

UCH-FC
MAG-EBE
C263
C1

**BIOLOGÍA REPRODUCTIVA Y MECANISMOS QUE EVITAN LA
AUTOPOLINIZACIÓN EN EL BERRO CORDILLERANO, *MIMULUS LUTEUS* L.
(PHRYMACEAE)**

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
En cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias

GASTÓN CARVALLO BRAVO

Diciembre, 2005



Director de tesis: Dr. Rodrigo Medel

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER**

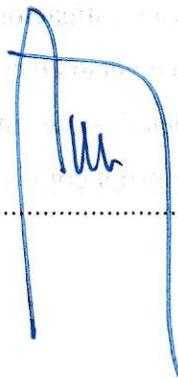
Se informa a la escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Ecológicas que la Tesis de
Magíster presentada por el candidato

GASTÓN CARVALLO BRAVO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al
grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva,
en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 23 de diciembre de 2005

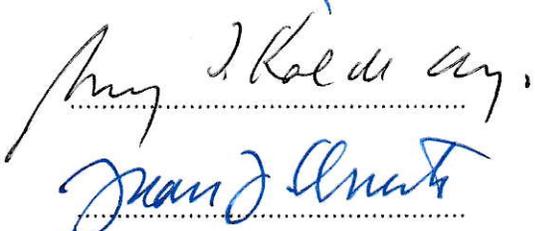
Director de Tesis

Dr. Rodrigo Medel C.



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Mary Kalin-Arroyo



Dr. Juan J. Armesto



AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Centro de Estudios Avanzados en Ecología e Investigación en Biodiversidad, Proyecto Milenio a través de una beca de Magíster P02-051-F y por el proyecto FONDECYT 1050199.



INDICE DE MATERIAS

PÁGINAS PRELIMINARES	PÁGINA
Página de título	i
Informe de aprobación	
Autobiografía	
Agradecimientos	ii
Índice de materias	iii
Resumen	v
Abstract	vii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	5
MATERIALES Y MÉTODOS	
Sistema y sitio de estudio	6
Evaluación de la conducta estigmática y la hercogamia como barreras a la autopolinización	6
Evaluación del sistema reproductivo y de la depresión por consanguinidad.....	9
Caracterización del ambiente de polinización	11
RESULTADOS	
Cierre estigmático y hercogamia como barreras a la autopolinización.....	15
Sistema reproductivo y depresión por consanguinidad.....	20
Caracterización del ambiente e polinización	24
DISCUSIÓN	27



PÁGINA

CONCLUSIONES 31

BIBLIOGRAFÍA 32



RESUMEN

Las plantas presentan diversidad de sistemas reproductivos, con especies con estrategias exclusivamente autógamas y alógamas, aunque un gran número de especies presentan estrategias reproductivas mixtas. Se ha argumentado que los costos reproductivos implícitos de la autogamia como son el descuento polínico, el descuento de semillas y la depresión por consanguinidad han favorecido la aparición de rasgos florales que evitarían la autopolinización. Usando la planta herbácea *Mimulus luteus* se evaluó la eficacia de dos rasgos que han sido postulados como mecanismos que evitan la autopolinización: la conducta estigmática y la distancia entre antera-estigma (hercogamia). Un experimento de dos factores, fuente y número de polinizaciones, fue aplicado sobre 90 estigmas de flores de individuos distintos el día de la antésis, para estimar si el tiempo que el estigma permanece cerrado responde de manera diferencial a estas variables. El tiempo que el estigma permanece cerrado no respondió de manera diferencial a la fuente de polen (autopolen o alopolen), por lo que este rasgo no puede ser considerado un mecanismo que evita la autopolinización. La proporción de estigmas que permanecen cerrados aumentó con un incremento en el número de polinizaciones que los estigmas recibieron. Para determinar si la hercogamia en esta especie contribuye a evitar la producción de semillas por autopolinización, se midió la distancia antera-estigma sobre individuos aislados de polinizadores la que fue correlacionada con la producción de semillas. La hercogamia explicó un 30% de la variación en la producción de semillas, sugiriendo que este mecanismo evitaría la producción de semillas por autogamia. Además usando tratamientos de polinización manual se estimó la depresión por consanguinidad (δ) sobre dos variables de adecuación biológica: producción y germinación de semillas. Los bajos valores de depresión por consanguinidad ($\delta = 0,267$ y $\delta = 0,054$ para la producción y germinación de las semillas respectivamente, valores n.s.) sugieren que mecanismos que evitan la autopolinización no presentarían una oportunidad importante de selección en esta especie. Al igual que en otros estudios, se observó que *M. luteus* es una especie autocompatible, pero que la población estudiada no requiere de la presencia de polinizadores para su éxito reproductivo. La tasa de visitas de polinizadores en el sitio de estudio fue muy baja (0,0038

visitas·flores⁻¹·hora⁻¹; 1EE = 0,0012; n = 9 visitas en 1028 min de observación) y está determinada por dos especies: *Melanostoma sp.* y *Bombus terrestris*. Experimentos de manipulación floral dentro de la población permitieron detectar una contribución similar de la reproducción alógama y autógama a la producción de semillas. Estudios de biología reproductiva en esta especie descartaron a la apomixis como mecanismo que contribuya a la producción de semillas en esta especie. Globalmente, la ausencia de efectos deletéreos de la autofecundación se relacionan con la ausencia de eficacia del cierre estigmático como barrera a la autopolinización.

ABSTRACT

In plants with hermaphrodite flowers, the detrimental effect of selfing has promoted the evolution of mechanisms that avoid this breeding system. Evaluation of this hypothesis requires a detailed knowledge of the reproductive system of the species under scrutiny. Using the herbaceous plant *Mimulus luteus* I evaluated the effectiveness of two flower traits that avoid selfing: (i) the time of stigma closure after contact, (ii) the anther-stigma distance (herkogamy). I measured the effects of inbreeding depression (δ) on seed production and germination in a two-factor design using source and number of pollination events as factors. Experimental pollination was carried out on 90 stigmas in the first day of anthesis. To determine whether herkogamy contributes to avoidance of selfing, the anther-stigma distance was measured in flowers isolated from pollinators. The time of stigma closure did not correspond to the source of pollen (self-pollination or allo-pollination), which implies this trait cannot be considered as an mechanism preventing selfing. The proportion of stigmas that remained closed increased with the quantity of pollen deposited, irrespective of the number of pollination events. Herkogamy accounted for 30% of variation in seed production, suggesting that this mechanism may help to avoid seed production by selfing. However, the absence of selfing costs ($\delta = 0,267$ and $\delta = 0,054$ for seed production and germination, respectively) suggests that such mechanisms do not exhibit an important opportunity for selection in this species. Consistent with other studies, my results indicate that *M. luteus* is an selfcompatible specie. However, unlike other populations, the presence of pollinators is not required for reproductive success. The low visitation rate ($0.0038 \text{ visits} \times \text{flower}^{-1} \times \text{hour}^{-1}$; $1EE = 0.0012$; $n = 9$ visits, 1028 min of observation) was determined by two taxa: *Melanostoma sp.* and *Bombus terrestris*. This observation was consistent with results from floral manipulation experiments that detected a similar contribution of allogamous and autogamous reproduction to seed production, rejecting apomixis as a potential mechanism contributing to seed production in this species. The absence of deleterious effects of selfing would account for the low effectiveness of stigma closure as barrier to avoid selfing in this species.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas reproductivos en plantas presentan dos puntos de estabilidad: la autogamia y la alogamia, aunque existe un gran número de especies con sistemas reproductivos mixtos (Lande & Schemske 1985; Schemske & Lande 1985; Barrett & Harder 1996). Las explicaciones que dan cuenta de esta variación son un debate candente en evolución. Por un lado, las ideas de selección automática de Fisher (1930) explican como la autogamia constituye una estrategia estable, ya que permite el traspaso completo del genoma parental a la siguiente generación (Schultz & Willis 1995; Barrett & Harder 1996; Husband & Schemske 1996; Byers & Waller 1999; Sweigart & Willis 2003). Por otro lado, la pérdida de la autogamia estaría gatillada por el aumento de homocigosis y la expresión de genes letales (Schemske 1983; Lande & Schemske 1985; Barrett & Charlesworth 1991; Schultz & Willis 1995) evidenciándose depresión por consanguinidad (Lloyd 1979; Charlesworth & Charlesworth 1979, 1987; Lande & Schemske 1985; Carr & Eubanks 2002; Keller & Waller 2002). Aproximadamente un tercio de las plantas presentan sistemas reproductivos mixtos, con alo- y autopolinización simultánea (Barrett y Harder 1996) señalándose que la estrategia que adoptará una planta (autógama o alógama) dependerá de factores relacionados tanto con su biología como de las características que presenta su ensamble de polinizadores (Müller 1883; Herrera 1995; Barrett & Harder 1996; Chittka y col. 1999; Kalisz & Vogler 2003; Morgan y col. 2005).

En este sentido, aunque se ha considerado que los polinizadores favorecen la alogamia, por el rol en el intercambio de polen entre flores a cambio de una recompensa (Darwin 1876; Sprengel 1996; Waser & Price 1981; Barrett 2003; Lunau 2002), los polinizadores también pueden prestar un servicio indirecto a la autopolinización a través de la geitonogamia y la polinización facilitada, favoreciendo la evolución de la autogamia (Lloyd & Schoen 1992). La polinización facilitada ocurre en las flores por los movimientos que el animal realiza dentro de estas, provocando el depósito involuntario de polen sobre los estigmas (Müller 1883; Kimura 1959; Schneider & Buchanan 1980).

También se ha considerado que la autopolinización facilitada tiene consecuencias desventajosas en varias etapas de la reproducción (Charlesworth & Charlesworth 1990; Lively & Lloyd 1990) ya que los granos de polen destinados a la polinización cruzada son usados en la autofecundación (discontinuidad polínica, Holsinger 1991; Kohn & Barrett 1994) y los óvulos destinados a la fecundación alógama reciben polen de la misma flor, lo que disminuye la producción de semillas cuando ocurre depresión por consanguinidad (discontinuidad de semillas, Herlihy & Eckert 2002). Por estos motivos, se ha propuesto que las plantas presentan una serie de rasgos que evitan la autopolinización por los costos reproductivos implícitos que esta presenta (Faegri & van der Pijl 1971; Stebbins 1974). Entre tales mecanismos, los más estudiados corresponden a la auto-incompatibilidad genética, en que se produce un rechazo al polen propio (Barrett 1988; Castric & Vekemans 2004); la hercogamia que es la separación espacial de las anteras y del estigma dentro de la flor (Campbell y col. 1994; Kohn & Barrett 1994; Takebayashi & Delph 2000; Thompson & Domme 2000) y la dicogamia, donde los componentes masculinos y femeninos de la flor maduran en diferentes tiempos (Lloyd 1979; Gregorius y col. 1987; Holtsford & Ellstrand 1992; Aizen & Basilio 1995; Barrett 2002).

Plantas con flores hermafroditas y con visitas de polinizadores presentan una mayor proporción de semillas formadas por autopolinización facilitada (Harder & Barrett 1996; Ashman y col. 2004). La cantidad de visitas de una flor puede incrementar en función al grado de atractividad que presenta a sus polinizadores dado por estructuras tales como el tamaño (Campbell y col. 1991; Mitchell y col. 1998), color (Waser 1978; Waser & Price 1981; Stanton 1987; Sutherland & Vickery Jr 1992; Withlock 1995) y forma de la corola (Schemske & Bradshaw Jr 1999; Galen & Cuba 2001) o presencia de guías de néctar (Medel y col. 2003). La presencia y eficacia de rasgos que evitan la autopolinización en una planta están determinadas por la magnitud de los efectos deletéreos producidos por la autogamia, lo que favorece estrategias mixtas de reproducción. El estudio de esta hipótesis está sujeta a la evaluación de las siguientes predicciones. Primero, se debe determinar la existencia de rasgos que evitan la autopolinización; en segundo lugar se debe evidenciar si la autogamia es una estrategia

reproductiva desventajosa en comparación a la alogamia, por los efectos deletéreos que presenta este modo de reproducción. Por último, los estudios reproductivos en plantas deben considerar el ambiente de polinización en que se desarrollan las especies, desde que se ha evidenciado que la variación en el ensamble de polinizadores es un factor importante en determinar el tipo de sistema reproductivo que una planta adopta (Herrera 1995; Kalisz & Vogler 2003; Moeller & Geber 2005). La conducta estigmática es un rasgo que podría haber evolucionado como mecanismo que evita la autopolinización, en respuesta a los costos reproductivos de la autogamia (Faegri & van der Pijl 1971). La conducta estigmática hace referencia al cierre y reapertura de los lóbulos de estigmas bilobulados, rasgo que está presente en algunas familias del orden lamiales (Bignoniaceae, Lentibulariaceae, Martynaceae y Phrymaceae; Fetscher & Kohn 1999). El cierre estigmático ocurre como consecuencia de la estimulación mecánica que este recibe y su reapertura está condicionada por el número de óvulos que son fecundados dentro de la flor (Fetscher & Kohn 1999). No obstante, se desconoce si la conducta estigmática responde de manera diferencial a distintas fuentes de polen (auto- y alo-polinización).

Usando como modelo de estudio la herbácea *Mimulus luteus* L. (Phrymaceae) se examinará si existen mecanismos que eviten la autopolinización y si estos rasgos pueden ser considerados como una ‘defensa’ a la autogamia por los costos reproductivos que este modo de reproducción presenta. Específicamente se evaluarán las preguntas: (1) ¿son el cierre estigmático y la hercogamia mecanismos que actúan como barrera a la autopolinización?; (2) ¿existe depresión por consanguinidad en *M. luteus*?; (3) ¿hay consistencia entre el ambiente de polinización y el mecanismo reproductivo que presenta la especie estudiada? La especie *Mimulus luteus* var. *luteus* L. (Phrymaceae) habita en Chile en la precordillera de los Andes, desde la III a la XI región asociada a cursos de agua (von Bohlen 1995). Produce flores hermafroditas solitarias con corolas tubulares amarillas que presentan una mancha roja en el lóbulo inferior (Fig.1) la que actúa como guía de néctar sin reflejar en el espectro UV (Medel y col. 2003, Botto y col. 2004). Estudios realizados en una población muestran que existe selección mediada por polinizadores sobre la guía de néctar (Los Pelambres, IV región, Chile; Medel y col. 2003) y que este rasgo presenta co-variación con el ensamble de polinizadores (cinco

poblaciones estudiadas en un rango latitudinal de 420Km; Botto-Mahan y col., datos no publicados). Con respecto a sus sistema reproductivo se ha evidenciado que los polinizadores son necesarios para la producción de semillas y que es una especie autocompatible (Pohl 2003; Medel col. 2003), aunque podría existir variación geográfica en estos rasgos lo que ocurre habitualmente en plantas (Herrera 1995). Para esta especie no existen trabajos que evalúen de manera directa la depresión por consanguinidad. Con respecto a los mecanismos que evitarían la autopolinización, en el género se ha estudiado el efecto de la hercogamia (*M. guttatus*, Carr & Fenster 1994 y *M. ringens*, Karron y col. 1997) y la conducta del estigma, sugiriéndose que los lóbulos estigmáticos una vez contactados físicamente cumplirían esta función (*M. aurantiacus*, Fetscher & Kohn 1999). Actualmente en *Mimulus aurantiacus* el estigma permanece cerrado dependiendo de la cantidad de óvulos fecundados (Fetscher & Kohn 1999).

OBJETIVOS

- Determinar si la conducta estigmática y la hercogamia son rasgos que contribuyen a evitar la autopolinización en esta especie
- Comparar el efecto de la auto- con la alo- polinización sobre la producción y germinación de semillas de *Mimulus luteus*
- Evaluar si las condiciones de polinización de *M. luteus* favorecen la estrategias (rasgos) que evitan la autopolinización

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema y sitio de estudio

Mimulus luteus var. *luteus* L. (Phrymaceae) es una especie herbácea que habita lugares asociados a cursos de agua, en la precordillera de los Andes, desde la III a la XI Región en Chile (von Bohlen 1995). Produce flores hermafroditas solitarias con corolas tubulares amarillas que presentan una mancha roja en el lóbulo inferior (Fig.1) la que actúa como guía de néctar sin reflejar en el espectro UV (Medel y col. 2003, Botto y col. 2004). Con el propósito de comparar la co-variación entre la guía de néctar y el ensamble de polinizadores con otras poblaciones, este estudio se realizó en una población localizada en el fundo de La Engorda, faldeo del Volcán San José (33°37'S 70°01'W, 2580m), Región Metropolitana, Chile, en enero del año 2005. Todos los experimentos fueron realizados en un parche monoespecífico que cubrió una longitud de 135m x 2,3m. La matriz vegetacional circundante de *M. luteus* incluye a *Adesmia echinus* (Papilionaceae), *Berberis empetrifolia* (Berberidaceae), *Caiphora coronata* (Loasaceae), *Calceolaria biflora* (Calceolariaceae), *Calceolaria purpurea* (Calceolariaceae) y *Ribes cucullatum* (Saxifragaceae). En visitas previas al sitio de estudio, se identificó a *Bombus terrestris* (Apidae) y al picaflor andino *Oreotrochilus leucopleurus* (Trochilidae) como los polinizadores más importantes. En *M. luteus* la producción de néctar no está asociada con el tamaño de la corola ni con el área de la guía de néctar.

Evaluación de la conducta estigmática y hercogamia como barreras a la autopolinización

Para evaluar de qué manera el estigma de *M. luteus* responde a la fuente de polen (alo- vs. auto-polinización) y al número de veces que este es polinizado, se estableció un diseño experimental de dos factores (fuente de polen y número de polinizaciones) el que se

aplicó en flores el día de la antésis. Se marcaron 60 yemas florales las que fueron cubiertas con bolsas de gasa. El día de la antésis, el estigma de cada flor fue polinizado manualmente con polen de la misma flor (autopolinización) o de una flor foránea (alopolinización). La polinización se efectuó usando una micropipeta Gilson p10 con la que se agregó una solución de 2 μ L de agua-polen. Esta solución fue preparada en un tubo de centrifugado donde se mezcló 20 μ L de agua con las cuatro anteras de la flor utilizada para llevar a cabo la polinización. La solución fue depositada inmediatamente después de su preparación sobre el estigma. Con esta metodología se estandarizó la cantidad de polen depositado en cada estigma (en 2 μ L, 832,6 \pm 84,8 granos de polen, n = 7; media \pm 1EE). Las flores utilizadas para la alopolinización fueron embolsadas en estado de yema floral y sus anteras se utilizaron el día de la antésis. Para tener una aproximación del comportamiento estigmático en ausencia de polen, una tercera manipulación de polinización fue utilizada (n = 30), donde se agregó agua sin polen (placebo) sobre estigmas el día de la antesis, utilizando el mismo volumen de agua que en los tratamientos descritos anteriormente (2 μ L de agua). Mientras se llevó a cabo la manipulación experimental, las plantas fueron desembolsadas y posteriormente vueltas a embolsar hasta que se realizó la cosecha de los frutos. En todos los tratamientos las plantas fueron emasculadas para evitar cualquier fuente de polen que no fuera exclusivamente la utilizada en el tratamiento de interés. Todos los estigmas cerraron sus valvas (lóbulos) al tener contacto con la micropipeta. Un total de 90 flores fueron polinizadas bajo distintos tratamientos (auto-, alo-polinización y placebo) a las que se le evaluó su estado estigmático (abierto o cerrado) a los 10, 20 y 30 minutos después de la primera polinización. Un grupo de flores (n = 20) de cada tratamiento de polinización fue polinizada una segunda vez, a los 10' de la primera polinización y un tercer grupo de flores de cada tratamiento de polinización (n = 10) fue polinizada a los 30' de la primera polinización. La evaluación del estigma a los 10' de la primera polinización indica el efecto de la fuente de polen en la conducta estigmática, mientras que a los 20' y 30' los factores de fuente y número de polinizaciones actúan sinérgicamente. Para determinar como estos factores afectan la permanencia de cierre del estigma, para cada tiempo de observación se usó una regresión logística múltiple, donde las variables independientes

fueron la fuente y el número de polinizaciones previas y la variable respuesta fue el estado del estigma (abierto/cerrado).

Para determinar el efecto de la fuente y el número de polinizaciones sobre el éxito reproductivo femenino, se recolectaron los frutos y se cuantificó el número de semillas producidas, 16 días después de iniciado el experimento. El efecto de estos factores sobre la producción de semillas fue examinado usando un ANDEVA de dos vías. Para determinar si existen diferencias estadísticas entre los distintos tratamientos, se contrastaron las diferencias observadas entre los grupos con una distribución obtenida por remuestreo aleatorio de los datos, tras 10.000 iteraciones, usando el programa Rndom Projects 1.1 (Jadwiszczak 2003).

Para determinar si la hercogamia es un rasgo que evita la autopolinización se marcaron y embolsaron 2 yemas florales en 50 individuos. El día de la anthesis de estas flores se midió la distancia entre el estigma y la antera más larga (estimación de la hercogamia) sobre una de las flores marcada usando un caliper digital (precisión 0,01mm). Una segunda flor de la misma planta permaneció embolsada durante toda su vida para evitar el aporte de polen foráneo y sobre esta se estimó la producción de semillas. La medición de la hercogamia es una metodología invasiva que requiere la manipulación de la flor, por lo que se optó por cuantificar el efecto de la hercogamia de manera indirecta. Mediciones previas muestran que esta variable no difiere de forma significativa dentro de un mismo individuo (Carvallo & Medel 2005). Transcurridos 18 días desde la anthesis, los frutos de las flores no manipuladas fueron colectados y conducidos al laboratorio, donde se cuantificó el número de semillas. Se evaluó la relación entre hercogamia y producción de semillas utilizando una regresión lineal simple, iterando los datos 10.000 veces usando el programa Rndom Project 1.1 (Jadwiszczak 2003).

Evaluación del sistema reproductivo y depresión por consanguinidad

Estudios anteriores han considerado a *M. luteus* var. *luteus* como una especie auto-compatible y que requiere de un polinizador para la producción de semillas (Medel y col. 2003; Pohl 2003) aunque podría existir variación espacio-temporal en estas características, lo que ocurre habitualmente en plantas (Herrera 1995; 2005). Por esta razón se consideró necesario evaluar el sistema reproductivo de esta especie para la población estudiada. Con este propósito se marcó y embolsó 120 yemas florales de distintos individuos. El día de la antésis las flores fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos: (1) autopolinización automática (APA), que estima la necesidad de un vector para el éxito reproductivo y consiste en evitar el acceso de los polinizadores a la flor, la cual permanece embolsada toda su vida; (2) autopolinización manual (APM), que utiliza el polen de la misma flor para realizar la polinización del estigma, lo cual tratamiento utilizado para estimar el nivel de autocompatibilidad de la planta; (3) polinización cruzada manual (PC), donde la flor receptora es emasculada y luego polinizada con polen de una segunda flor escogida aleatoriamente a más de un metro de la flor focal; (4) control (C), flores desembolsadas el día de su antésis y dejadas intactas hasta su abscisión. Cada tratamiento fue replicado 30 veces con flores de individuos independientes. Para los tratamientos de polinización cruzada se utilizó polen de una flor cuya antésis ocurrió el día de la polinización, estas flores fueron previamente embolsadas. La polinización se realizó con una micropipeta Gilson p10, tomando 2 μ L de una solución agua-polen desde un tubo de centrifugado, donde previamente se mezcló 20 μ L de agua con las cuatro anteras de la flor utilizada para llevar a cabo la polinización. La solución fue depositada inmediatamente después de su preparación sobre el estigma. Con esta metodología se estandarizó la cantidad de polen depositado en cada estigma (en 2 μ L, 832,6 \pm 84,8 granos de polen, n = 7; media \pm 1EE). Veinte días más tarde de aplicado el tratamiento, los frutos obtenidos fueron cosechados maduros y en el laboratorio se cuantificó el número de semillas dentro cada fruto. Se relacionó el tratamiento de polinización con la producción de semillas. Un segundo componente de

éxito reproductivo medido fue la proporción de germinación de las semillas obtenidas. Para obtener esta variable, las semillas fueron puestas a germinar sobre placas Petri de forma independiente para cada fruto, usando como sustrato papel absorbente humedecido diariamente con 20mL de agua potable. Las cápsulas se mantuvieron en el laboratorio bajo un régimen de iluminación natural. Se evaluó la capacidad de germinación de las semillas como la razón entre el número de semillas que germinaron 9 días después de iniciada la siembra dividido por el total de semillas al inicio del experimento. Esta razón fluctúa entre 0 (baja germinación de las semillas) y 1 (germinación completa de todas las semillas). Para determinar si existen diferencias estadísticas entre los distintos tratamientos, tanto para la producción como para la germinación de las semillas, las diferencias observadas entre los tratamientos fueron contrastadas con una distribución obtenida por remuestreo aleatorio de los datos, tras 10.000 iteraciones, usando el programa Rndom Projects 1.1 (Jadwiszczak 2003).

Se calculó el nivel de depresión por consanguinidad (δ) para cada estimador de adecuación usando el siguiente índice:

$$\delta = \frac{W_o - W_s}{W_o}$$

donde W_o es el éxito reproductivo promedio de los individuos con polinización cruzada manual y W_s es el éxito reproductivo promedio de los individuos con auto polinización manual (Charlesworth & Charlesworth 1990; Keller & Waller 2002). El índice fluctúa entre 0 (ausencia de depresión por consanguinidad) y 1 (máxima depresión por consanguinidad). Para determinar la significancia estadística del índice, se comparó el valor observado de δ con una distribución obtenida de la permutación aleatoria de los datos (10.000 iteraciones) utilizando análisis de Montecarlo (Hood 2005), evaluando la hipótesis nula que $\delta_{\text{Observado}} = 0$. También se calculó el índice de auto-incompatibilidad, dividiendo el número de semillas obtenidas por autopolinización manual por el número de semillas obtenidas por polinización cruzada manual (Ruiz-Zapata & Arroyo 1978).

Este índice toma valores entre 0 y 1, especies con valores menores a 0,2 se consideran autoincompatibles.

Caracterización del ambiente de polinización

Si los mecanismos que evitan la autopolinización son interpretados como rasgos que evolucionan en respuesta a costos reproductivos (Charlesworth 1990), la caracterización del ensamble de polinizadores y su rol en la polinización serán importantes para comprender la evolución de los sistemas reproductivos en plantas (Charlesworth & Charlesworth 1987; Herrera 1995; Barrett & Harder 1996; Kalisz & Vogler 2003; Barrett 2003). En esta dirección, se determinó la composición del ensamble de polinizadores y la preferencia que estos presentan sobre rasgos florales, específicamente sobre el área de la corola y la guía de néctar. En una segunda etapa, se estimó experimentalmente cuál es la contribución de la reproducción autógena y alógena a la producción de semillas de *M. luteus*.

Para verificar la preferencia de los polinizadores sobre los distintos fenotipos florales, se efectuaron observaciones de la tasa de visita en tres cuencas de similares características (transectos de 120 x 2m; orientación este-oeste). El 12 y 16 de febrero del 2005, entre las 700 y 2100 horas, en cada una de estas cuencas se establecieron aleatoriamente 25 cuadrantes de 1m x 1m, en cada uno se cuantificó el número de flores ($214,1 \pm 25,6$ flores; $n = 25$; media \pm 1EE). Para cada cuadrante se realizó observaciones de los polinizadores en períodos de 30 minutos, entre las 800 y 2100, rotando aleatoriamente entre ellos. Observaciones anteriores en poblaciones naturales de *M. luteus* var. *luteus* han mostrado que no existen polinizadores nocturnos (Medel y col. 2003; Pohl 2003). En total se acumularon 1.028 minutos de observación. Se consideró como polinizador a aquellos animales que ingresaron al tubo de la corola. Cada vez que se observó la visita de un polinizador dentro del parche, se registró la identidad del visitante y el estado estigmático de las flores (abierto/cerrado) una vez efectuada la visita. Los visitantes florales fueron capturados para realizar su determinación taxonómica. Para

obtener la preferencia fenotípica floral de cada polinizador, cada flor visitada fue fotografiada obteniendo el registro de la corola. La imagen de la corola fue capturada digitalmente usando una cámara Nikon Coolpix 4300 (Nikon Corporation), desde la perspectiva de aproximación del polinizador, en un plano de 90° al eje del tubo de la corola. La distancia desde la cámara a la flor fue mantenida de manera constante con un soporte plástico rígido y la imagen fue escalada incluyendo en la toma fotográfica una regla graduada milimétricamente. Desde esta imagen se estimó el tamaño de la corola y el área de la guía de néctar usando el programa SigmaScan Pro para Windows, versión 5.0 (1999 SPSS Inc.). Se observó un bajo número de visitas florales (0,0025 visitas-flores⁻¹·hora⁻¹; 1EE = 0,0011; n = 9) con sólo 9 registros de fotografías de corolas visitadas.

El modo de polinización puede ser inferido experimentalmente combinando distintos tratamientos de manipulación floral y cuantificando la producción de semillas (Lloyd & Schoen 1992; Schoen & Lloyd 1992, Herlihy & Eckert 2002). Los sistemas de reproducción en plantas pueden ser calificados en alógamos y autógamos, reconociéndose dentro de este último grupo tres tipos de polinización: autopolinización previa, competitiva y tardía, las que se diferencian de acuerdo a la etapa en que ocurren dentro de la ontogenia floral (Lloyd & Schoen 1992). La ocurrencia de autopolinización competitiva es un fenómeno difícil de medir, porque ocurre simultáneamente con la alopolinización cuando la flor está siendo visitada por un polinizador e idealmente requiere del uso de herramientas moleculares de paternidad para ser detectada (Awadalla & Ritland 1997; Ritland & Leblanc 2004; Moeller & Geber 2005). Para determinar la contribución de la reproducción alógama y autógama a la producción de semillas se marcaron tres yemas florales por individuo, las que fueron embolsadas para impedir el acceso a los polinizadores; el día de la anthesis se aplicó uno de los siguientes tratamientos sobre cada una de estas flores por individuo: (1) una flor fue emasculada y desembolsada, lo que permitió el acceso a los polinizadores, en esta caso la producción de semillas es consecuencia de la alopolinización (polinización cruzada y geitonogamia); (2) flor sin acceso a los polinizadores, las flores se mantuvieron cubiertas con una bolsa de gasa; en este caso la producción de semillas es producto de la reproducción autógama y excluye a la autopolinización competitiva mediada por polinizadores; y (3) flor sin manipular,

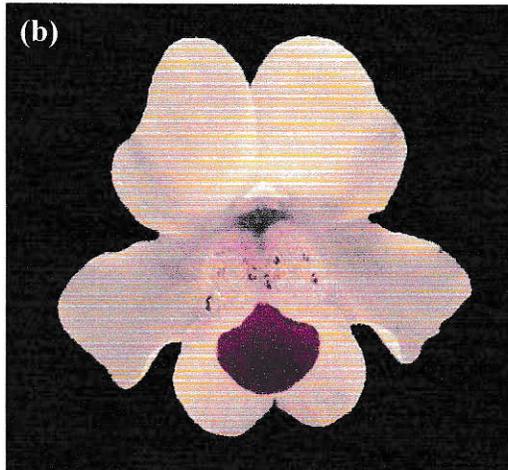
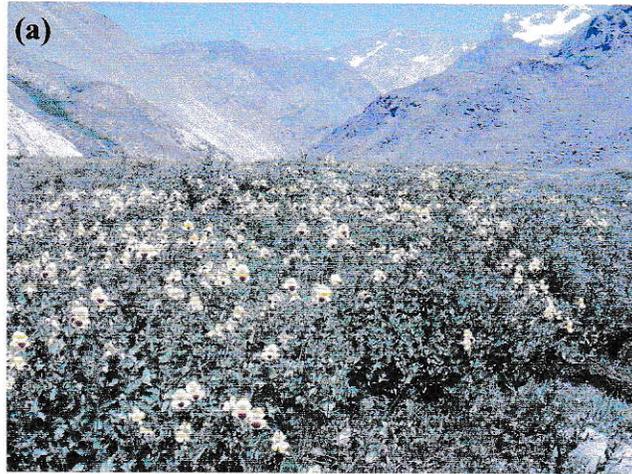
donde se ve la contribución a la producción de semillas de todos los componentes de la polinización (autógama y alógama). Esta metodología supone que en un individuo todas las flores presentan la misma oportunidad de ser visitadas. Para la emasculación, se utilizó una pinza, cuidando no depositar polen en el estigma. Transcurridos 17 días desde que cada tratamiento fue aplicado, se recolectaron los frutos, los que fueron guardados en sobres de papel de manera independiente y transportados al laboratorio donde se cuantificó el número de semillas para cada uno de ellos. La producción de semillas fue comparada entre los tres tratamientos, contrastando las diferencias observadas entre los grupos con una distribución obtenida por remuestreo aleatorio de los datos, tras 10.000 iteraciones, usando el programa Rndom Projects 1.1 (Jadwiszczak 2003). Para el análisis sólo se consideró aquellos casos donde la antesis entre la primera y última flor de cada individuo ocurrió dentro de 24 horas. Con esta restricción, sólo un individuo fue excluido de los análisis. Las comparaciones entre los tres tratamientos permiten determinar la contribución de la autogamia y alogamia a la producción de semillas, para este último caso se utilizó el cálculo de aseguramiento reproductivo (Herlihy & Eckert 2002). El aseguramiento reproductivo (R) es un índice que es calculado a partir de las diferencias en la producción de semillas de una flor sin manipular y una flor emasculada dentro de un mismo individuo. La fórmula para su cálculo es:

$$R = UM - EM$$

donde UM y EM corresponden a la producción de semillas de los individuos sin manipulación y aquellos emasculados, respectivamente. Para determinar la significancia estadística de R, se comparó el valor observado de R con una distribución obtenida de la permutación aleatoria de los datos (10.000 iteraciones) utilizando análisis de Montecarlo (Hood 2005), evaluando la hipótesis nula que $R_{\text{Observado}} = R_{\text{Esperado}}$.

Figura 1

(a) Visión parcial del sitio de estudio en el valle de La Engorda, faldeos del volcán San José, Región Metropolitana, Chile ($33^{\circ}37'S$ $70^{\circ}01'W$) y (b) detalle de la corola de *M. luteus* var. *luteus* desde la perspectiva de aproximación del polinizador, donde se observa la guía de néctar sobre el pétalo de aterrizaje



RESULTADOS

Cierre estigmático y hercogamia como barreras a la autopolinización

El día de la antesis, con la excepción de un solo individuo, todos los estigmas de las flores usadas en este experimento se encontraban abiertos (99,91% de los casos, N = 90). Cada vez que se aplicó el tratamiento de polinización, los estigmas se cerraron frente a la estimulación mecánica tal como se ha detectado en otros estudios (rango de tiempo de cierre 0,89 - 51,59 seg, Carvallo & Medel 2005). El 60% de los estigmas permanecieron cerrados 10 min después de la primera polinización manual, no existiendo diferencias entre los individuos que recibieron polen y aquellos que recibieron polinización placebo (Tabla 1). Para este intervalo de observación la fuente de polen no explicó la conducta del estigma ($W = 0,449$; $P = 0,502$; Tabla 2). Transcurridos 20' después de la primera polinización, el 42,2% de los estigmas se encontraban cerrados, siendo mayor esta proporción en aquellas flores que recibieron polen en comparación a las flores polinizadas con una solución placebo (50% y 27% de estigmas cerrados respectivamente; Tabla 1); para este intervalo de observación ni el número de polinizaciones ni la fuente de polen explicaron el estado del estigma (estadígrafos en Tabla 2). A los 30' de la primera polinización un 33,3% de los estigmas permanecen cerrados, existiendo diferencias entre aquellos tratamientos que recibieron polen y el tratamiento placebo (50% y 0% de estigmas cerrados respectivamente; Tabla 1) aunque sólo el número de polinizaciones fue un factor que explicó la variabilidad del estado del estigma (Tabla 2). Frente a incrementos en el número de polinizaciones, aquellos estigmas que no recibieron polen (placebo) permanecieron abiertos en mayor proporción que aquellos que recibieron polen (17% y 55% de estigmas cerrados, respectivamente; Tabla 1). Los resultados indican que aunque se observó una diferencia en la proporción de estigmas cerrados entre aquellas flores que recibieron una polinización con polen y placebo, esta diferencia no tuvo significancia estadística (Tabla 2). El número de estigmas que permanecen cerrados fue

explicado por el número de polinizaciones que recibe una flor, lo que se detectó 30' después de una primera polinización.

En *M. luteus* var. *luteus* el polen es un factor que da cuenta de la variación en la producción de semillas, ya que su ausencia se relacionó con una disminución en esta variable (Fuente de polen g.l.: 2, CM = 32,260, F = 86,269, P < 0,001), pero no fue afectada ni por el número de polinizaciones (g.l. = 2, CM = 0,261, F = 0,700, P = 0,554) ni por la interacción entre los factores estudiados (g.l. = 4, CM = 0,441, F = 1,181, P = 0,322, Fig. 2). Los contrastes a posteriori mostraron que el grupo de polinización placebo presentó una producción de semillas significativamente menor que el tratamiento de aloy auto-polinización y que para estos dos tratamientos no existieron diferencias significativas (Tabla 1 y Fig. 2). Estos resultados indican que incrementos en el número de veces que una flor es polinizada no se traduce en un aumento en la producción de semillas (Fig. 2) sugiriendo que un evento de polinización es suficiente para fecundar todos los óvulos de la flor.

El aumento de hercogamia en *M. luteus* var. *luteus* reduce la producción de semillas en ausencia de polinizadores (medición en flores aisladas, n = 48). Se registró una producción autógama de $54,85 \pm 9,05$ semillas (media \pm 1EE) en flores aisladas. El tipo de hercogamia observada en esta especie corresponde a la hercogamia de aproximación (Barrett 2003) en la cual el estigma se encuentra sobre las anteras; la distancia promedio antera-estigma registrada en la muestra fue de $3,09 \pm 0,27$ mm. La regresión lineal entre estas variables fue marginalmente significativa, sugiriendo que la hercogamia reduciría la autopolinización (regresión: Producción de semillas = $85,63 - 9,93 \cdot$ hercogamia; $r^2 = 0,292$; n = 48; P = 0,044). Una prueba de poder señaló que el número de flores utilizado para detectar esta diferencia es adecuado ($n_{\text{Teórico}} = 41$; $n_{\text{Muestra}} = 48$). La relación $(t \cdot \sigma / \beta)^2$ permite calcular el tamaño de la muestra para lograr el nivel de significancia obtenido en la regresión (Medel 2000), con un nivel de confianza al 95% ($\alpha = 0,05$), donde t = 1,96; β es el valor de la pendiente de la regresión ($\beta = -9,930$) y σ corresponde a la desviación estándar de este parámetro ($\sigma = 32,446$).

Tabla 1. Proporción de estigmas cerrados y producción de semillas en función de los factores fuente de polen y número de polinizaciones manuales. La proporción de estigmas cerrados fue medida en tres intervalos de observación ($t_1 = 10$ min; $t_2 = 20$ min; $t_3 = 30$ min después de la primera fertilización).

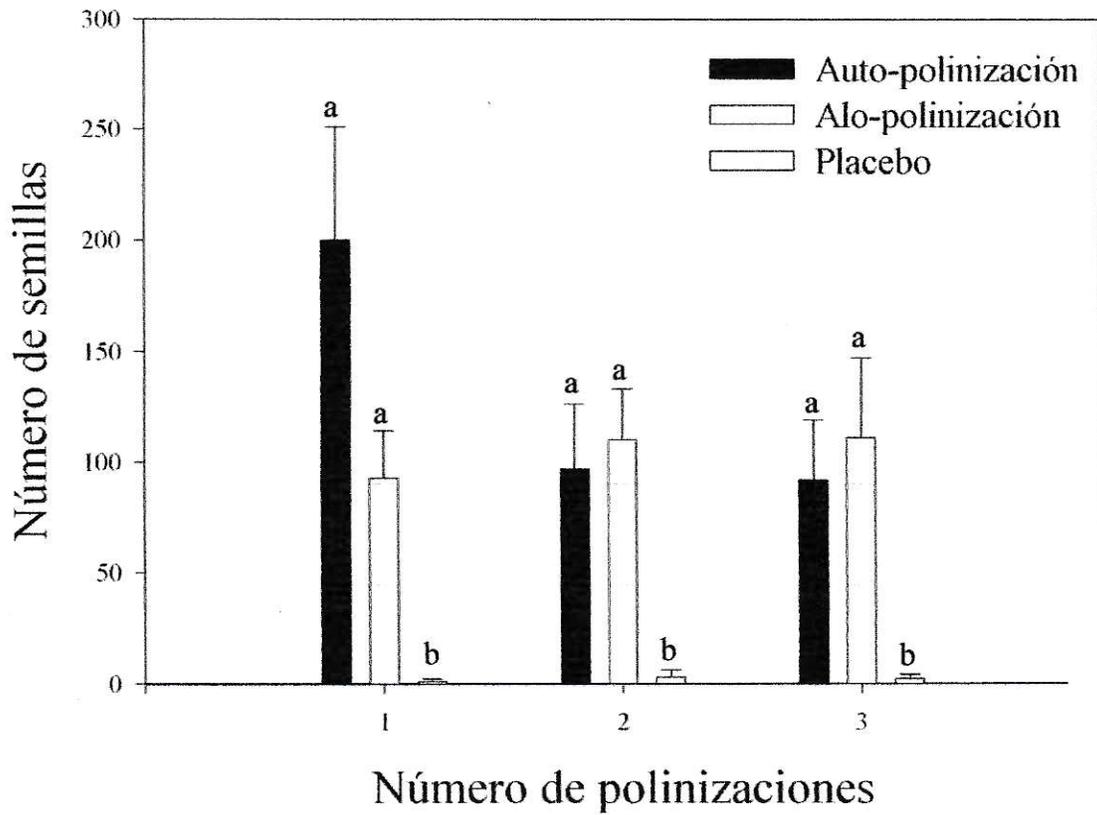
Fuente de polen	N° polinizaciones	t_1	t_2	t_3	Número de semillas (media \pm 1EE)
Auto-polinización	1	0,60	0,30	0,20	200,3 \pm 51,74 (n = 10)
	2	0,60	0,60	0,20	97,44 \pm 29,99 (n = 9)
	3	0,60	0,60	0,80	92,50 \pm 27,49 (n = 8)
Alo-polinización	1	0,60	0,30	0,30	93,00 \pm 21,62 (n = 9)
	2	0,60	0,60	0,50	110,60 \pm 23,28 (n = 10)
	3	0,60	0,60	1,00	111,56 \pm 36,87 (n = 9)
Placebo	1	0,60	0,40	0,00	1,67 \pm 1,30 (n = 9)
	2	0,70	0,40	0,00	3,90 \pm 3,68 (n = 10)
	3	0,50	0,00	0,00	2,62 \pm 2,34 (n = 8)

Tabla 2. Resumen de los análisis de regresión logística utilizados para predecir la probabilidad de que los estigmas permanezcan cerrados, en función de la fuente de polen y número de polinizaciones en tres intervalos de observación ($t_1 = 10$ min; $t_2 = 20$ min; $t_3 = 30$ min después de la primera polinización). Se incluye el valor del parámetro de la regresión (β), su error estándar, el estadígrafo de Wald y el valor de significancia para cada variable

	Fuente de variación	B	Error estándar	Estadígrafo de Wald (W)	P
t_1	Intercepto	16,048	23,447		
	Fuente de polen	-0,153	0,229	0,449	0,502
t_2	Intercepto	-11,666	23,134	0,254	0,614
	Fuente de polen	0,103	0,228	0,804	0,650
	N° de polinizaciones	0,515	0,441	1,362	0,243
t_3	Intercepto	-41,329	27,3	2,326	0,100
	Fuente de polen	0,374	0,268	1,951	0,162
	N° de polinizaciones	1,173	0,292	16,113	0,000

Figura 2

Producción de semillas en *M. luteus* var. *luteus* bajo distintas fuentes de polen y número de polinizaciones. Las barras representan la media de los grupos y el intervalo un error estándar. Las letras indican el resultado de las comparaciones a posteriori realizadas entre los grupos, se utilizaron letras iguales para designar aquellos grupos que no difieren estadísticamente entre sí



Sistema reproductivo y depresión por consanguinidad

La producción de semillas no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos comparados, exceptuando el contraste entre autopolinización automática y polinización cruzada manual (Tabla 3). Al no existir diferencias entre los tratamientos de autopolinización automática y autopolinización manual se infiere que *M. luteus* var. *luteus* no requiere de un vector de polen para su éxito reproductivo, resultado que difiere de lo observado en otras poblaciones (Medel y col. 2003, Pohl 2003). No obstante, una prueba de poder indica que una muestra de 109 individuos permitiría detectar diferencias entre el tratamiento de autopolinización manual y automática. La relación para determinar el tamaño poblacional necesario para que las diferencias detectadas sean significativas estadísticamente fue calculado con la relación:

$$n = \frac{(2ts)^2}{q^2}$$

donde t representa el nivel de confianza deseado de acuerdo a una distribución de t ; s corresponde a una medida de dispersión de los grupos comparados, en este caso la desviación estándar y q representa el intervalo de confianza de los datos (Milton 1994). En el caso de los datos de producción de semillas, para la comparación entre los tratamientos de autopolinización manual y automática se utilizó un nivel de confianza del 95% ($t = 1,96$), el valor de dispersión está dado por la desviación estándar (en este caso $\sigma = 225,1$) y el intervalo de confianza corresponde a la diferencia en la media de los grupos comparados (79,81 semillas).

Al no existir diferencias entre los grupos de autopolinización (automática y manual) con el grupo polinización cruzada manual se puede determinar que la población de *M. luteus* var. *luteus* estudiada es auto-compatible. Este resultado es congruente con el índice de auto-incompatibilidad estimado, que presentó un valor de 0,73, lo que indica que esta especie es altamente auto-compatible. Al no detectarse diferencias en la producción de semillas entre los tratamientos de polinización manual (autopolinización y cruzada) y el grupo control, se infiere que la cantidad de polen aplicada manualmente en

cada polinización es suficiente para emular la cantidad de polen que las plantas reciben en condiciones naturales (Fig. 3). Porcentualmente, un 47,8% de los frutos formados presentó producción de al menos una semilla. Este porcentaje fue menor en los tratamientos de autopolinización automática (40,75%) y control (43,33%), mientras que este porcentaje aumenta en los grupos de polinización cruzada manual (50,00%) y autopolinización automática (53,13%).

La proporción de semillas que germinaron fue similar en todos los grupos comparados, con una disminución en la media del tratamiento de autopolinización automática, aunque esta diferencia no fue significativa estadísticamente (Tabla 3 y Fig. 3). Estos resultados indican que la germinación de las semillas no es afectada por el tipo de tratamiento de apareamiento utilizado. El 76,5% de los frutos que produjeron semillas presentaron germinación en al menos una de ellas, este porcentaje fue similar en todos los grupos (autopolinización automática: 80,00%; autopolinización manual: 76,47%; polinización cruzada manual: 80,00%; control: 70,50%).

El cálculo del índice de depresión por consanguinidad (δ) evidencia que no existen efectos sobre la producción de semillas ($\delta = 0,267$; Límites de confianza $_{95\%} = -1,589 - 0,618$; $P = 1,000$) ni sobre la germinación de las semillas ($\delta = 0,054$; Límites de confianza $_{95\%} = -2,054 - 0,657$; $P = 1,000$). Estos resultados no permiten rechazar la hipótesis nula $\delta = 0$, por lo que se concluye que ni la producción ni la germinación de las semillas son afectadas por la depresión por consanguinidad.

Tabla 3. (a) Estadística descriptiva de la producción de semillas y proporción de semillas que germinaron de la población estudiada de *M. luteus* var. *luteus*. En paréntesis se indica el tamaño de la muestra de cada tratamiento. (b) Resumen de los contrastes realizados entre los tratamientos para la producción de semillas (diagonal superior de la tabla) y la proporción de semillas que germinaron (diagonal inferior de la tabla). Valores representan el estadígrafo t-Student tra la aleatorización de los datos. En paréntesis se muestra el valor de P.

(a) Producción y germinación de semillas en *M. luteus* var. *luteus*

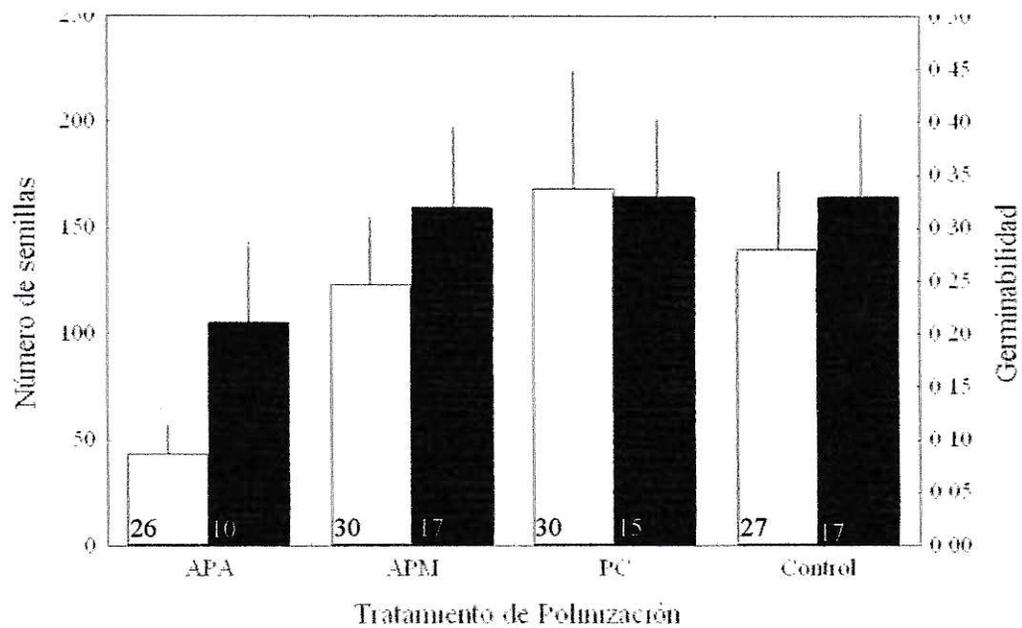
Tratamiento de polinización	Producción de semillas (media \pm 1 EE)	Proporción de germinación (media \pm 1 EE)
Autopolinización automática (APA)	43,6 \pm 21,5 (n = 26)	0,21 \pm 0,07 (n = 10)
Autopolinización manual (APM)	123,4 \pm 35,5 (n = 32)	0,32 \pm 0,07 (n = 17)
Polinización cruzada manual (PC)	168,6 \pm 54,8 (n = 30)	0,33 \pm 0,08 (n = 15)
Control (C)	139,9 \pm 41,4 (n = 27)	0,33 \pm 0,09 (n = 17)

(b) Estadígrafos obtenidos al comparar la producción (sobre la diagonal) y germinación de semillas (bajo la diagonal) entre distintos tratamientos en *M. luteus* var. *luteus*

Tratamientos	APA	APM	PC	C
APA		-1,814 (0,075)	-2,090 (0,037)	-1,970 (0,053)
APM	-1,013 (0,313)		-0,710 (0,497)	-0,302 (0,706)
PC	-1,013 (0,324)	-0,070 (0,945)		-0,422 (0,676)
C	-0,910 (0,365)	-0,050 (0,958)	-0,015 (0,987)	

Figura 3

Producción (barra blanca) y proporción de semillas germinadas (barra negra) en *M. luteus* var. *luteus* obtenidas bajo distintos tratamientos de polinización. APA: autopolinización automática; APM: autopolinización manual; PC: polinización cruzada manual; C: control. Las barras representan la media y la línea sobre estas 1EE; los valores dentro de cada barra indican el tamaño de la muestra para cada tratamiento



Caracterización del ambiente de polinización

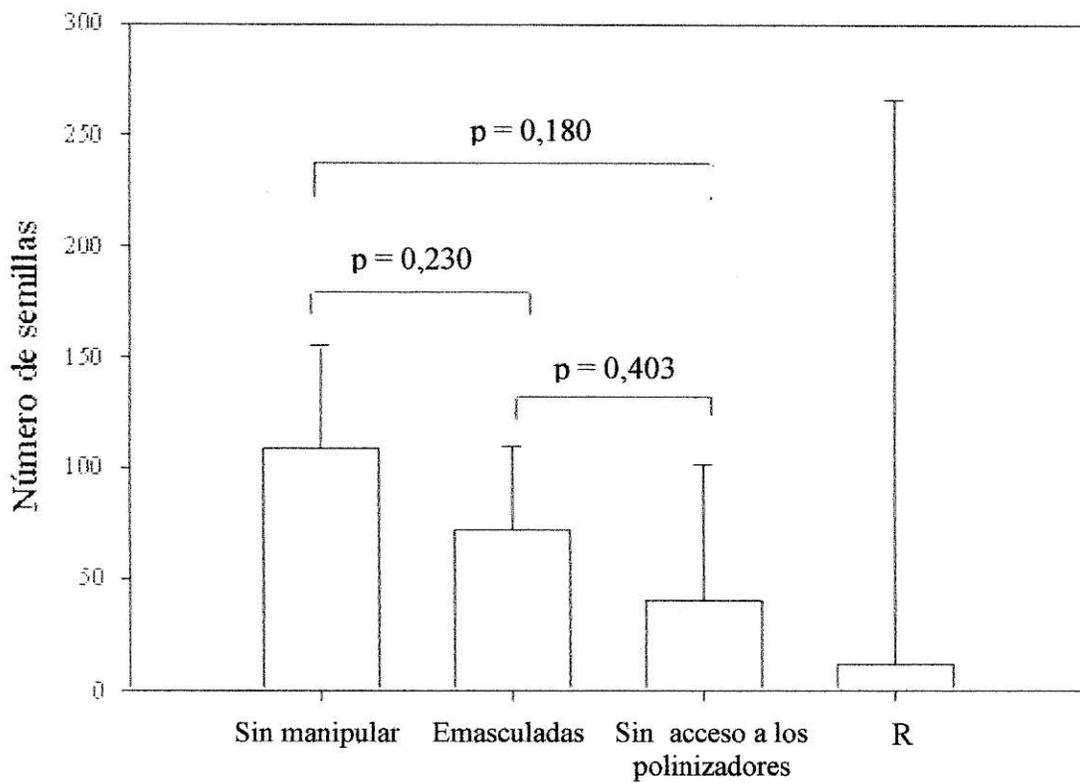
La tasa de visitas a las flores de *M. luteus* var. *luteus* durante el periodo de observación fue bajo ($0,0038 \pm 0,0012$ visitas·flores⁻¹·hora⁻¹, n = 9; media \pm 1EE tras 1028 min de observación) y difiere levemente con otros estudios realizados para la misma especie (Los Pelambres, Chile: $0,0025 \pm 0,0009$ visitas·flores⁻¹·hora⁻¹, Medel y col. 2003). En el sitio de estudio se detectó dos entidades taxonómicas visitando a *M. luteus* var. *luteus*: el abejorro introducido *Bombus terrestris* (Apidae) ($0,0018 \pm 0,0021$ visitas·flores⁻¹·hora⁻¹, n = 4 visitas) e individuos del género *Melanostoma* (Syrphidae) ($0,0035 \pm 0,0056$ visitas·flores⁻¹·hora⁻¹, n = 5 visitas). Al comparar las tasas de visitas con las registradas en otros sitios donde el ensamble de *M. luteus* ha sido estudiado (Medel y col. 2003; Pohl 2003) se observa que en el sitio de estudio hay escasez de polinizadores, al menos en las horas que se realizaron las observaciones. Aunque el bajo número de visitas registradas impide relacionar la preferencia de los polinizadores con los fenotipos observados, *B. terrestris* visitó flores con corolas mayores y guías de néctar pequeñas (área corola: $769,1 \pm 141,1$ mm²; área de guía de néctar: $9,6 \pm 3,3$ mm²; n = 4) en comparación a *Melanostoma* sp. (área corola: $672,4 \pm 87,8$ mm²; área de guía de néctar: $22,5 \pm 11,1$ mm²; n = 5). Con respecto al horario de las visitas, los individuos del género *Melanostoma* sp. sólo fueron observados visitando en las mañanas (entre las 9:00 y 12:00) pero la baja cantidad de visitas impide hacer una inferencia si el fenómeno se trata de un patrón ocasional o si existe efectivamente discriminación temporal en los individuos de esta especie. En todas las visitas observadas los polinizadores produjeron un cierre del estigma (n = 7), aunque no fue posible determinar el estado previo de este. En observaciones efectuadas a un conjunto de flores de distintos individuos el estigma se encontraba abierto el 96,56% de las veces (n = 699 observaciones).

Los tratamientos de emasculación utilizados para inferir la contribución de los distintos modos de fecundación a la producción de semillas presentaron valores similares (Fig. 4), existiendo una mayor producción de semillas en el tratamiento control (109 ± 23 semillas, promedio \pm 1EE, n = 30) en comparación con el grupo de flores emasculadas

(72 ± 19 semillas, $n = 35$) y con aquellas sin acceso a los polinizadores (40 ± 31 semillas, $n = 31$). Estos resultados indican que la contribución de la polinización autógena y alógena a la producción de semillas no difirió en esta población (Fig. 4). Se detectó una reducida contribución de la fecundación autógena a la producción de semillas (aseguramiento reproductivo, R) con alta variabilidad (12 ± 127 semillas, $n = 21$; Fig. 4) y no difirió estadísticamente de los valores obtenidos por remuestreo aleatorio de los datos (Promedio = 12,96 semillas; IC 95% = -70 – 92 semillas; $P > 0,280$ tras 10.000 iteraciones). La gran variabilidad en el estimador de aseguramiento reproductivo sugiere que un porcentaje importante de los individuos utilizados en la muestra presentan un mecanismo autógeno en la producción de semillas.

Figura 4

Producción de semillas bajo tres tratamientos de manipulación floral en individuos de *M. luteus* var. *luteus* y contribución a la producción de semillas de la polinización autógena (aseguramiento reproductivo, R). Las barras representan el promedio de semillas y la línea 2EE. Los distintos tratamientos fueron contrastados entre sí, obteniendo un valor de p ($\alpha = 0,05$)



DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó si en *M. luteus* var. *luteus* la autopolinización es reducida a través de dos mecanismos: el cierre estigmático, un rasgo característico de este género, y a través de la separación espacial de las anteras y el estigma. Luego que los lóbulos estigmáticos de *M. luteus* var. *luteus* son estimulados mecánicamente, éstos se cierran (rango de tiempo de cierre 0,89 - 51,59 seg, Carvallo & Medel 2005) y permanecen en este estado un tiempo variable (rango de tiempo en ausencia de polen: 8 – 2245 seg, Carvallo & Medel 2005). Esta conducta ha sido considerada como una estrategia para evitar la autopolinización ya que los visitantes que contactan el estigma pueden favorecer el traspaso de polen dentro de la misma planta (Faegri & van der Pijl 1971). Sin embargo, los resultados obtenidos muestran que en *M. luteus* var. *luteus* el tiempo que el estigma permanece cerrado no evita la autopolinización, ya que la fuente de polen no da cuenta de la variabilidad en este rasgo. La ausencia de polen genera una mayor proporción de estigmas que permanecen abiertos, por lo que se infiere que la carga de polen que el estigma recibe sería importante en determinar su estado (30%, 9% y 0% de los estigmas permanecen cerrados tras 1, 2 y 3 eventos de polinización placebo, Tabla 3). La tendencia de los estigmas a reabrir cuando no reciben una carga de polen ha sido evidenciada en *Prosboscidea louisianica* (Martyniaceae; Thieret 1976), *Catalpa speciosa* (Bignoniaceae; Stephenson & Thomas 1977), *M. guttatus* (Dudash & Ritland 1991) y *M. aurantiacus* (Fetscher & Kohn 1999). Trabajos con la especie norteamericana *M. aurantiacus* han mostrado que la probabilidad de que los estigmas permanezcan cerrados aumenta con la cantidad de granos de polen depositados en su estigma, ya que el mecanismo de cierre se relacionaría con la cantidad de óvulos fecundados (Fetscher & Kohn 1999). Este no parece ser el caso de *M. luteus* donde se detectó que aumentos en el número de polinizaciones no se reflejan en una conducta diferencial del estigma. Esto se produciría por la fecundación de todo el set de óvulos con la carga de polen que se utilizó en este trabajo (~ 830 granos de polen) como se puede observar al comparar la producción de semillas tras tres eventos de polinización (Fig. 2). Para este trabajo la respuesta del

estigma fue evaluada transcurrido un tiempo desde la polinización (a los 10', 20' y 30' tras la primera polinización), con lo que no fue posible detectar los efectos inmediatos de la fuente de polen sobre el movimiento de los lóbulos estigmáticos. Detectar este tipo de respuesta en el campo es metodológicamente complejo. Sin embargo futuros estudios deberían considerar su medición al menos en condiciones de laboratorio.

La hercogamia en esta especie reduciría la producción de semillas por autofecundación. La distancia hercogámica explica un porcentaje importante de la varianza en la producción de semillas autógamas ($r^2 \sim 30$; $P = 0,044$). Trabajos con otras especies del género *Mimulus* han mostrado una relación positiva entre hercogamia y semillas producidas por alo-polinización (*M. ringens*, Karron y col. 1997), destacándose la importancia en la disminución de este rasgo para permitir la evolución hacia una estrategia de fecundación autógama (Carr y col. 1997). Si bien en *M. luteus* var. *luteus* la hercogamia puede ser considerada como un rasgo que disminuye la autopolinización, la ausencia de efectos deletéreos de la autogamia, al menos para la producción y germinación de semillas, sugiere que la presión selectiva sobre este rasgo es débil, relajando la eficacia de este mecanismo como defensa a la autopolinización. De la misma forma se explica la ineficacia de la conducta estigmática como mecanismo para evitar la autopolinización. Los mecanismos evaluados en este trabajo no parecen ser barreras efectivas contra la autopolinización, lo que se espera por la ausencia de desventajas reproductivas en la producción de semillas y la germinación de estas. Varios autores han mencionado a la autopolinización como un mecanismo reproductivo deletéreo, principalmente por los efectos de la consanguinidad (Schemske 1983; Lande & Schemske 1985; Barrett & Charlesworth 1991; Schultz & Willis 1995; Barrett & Harder 1996) lo que ha servido de sustento a la hipótesis que considera a la conducta estigmática como un rasgo que evita la autopolinización (Faegri & van der Pilj 1971) sin existir aún evidencia empírica en ese sentido (Fetscher & Kohn 1999; Richardson 2004, este trabajo). En *M. luteus* var. *luteus* no se detectó depresión por consanguinidad, al menos a nivel de producción y germinación de semillas ($\delta = 0,267$ y $\delta = 0,054$, respectivamente).

Al igual que en trabajos anteriores, se evidencia que *M. luteus* var. *luteus* es una especie autocompatible (Medel y col. 2003, Pohl 2003). Las especies autocompatibles

presentan más oportunidades de presentar cambios evolutivos desde estrategias de alo-a auto-polinización (Charlesworth & Charlesworth 1987; Lloyd & Schoen 1992), porque en ellas los efectos de la depresión por consanguinidad han sido reducidos (Lande & Schemske 1985; Charlesworth & Charlesworth 1987; Lloyd & Schoen 1992; Husband & Schemske 1996). Estudios efectuados en el género *Mimulus* han mostrado que no existen efectos de consanguinidad en etapas posteriores del ciclo de vida tales como el número de flores y biomasa de las plantas (*M. guttatus*, Carr & Eubanks 2002; Ivey y col. 2004).

El tipo de estrategia reproductiva que presenta una especie depende del ambiente de polinización (Kalisz & Vogler 2003; Moeller & Geber 2005). La producción de semillas en la población estudiada sería independiente de la presencia de polinizadores (Fig. 2 y 4). Estudios anteriores concluían que *M. luteus* requiere de un vector de polen para su éxito reproductivo (Medel y col. 2003; Pohl 2003), sin embargo los resultados de este trabajo no son concluyentes en este sentido. Por un lado, se detectó que las flores aisladas de polinizadores son capaces de producir semillas aunque el aseguramiento reproductivo no presentó valores estadísticamente significativos (Fig. 4). Esto supone que *M. luteus* var. *luteus* presenta un mecanismo autógamo de producción de semillas. Por otro lado, las flores emasculadas presentaron una producción de semillas similar a las flores utilizadas como control, lo que indica que existió alopolinización. Sin embargo la actividad de polinizadores durante el transcurso del estudio fue escasa. Aunque no se evaluó la presencia de polinizadores nocturnos, en estudios anteriores se ha descartado su presencia (Medel y col. 2003). Si la alopolinización que fue detectada es producto de un vector biótico, las visitas pudieron ocurrir fuera del intervalo de observación, principalmente al amanecer donde el picaflor cordillerano *Oreotrochilus leucopleurus* (Trochilidae) centra sus visitas (Medel y col. 2003; Pohl 2003). Otro mecanismo que explicaría la alopolinización es la anemofilia, que ha demostrado ser importante en poblaciones de plantas presentes en vegas (Arroyo y col. 1983), aunque es preciso un estudio específico que determine el mecanismo de polinización en esta especie, al menos para la población estudiada. Una disminución en la abundancia de polinizadores sería una barrera reproductiva importante en *Mimulus* disminuyendo la producción de semillas (Ramsey y col. 2003). Esto se puede observar al comparar distintas poblaciones de *M.*

luteus estudiadas, donde se detecta una relación positiva entre la abundancia de distintos taxa de polinizadores con la producción de semillas (Localidad de Los Pelambres $335,2 \pm 15,9$ semillas, $n = 300$ frutos, 4 taxa de polinizadores observados [Medel y col. 2003]; El Yeso $\sim 800 \pm \sim 50$ semillas; $n = 157$ frutos, 11 taxa de polinizadores observados [Pohl 2003]; Volcán San José 62 ± 10 semillas, $n = 70$ frutos. 2 taxa de polinizadores observados, este estudio). Una gran cantidad de argumentos hipotéticos apuntan a que los cambios de estrategia reproductiva de una especie son causados principalmente por la fluctuación del ensamble de polinizadores (Herrera 1995, 1996, Gómez 2002, Kalisz & Vogler 2003; Herrera 2005). La consideración de este tipo de variación en la biología reproductiva de plantas es un fenómeno relativamente novedoso y que ha adquirido connotación en los últimos años (Herrera 1995, 2005; Moeller & Geber 2005). Futuros estudios deben determinar el contexto ecológico en que surge la reproducción autógama en poblaciones de *Mimulus*.

CONCLUSIONES

1. La proporción de estigmas que permanecen cerrados después de la polinización no responde de manera diferencial a la fuente de polen (auto- y alo- polen) por lo que se descarta la conducta estigmática como un mecanismo que evita la autopolinización
2. Se detectó una relación negativa y estadísticamente significativa entre hercogamia y producción de semillas por autogamia ($r^2 \sim 30\%$), sugiriendo que este mecanismo puede contribuir a evitar la autopolinización
3. En *M. luteus* var. *luteus* no existen efectos deletéreos de la autofecundación sobre la producción ($\delta = 0,267$) y germinación de semillas ($\delta = 0,054$). Esta especie es altamente autocompatible y al menos la población estudiada no requiere de polinizadores para su éxito reproductivo.
4. En la población estudiada se observó escasez de polinizadores. La contribución de la alo- y auto-fecundación a la producción de semillas no difirió, se infiere que la contribución a la producción de semillas esta determinada por estos dos modos de reproducción (auto- y alo-gamia). Sin embargo, los mecanismos de fecundación no fueron dilucidados. Experimentos de emasculación descartan a la apomixis como un mecanismo que contribuya a la producción de semillas en esta especie.

BIBLIOGRAFÍA

- Aizen, M.A. & Basilio, A.** 1995. Within and among flower sex-phase distribution in *Alstroemeria aurea* (Alstroemeriaceae). *Canadian Journal of Botany* 73: 1986-1994
- Arroyo, M.T.K., Armesto, J. & Primack, R.** 1983. Tendencias altitudinales y latitudinales en mecanismos de polinización en la zona andina de los Andes templados de Sudamérica. *Revista Chilena de Historia Natural* 56: 159-180
- Ashman, T-L., Knight, T.M., Steets, J.A., Amarasekare, P., Burd, M., Campbell, D.R., Dudash, M.R., Johnston, M.K., Mazer, S.J., Mitchell, R.J., Morgan, M.T. & Wilson, W.G.** 2004. Pollen limitation of plant reproduction: ecological and evolutionary causes and consequences. *Ecology* 85: 2408-2421
- Awadalla, P. & Ritland K.** 1997. Microsatellite variation and evolution in *Mimulus guttatus* species complex with contrasting mating systems. *Molecular Biology and Evolution* 14: 1023-1034
- Barrett, S.C.H.** 1988. Evolution of breeding systems in *Eichhornia*, a review. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 741-760
- Barrett, S.C.H.** 2002. The evolution of plant sexual diversity. *Nature Genetics* 3: 274-283
- Barrett, S.C.H.** 2003. Mating strategies in flowering plants: the outcrossing-selfing paradigm and beyond. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 358: 991-1004

Barrett, S.C.H. & Charlesworth, D. 1991. Effect of a change in the level of inbreeding on the genetic load. *Nature* 352: 522-524

Barrett, S.C.H. & Harder, L.D. 1996. Ecology and evolution of plant mating. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 73-79

Botto-Mahan, C., Pohl, N. & Medel, R. 2004. Nectar guide fluctuating asymmetry does not predict female fitness in *Mimulus luteus*. *Plant Ecology* 170: 1-6.

Byers, D.L. & Waller, D.M. 1999. Do plant populations purge their genetic load? effects of population size and mating history on inbreeding depression. *Annual Review of Ecology and Systematics* 30: 479-513.

Campbell, D.R., Waser, N.K., Price, M.V., Lynch, E.A., & Mitchell, R.J. 1991. Components of phenotypic selection: pollen export and flower corolla width in *Ipomopsis aggregata*. *Evolution* 45: 1458-1467

Campbell, D.R., Waser, N.M. & Price, M.V. 1994. Indirect selection of stigma position in *Ipomopsis aggregata* via a genetically correlated trait. *Evolution* 48: 55-68

Carr, D.E. & Fenster, C.B. 1994. Levels of genetic variation and covariation for *Mimulus* (Scrophulariaceae) floral traits. *Heredity* 72: 606-612

Carr, D.E. & Eubanks, M. 2002. Inbreeding alters resistance to insect herbivory and host plant quality in *Mimulus guttatus* (Scrophulariaceae). *Evolution* 56: 22-30

Carr, D.E., Fenster C.B. & Dudash, M.R. 1997. The relationship between mating-system characters and inbreeding depression in *Mimulus guttatus*. *Evolution* 51: 363-372

- Carvallo, G. & Medel, R.** 2005. The modular structure of the floral phenotype in *Mimulus luteus* var. *luteus* (Phrymaceae). *Revista Chilena de Historia Natural*. En prensa
- Castric, V. & Vekemans, X.** 2004. Plant self incompatibility in natural populations: a critical assessment of recent theoretical and empirical advances. *Molecular Ecology* 13: 2873-2879
- Charlesworth, B.** 1990. Optimization models, quantitative genetics, and mutation. *Evolution* 44: 520-538
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B.** 1979. Selection on recombination in a multi-locus system. *Genetics* 91: 575-580
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B.** 1987. The effects of investment in attractive structures on allocation to male and female function in plants. *Evolution* 41: 948-968
- Charlesworth, D. & Charlesworth, B.** 1990. Inbreeding depression with heterozygote advantage and its effects on selection for modifiers changing in the outcrossing rate. *Evolution* 44: 870-888
- Chittka, L., Thomson, J.D. & Waser, N.M.** 1999. Flower constancy, insect psychology, and plant evolution. *Naturwissenschaften* 86: 361-377
- Darwin, C.** 1876. *Cross and self-fertilization of plants*. Murray, London
- Dudash, M.R. & Ritland, K.** 1991. Multiple paternity and self fertilization in relation to floral age in *Mimulus guttatus* (Schrophulariaceae). *American Journal of Botany* 78: 1746-1753

Faegri, K. & van der Pijl, L. 1971. The principles of pollination ecology. Pergamon Press

Fetscher, E. & Kohn, J.R. 1999. Stigma behavior in *Mimulus aurantiacus* (Schrophulariaceae). American Journal of Botany 86: 1130-1135

Fisher, R.A. 1930. The genetical theory of natural selection. Oxford, UK

Galen, C. & Cuba, J. 2001. Down the tube: pollinators, predators, and the evolution of flower shape in the alpine skypilot, *Polemonium viscosum*. Evolution 55: 1963-1971

Gómez, J.M. 2002. Generalización en las interacciones entre plantas y polinizadores. Revista Chilena de Historia Natural 75: 105-116

Gregorius, H.R., Ziehe, M & Ross, M.D. 1987. Selection caused by self-fertilization. I. Four measures of self-fertilization and their effects on fitness. Theoretical Population Biology 31: 91-115

Harder, L.D. & Barret, S.C.H. 1996. Pollen dispersal and mating patterns in animal-pollinated plants. En D.G. Lloyd y S.C.H. Barrett (Eds.) Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants. pp 140-190. Chapman-Hall, New York

Herlihy, C.R. & Eckert, C.G. 2002. Genetic cost of reproductive assurance in a self-fertilizing plant. Nature 416: 320-323

Herrera, C.M. 1995. Microclimate and individual variation in pollinators: flowering plants are more than their flowers. Ecology 76: 1516-1524

Herrera, C.M. 1996. Floral traits and plant adaptation to insect pollinators: a devil's advocate approach. *En* D.G. Lloyd y S.C.H. Barrett (Eds.) *Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants*. pp 65-87. Chapman-Hall, New York

Herrera, C.M. 2005. Plant generalization on pollinators: species property or local phenomenon? *American Journal of Botany* 92: 13-20

Holsinger, K.E. 1991. Mass-action models of plant mating systems: the evolutionary stability of mixed mating systems. *American Naturalist* 138: 606-622

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

Hood, G.M. 2005. Pop Tools, versión 2.6.6. testing version 1.1. Programa disponible en <http://www.cse.csiro.au/poptools>

Husband, B. & Schemske, D.W. 1996. Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants. *Evolution* 50: 54-70

Ivey, C.T., Carr, D.E. & Eubanks M.D. 2004. Effects of inbreeding in *Mimulus guttatus* on tolerance to herbivory in natural environments. *Ecology* 85: 567-574

Jadwiszczak, P. 2003. Rndom projects: an application for randomization and bootstrap testing, version 1.1. Programa disponible en <http://pjadw.trpod.com>

Kalisz, S., & Vogler, D.W. 2003. Benefits of autonomous selfing under unpredictable pollinator environments. *Ecology* 84: 2928-2942

- Karron, J.D. Jackson, R. T., Thumser, N.M., Schlicht, S.L.** 1997. Outcrossing rates of *Mimulus ringens* genets are correlated with anther-stigma separation. *Heredity* 79:365-370
- Keller, L.F. & Waller, D.M.** 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 230-241
- Kimura, M.** 1959. Conflict between self-fertilization and outbreeding in plants. *Annual Report of the Natural Institute of Japan* 9: 87-88
- Kohn, J.R. & Barrett, S.C.H.** 1994. Pollen discounting and the spread of a selfing variant in tristylous *Eichhornia paniculata*: evidence from experimental populations. *Evolution* 48: 1576-1594
- Lande, R. & Schemske, D.** 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. I. Genetic models. *Evolution* 39: 24-40
- Lively, C.M. & Lloyd, D.G.** 1990. The cost of biparental sex under individual selection. *American Naturalist* 135: 489-500
- Lloyd, D.G.** 1979. Some reproductive factors affecting the selection of self-fertilization in plants. *American Naturalist* 113: 67-79
- Lloyd, D.G. & Schoen, D.J.** 1992. Self- and cross-fertilization in plants. I. Functional dimensions. *International Journal of Plant Sciences* 153: 358-369
- Lunau, K.** 2002. The evolution of flowering plants, flower visitors and interactions between them – a look at flower biology with G. Von Wahlert. *Bonner Zoologist Monographs* 50:109-136

Medel, R. 2000. Assessment of parasite-mediated selection in a host-parasite system in plants. *Ecology* 81: 1554-1564

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

Milton, J.S. 1994. Estadística para biología y ciencias de la salud. pp 519. 2ªEd. McGraw-Hill.

Mitchell, R.J., Shaw, R.G., Waser, N.M. 1998. Pollinator selection, quantitative genetics and predicted evolutionary responses of floral traits in *Penstemon centranthifolius* (Schrophulariaceae). *International Journal of Plant Sciences* 159: 331-337

Moeller, D.A. & Geber, M.A. 2005. Ecological context of evolution of self-pollination in *Clarkia xantiana*: population size, plant communities and reproductive assurance. *Evolution* 59: 786-799

Morgan, M.T., Wilson, W.G & Knight T.M. 2005. Plant population dynamics, pollinator foraging, and the selection of self-fertilization. *American Naturalist* 166:169-183

Müller, H. 1883. The fertilization of flowers. Macmillan, London

Pohl, N. 2003. Importancia de la guía de néctar en la interacción entre herbivoría y polinización en *Mimulus luteus*. Tesis de Magíster, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile

- Ramsey, J., Bradshaw Jr, H.D. & Schemske, D.W.** 2003. Components of reproductive isolation between the monkeyflowers *Mimulus lewisii* and *M. cardinalis* (Phrymaceae). *Evolution* 57:1520-1534
- Richardson, S.C.** 2004. Benefits and costs of floral visitors to *Chilopsis linearis*: pollen deposition and stigma closure. *Oikos* 107: 363-375
- Ritland, K. & Leblanc, M.** 2004. Mating system of four inbreeding monkeyflower (*Mimulus*) species reveals using 'progeny-pair' analysis of highly informative microsatellite markers. *Plant Species Biology* 19: 149-157
- Ruiz-Zapata, T. & Arroyo, M.T.K.** 1978. Plant reproductive ecology of a secondary deciduous tropical forest in Venezuela. *Biotropica* 10: 221-230
- Schemske, D.W.** 1983. Breeding system and habitat effects on fitness components in three neotropical *Costus* (Zingiberaceae). *Evolution* 37: 523-539
- Schemske, D.W. & Lande, R.** 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. *Evolution* 39: 41-52
- Schemske, D.W. & Bradshaw Jr, H.D.** 1999. Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 11910-11915
- Schneider, E.L. & Buchanam, J.D.** 1980. Morphological studies of the Nymphaeaceae. XI. The floral biology of *Nelumbo pentapetala*. *American Journal of Botany* 67: 182-193
- Schoen, D.J. & Lloyd, D.G.** 1992. Self- and cross-fertilization in plants. III. Methods for studying modes and functional aspects of self-fertilization. *International Journal of Plant Sciences* 153: 381-393

Schultz, S. & Willis, J.H. 1995. Individual variation in inbreeding depression: the roles of inbreeding stories and mutation. *Genetics* 141: 1209-1223

Sprengel, C.K. 1996. Discovery of the secret of Nature in the structure and fertilization of flowers. *En* D.G. Lloyd y S.C.H. Barrett (Eds.) *Floral biology: studies on floral evolution in animal-pollinated plants*. pp 3 - 43. Chapman-Hall, New York

Stanton, M.L. 1987. Reproductive biology of petal color variants in wild populations of *Raphanus sativus*. I. Pollinator response to color morphs. *American Journal of Botany* 74: 178-187

Stebbins, G.L. 1974. *Flowering plants: evolution above the species level*. Belknap, Cambridge, Massachussets

Stephenson, A.G. & Thomas, W.W. 1977. Diurnal and nocturnal pollination of *Catalpa speciosa* (Bignoniaceae). *Systematic Botany* 2: 190-199

Sutherland, S.D. & Vickery Jr., R.K. 1992. On the relative importance of floral color, shape and nectar rewards in attracting pollinators to *Mimulus*. *Great Basin Naturalist* 53: 107-117

Sweigart, A.A. & Willis, J.H. 2003. Patterns of nucleotide diversity in two species of *Mimulus* are affected by mating system and asymmetric introgression. *Evolution* 57: 2490-2506

Takebayashi, N. & Delph, L.F. 2000. An association between floral trait and inbreeding depression. *Evolution* 54: 840-846

Thieret, J.W. 1976. Floral biology of *Prosboscidea louisianica* (Martyniaceae). *Rhodora* 78: 169-179

Thompson, J.D. & Dommee, B. 2000. Morph-specific patterns of variation in stigma height in natural populations of distylous *Jasminum fruticans*. *New Phytologist* 148: 303-314

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

Waser, N.M. 1978. Competition for hummingbird pollination and sequential flowering in two Colorado wildflowers. *Ecology* 59: 934-944

Waser, N.M. & Price, M.V. 1981. Pollinator choice and stabilizing selection for flower color in *Delphinium nelsonii*. *Evolution* 35: 376-390

Withlock, M.C. 1995. Variance-induced peak shifts. *Evolution* 45: 252-259