ciatio	fecha	hora	estadio floral	µL H2O antes	mm nectar	µL H2O después	lectura refractometro	notas_campo	notas_captura
2															
3															
4															
5															
6															
7															
8															
9															
10															
11															

Figura S2. Formato utilizado para la toma de datos de mediciones de néctar en poblaciones de *Euphorbia tithymaloides*.

Anexo 2. Evaluación de normalidad y homocedasticidad.

Se realizaron pruebas de Shapiro y Levene para evaluar la normalidad y la homocedasticidad (respectivamente) en los datos de concentración, volumen y azúcares totales de néctar en jardín común y campo (Tablas S1a, S1b). Se implementaron transformaciones de logaritmo natural (log) para los datos de concentración de néctar y de raíz cuadrada (sqrt) para los de volumen y azúcares totales de néctar (Figuras S3 y S4).

Tabla S1a. Valores obtenidos de la prueba de Shapiro para evaluar la normalidad de los datos; las transformaciones seleccionada se encuentra en negritas.

Fuente	Variable	Unidad	W	P value
Jardín común	Concentración	°B	0.82884	2.32E-12
		log(°B)	0.98941	0.2782
		sqrt(°B)	0.93357	9.49E-07
	Volumen	uL	0.96827	0.001022
		log(uL)	0.94978	1.83E-05
		sqrt(uL)	0.98439	0.07072
	Azúcares totales	mg	0.92961	4.90E-07
		log(mg)	0.97741	0.01042
sqrt(mg)		0.97872	0.01479	
Campo	Concentración	°B	0.79272	7.02E-15
		log(°B)	0.98404	0.0343
		sqrt(°B)	0.91462	7.40E-09
	Volumen	uL	0.94702	2.43E-06
		log(uL)	0.93169	1.28E-07
		sqrt(uL)	0.98744	0.1016
	Azúcares totales	mg	0.93283	1.57E-07
		log(mg)	0.93026	9.95E-08
sqrt(mg)		0.9904	0.2553	

Tabla S1b. Valores obtenidos de la prueba de Levene para evaluar la homocedasticidad en los datos.

Fuente	Variable	Unidad	DF	F value	P value
Jardín común	Concentración	log(°B)	7/151	0.7583	0.6231
	Volumen	sqrt(uL)	7/151	1.8509	0.0815
	Azúcares totales	sqrt(mg)	7/151	2.2721	0.0316
Campo	Concentración	log(°B)	13/170	3.1654	0.0003
	Volumen	sqrt(uL)	13/170	1.6467	0.0769
	Azúcares totales	sqrt(mg)	13/170	1.0253	0.4293

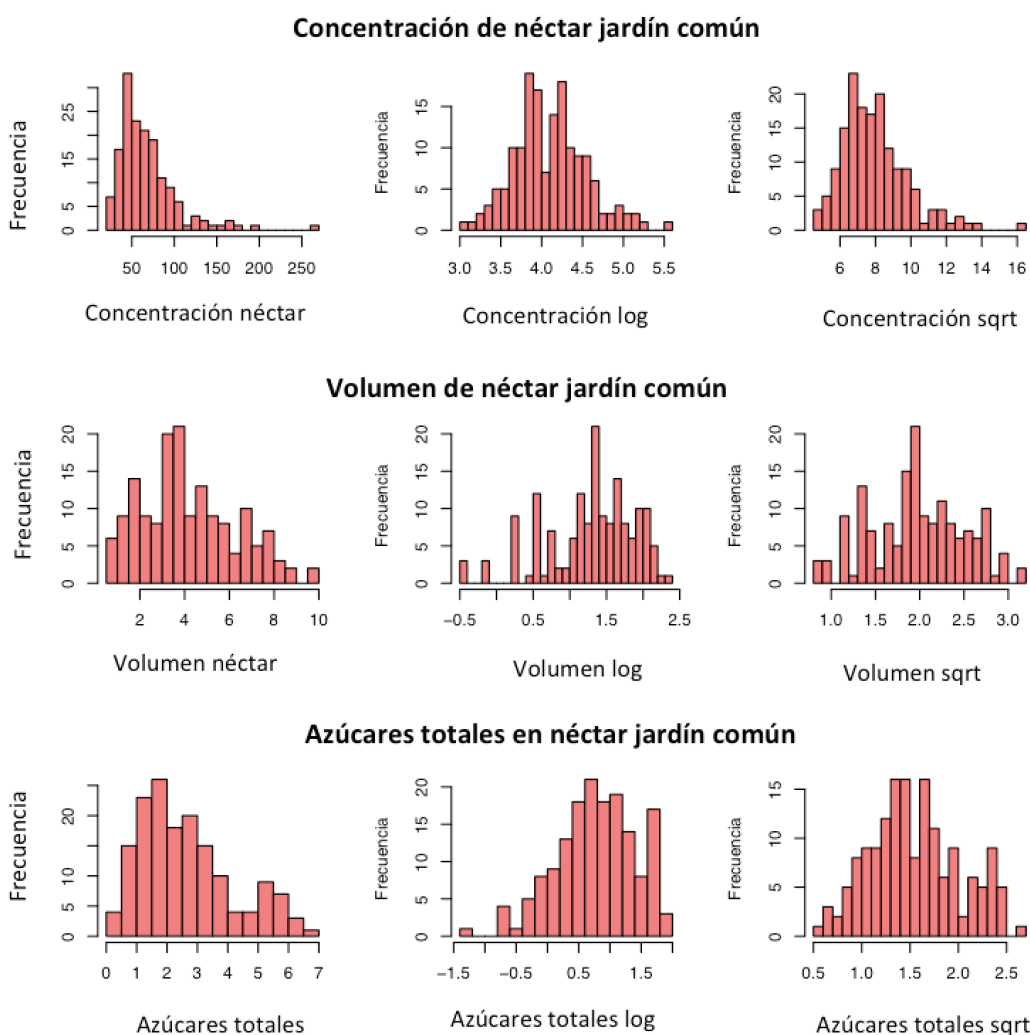


Figura S2. Conjunto de histogramas para concentración, volumen y azúcares totales en néctar de poblaciones de *Euphorbia tithymaloides* en jardín común. Observamos una distribución normal para los datos de concentración con la función log (\log), mientras que para el volumen de néctar y los azúcares totales se utilizó la función sqrt($\sqrt{\quad}$).

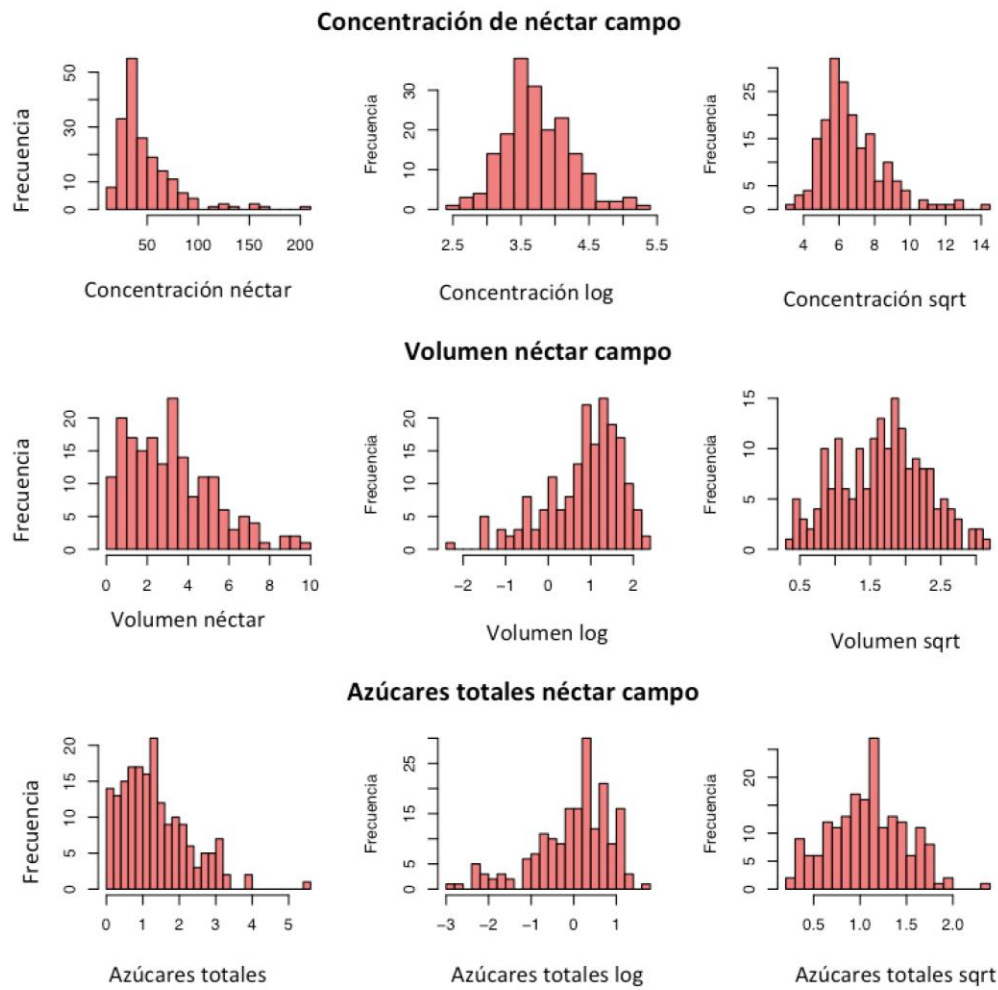


Figura S3. Distribución de los datos de concentración, volumen y azúcares totales en néctar de poblaciones de *Euphorbia tithymaloides* en campo. Observamos una distribución normal para los datos de concentración con la función log (), mientras que para el volumen de néctar y los azúcares totales se utilizó la función sqrt().

Anexo 3. Pruebas de ANOVA y modelos lineales para evaluar diferencias en datos según su fuente (campo vs. jardín común).

Se realizaron pruebas de ANOVA e implementaron modelos lineales para evaluar si los datos de concentración, volumen y azúcares totales de néctar obtenidos de plantas de jardín común y poblaciones naturales de *E. tithymaloides* eran significativamente diferentes (Tablas S2 y S3). Para la visualización de los datos se realizaron gráficas de cajas y bigote (Figura S4).

Tabla S2. Los resultados sugieren que si bien existe traslape entre los datos de campo y de jardín común, también existen diferencias significativas para las tres métricas evaluadas. GL= grados de libertad, SS= suma de cuadrados, MC= media cuadrada, F= valor de F estadística.

ANOVA fuente concentración néctar log(Brix)					
Coeficientes	GL	SS	MC	F	Pr(>F)
Fuente	1	11.016	11.0161	46.59	1.064e-11***
Residuales	341	75.797	0.2223		
ANOVA fuente volumen néctar sqrt(µl)					
Coeficientes	GL	SS	MC	F	Pr(>F)
Fuente	1	8.559	8.5589	25.12	8.667e-07***
Residuales	341	116.181	0.3407		
ANOVA fuente azúcares totales sqrt(mg)					
Coeficientes	GL	SS	MC	F	Pr(>F)
Fuente	1	18.732	18.7315	98.10	<2.2e-16***
Residuales	341	65.111	0.1909		

Tabla S3. La cantidad de variación explicada por el modelo es menor para la concentración y volumen que para los azúcares totales. SE= error estándar, t=valor de t, Signif.= significancia, R2= raíz cuadrada ajustada, F= valor de F estadístico y GL= grados de libertad.

Modelo lineal fuente concentración néctar log(°Brix)									
Coeficientes	Estimado	SE	t	Pr(> t)	R2	F	GL1	GL2	
Intercepto	3.746	0.034	107.8	2.00e-16 ***	0.124	49.56	1	341	
FuenteJardín	0.359	0.051	7.04	1.06e-11 ***					
Modelo lineal fuente volumen néctar sqrt(µl)									
Coeficientes	Estimado	SE	t	Pr(> t)	R2	F	GL1	GL2	
Intercepto	1.662	0.043	38.644	2e-16 ***	0.065	25.12	1	341	
FuenteJardín	0.316	0.063	5.012	8.67E-07 ***					
Modelo lineal fuente azúcares totales sqrt(mg)									
Coeficientes	Estimado	SE	t	Pr(> t)	R2	F	GL1	GL2	
Intercepto	1.084	0.032	33.656	<2e-16 ***	0.221	98.1	1	341	
FuenteJardín	0.468	0.047	9.905	<2e-16 ***					

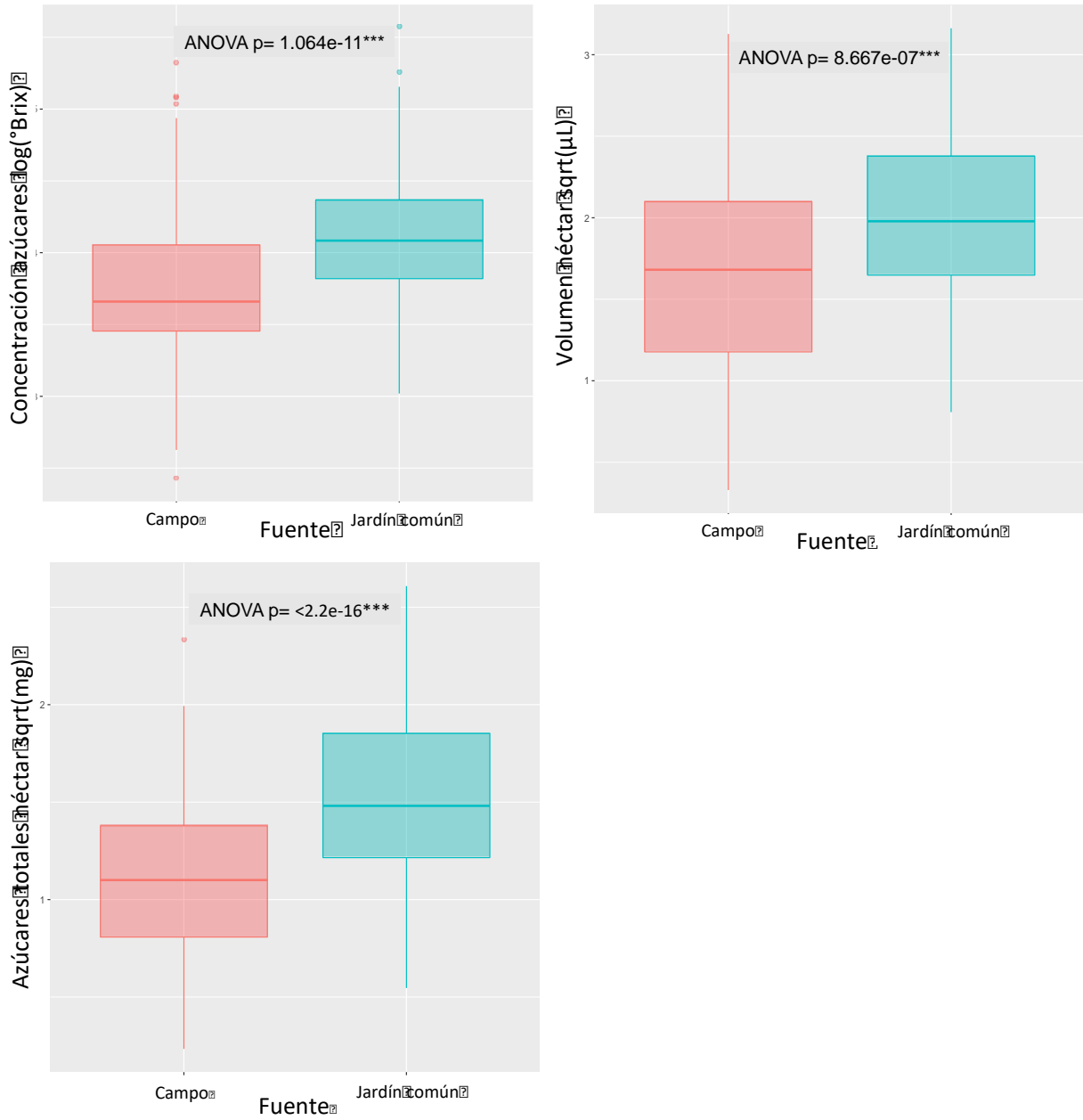


Figura S4 Existen diferencias significativas en la concentración, volumen y azúcares totales del néctar de *Euphorbia tithymaloides* en condiciones de campo y en jardín común.

Anexo 4. Datos de concentración, producción y cantidad de azúcares totales en néctar de *Euphorbia tithymaloides* en las tres áreas geográficas focales abordadas en este estudio.

Tabla S4. Datos de concentración, producción y cantidad de azúcares totales en néctar de *Euphorbia tithymaloides* para el continente, Antillas Mayores y Antillas Menores. Q1= primer cuartil, Q3= tercer cuartil, SD= desviación estándar.

Concentración de néctar (°Brix)							
Fuente de variación	mínimo	Q1	mediana	media	Q3	máximo	SD
Continente	20.48	41.79	50.75	62.25	75.38	190.67	34.822
Antillas Mayores	11.31	28.60	39.46	51.32	63.33	203.52	34.018
Antillas Menores	22.87	37.41	58.47	58.47	68.83	262.50	32.083
Producción de néctar (µL)							
Fuente de variación	mínimo	Q1	mediana	media	Q3	máximo	SD
Continente	0.652	2.608	3.587	3.722	4.619	8.695	1.725
Antillas Mayores	0.107	1.087	3.043	2.957	4.347	7.065	1.855
Antillas Menores	0.217	1.956	3.750	4.171	6.358	10.000	2.558
Azúcares totales de néctar (mg)							
Fuente de variación	mínimo	Q1	mediana	media	Q3	máximo	SD
Continente	0.298	1.337	1.868	2.141	2.703	6.003	1.160
Antillas Mayores	0.054	0.572	1.254	1.329	1.900	5.427	0.970
Antillas Menores	0.092	0.929	1.894	2.320	3.144	6.804	1.667