



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE POSTGRADO

Efecto del componente espacial sobre estimaciones de selección en un sistema planta-polinizador

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Grado de Magíster en Ciencias Biológicas.

Pedro Felipe Ferrer Rosende

Director del Seminario de Título: Dr. Rodrigo Medel
Co-Director del Seminario de Título: Dr. Carezza Botto

Noviembre de 2018
Santiago - Chile

*"Para investigar la verdad es preciso dudar,
en cuanto sea posible,
de todas las cosas, una vez en la vida."*

René Descartes

BIOGRAFIA



Pedro Ferrer Rosende nació el 16 de Octubre de 1990 en Santiago. Realizó sus estudios de educación básica y media en el Colegio San Esteban Diácono. Siempre motivado por el área de las ciencias ingresó a Biología Ambiental en la Universidad de Chile el año 2010, esperando encontrar las respuestas a sus preguntas. A medida que cursaba la carrera se interesó inmediatamente con la evolución, es por esto que ingresó al Laboratorio de Ecología Evolutiva a cargo del profesor Rodrigo Medel. Con el tiempo además de la evolución su interés se centró en los métodos cuantitativos utilizados tanto en esta como en ecología por lo que comenzó a adentrarse en al área de la Bioestadística, área que busca complementar con los conocimientos adquiridos directamente de la naturaleza. Pedro encontró un campo que combina a la perfección estas dos disciplinas en la ecología espacial y las aplicaciones de esta sobre los estudios de la selección natural, es de ahí donde nacen los cimientos para la realización de esta tesis, signo de la culminación de un proceso, pero que en realidad no es más que el inicio de una etapa mucho mayor.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el incondicional apoyo de mis tutores, Rodrigo Medel y Carezza Botto, quiénes desde el 2013 han sido un aporte fundamental en mi formación no solo como biólogo y profesional sino que como persona. Por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio de Ecología Evolutiva, y con esto poder relacionarme con un grupo de trabajo tan íntegro y honesto. A mis revisores, Alejandra González y Francisco Fontúrbel por darse el tiempo de revisar esta tesis y sus importantes aportes.

Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio, que siempre colaboraron en mis trabajos con diversos y valiosos comentarios, en especial a mis compañeros de terreno Mildred E, Catalina G, Gabriel E, Pachy Y, Paloma J, Constanza T, Consuelo S, Rodrigo G, Kevin “El Jefe” W, Francisco Z y Daniela S por el apoyo y las historias en los dos veranos de terreno que aportaron a la realización de esta tesis.

Infinitas gracias a mis padres, por el apoyo y cariño incondicional. A mis queridos amigos de la Universidad y de la vida, que no sólo ayudaron a formarme y madurar como profesional, sino que fueron una alegría y enriquecimiento humano constante.

Por último agradecer a CONICYT que en el marco del proyecto FONDECYT 1150112 hizo posible la realización de este estudio y que gracias a la Beca de Magister Nacional 2017 me dió la oportunidad de cursar este programa de Postgrado.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| Índice..... | v |
| Lista de Tablas..... | vi |
| Lista de Figuras..... | vii |
| Resumen..... | viii |
| Abstract..... | x |
| Introducción..... | 1 |
| Objetivos..... | 6 |
| Materiales y métodos..... | 7 |
| Historia natural y área de estudio..... | 7 |
| Diseño del estudio..... | 9 |
| Trabajo de campo y procedimientos de laboratorio..... | 10 |
| Análisis descriptivo..... | 10 |
| Autocorrelación espacial..... | 11 |
| Modelos de selección fenotípica..... | 14 |
| Resultados..... | 17 |
| Análisis descriptivo..... | 17 |
| Autocorrelación espacial..... | 22 |
| Análisis de selección fenotípica..... | 28 |
| Discusión..... | 33 |
| Conclusiones..... | 40 |
| Bibliografía..... | 42 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla I. Medias \pm DE de los distintos rasgos medidos para cada ensamble de polinizadores..... | 17 |
| Tabla II. Diferenciales y gradientes de selección para los distintos rasgos de <i>Erythranthe lutea</i> en cada ensamble de polinizadores..... | 31 |
| Tabla III. AIC y significancia del componente espacial para cada uno de los modelos..... | 32 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. a) Frecuencia de visitas florales para abejas y picaflones a lo largo del día. b) Media del tamaño de guía de néctar y de área de corola de flores visitadas por abejas y picaflones..... | 8 |
| Figura 2. Representación gráfica de las medias de los distintos rasgos medidos para cada uno de los ensambles de polinizadores..... | 18 |
| Figura 3. Histograma de número de semillas para cada ensamble de polinizadores..... | 18 |
| Figura 4. Correlaciones entre rasgos..... | 20 |
| Figura 5. Correlogramas de Moran para cada rasgo en ensamble P+A+..... | 23 |
| Figura 6. Correlogramas de Moran para cada rasgo en ensamble P-A+..... | 24 |
| Figura 7. Correlogramas de Moran para cada rasgo en ensamble P+A-..... | 25 |
| Figura 8. Correlogramas de Moran para cada rasgo en ensamble P-A-..... | 26 |
| Figura 9. Correlogramas de Mantel de los rasgos medidos para cada ensamble de polinizadores..... | 27 |
| Figura 10. Correlogramas de Moran para el <i>fitness</i> en cada ensamble de polinizadores | 27 |
| Figura 11. Correlogramas <i>spline</i> de los residuales para cada ensamble..... | 32 |

RESUMEN

La estructura espacial es una variable que influye en una amplia variedad de fenómenos en ecología y evolución. En ecología evolutiva, se ha señalado que la covarianza fenotipo-*fitness* puede ser sobrestimada si no se controla por efectos de dependencia espacial. Sin embargo, raras veces la estructura espacial de los organismos ha sido explícitamente considerada en estudios de selección natural y a nuestro conocimiento nunca se ha considerado su efecto para la selección mediada por distintos ensambles de polinizadores tomando en cuenta sus respectivas técnicas de forrajeo y el posible impacto sobre los gradientes de selección por separado. Este estudio se focaliza en la relación de la herbácea *Erythranthe lutea* con dos ensambles de polinizadores (abejas y picaflor) en una población de Chile central, en un intento por indagar de qué manera la estructura espacial de las plantas afecta las estimaciones de selección fenotípica. Se examinó la asociación de cinco rasgos fenotípicos (número de flores de la planta en un radio de 30 cm, largo del tubo floral, distancia antera-estigma, área de corola y guía de néctar), con estimaciones de *fitness* femenino, considerando la estructura espacial mediante una función de suavizado en un modelo GAMM. Esto permitió comparar la selección multivariada de los rasgos en presencia y ausencia de la variable espacial así como el efecto directo de la variable espacial sobre el *fitness*. Los resultados revelaron autocorrelación espacial en las primeras categorías de distancia en los rasgos de cada tratamiento, pero no en el *fitness* ni en los residuales del modelo, lo que se vio representado por una baja variación de los coeficientes de selección al controlar por la estructura espacial. A pesar de esto, la estructura

espacial tuvo un efecto significativo sobre la producción de semillas en el tratamiento control, en presencia de abejas y picaflores. Independiente de la magnitud, estimaciones de selección que no consideren el espacio como una variable que contribuye a la covariación fenotipo-*fitness* corren el riesgo de sobre o subestimar las fuerzas selectivas actuando sobre el fenotipo floral en las poblaciones de plantas.

ABSTRACT

The spatial structure is a variable that influences a wide variety of phenomena in ecology and evolution. In evolutionary ecology, it has been pointed out that the phenotype-fitness covariance can be overestimated if it is not controlled by effects of spatial dependence. However, the spatial structure of organisms has rarely been explicitly considered in natural selection studies and to our knowledge the effect of spatial autocorrelation on selection by different pollinator assemblages has never been considered taking into account their respective foraging techniques and the possible impact on the selection gradients separately. This study focuses on the relationship between the herbaceous *Erythranthe lutea* and two assemblages of pollinators (bees and hummingbirds) in a population of central Chile, in an attempt to investigate how the spatial structure of plants affects estimates of phenotypic selection. We evaluated the association of five phenotypic traits (number of flowers of the plant in a 30 cm radius, floral tube length, anther-stigma distance, corolla and nectar guide area), with estimates of female fitness, considering the spatial structure by a smoothing function in a GAMM model. This allowed us to compare the multivariate selection of traits in the presence and absence of the spatial variable as well as the direct effect of the spatial variable on fitness. The results revealed spatial autocorrelation in the first distance categories in the traits of each treatment, but not in the fitness or residuals of the model which was represented by a low variation of the selection coefficients when controlling for the spatial structure. Despite this, spatial structure had a significant effect on seed production in the presence of bees

and hummingbirds. Independent of the magnitude, selection estimates that do not consider space as a variable that contributes to phenotype-fitness covariance may over or underestimate the selective forces acting on the floral phenotype in plant populations.

INTRODUCCIÓN

Las interacciones ecológicas constituyen un aspecto central de la biodiversidad ya que su pérdida puede afectar la funcionalidad y estructura de los ecosistemas en una tasa mayor que la extinción de especies en la actualidad (Valiente-Banuet y col., 2015). Por otra parte, los organismos suelen tener distribuciones espaciales no aleatorias tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos (Maestre y col., 2005; Barnes y col., 2007). En el caso de las plantas esto se debe a que factores abióticos como la precipitación, los nutrientes y el agua disponible siguen complejos patrones espacio-temporales, en ocasiones asociados a los de distintos organismos (Maestre y Escudero, 2008). Todo ello ha provocado que se reconozca la relevancia del espacio y de las estructuras espaciales en el funcionamiento de los ecosistemas, incluso llegando a ser nombrado como el "paradigma espacial de la ecología" (Legendre, 1993; Tilman y Kareiva, 1997).

El análisis de los patrones espaciales es una parte fundamental de una amplia variedad de disciplinas científicas, aunque en ecología y ciencias afines el análisis de datos espacialmente explícitos cobra una especial relevancia (Maestre y Escudero, 2008). Por definición, la ecología se encarga del estudio de las relaciones recíprocas entre los organismos y su medio ambiente, su distribución y su abundancia (Begon y col., 1995). Dado que tanto los organismos como los factores abióticos que definen los ecosistemas presentan marcados patrones espaciales, el estudio de éstos es clave para poder entender dichas relaciones (Maestre y Escudero, 2008).

En el último tiempo, el estudio del componente espacial en ecología se ha diversificado, desarrollándose diversos métodos dirigidos no sólo a describir la importancia del espacio, sino a indagar su influencia en estimaciones de parámetros ecológicos y evolutivos. Por ejemplo, es bien conocido que por influir en el comportamiento de agentes bióticos responsables de la polinización, la distribución espacial de las plantas incide en su éxito reproductivo (Kunin, 1997; Ghazoul, 2005; Elliot e Irwin, 2009). Menos conocida, sin embargo, es la relevancia de la estructura espacial de rasgos florales en procesos microevolutivos tales como la selección de rasgos fenotípicos de las especies. En principio, la estructura espacial del ambiente puede afectar la distribución espacial tanto de las plantas como de rasgos florales, pudiendo afectar en último término el potencial evolutivo de las especies involucradas en la interacción polinizador-planta.

En cualquier análisis estadístico, uno de los principales requisitos muestrales es la independencia de los datos, la que es usualmente supuesta por el investigador pero raras veces demostrada. Al respecto, se ha indicado que una variable presenta autocorrelación espacial cuando sus valores en un sistema de coordenadas x e y difieren menos de lo que cabría esperar por una distribución aleatoria (Fortín y Dale, 2005). En caso de existir autocorrelación (especialmente a nivel de residuales), la independencia podría ser cuestionada, lo que plantearía numerosos problemas al momento de realizar e interpretar análisis estadísticos (Legendre, 1993). En particular, los modelos que ignoran la autocorrelación espacial son especialmente susceptibles a error tipo I, debido a un sobre optimismo en la precisión de los valores de parámetros estimados (Cressie, 1993; Sadoti y col., 2010).

En ausencia de estimaciones de autocorrelación espacial se corre el riesgo de extraer conclusiones erróneas que pueden afectar decisiones críticas en áreas como la ecología, la conservación y la planificación ambiental, entre otras (Escudero y col., 2003; Maestre y Escudero, 2008). Más aún, se ha establecido que el estudio de la autocorrelación espacial siempre debería formar parte de una investigación en ecología, tanto así, que existen afirmaciones que los análisis que no la toman en cuenta serían deficientes e infundados (Diniz-Filho y col., 2003).

A pesar de la atención que se le ha dado al componente espacial en ecología se ha prestado poca atención a los métodos geoestadísticos de ecólogos interesados en la variación individual. Esta omisión es desafortunada ya que los valores de *fitness* también podrían verse afectados por la estructura espacial, sobretodo en plantas (Kalisz, 1986; Stratton y Bennington, 1998). Por ejemplo, se ha señalado que tanto la fragmentación como la transformación del hábitat podría influir en la selección de diferentes rasgos fenotípicos en *Phyteuma spicatum* y en el quintral (*Tristerix corimbosus*) (Weber y Kolb, 2011; Fontúrbel y col., 2015) mientras que la masa del carbonero (*Parus major*) estaría fuertemente correlacionada con la concentración de calcio en el suelo y con el número de robles cerca de sus nidos (Wilkin y col., 2009).

Desde el punto de vista de la selección natural, uno de los aspectos cruciales es indagar si los valores de sobrevivencia y reproducción individual son sensibles a variables ambientales espacialmente estructuradas. En caso de serlo, puede ocurrir autocorrelación espacial en residuos de su asociación con cualquier otro rasgo del fenotipo, afectando así la estimación de la selección natural. A pesar de estos

problemas potenciales, la autocorrelación espacial y su influencia en la estimación de la selección no habían sido exploradas por los ecólogos evolutivos hasta un reciente artículo de Marrot y col. (2015) donde los autores demostraron para una población de herrerillo (*Cyanistes caeruleus*) que la autocorrelación espacial en el *fitness* puede afectar severamente los diferenciales de selección y gradientes, incluso a una escala espacial relativamente pequeña. Los autores además revelaron una fuerte autocorrelación espacial en los residuales de los modelos de selección. En general, la magnitud de los gradientes y diferenciales de selección disminuyó sistemáticamente en los modelos espacialmente explícitos, mientras que el grado de ajuste de estos modelos aumentó de manera importante.

Por otro lado, a lo largo de los años se ha refinado el estudio de las distintas estrategias de forrajeo de los distintos polinizadores, particularmente de las abejas y los picaflones. Aun cuando en un comienzo se creía que las visitas a las flores eran aleatorias, actualmente se sabe que no lo son y que estas visitas serían en secuencias repetidas o *traplines* (Ohashi y Thompson, 2009), aunque tales secuencias serían variables entre las especies. Destaca el hecho que si bien ambos tipos de polinizadores alterarían sus recorridos en respuesta a cambios en la geometría espacial de las flores, las abejas lo harían priorizando parches de alta recompensa mientras que los picaflones modificarían su *trapline* para evitar parches con baja recompensa (Lihoreau y col., 2010; Pritchard y col., 2017). Junto a esto se ha evaluado el impacto de los distintos ensambles de polinizadores por separado, a través de los gradientes de selección, como una medida de la selección actuando directamente sobre los caracteres florales. En estos casos los insectos han ejercido

un mayor impacto que los picaflores, no observándose diferencias entre las situaciones de polinización por separado y mixta (Medel y Nattero, 2009).

La investigación que se presenta en esta tesis focaliza en la relación entre la herbácea *Erythranthe lutea* (ex *Mimulus luteus*) y distintas combinaciones de polinizadores generados experimentalmente en una población de Chile central. Resultados previos efectuados sobre *E. lutea* (Ferrer y Medel, datos no publicados) sugieren la existencia de un posible compromiso entre funciones sexuales respecto a la autofecundación, que es revelado solamente en ausencia de efectos espaciales. Por otro lado, se ha detectado selección actuando sobre la variación intra-individuo de ciertos rasgos florales (Arceo-Gomez y col., 2017) por la presencia de distintos ensambles de polinizadores actuando sobre una misma especie. En esta tesis se examinará la posibilidad que la no consideración de autocorrelación espacial pueda sobre o subestimar las fuerzas selectivas actuando sobre el fenotipo floral en poblaciones de *E. lutea* y que tal efecto sea dependiente de los patrones de forrajeo de las especies de polinizadores.

Pregunta de investigación

¿De qué manera la distribución espacial de las plantas puede afectar las estimaciones de selección mediada por cada uno de los ensambles de polinizadores que interactúan con *Erythranthe lutea*?

Objetivo general

Estimar el impacto del componente espacial en un sistema planta-polinizador y su efecto sobre la selección impuesta por distintas combinaciones de especies de polinizadores.

Objetivos específicos

1. Evaluar la autocorrelación espacial de rasgos florales de *Erythranthe lutea* en distintas parcelas experimentales de polinizadores.
2. Analizar la influencia de la distribución espacial de *Erythranthe lutea* sobre las estimaciones de selección fenotípica impuestas por distintas combinaciones de polinizadores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Historia natural y área de estudio

Erythranthe lutea es una hierba perenne e hidrofílica que crece entre 0 y 3650 msnm y entre 29° y 45° latitud Sur (von Bohlen, 1995). Presenta flores hermafroditas solitarias con corolas tubulares de color amarillo y una mancha roja visible en el lóbulo inferior, que actúa como guía de néctar (Medel y col., 2003). Las flores son zigomorfas, con dimensiones de 34 mm a lo largo del plano de simetría y 26 mm de ancho. Las flores permanecen abiertas entre 3,6 a 5,9 días, dependiendo de si es polinizada o no (Medel y col., 2003) y tienen el estigma por sobre las anteras, fenómeno denominado "hercogamia de aproximación" (Barrett, 2002). A pesar de tratarse de una especie autocompatible, se ha descrito que la cantidad de frutos y semillas producida mediante autopolinización, es menor que la producida mediante polinización cruzada (Carvallo y Medel, 2010). La producción promedio de semillas por fruto varía de 82 a 800 semillas dependiendo de la población (Medel y col., 2003).

La especie en estudio es polinizada fundamentalmente por dos grupos de polinizadores: picaflores y abejas. Se ha descrito que estas especies poseen distintos hábitos de polinización y que actúan a diferentes horas del día, presentando preferencia por rasgos de distintas características (Figura 1).

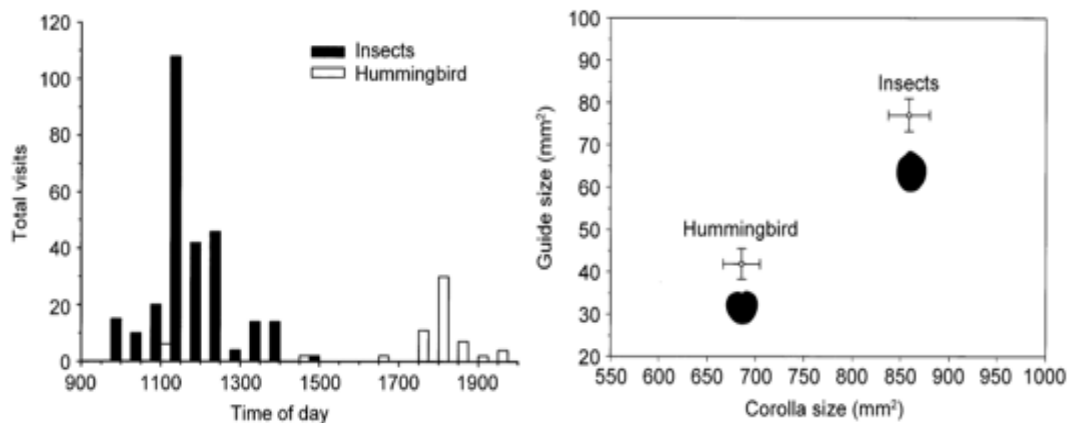


Figura 1. a) Frecuencia de visitas florales para abejas y picaflores a lo largo del día. b) Media del tamaño de guía de néctar y del área de la corola de flores visitadas por abejas y picaflores (Imagen tomada de Medel y col., 2003).

El presente estudio se realizó en una población altoandina ubicada en Juncal (32°52'S, 70°09'W, 2216 msnm), zona que se cubre totalmente de nieve al menos tres meses al año. En el sitio de estudio, *E. lutea* es la especie más abundante alcanzando una abundancia relativa de 67,8%. La siguen en abundancia: *Brassica campestris* (Brassicaceae) (11,7 %), *Chrysanthemum parthenium* (Asteracea) (9,5%), *Veronica anagallis-aquatica* (Scrophulariaca) (6,4%), *Verbascum densiflorum* (Scrophulariaceae) (1,9 %), *Solidago chilensis* (Asteracea) (1,5%), y *Lactuca serriola* (Asteracea) (1,1%) (Esterio y col., 2013). Los principales polinizadores descritos para esta población son el abejorro *Bombus terrestris*, las abejas *Centris nigerrima*, *Centris chilensis*, *Megachile saulcyi*, *Megachile semirufa* y el picaflor *Oreotrochilus leucopleurus* (Esterio y col., 2013).

Diseño del estudio

En el sitio de estudio los picaflores y las abejas están casi completamente segregadas en sus períodos de actividad de forrajeo a lo largo del día, estando los picaflores principalmente activos en la sombra, es decir, temprano por la mañana y al atardecer, mientras que las abejas comienzan su actividad una vez que la luz solar cubre el sitio del estudio, momento en que el picaflor termina su forrajeo (Figura 1a; Medel y col., 2003). Este escenario natural permitió separar los impactos de cada grupo sobre la fecundidad de las plantas y así conocer el impacto selectivo sobre rasgos florales mediante un diseño factorial 2 x 2 con los siguientes tratamientos:

- (P-A+): Parcela cubierta con malla de gallinero (abertura de 30 mm) para permitir el libre acceso de las abejas (A) pero no de las aves (P).
- (P+A-): Parcela cerrada con mosquiteros (abertura de 1 mm). Para permitir el acceso de picaflores y no de abejas las parcelas son abiertas al atardecer y cerradas a la mañana siguiente, justo antes de llegar el sol al sitio. Este procedimiento se repitió durante varios días, correspondiendo al período de antesis de las yemas florales marcadas.
- (P-A-): Parcela completamente cerrada con mosquiteros de modo de impedir el acceso de picaflores y abejas a su interior.
- (P+A+): Parcela control con postes de apoyo, pero sin mosquitero ni alambre de gallinero. Permite el libre acceso de picaflores y abejas a las plantas.

Trabajo de campo y procedimientos de laboratorio

Se trabajó con 100 individuos escogidos al azar en cada parcela, registrándose sus coordenadas mediante el método propuesto por Dale (1999). También se registró el número de flores en un radio de 30 cm alrededor de cada planta. De cada planta se retiraron tres flores a las que se les midió la distancia antera-estigma (mm), longitud del tubo floral (mm), área de la corola (mm²) y área de la guía de néctar (mm²). Posteriormente, transcurridas dos semanas, se retiraron cápsulas de la planta para contar las semillas producidas durante los días de tratamiento. Tanto la distancia antera-estigma como la longitud del tubo floral se midieron directamente con un calíper digital (precisión de 0,01 mm), mientras que el área de la corola y el de la guía de néctar se midieron en el laboratorio a partir de fotografías tomadas en el terreno usando el programa Image J 1.47v. Las fotografías consistieron en un registro frontal y lateral a cada flor usando una regla de 10 cm como estándar. Para el conteo de las semillas producidas se utilizó un contador automático Elmor C3.

Análisis descriptivo

Una forma muy práctica de observar gráficamente datos multivariados son las caras de Chernoff (1973). Cada sistema que se quiera comparar está representado por una cara animada donde cada característica (nariz, boca, etc.) es una variable medida. Mientras más similares sean las variables entre sistemas, más similares serán los rasgos de sus respectivas caras de Chernoff.

Para evaluar si las condiciones iniciales eran similares entre los tratamientos se realizó un Análisis Multivariado de Varianza (MANOVA) (Hand y Taylor, 1987).

Autocorrelación espacial

La autocorrelación espacial en sentido amplio se define como la ausencia de aleatoriedad en la distribución de los valores que toma una variable debido a la existencia de una estructuración espacial (Iriondo y col., 2003). En otras palabras, el valor de una variable en un punto determinado se encuentra asociado al valor de la misma variable en puntos situados a una determinada distancia, de manera que conociendo el valor de una variable en un determinado lugar tenemos mucha información sobre el valor que puede tomar en un punto cercano. Los valores que adopta una variable regionalizada en un determinado rango de distancia pueden presentar autocorrelación positiva o negativa. La autocorrelación positiva indica que los puntos situados en el rango de distancia considerado presentan valores más similares que lo que cabría esperar si la variable tuviera una distribución al azar. Por el contrario, la existencia de autocorrelación negativa implica que los valores de la variable son más diferentes que lo esperado por azar.

Los datos necesarios para realizar estos tipos de análisis son la variable de estudio y las coordenadas geográficas de las unidades muestrales. En la mayor parte de las situaciones la distancia geográfica entre dos unidades muestrales i y j se calculará directamente a partir de sus coordenadas (x, y) mediante el cálculo de la distancia euclidiana (d_{ij}). Así la distancia entre $x_i y_i$ y $x_j y_j$ se calcula según la expresión:

$$d_{ij} = \sqrt{(x_i - x_j)^2 + (y_i - y_j)^2} \quad (2)$$

Para detectar autocorrelación espacial es necesario definir previamente el rango de distancias entre las unidades muestrales que van a ser objeto de análisis. Para esto se utilizará la regla de Sturge (Legendre y Legendre, 1998) según la cual el número de clases (n) a utilizar se calcula siguiendo la expresión: $n = 1 + 3,3 \log(m)$, siendo m el número de pares de puntos existentes (i.e., el número de elementos de la matriz triangular de distancias).

Para medir la autocorrelación utilizamos el coeficiente I de Moran (1950) el cual se calcula según la siguiente expresión:

$$I(d) = n \frac{\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n w_{ij}(d)(y_i - \bar{y})(y_j - \bar{y})}{W(d) \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} \quad (3)$$

donde:

n: número de unidades muestrales consideradas.

y: valor que adopta la variable en los puntos *i* y *j*, siendo en toda la expresión siempre $i \neq j$.

$w_{ij}(d)$: elemento de matriz de pesos entre los puntos *i* y *j* comprendidos dentro de la clase de distancia d.

$W(d)$: sumatoria de los valores de los elementos de la matriz de pesos $w_{ij}(d)$; se corresponde con el número de pares de puntos *i* y *j* comprendidos dentro de la clase de distancia d.

Los valores del coeficiente de Moran oscilan entre -1 y 1, de manera que los valores positivos indican la existencia de autocorrelación positiva mientras que los valores negativos la presencia de autocorrelación negativa. El valor esperado ante la ausencia de autocorrelación espacial es cercano a cero.

Como podemos calcular el coeficiente I para cada intervalo de distancia, se representan gráficamente los valores I en relación a la distancia mediante correlogramas. Para evaluar la autocorrelación multivariada se usa la prueba de Mantel (1967), la que estima el grado de correlación existente entre dos matrices, X e Y . La hipótesis de nulidad postula que las distancias/similitudes entre las variables de la matriz respuesta Y no están linealmente correlacionadas con las correspondientes distancias/similitudes en la matriz modelo X . Se trata, por tanto, de evaluar si la asociación (positiva o negativa) es más robusta que lo que cabría esperar por azar. El estadístico del test de Mantel (Z_M) se calcula mediante la suma de los productos cruzados de los valores de las dos matrices de similitud/distancia, excluyendo la diagonal principal que sólo contiene valores triviales (0 en el caso de las matrices de distancias y 1 en el caso de las matrices de similitudes):

$$Z_M = \sum_{i,j} X_{ij}Y_{ij} \quad (5)$$

donde X_{ij} Y_{ij} son los elementos de las matrices X e Y , respectivamente. Para contrastar la hipótesis de nulidad con el estadístico Z_M , se utiliza un test de permutaciones, en el que los elementos de una matriz se reordenan al azar. Se permutan los elementos de una de las matrices al azar y se calcula cada vez el valor de Z . Así, de la distribución de valores Z obtenidos al azar podemos evaluar cuál es la probabilidad de obtener el valor Z observado.

Modelos de selección fenotípica

Una de las maneras más frecuentes de cuantificar la selección es a través del diferencial de selección (Falconer, 1981). Este coeficiente estima la fuerza total de la selección actuando sobre el rasgo i , y puede ser calculado como la covarianza entre el rasgo z_i y el *fitness* relativo (w):

$$S_i = COV(z_i, w) \quad (6)$$

El *fitness* relativo es estimado mediante el cociente entre el número de semillas recolectado en cada planta y la media de semillas por tratamiento.

Muchas veces la selección que se presume actúa sobre algún rasgo es un efecto incidental de la selección natural actuando sobre un segundo rasgo, el cual posee una correlación genética con el primero. Este fenómeno se denomina selección sobre caracteres correlacionados. Lande y Arnold (1983) resolvieron en parte ese inconveniente mediante el método de regresión múltiple que permite controlar por la selección sobre rasgos correlacionados y que al mismo tiempo facilita las estimaciones de selección en períodos de tiempo intrageneracionales. La contribución directa de la selección direccional sobre cada rasgo i puede ser estimada mediante:

$$w = \alpha + \sum_{i=1}^n \beta_i z_i + \varepsilon \quad (7)$$

donde α es una constante, β_i representa la pendiente promedio de la superficie de selección en el plano del rasgo z_i y ε es un término de error. A través de esta ecuación se estima la fuerza de la selección direccional sobre el fenotipo i .

El impacto de variables ambientales en los análisis estadísticos utilizados para medir selección y el sesgo que estas pudiesen provocar en las estimaciones es algo que hace un tiempo es tomado en cuenta en los estudios de biólogos evolutivos (Rausher, 1992). Una de las maneras de afrontar este problema es incluir la contribución del espacio como variable en el contexto de selección multivariada en un modelo GAMM (General Additive Mixed Model) usando las coordenadas de cada planta (Dormann y col., 2007) como función de suavizado, de modo que el modelo quedaría de la siguiente manera:

Modelo del Nivel 1 (Flores)

$$Semilla_{ij} = \pi_{0j} + \pi_{1j}Largo_tubo_{ij} + \pi_{2j}Área_guía_{ij} + \pi_{3j}Área_corola_{ij} \\ + \pi_{4j}Distancia_AE_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

donde

$$\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma_{ent:flores}^2)$$

Modelo del Nivel 2 (Plantas)

$$\pi_{pj} = \beta_{p0} + \beta_1Flores_j + S(x, y)_j + r_{pj}$$

donde

$$r_{pj} \sim N(0, T_{ent:plantas})$$

Donde:

Semilla_{ij} es el número de semillas obtenidas de cada cápsula *i* de la planta *j*.

Largo_tubo_{ij} es la medida del largo floral para cada flor *i* de la planta *j*.

Área_guía_{ij} es el área de la guía de néctar medida a través fotos obtenidas para cada flor i de la planta j .

Área_corola_{ij} es el área de la corola medida a través fotos obtenidas para cada flor i de la planta j .

Distancia_AE_{ij} es la distancia antera-estigma para cada flor i de la planta j .

Flores_j es el número de flores en un radio de 30 cm para cada planta j .

$S(x,y)$ es el componente espacial de coordenada x,y que opera como una función no lineal.

De esta manera es posible obtener los coeficientes de selección corregidos espacialmente, además de examinar la influencia de la estructura espacial sobre los resultados. La visualización de la autocorrelación de los residuales de cada modelo se efectuó mediante los correlogramas de los índices I de Moran. En el caso de existir autocorrelacion, distintas estructuras de correlación en los residuales fueron probadas (Zuur y col., 2009).

RESULTADOS

Análisis descriptivo

El resumen de las medidas de cada uno de los rasgos para los distintos tratamientos se observa en la Tabla 1, mientras que una versión gráfica se puede apreciar mediante las Caras de Shernoff en la Figura 2. El MANOVA mostró diferencias entre los distintos ensambles ($W=0,25$; $F_{(15,1096.3)}=47,2$; $p<0,001$). De esto se desprende que las características iniciales de las plantas y flores no serían homogéneas entre los cuatro tratamientos.

Tabla I. Medias \pm DE de los distintos rasgos medidos para cada uno de los ensambles de polinizadores (N=300 por parcela).

| <i>Rasgo</i> | Parcela | | | |
|-------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | P+A+ | P-A+ | P+A- | P-A- |
| Número de flores (#) | 9,26 (\pm 3,66) | 10,25 (\pm 2,96) | 12,99 (\pm 4,00) | 9,10 (\pm 3,10) |
| Distancia antera-estigma (mm) | 4,00 (\pm 1,55) | 3,14 (\pm 1,87) | 4,29 (\pm 1,30) | 3,21 (\pm 1,84) |
| Largo tubo (mm) | 35,77 (\pm 3,12) | 32,71 (\pm 2,98) | 34,63 (\pm 2,89) | 33,36 (\pm 2,92) |
| Área corola (mm ²) | 892,22 (\pm 238,81) | 814,13 (\pm 297,28) | 912,97 (\pm 282,77) | 968,25 (\pm 334,49) |
| Área guía néctar (mm ²) | 61,87 (\pm 21,98) | 35,09 (\pm 18,18) | 84,11 (\pm 32,31) | 45,98 (\pm 19,31) |

Un histograma del número de semillas recolectadas para cada ensamble de polinizadores se puede observar en la Figura 3. Aquí se aprecia claramente como en los ensambles P+A+ (picaflores y abejas; media \pm DE de 469,7 \pm 351,5 semillas) y P-A+ (sólo abejas, 382,7 \pm 349,1 semillas) el número de semillas recolectado es mucho mayor que en el ensamble P+A- (sólo picaflores; 47,1 \pm 132,7 semillas) y P-A- (autopolinización; 16,5 \pm 73,3 semillas).

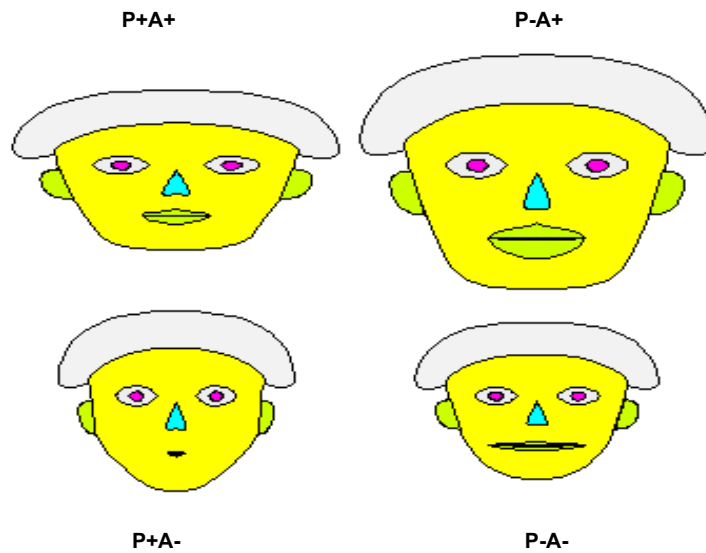


Figura 2. Representación gráfica de las medias de los distintos rasgos medidos para cada uno de los ensambles de polinizadores. (Altura cara: número flores; ancho cara: distancia antera-estigma; estructura cara: largo tubo floral; altura boca: área guía néctar; largo boca: área corola)

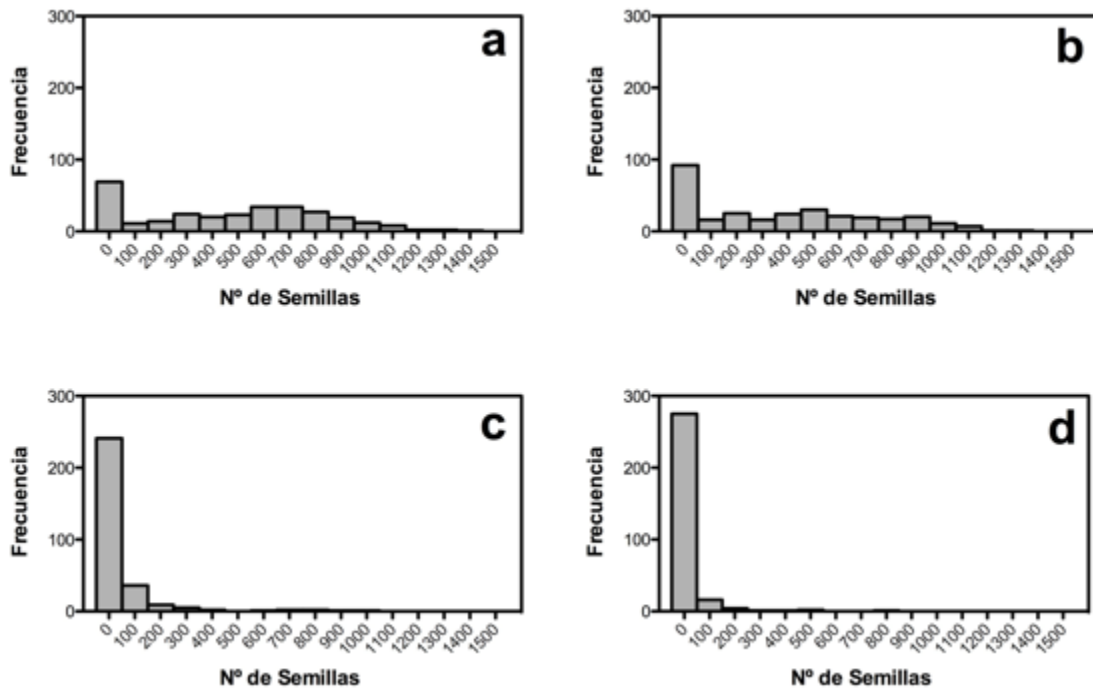


Figura 3. Histograma del número de semillas para cada ensamble de polinizadores. Donde a) P+A+; b) P-A+, c) P+A-; d) P-A-. N=300 cápsulas por tratamiento.

Las exclusiones de abejas (P+A-) y de ambos polinizadores (P-A-) incluyeron bastantes cápsulas en las que no había semillas. Esto sugiere que las abejas serían un agente polinizador más importante que los picaflones en este sistema. Además, si comparamos el número de semillas en los tratamientos control (P+A+) con el de autopolinización (P-A-) se corroboran investigaciones previas que indican que la producción de semillas es mayor al haber polinización cruzada que por autopolinización ($t_{(324.95)} = 21.86$, $p < 0,001$) (Medel y col., 2003).

Las Figura 4a y 4b muestran las correlaciones entre los rasgos en cada tratamiento así como la de cada rasgo con el número de semillas. En general no se observaron correlaciones altas ($>0,5$) entre los rasgos, con la excepción de la relación entre el área de la guía y el área de la corola en la mayor parte de los tratamientos y una relación positiva entre el largo del tubo floral y el área de la guía de néctar en el tratamiento P-A+ (sólo abejas). Es decir, flores más grandes tendrían guías más grandes.

Al momento de analizar la correlación entre los rasgos y el número de semillas, no se observaron correlaciones muy claras, lo que en principio sugiere una baja probabilidad de detectar selección fenotípica.

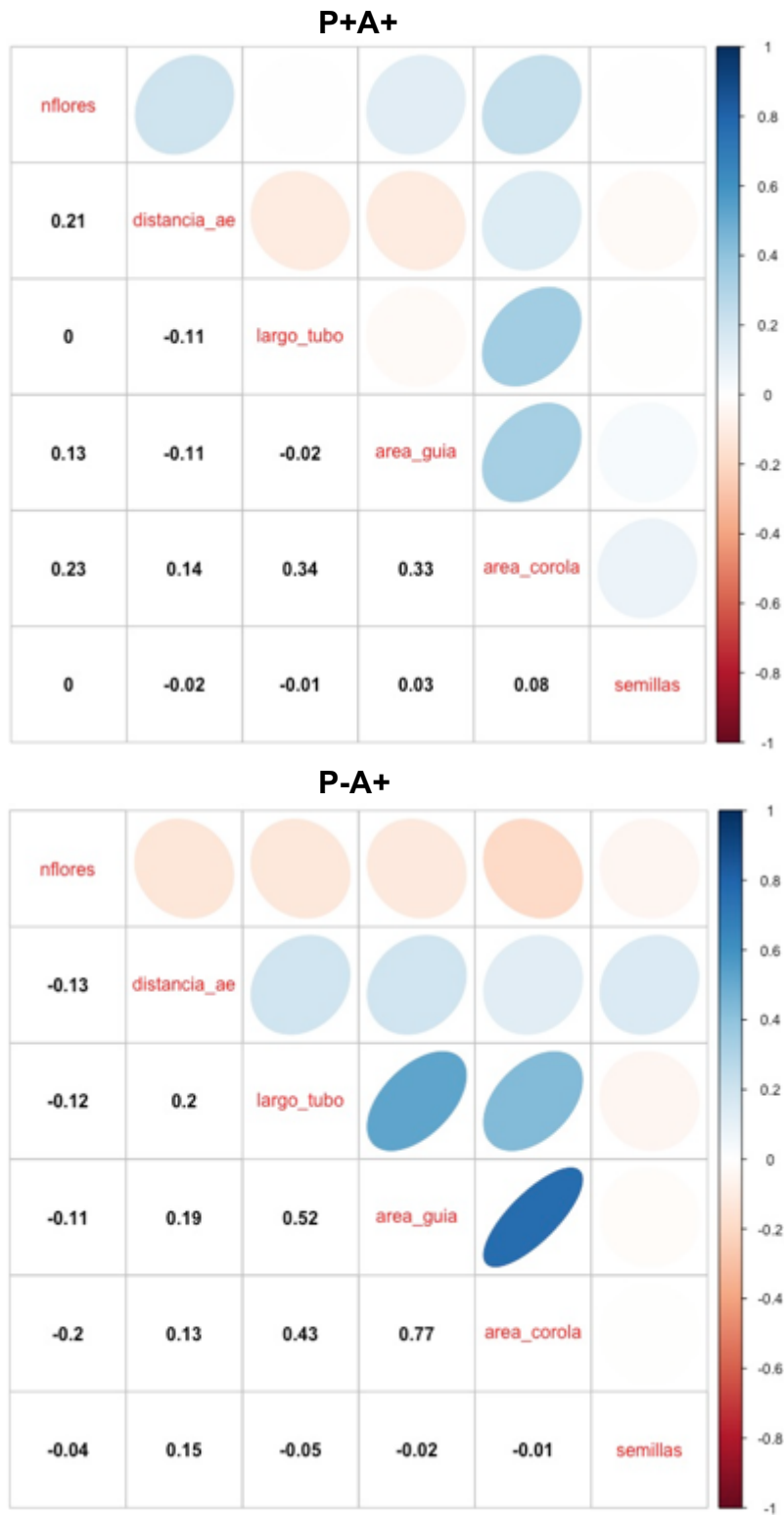


Figura 4a. Correlaciones entre rasgos para tratamientos P+A+ (panel superior) y P-A+ (panel inferior). N=300 por tratamiento.

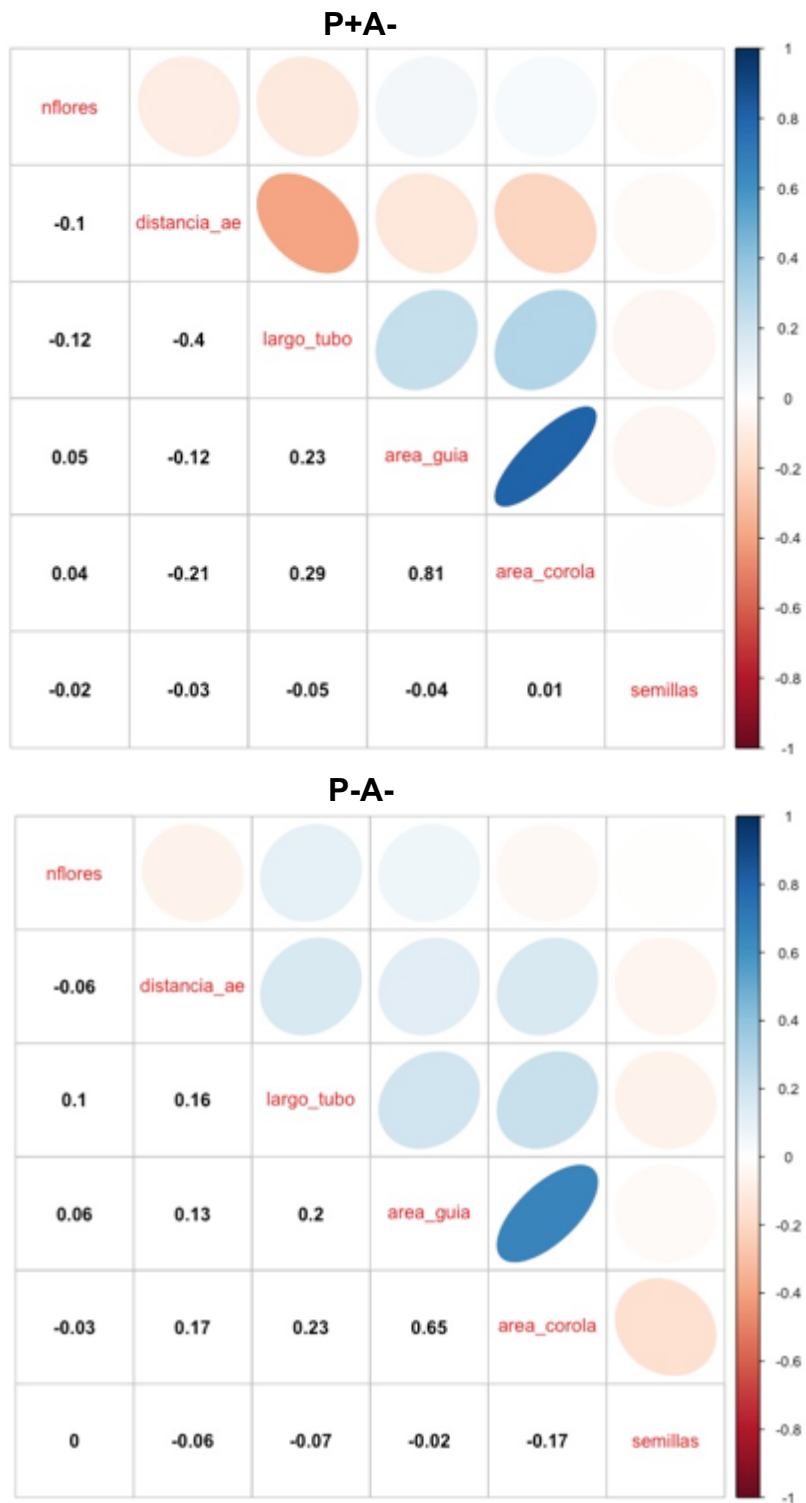


Figura 4b. Correlaciones entre rasgos para tratamientos P+A- (panel superior) y P-A- (panel inferior). N=300 por tratamiento.

Autocorrelación espacial

Para medir la autocorrelación espacial en los distintos rasgos de *Erythranthe lutea* se realizaron correlogramas de Moran en cada tratamiento con 13 clases de distancia siguiendo la regla de Sturge. Los correlogramas son indicados en las Figuras 5-8. Sólo se muestran las primeras nueve clases de distancia, ya que interesa la interpretación a distancias cercanas.

Como era esperable, en general se encontró autocorrelación positiva en las primeras clases de distancia para todos los rasgos en cada tratamiento, con la excepción de distancia antera-estigma en la exclusión de picaflores (P-A+) y número de flores junto a largo del tubo floral en la parcela de autopolinización (P-A-). Esto significa que las plantas más cercanas tienen rasgos florales más similares entre ellas que las esperables por azar.

Esto se repite a nivel multivariado como se observa en los correlogramas de Mantel (Figura 9), donde se encontró autocorrelación positiva para el conjunto de rasgos en todos los tratamientos menos en el libre de abejas (P+A-), aunque en distintas clases de distancias (P+A+: 3,92 m; P-A+: 2,17 m; P-A-: 3,78 m).

Por último, al evaluar la autocorrelación a nivel de *fitness* (Figura 10), sólo se encontró autocorrelación positiva en la primera clase de distancia del ensamble control (P+A+), lo que daría a entender que el espacio no tendría mucha influencia sobre el sistema en estudio, pues la autocorrelación en rasgos no se vería reflejado en una autocorrelación en la variable respuesta, en este caso, el número de semillas.

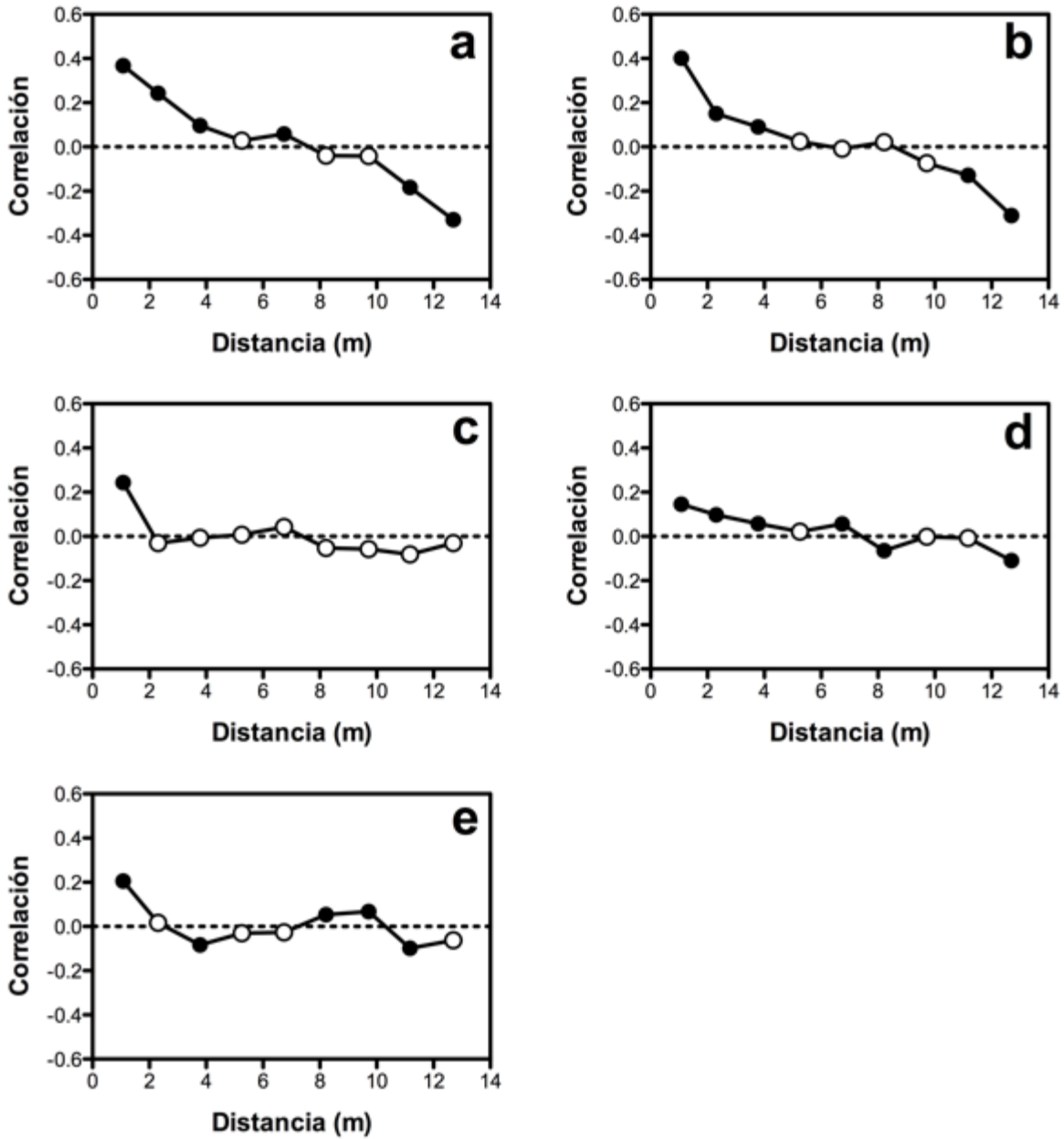


Figura 5. Correlogramas de Moran para cada rasgo en ensamble control (P+A+). Donde a) número de flores; b) distancia antera-estigma; c) largo tubo floral; d) área corola; e) área guía néctar. Círculos negros (●) indican valores significativos ($p < 0,05$). N=100.

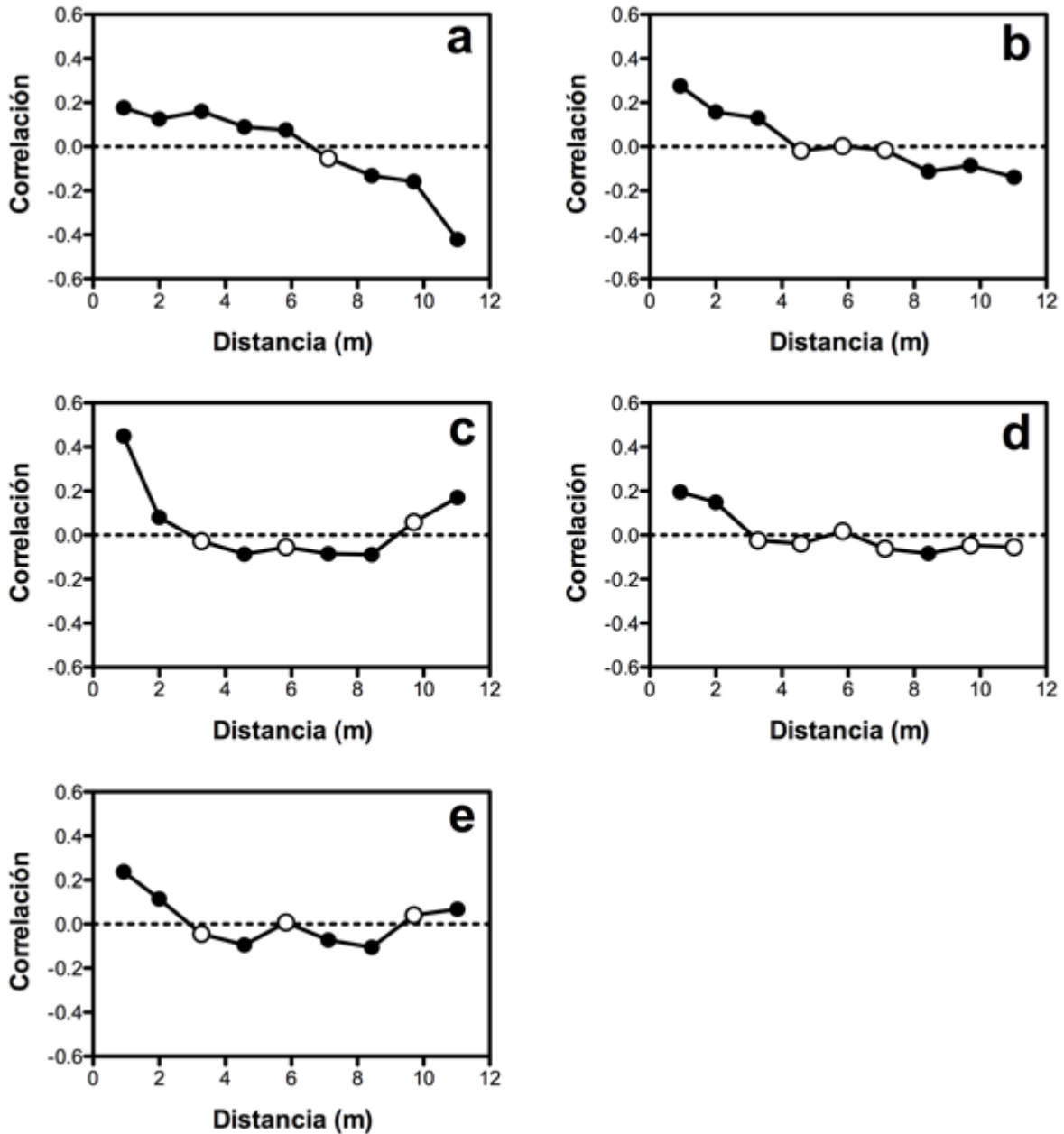


Figura 6. Correlogramas de Moran para cada rasgo en ensamble abejas (P-A+). Donde a) número de flores; b) distancia antera-estigma; c) largo tubo floral; d) área corola; e) área guía néctar. Círculos negros (●) indican valores significativos ($p < 0,05$). $N=100$.

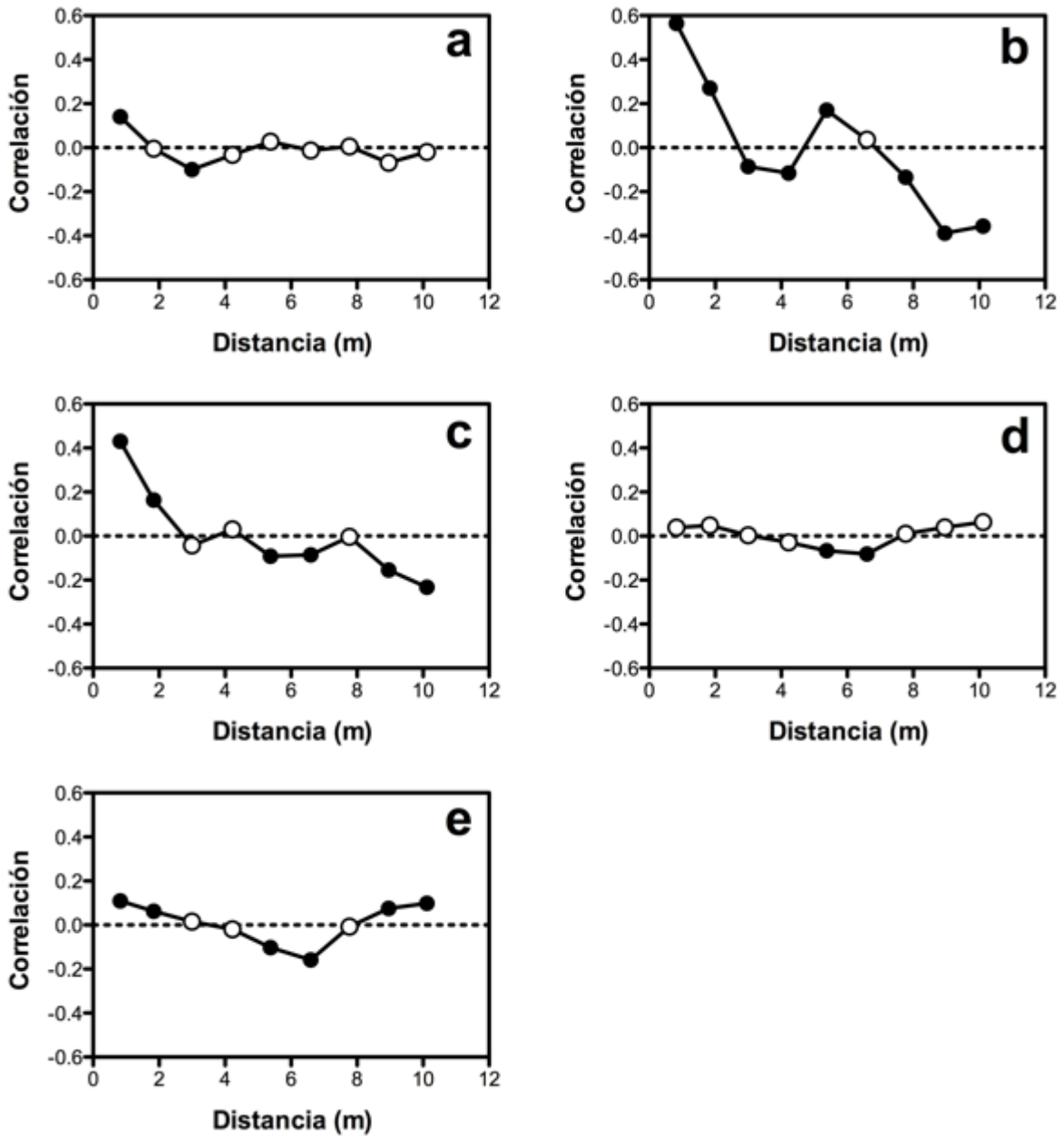


Figura 7. Correlogramas de Moran para cada rasgo en ensamble de picaflores (P+A-). Donde a) número de flores; b) distancia antera-estigma; c) largo tubo floral; d) área corola; e) área guía néctar. Círculos negros (●) indican valores significativos ($p < 0,05$). $N=100$.

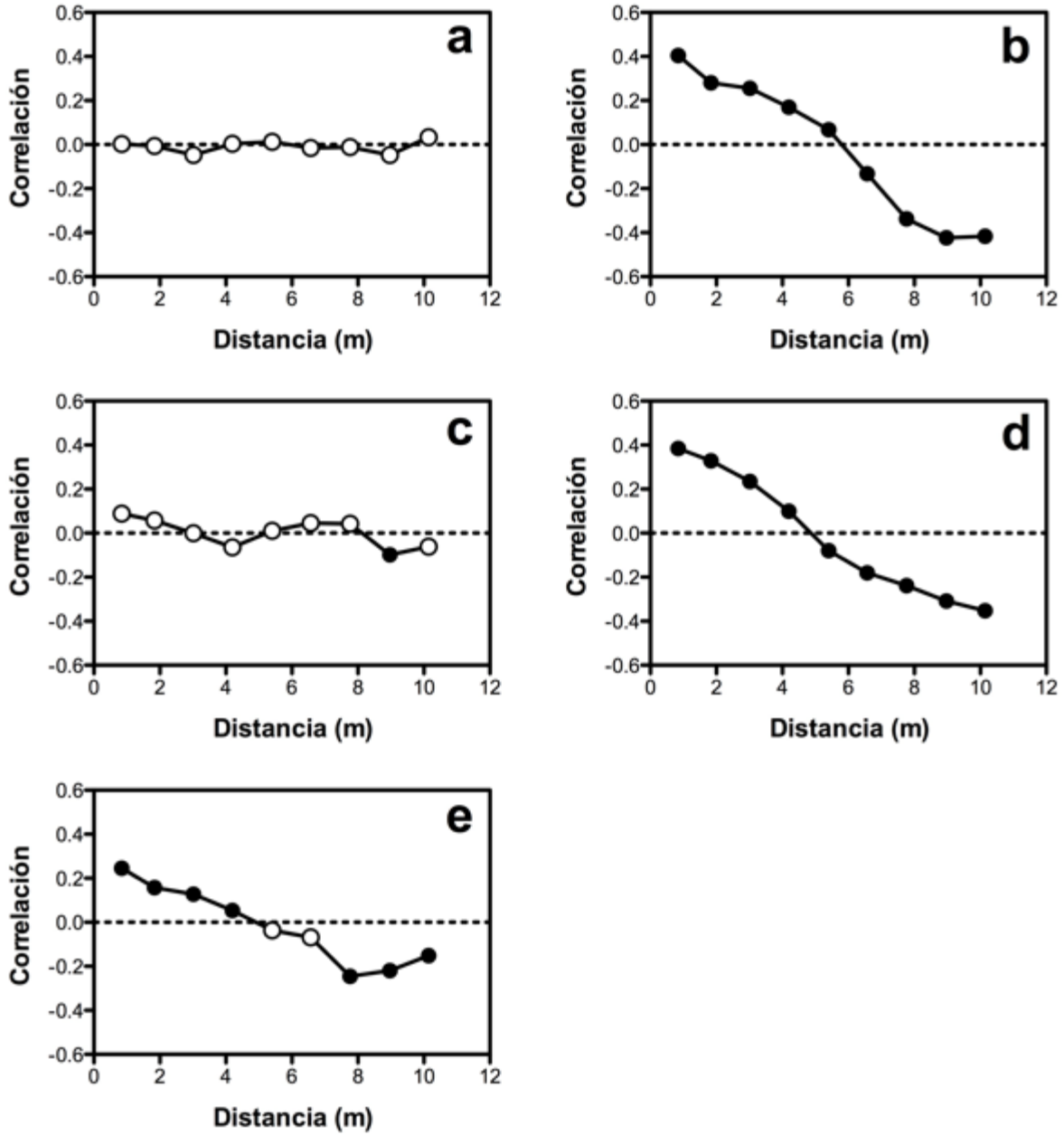


Figura 8. Correlogramas de Moran para cada rasgo en parcela de autopolinización (P-A-). Donde a) número de flores; b) distancia antera-estigma; c) largo tubo floral; d) área corola; e) área guía néctar. Círculos negros (●) indican valores significativos ($p < 0,05$). $N=100$.

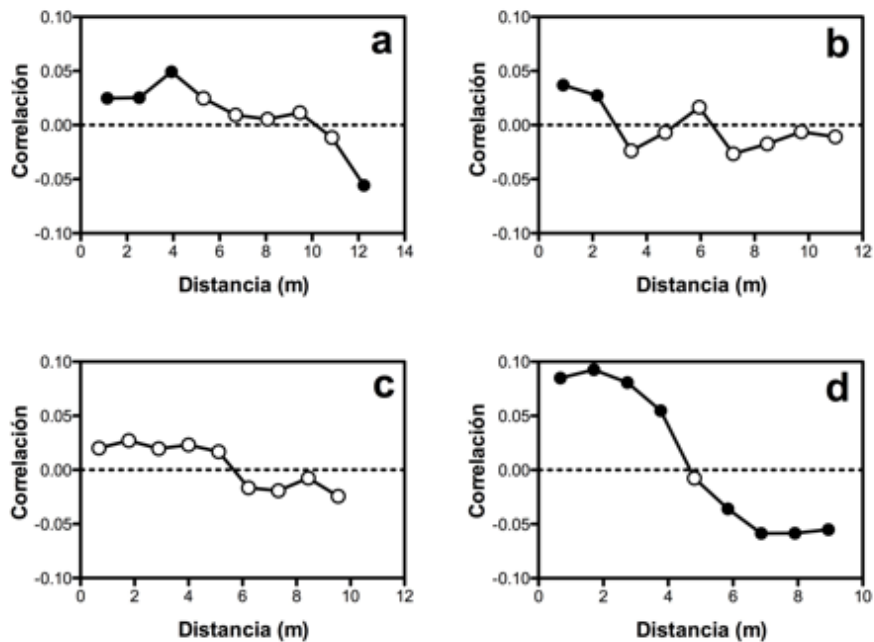


Figura 9. Correlogramas de Mantel de los rasgos medidos para cada ensamble de polinizadores. Donde a) P+A+; b) P-A+; c) P+A-; d) P-A-. Círculos negros (●) indican valores significativos ($p < 0,05$).

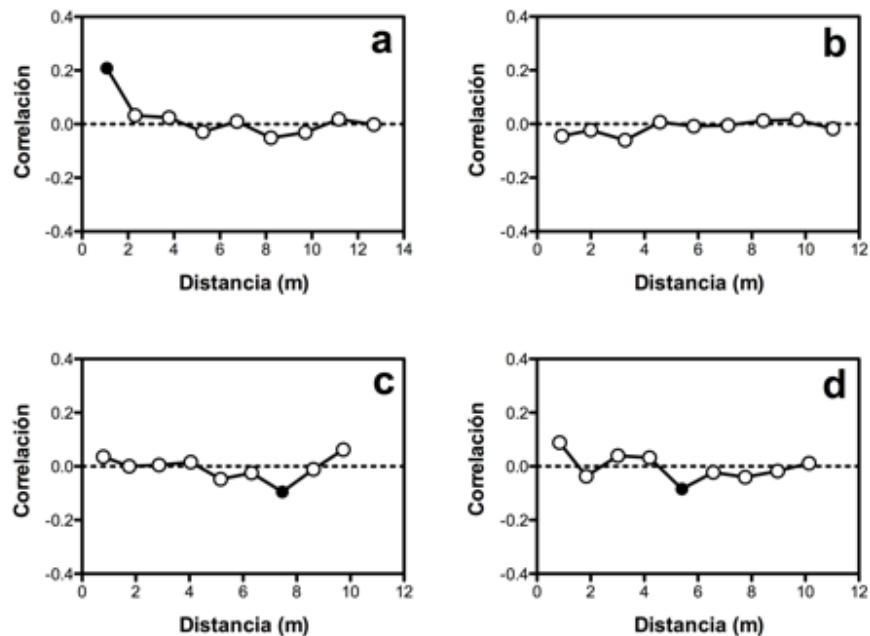


Figura 10. Correlogramas de Moran para *fitness* (número de semillas) en cada uno de los ensambles de polinizadores. Donde a) P+A+; b) P-A+; c) P+A-; d) P-A-. Círculos negros (●) indican valores significativos ($p < 0,05$).

Selección fenotípica

Luego de los análisis descriptivos se procedió a realizar los análisis de selección fenotípica. Debido a la naturaleza anidada de los datos (3 flores por cada planta), se trabajó con modelos mixtos (GAMM) de intercepto aleatorio, modelo que ajustó mejor a la naturaleza de los datos. Para los tratamientos control (P+A+) y exclusión de picaflores (P-A+), se trabajó con una distribución de los errores Gaussiana, mientras que para los tratamientos de exclusión de abejas (P+A-) y de autopolinización se trabajó con una distribución de los errores Binomial negativa debido a la alta cantidad de ceros observados. Al no provenir de fuentes diferentes (pues sólo hay una baja media del número semillas y no un impedimento para polinizar que evite la producción de éstas), no es correcto tratar estos datos con modelos de ceros inflados, opción que se evaluó, pero se deshechó por las razones dichas anteriormente. Además, en estos casos la distribución Binomial negativa en los errores tiende a tener el mejor ajuste (Yang y col., 2017).

En la Tabla II se presentan los diferenciales (S) representando la selección total (directa e indirecta) sobre los rasgos, y gradientes (β) representando la selección directa sobre los rasgos, para cada tratamiento en ausencia y presencia del componente espacial como función de suavizado. Todos los coeficientes de selección están estandarizados con media 0 y varianza 1. Como no existió autocorrelación en los residuales de los modelos no fue necesario evaluar distintas estructuras aleatorias en los errores (Figura 11).

Para este sistema son pocos los rasgos que presentan selección de los polinizadores, siendo sólo tres diferenciales (S) de selección significativos:

distancias antera-estigma más grandes en la parcela de exclusión de picaflores (P-A+) ($S=0,162$; $p=0,003$), corolas más pequeñas ($S=-0,921$; $p=0,016$) y tubos florales más cortos ($\beta=-0,921$; $p=0,041$) en la parcela con remoción de ambos polinizadores (P-A-)

Al momento de evaluar la selección directa (multivariada) es importante destacar que la magnitud tanto de los diferenciales (selección directa + indirecta) como los gradientes (selección directa), sólo son comparables entre los obtenidos en los tratamientos control (P+A+) con el tratamiento sin picaflores (P-A+), y entre los obtenidos en los tratamientos sin abejas (P+A-) con el tratamiento sin polinizadores (P-A-) pues poseen funciones link diferentes (al utilizar distribuciones de errores Gaussiana y Binomial negativo, respectivamente). Independiente de esto, la significancia se interpreta de manera similar, donde gradientes positivos representarían selección direccional positiva, mientras que gradientes negativos selección direccional negativa.

En el ensamble sin picaflores (P-A+) se favorecen distancias antera-estigma más grandes ($\beta=0,172$; $p=0,002$), mientras que se observa una selección hacia una menor distancia antera-estigma ($\beta=-0,313$; $p=0,019$) en el tratamiento sin abejas (P+A-), esto sugiere que picaflores y abejas ejercen fuerzas de selección opuestas sobre la distancia antera-estigma.

También se favorecería tubos florales más pequeños ($\beta=-0,264$; $p=0,032$) en el ensamble con exclusión de abejas (P+A-), guías de néctar más grandes ($\beta=0,781$;

$p=0,043$) y corolas más pequeñas ($\beta=-1,507$; $p=0,004$) en la parcela sin polinizadores presentes (P-A-).

Como se pudo desprender de la Figura 10, el espacio no pareciera influir demasiado en los gradientes de selección, aunque se observa que en la parcela sin picaflores (P-A+) el gradiente de distancia antera-estigma ya no sería significativamente distinto de cero al agregar el componente espacial.

A pesar del bajo impacto que tuvo el espacio sobre los gradientes de selección, en el tratamiento control (P+A+) el componente espacial fue significativo (Tabla III), siendo, junto al modelo del tratamiento de autopolinización (P-A-), los únicos modelos que tienen mejor ajuste al usar la función de suavizado. Esto representaría la influencia directa de la distribución espacial de las plantas sobre su *fitness* mas que del impacto de esta sobre los gradientes de selección en los diversos rasgos florales.

Tabla II. Diferenciales y gradientes de selección para los distintos rasgos de *Erythranthe lutea* en cada uno de los ensambles de polinizadores. P+A+: Picaflores y abejas; P-A+: Sólo abejas; P+A-: Sólo picaflores; P-A-: Ningún polinizador. N=300 por tratamiento.

| Plot | Rago i | $S_i' \pm EE$ | No Espacial $\beta_i' \pm EE$ | Espacial $\beta_i' \pm EE$ |
|-------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| P+A+ | | | | |
| | Número de flores | - 0,002 ± 0,043 | - 0,005 ± 0,050 | - 0,084 ± 0,053 |
| | Distancia antera-estigma | - 0,027 ± 0,044 | - 0,035 ± 0,047 | - 0,064 ± 0,047 |
| | Largo tubo floral | - 0,002 ± 0,044 | - 0,026 ± 0,049 | - 0,004 ± 0,048 |
| | Área corola | 0,047 ± 0,044 | 0,058 ± 0,053 | 0,020 ± 0,053 |
| | Área guía néctar | 0,033 ± 0,044 | 0,006 ± 0,049 | - 0,002 ± 0,048 |
| P-A+ | | | | |
| | Número de flores | - 0,037 ± 0,060 | - 0,024 ± 0,062 | - 0,057 ± 0,068 |
| | Distancia antera-estigma | 0,162 ± 0,053** | 0,172 ± 0,054** | 0,183 ± 0,056** |
| | Largo tubo floral | - 0,048 ± 0,056 | - 0,055 ± 0,064 | - 0,050 ± 0,064 |
| | Área corola | - 0,027 ± 0,054 | 0,011 ± 0,083 | 0,022 ± 0,083 |
| | Área guía néctar | - 0,038 ± 0,056 | - 0,050 ± 0,088 | - 0,055 ± 0,088 |
| P+A- | | | | |
| | Número de flores | - 0,041 ± 0,139 | - 0,018 ± 0,141 | 0,023 ± 0,140 |
| | Distancia antera-estigma | - 0,195 ± 0,121 | - 0,313 ± 0,132* | - 0,218 ± 0,143 |
| | Largo tubo floral | - 0,127 ± 0,111 | - 0,264 ± 0,122* | - 0,275 ± 0,124* |
| | Área corola | 0,018 ± 0,111 | 0,187 ± 0,183 | 0,209 ± 0,184 |
| | Área guía néctar | - 0,053 ± 0,113 | - 0,201 ± 0,182 | - 0,166 ± 0,185 |
| P-A- | | | | |
| | Número de flores | - 0,014 ± 0,251 | - 0,189 ± 0,304 | 0,033 ± 0,311 |
| | Distancia antera-estigma | - 0,148 ± 0,106 | - 0,216 ± 0,268 | - 0,071 ± 0,105 |
| | Largo tubo floral | - 0,271 ± 0,132* | - 0,138 ± 0,328 | - 0,253 ± 0,143 |
| | Área corola | - 0,921 ± 0,381* | - 1,507 ± 0,517** | - 0,988 ± 0,201*** |
| | Área guía néctar | 0,056 ± 0,101 | 0,781 ± 0,384* | 0,878 ± 0,174*** |

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

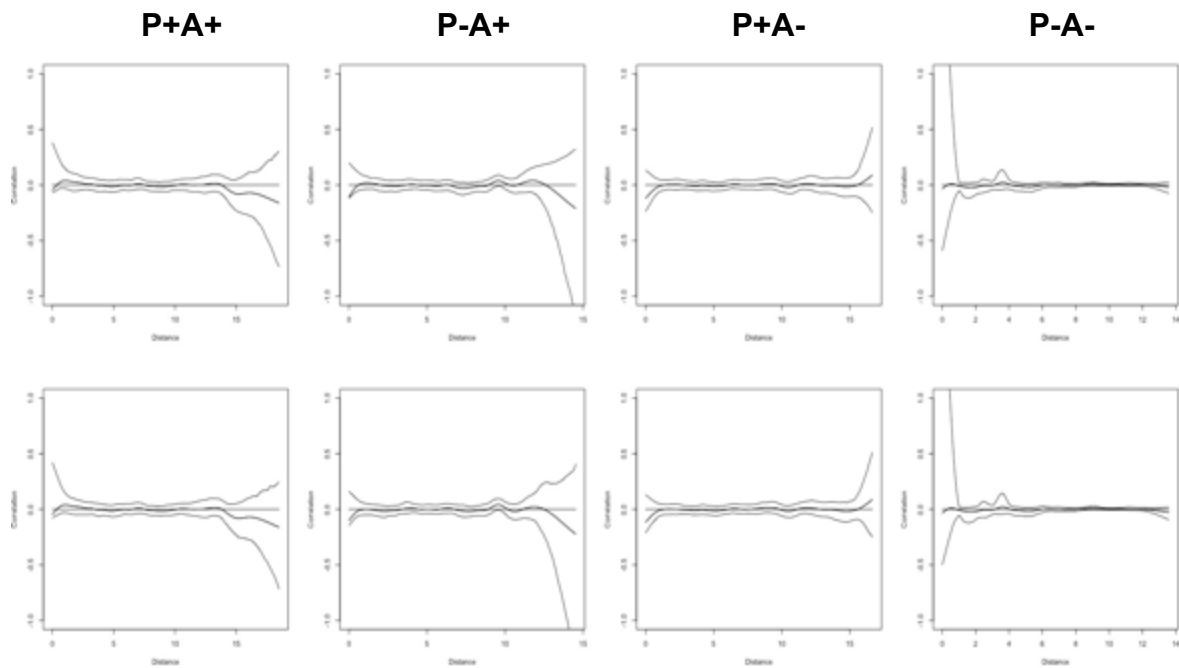


Figura 11. Correlogramas *spline* de residuales para cada ensamble de polinizadores, en ausencia (arriba) y presencia (abajo) del componente espacial.

Tabla III. AIC y significancia del componente espacial para cada uno de los modelos. P+A+: Picaflores y abejas; P-A+: Sólo abejas; P+A-: Sólo picaflores; P-A-: Ningún polinizador.

| Modelo | Plot | | | |
|-----------------------------------|------------------|--------|---------|---------|
| | P+A+ | P-A+ | P+A- | P-A- |
| AIC Modelo no espacial | 685,89 | 793,85 | 1238,97 | 1691,37 |
| AIC Modelo espacial | 680,01 | 798,41 | 1245,70 | 1710,14 |
| Significancia componente espacial | p<0,01 | p=0,49 | p=0,23 | p=0,06 |

DISCUSIÓN

Rasgos florales

Los rasgos medidos están dentro del rango previamente descrito para esta especie (Medel y col., 2007), aunque llama la atención las corolas particularmente grandes, sobretodo en los tratamientos sin abejas (P+A-) y de autopolinización (P-A-), y el tamaño de la guía de néctar en el tratamiento sin abejas (P+A-) que fue bastante mayor a lo descrito.

Los rasgos medidos al iniciar el experimento en los cuatro tratamientos diferían entre ellos. Esto puede confirmarse en la Tabla I y con las notorias diferencias que se ven en las caras de Chernoff. El área de la guía de néctar fue un rasgo particularmente variable, incluso llegando a duplicar su valor entre parcelas. Debido a las diferencias iniciales de los rasgos en cada exclusión y tomando en cuenta que las coordenadas se tomaron por separado en cada parcela, cada parcela se trató como un experimento independiente.

Lo óptimo para diseñar este estudio hubiera sido aplicar los distintos tratamientos aleatoriamente entre las 400 plantas y tomar las coordenadas de cada una de ellas para poder aplicar un modelo y no cuatro distintos, pero este diseño era inviable en la situación natural.

Llama la atención que la producción de semillas en la exclusión de picaflores (P-A+) es bastante baja, muy cercana a la de autopolinización. Esto se debería a que por primera vez desde que se estudia este sistema se registró la presencia del esfíngido *Hyles annei* visitando *E. lutea*, posiblemente debido a que fue un año de El Niño. A

pesar que la especie tuvo una tasa de visita mayor a la de cualquier otro polinizador en el sitio, tuvo una efectividad de polinización muy baja (Medel y col., 2018), lo que se puede deber al hecho que su trompa excede la longitud del tubo floral de *E. lutea*, comportándose como ladrón de néctar mas que como legítimo polinizador. Como la actividad de *H. annei* ocurre en los mismos horarios que el picaflor *O. leucopleurus*, la baja actividad de los picaflores sobre *E. lutea* es entendible si las flores ya se encuentran vaciadas de néctar, forzando un desplazamiento de *O. leucopleurus* hacia otras especies disponibles en el sitio de estudio (e.g., *Mutisia*). Esto explicaría la baja tasa de visitas que se registró el año 2016 del picaflor sobre *E. lutea* en comparación a otros años (Medel y col., 2018).

Esta circunstancia implica que el objetivo inicialmente propuesto de comparar el efecto del espacio entre parcelas experimentales con distintas combinaciones de abejas y picaflores no pueda cumplirse a cabalidad, ya que *O. leucopleurus* practicamente no actuó como polinizador de *E. lutea* en el año 2016. A pesar de esto, al compartir hábitos de polinización y debido a una similitud en tamaño corporal, la parcelas con exclusión de picaflores actuaron en la práctica como parcelas de exclusión de *H. annei*, la que se verificó que no ingresaba en las parcelas (P-A+) y (P-A-) e ingresaba a las (P+A-) y (P+A+). Por lo anterior, se podría considerar estos resultados compatibles con un estudio de selección fenotípica de *H. annei* sobre *E. lutea* y la influencia del espacio sobre sus respectivos coeficientes de selección. Independiente de lo anterior, se corroboran previas investigaciones que indican que la producción de semillas es mayor al haber polinización cruzada que por autopolinización (Medel y col., 2003; Carvallo y Medel, 2010).

Autocorrelación espacial

Como era esperable se encontró autocorrelación positiva en prácticamente todos los rasgos medidos en cada tratamiento, es decir, los rasgos son más similares entre si a distancias más cortas de lo que cabría esperar por azar, lo que se condice con estudios anteriores (Diniz-Filho y col., 2003), aunque la distancia a la cual ocurre la autocorrelación fue variable entre rasgos y entre los tratamientos. Esta heterogeneidad es evidente al revisar los correlogramas de Mantel (Figura 10), donde se observa que la distancia requerida para asegurar independencia espacial de las plantas varía según cada exclusión. Por ejemplo, en la situación de coexistencia entre picaflores y abejas la distancia mínima entre plantas es de 3,92 m en el control, 3,78 m en la parcela sin polinizadores, y 2,17 m en la sin picaflores, valores cercanos a los obtenidos anteriormente para este sistema (3,79 m; Ferrer y Medel, datos no publicados).

Es importante señalar que la correlación entre rasgos puede ser un problema estadístico cuando se traduce en autocorrelación espacial en el *fitness* y autocorrelación a nivel de residuales, ya que significa una violación directa del criterio de independencia de los organismos, sesgando los análisis de selección fenotípica. Como en este caso no se observó autocorrelación en el número de semillas, exceptuando la primera clase de distancia en el tratamiento control, la autocorrelación de los residuales en los modelos examinados de selección fenotípica fue despreciable (Figura 11, Tabla III).

Selección fenotípica

Al evaluar los diferenciales de selección, sólo dos rasgos recibieron selección total (directa + indirecta) en este sistema durante 2016. Las abejas promovieron flores con mayores distancias antera-estigma, sin embargo, esto antagoniza con el gradiente negativo (selección directa) para este rasgo en la exclusión dominada por *Hyles annei*, donde se favorecería la autopolinización por el robo de néctar que estas realizan.

La distancia antera-estigma es un rasgo que suele estar sometido a selección en plantas hermafroditas, pues podría afectar la cantidad de polen depositado por autopolinización influyendo así en la cantidad y calidad de polen disponible para la fertilización del óvulo (Holtsford y Ellstrand, 1992; Kulbaba y Worley, 2012). En el caso particular de este estudio se aprecia como existiría una selección positiva sobre este rasgo. Es decir, distancias mayores entre las estructuras femenina y masculina estarían siendo favorecidas por las abejas mientras que distancias menores se verían favorecidas en la presencia de *Hyles*.

La ausencia de selección sobre la distancia antera-estigma en el tratamiento control, con ambos polinizadores presentes, se puede relacionar con estudios previos donde se ha encontrado selección favoreciendo la variación intra-individuo de este rasgo pero no en la media (Arceo-Gómez y col., 2017). La explicación de este fenómeno vendría dada por la presencia de distintos ensambles de polinizadores actuando sobre una misma especie, como es el caso de *E. lutea*, ya que la ganancia en *fitness* obtenida por la especialización en general tiene que superar la pérdida

de *fitness* que provocaría desadaptarse a otros polinizadores (Waser y col., 1996). Sin embargo, hay evidencia que sugiere que el abejorro invasor *Bombus terrestris* se ha convertido en el polinizador más importante de este sistema, y esto se vería reflejado en la selección de los rasgos de *E. lutea* que favorecerían las visitas de este abejorro (Medel y col., 2018).

El gradiente de selección negativo sobre la distancia antera-estigma en el tratamiento con exclusión de abejas (P+A-) se explicaría por el bajo nivel de polinización y alto nivel de robo de néctar de *H. annei*. Esto provocaría que los rasgos que favorecen la autopolinización serían promovidos y bajas distancias antera-estigma es uno de ellos.

Algo similar ocurriría con la selección hacia tubos florales más cortos en el tratamiento sin abejas (P+A-) y de corolas más pequeñas en el de autopolinización (P-A-), donde, al verse favorecida la autopolinización, las flores que gastan menos energía en corolas y tubos grandes producirían más semillas. Llama la atención la selección de guías de néctar en esta exclusión, pero hay que tener en cuenta que la interpretación es difícil debido a la gran cantidad de cápsulas sin semillas. Aún así, pareciera haber una tendencia a que se favorezcan flores más pequeñas.

Tomando en cuenta lo anterior, a pesar de estar en presencia de dos grupos de polinizadores, en realidad sólo las abejas estarían actuando como tal y su efecto selectivo estaría siendo amortiguado por el robo de néctar de los esfíngidos.

Espacio en selección fenotípica

Como se pudo desprender de los análisis de autocorrelación, tanto en el número de semillas como en el de residuales, el espacio no jugaría un papel muy importante en la selección de rasgos fenotípicos en este sistema, aunque sí podría ser importante en su efecto directo sobre el *fitness*, como se observa en el tratamiento control, único tratamiento donde el componente espacial fue significativo. Factores relacionados con heterogeneidad microambiental podrían ser los responsables de esto (i.e., cercanía a corrientes de agua, exposición solar, nutrientes del suelo). Para profundizar en ese tema habría que realizar estudios tomando en cuenta estas variables.

No obstante, agregar el espacio como covariable o función genera análisis más robustos ya que el efecto de este sería impredecible, tal como puede apreciarse en las subestimación del gradiente en la distancia antera-estigma para el tratamiento sin abejas (P+A-) y la sobrestimación de gradientes en el área de la corola y el largo del tubo floral en el tratamiento sin polinizadores (P-A-). Se ha descrito que la autocorrelación sobreestimaría los resultados al estimar errores estandar más pequeños (Cressie, 1993; Sadoti y col., 2010), pero en este caso, a pesar que en algunos rasgos se observan errores más grandes al incluir el espacio, en otros los errores son menores.

Se ha descrito que las abejas aprenden principalmente los colores, formas o recompensas de las flores (Heinrich y col., 1977), mientras que para los picaflores la ubicación espacial de estas sería de mayor importancia (Cole y col., 1982;

Pritchard y col., 2017). Por ejemplo, las abejas tendrían preferencia de flores bicolors por sobre flores de un color y flores con áreas centrales grandes por sobre pequeñas (Heuschen y col., 2005). Por otro lado los picaflors tienden a visitar flores en los bordes de los parches en la mañana mientras que en la noche priorizan flores al interior de estos (Paton y Carpenter, 1984) y pueden aprender la ubicación de una flor con solo una visita (Flores-Abreu y col., 2012). Esto podría dar cuenta del bajo efecto de la estructura espacial sobre los gradientes de selección en este experimento, ya que, debido a la ausencia de picaflors, el principal agente selectivo (las abejas) tendrían técnicas de forrajeo menos dependientes del espacio que las que hubiera tenido el ensamble de picaflors.

La inclusión del componente espacial en los distintos métodos y modelos en ecología es una práctica cada vez más común y es una manera de aportar a la veracidad de estos. En este estudio el componente espacial no actuó de manera masiva sobre los coeficientes de selección. Sin embargo, es suficientemente apropiado ya que revela sutiles covariaciones entre los rasgos y el *fitness*. Con este trabajo se busca promover la utilización de métodos espacialmente explícitos para análisis de selección multivariada donde, al incluir el espacio, se logre un análisis más robusto pues se disminuye la variabilidad atribuida al azar.

CONCLUSIONES

El objetivo de este estudio fue estimar el impacto del componente espacial en un sistema planta-polinizador y su efecto sobre la selección impuesta por distintas combinaciones de especies de polinizadores. Con respecto a esto y los resultados obtenidos se desprenden las siguientes conclusiones:

En primer lugar, como era de esperar, se encontró autocorrelación espacial de los rasgos medidos en las plantas más cercanas pero no en la variable respuesta ni en los residuales de los modelos, por lo que no se violó el supuesto de independencia, fundamental para realizar cualquier análisis estadístico.

Lo anterior se vió reflejado en una baja influencia del componente espacial en los gradientes de selección, aunque la impredecibilidad de su efecto sobre las estimaciones lo hacen una valiosa herramienta para realizar analisis más robustos.

El bajo efecto que mostró el espacio sobre los coeficientes de selección se debería, en parte, a la ausencia de picaflores el año del estudio debido probablemente a la presencia del esfíngido *H. annei*. El principal agente polinizador y selectivo (las abejas) tendrían técnicas de forrajeo menos dependiente del espacio que las que hubiera tenido el ensamble de picaflores. A pesar de esto, la distribución espacial de las plantas influye directamente en su *fitness* relativo a través de la heterogeneidad microambiental.

La inclusión del componente espacial en los distintos métodos y modelos en ecología es una práctica cada vez más común, siendo una manera de aportar a la veracidad de estos. En este estudio el componente espacial no actuó de manera

masiva sobre los coeficientes de selección. Sin embargo, el análisis de este componente fue suficientemente apropiado ya que reveló sutiles covariaciones entre los rasgos y el *fitness*.

BIBLIOGRAFÍA

Arceo-Gómez, G., Vargas, C.F. y Parra-Tabla, V. 2017. Selection on intra-individual variation in stigma–anther distance in the tropical tree *Ipomoea wolcottiana* (Convolvulaceae). *Plant Biology*, 19: 454-459.

Barnes, R.J., Baxter, S.J. y Lark, R.M. 2007. Spatial covariation of *Azotobacter* abundance and soil properties: A case study using the wavelet transform. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 295-310.

Barrett, S.C.H. 2002. Sexual interference of the floral kind. *Heredity*, 88: 154-159.

Begon, M., Harper, J. L. y Townsed, C. R. 1995. *Ecología. Individuos, Poblaciones y Comunidades*. Ediciones Omega, Barcelona.

Carvalho, G.O. y Medel, R. 2010. Effects of herkogamy and inbreeding on the mating system of *Mimulus luteus* in the absence of pollinators. *Evolutionary Ecology*, 24: 509-522.

Chernoff, H. 1973. The use of faces to represent points in k-dimensional space graphically. *Journal of the American Statistical Association*, 68: 361-368.

Cole, S., Hainsworth, F.R., Kamil, A.C., Mercier, T. y Wolf, L.L. 1982. Spatial learning as an adaptation in hummingbirds. *Science*, 217: 655-657.

Cressie, N.A.C. 1993. *Statistics for Spatial Data*. Wiley. Cambridge.

Dale, M.R.T. 1999. *Spatial Pattern Analysis in Plant Ecology*. Cambridge University Press, Cambridge.

Diniz-Filho, J.A.F., Bini, L.M. y Hawkins, B.A. 2003. Spatial autocorrelation and red herrings in geographical ecology. *Global Ecology and Biogeography*, 12: 53-64.

Dormann, C.F., McPherson, J.M., Araújo, M.B, Bivand, R., Bolliger, J., Carl, G., Davies, R.G., Hirzel, A., Jetz, W., Daniel-Kissling, W., Kühn, I., Ohlemüller, R., Peres-Neto, P.R., Reineking, B., Schröder B., Schurr, F.M. y Wilson, R. 2007. Methods to account for spatial autocorrelation in the analysis of species distributional data: a review. *Ecography*, 30: 609-628.

Elliott, S.E. y Irwin, R.E. 2009. Effects of flowering plant density on pollinator visitation, pollen receipt, and seed production in *Delphinium barbeyi* (Ranunculaceae). *American Journal of Botany*, 96: 912-919.

Escudero, A., Iriando, J.M. y Torres, E. 2003. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation*, 113: 351-365.

Esterio, G., Cares-Suárez, C., González-Browne, C., Salinas, P., Carvallo, G. y Medel, R. 2013. Assessing the impact of the invasive buff-tailed bumblebee (*Bombus terrestris*) on the pollination of the native Chilean herb *Mimulus luteus*. *Arthropod-Plant Interactions*, 7: 467-474.

Falconer, D. S. 1981. *Introduction to Quantitative Genetics*, 2nd edn. Longman, NY, USA.

Flores-Abreu, I.N., Hurly, T.A. y Healy, S.D. 2012. One-trial spatial learning: wild hummingbirds relocate a reward after a single visit. *Animal cognition*, 15: 631-637.

Fontúrbel, F.E., Jordano, P. y Medel, R. 2015. Scale-dependent responses of pollination and seed dispersal mutualisms in a habitat transformation scenario. *Journal of Ecology*, 103: 1334-1343.

Fortin, M.J. y Dale, M.R.T. 2005. *Spatial Analysis: A Guide for Ecologists*. Cambridge University Press, Cambridge.

Ghazoul, J. 2005. Pollen and seed dispersal among dispersed plants. *Biological Reviews*, 80: 413-443.

Hand, D.J., & Taylor, C.C. 1987. *Multivariate analysis of variance and repeated measures: a practical approach for behavioural scientists*. CRC press.

Heinrich, B., Mudge, P.R., y Deringis, P.G. 1977. Laboratory analysis of flower constancy in foraging bumblebees: *Bombus ternarius* and *B. terricola*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 2: 247-265.

Heuschen, B., Gumbert, A. y Lunau, K. 2005. A generalised mimicry system involving angiosperm flower colour, pollen and bumblebees' innate colour preferences. *Plant Systematics and Evolution*, 252: 121-137

Holtsford T.P. y Ellstrand N.C. 1992. Genetic and environmental variation in floral traits affecting outcrossing rate in *Clarkia tembloriensis* (Onagraceae). *Evolution*, 46: 216-225.

Iriondo, J.M., Torres, E. y Escudero, A. 2003. Métodos para analizar variables continuas y categóricas: Correlogramas y estadísticos "join count". En F.Maestre, A.Escudero y A.Bonet (eds.), *Introducción al Análisis Espacial de Datos en Ecología y Ciencias Ambientales: Métodos y Aplicaciones*. pp 184-215. Dykinson S.L., Madrid.

Kalisz, S. 1986. Variable selection on the timing of germination in *Collinsia verna* (Scrophulariaceae). *Evolution*, 40: 479-491.

Kulbaba M.W. y Worley A.C. 2012. Selection on floral design in *Polemonium brandegeei* (Polemoniaceae): female and male fitness under hawkmoth pollination. *Evolution*, 66: 1344-1359.

Kunin, W.E. 1997. Population size and density effects in pollination: pollinator foraging and plant reproductive success in experimental arrays of *Brassica kaber*. *Journal of Ecology*, 85: 225-234.

Lande, R. y Arnold, S.J. 1983. The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, 37: 1210-1226.

Legendre, P. 1993. Spatial autocorrelation: trouble or new paradigm? *Ecology*, 74: 1659-1673.

Legendre, P. y Legendre, L. 1998. Numerical ecology. Elsevier Publishers, Amsterdam.

Lihoreau, M., Chittka, L. y Raine, N. E. 2010. Travel optimization by foraging bumblebees through readjustments of traplines after discovery of new feeding locations. *American Naturalist*, 176: 744-757.

Maestre, F.T., Rodríguez, F., Bautista, S., Cortina, J. y Bellot, J. 2005. Spatial associations and patterns of perennial vegetation in a semi-arid steppe: a multivariate geostatistics approach. *Plant Ecology*, 179: 133-147.

Maestre, F.T. y Escudero, A. 2008. Introducción. En F.Maestre, A.Escudero y A.Bonet (eds.), *Introducción al Análisis Espacial de Datos en Ecología y Ciencias Ambientales: Métodos y Aplicaciones*. pp 1-35. Dykinson S.L., Madrid.

Mantel, N. A. 1967. The depletion of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.

Marrot, P., Garant, D., & Charmantier, A. 2015. Spatial autocorrelation in fitness affects the estimation of natural selection in the wild. *Methods in Ecology and Evolution*, 6: 1474-1483.

Medel, R., Botto-Mahan, C. y Kalin-Arroyo, M. 2003. Pollinator-mediated selection on the nectar guide phenotype in the Andean monkeyflower, *Mimulus luteus*. *Ecology*, 84: 1721-1732.

Medel, R., Valiente, A., Botto-Mahan, C., Carvallo G., Pérez F., Pohl N. y Navarro L. 2007. The influence of insects and hummingbirds on the geographical variation of the flower phenotype in *Mimulus luteus*. *Ecography*, 30: 812-818.

Medel, R. y Nattero, J. 2009. Selección mediada por polinizadores sobre el fenotipo floral: examinando causas y blancos de selección natural. En R. Medel, M. Aizen y

R. Zamora (eds.), *Ecología y evolución de interacciones planta-animal*. Editorial Universitaria, Santiago de Chile.

Medel, R., González-Browne, C., Salazar, D., Ferrer, P. y Ehrenfeld, M. 2018. The most effective pollinator principle applies to new invasive pollinators. *Biology Letters*, 14: 20180132.

Moran, P.A.P. 1950. Notes on continuous stochastic phenomena. *Biometrika*, 37: 17-23.

Ohashi, K. y Thomson, J.D. 2009. Trapline foraging by pollinators: its ontogeny, economics and possible consequences for plants. *Annals of Botany*, 103: 1365-1378.

Paton, D.C. y Carpenter, F.L. 1984. Peripheral foraging by territorial rufous hummingbirds: defense by exploitation. *Ecology*, 65: 1808-1819.

Pritchard, D.J., Ramos, M.T., Muth, F. y Healy, S.D. 2017. Treating hummingbirds as feathered bees: a case of ethological cross-pollination. *Biology Letters*, 13: 20170610.

Rausher, M. D. 1992. The measurement of selection on quantitative traits: biases due to environmental covariances between traits and fitness. *Evolution*, 46: 616-626.

Sadoti, G., Rodhouse, T.J. y Vierling, K.T. 2010. Spatial dependence in northern flicker habitat-reproduction relationships: An application of dutilleul's modified t-test. *The Condor*, 12: 363-368.

Stratton, D.A. y Bennington, C.C. 1998. Fine-grained spatial and temporal variation in selection does not maintain genetic variation in *Erigeron annuus*. *Evolution*, 52: 678-691.

Tilman, D. y Kareiva, P. 1997. *Spatial ecology: The Role of Space in Population Dynamics and Interspecific Interactions*. Princeton University Press, Princeton, Estados Unidos.

Valiente-Banuet, A., Aizen, M., Alcántara, J.M., Arroyo, J., Cocucci, A., Galetti, M., García, M.B., García, D., Gómez, J.M., Jordano, P., Medel, R., Navarro, L., Obeso, J.R., Oviedo, R., Ramírez, N., Rey, P.J., Traveset, A., Verdú, M. y Zamora, R. 2015. Beyond species loss: the extinction of ecological interactions in a changing world. *Functional Ecology*, 29: 299-307.

Von Bohlen, C. 1995. El género *Mimulus* (Schrophulariaceae) en Chile. *Gayana Botanica*, 52: 7-28.

Waser N.M., Chittka L., Price M.V., Williams N.M. y Ollerton J. 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology*, 77: 1043-1060.

Weber, A. y Kolb, A. 2011. Evolutionary consequences of habitat fragmentation: population size and density affect selection on inflorescence size in a perennial herb. *Evolutionary Ecology*, 25: 417-428.

Wilkin, T.A., Gosler, A.G., Garant, D., Reynolds, S.J. y Sheldon, B.C. 2009. Calcium effects on life-history traits in a wild population of the great tit (*Parus major*): analysis of long-term data at several spatial scales. *Oecologia*, 159: 463-472.

Yang, S., Harlow, L.I., Puggioni, G., & Redding, C.A. 2017. A comparison of different methods of zero-inflated data analysis and an application in health surveys. *Journal of Modern Applied Statistical Methods*, 16: 518-543.

Zuur, A.F., Ieno, E.N., Walker, N.J., Saveliev, A.A., & Smith, G.M. 2009. Mixed effects models and extensions in ecology with R. Gail M, Krickeberg K, Samet JM, Tsiatis A, Wong W, editors. New York, NY: Springer Science and Business Media.