



UNIVERSIDAD DE CHILE-FACULTAD DE CIENCIAS-ESCUELA DE POSTGRADO

Efectos aditivos y no aditivos de la selección mediada por polinizadores en la herbácea *Erythranthe lutea*

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

Daniela Andrea Salazar Rodríguez

Director de Tesis: Dr. Rodrigo Medel
Co-Directora de Tesis: Dr. Carezza Botto

Octubre de 2018
Santiago - Chile

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

DANIELA ANDREA SALAZAR RODRÍGUEZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 4 de octubre de 2018.

Director de Tesis:
Dr. Rodrigo Medel

Co-Director de Tesis
Dra. Carezza Botto

Comisión de Evaluación de la Tesis
Dra. Alejandra González

Dra. Mary Kalin

BIOGRAFÍA



Mi nombre es Daniela Andrea Salazar Rodríguez, nací el día 18 de diciembre de 1989. Realicé mis estudios de educación básica y media en el colegio Inmaculada Concepción de Peñaflor. Ya durante la enseñanza media, comprendí que mi mayor motivación era la comprensión de la naturaleza, por lo cual, el año 2009 ingresé a la carrera de Biología ambiental con mención en medio ambiente en la Universidad de Chile. Dentro de ésta pude conocer a los profesores Rodrigo Medel y Carezza Botto, quienes me permitieron desarrollar diversas habilidades en el laboratorio de Ecología Evolutiva y me orientaron cuando decidí ingresar al programa de magíster en Ciencias Biológicas en la Facultad de Ciencias el año 2015. Es así como participé desde hace 4 años en proyectos de investigación vinculados a la especie estudio de esta tesis y al lugar en donde ésta se desarrolló (FONDECYT 1120155 y 1150112).

Hoy cierro esta etapa, con múltiples aprendizajes, agradecimientos y nuevas inquietudes, y con la convicción de estar avanzando hacia dónde mayores aportes puedo realizar.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer profundamente el apoyo de mi tutor, el profesor Rodrigo Medel, por su paciente compañía, incondicional apoyo y por el sincero vínculo generado a lo largo de este proceso. A mi cotutora, Carezza Botto, quién desde hace al menos 6 años ha acompañado mi formación académica y humana, siendo para mí, constante fuente de inspiración a través de su propio ejemplo. Agradezco a mis revisoras, Alejandra González y Mary Kalin por su honesto interés y por las preguntas y comentarios realizados a este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, por generar y mantener el ambiente laboral en el que me encantaría desenvolverme siempre. En especial muchas gracias a Gabriel E., Mildred E., Constanza C., Paloma Y., Francisco Z., Pachy Y., Toti C. y Consu S. por acompañarme en los fríos y deslumbrantes amaneceres de montaña. A Catina G., por sus infinitos aportes a esta tesis y a mi vida.

Infinitas gracias a mis padres, porque sin su amor y soporte, esta tesis no habría visto la luz. A mis hermanos, por ser lo mejor que me ha tocado en el multiverso, y a mis abuelitos, por seguir siendo sólo amor durante éstos 28 años.

A mis amigos de la Facultad, por acompañarme a través de todos los procesos vividos durante esta etapa y ser constante fuente de felicidad y regalones. A Pedro F., por las increíbles conversaciones y su incondicional apoyo.

A mis amigos eternos: Jorge D., Nicole S., Paulina Z., Javier M., Paula C. y Angela P., por mantenerse en mi vida y recordarme lo importante de reír.

No puedo dejar de agradecer a La Comunidad Cano Gallego, quienes entregaron su apoyo y buena voluntad para la realización de esta investigación, y al proyecto FONDECYT 1150112 (IP: Dr. Rodrigo Medel) que permitió el financiamiento de esta tesis.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| Lista de Tablas | iv |
| Lista de Figuras | v |
| Resumen | vi |
| Abstract | viii |
| Introducción | 1 |
| Objetivos | 4 |
| Métodos | 5 |
| Historia natural y sitio de estudio | 5 |
| Diseño del estudio | 8 |
| Ensamble de polinizadores y tasas de visita | 9 |
| Deposición efectiva de polen | 10 |
| Rasgos florales | 12 |
| Limitación de polen | 13 |
| Análisis de selección fenotípica | 14 |
| Resultados | |
| Ensamble polinizador y tasas de visita | 17 |
| Deposición efectiva de polen | 19 |
| Rasgos florales | 21 |

| | |
|---|----|
| Análisis de varianza entre ensambles polinizadores y la producción de semillas | 22 |
| Limitación de polen | 24 |
| Análisis de selección fenotípica | 25 |
| Análisis de covarianza entre los ensambles polinizadores y los rasgos florales | 27 |
| Discusión | 29 |
| Conclusiones | 34 |
| Bibliografía | 36 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1: Composición de las especies de flora acompañante por año. | 6 |
| Tabla 2: Composición del ensamble polinizador y tasas de visita registradas en <i>Erythranthe lutea</i> en los períodos 2016-2017. | 18 |
| Tabla 3: Efectividad de deposición de polen en una visita única (D_v) y por unidad de tiempo (D_t). | 20 |
| Tabla 4: Valores promedio de los rasgos florales. | 21 |
| Tabla 5: Resumen del modelo ANOVA de dos vías que describe el efecto de los distintos ensambles polinizadores sobre la producción de semillas. | 22 |
| Tabla 6: Diferenciales y gradientes de selección estandarizada para los rasgos florales medidos en cada parcela. La variable respuesta corresponde a la producción de semillas | 26 |
| Tabla 7: Efectos de abejas y picaflores sobre el número de semillas para ambos años, utilizando como covariables los rasgos florales: área corola, área guía, largo tubo floral. | 27 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Número de semillas en cada uno de los tratamientos (P+A+) (P+A-) (P-A+) y (P-A-) en ambos períodos de muestreo | 23 |
| Figura 2: Promedio de semillas por planta y tratamiento en cada año. | 24 |

RESUMEN

La medida en que los caracteres florales evolucionan bajo selección mediada por polinizadores ha sido ampliamente estudiada en la literatura. Sin embargo, la relación entre selección y efectividad de los polinizadores es un tema poco estudiado. El presente trabajo busca identificar y cuantificar las fuerzas selectivas ejercidas por abejas y colibríes sobre *Erythranthe lutea*, una planta herbácea altoandina de Chile central. Una de las principales preguntas en este estudio es evaluar si la selección mediada por polinizador sigue el principio del polinizador más eficiente de Stebbins. Para hacerlo, examinamos la selección putativa sobre tres rasgos florales de *E. lutea* durante dos años consecutivos a través de la función sexual femenina. Para examinar posibles efectos aditivos y no aditivos de los polinizadores, implementamos cuatro tratamientos en un diseño factorial de 2 x 2 usando Picaflores (P) y Abejas (A) como factores principales. De esta forma, probamos la selección mediada por polinizadores en los siguientes tratamientos: P+A+, P+A-, P-A+, P-A-. Nuestros resultados indican que el polinizador más eficiente fue el abejorro exótico *Bombus terrestris*, una de las especies responsables de la mayor fuerza selectiva impuesta por abejas. En particular, las abejas promueven la reproducción de flores con corolas más grandes en el período 2016. Sin embargo, durante el período 2017 se detectaron efectos no aditivos, lo que indica que el efecto de las abejas estaba supeditado a la presencia de picaflores y viceversa, lo que impide la evaluación de los efectos independientes. Si bien *E. lutea* parece estar evolucionando según el principio de

Stebbins, es necesario demostrar que el *fitness* ganado después de la especialización de los rasgos florales excede al costo en *fitness* asociado a la pérdida de otros polinizadores menos eficientes. La observación de que *B. terrestris* fue el polinizador más eficiente en el ensamble de polinizadores sugiere que los polinizadores introducidos pueden impulsar nuevos y rápidos procesos de adaptación floral. En consecuencia, comprender el impacto evolutivo de los polinizadores exóticos puede ayudar al diseño de políticas de conservación frente al intercambio biótico y a la homogeneización a gran escala.

ABSTRACT

The extent to which floral characters evolve under pollinator-mediated selection has been extensively studied in the literature. However, the relationship between selection and pollinator effectiveness is a less understood subject. The present study aims to identify and quantify the selective force imposed by bees and hummingbirds upon *Erythranthe lutea*, a high Andean herbaceous plant from central Chile. A major question in this study is to evaluate whether pollinator-mediated selection follows the Stebbins' principle of the most efficient pollinator. In doing so, we examined putative selection upon three flower traits of *E. lutea* during two consecutive years through the female sex function. To examine potential additive or nonadditive pollinator effects, we set four treatments in a 2 x 2 factorial design using hummingbirds (H) and bees (B) as main factors. In this way, we tested for pollinator mediated selection in the following treatments: H+B+, H+B-, H-B+, H-B-. Our results indicate that the most efficient pollinator was the exotic bumblebee *Bombus terrestris*, one of the responsible species of the higher selective force imposed by bees. In particular, bees promoted the reproduction of flowers with large-sized corollas in the 2016 period. However, during the 2017 nonadditive effects were detected, indicating that the effect of bees were contingent to the presence of bees and viceversa, which prevented the assessment of independent effects. While *E. lutea* seems to be evolving under Stebbins' principle, it is necessary to demonstrate that the gained fitness after

floral traits specialization exceeds the fitness cost associated to the loss of other less efficient pollinators. The observation that *B. terrestris* was the most efficient pollinator in the pollinator assemblage suggests that introduced pollinators can drive new and rapid floral adaptation processes. In consequence, understanding the evolutionary impact of exotic pollinators can help to the design of conservation policies in the face of biotic exchange and broad scale homogenization.

INTRODUCCIÓN

Las angiospermas y su estrecha interacción con los polinizadores es un tópico que ha sido ampliamente tratado en la literatura. Actualmente se sabe que cerca del 87,5% de las plantas con flores necesitan de un vector de polinización, ya sea insecto u otro animal (Ollerton y col. 2011). Esta interacción se identifica como mutualista, debido a que ambos participantes se benefician al interactuar. Por un lado, los animales consiguen alimento o materiales para construir sus refugios y por el otro, las plantas, en la mayoría de los casos, la reproducción. Ya en 1793, Sprengel comienza a describir esta estrecha relación existente entre los fenotipos florales y sus grupos polinizadores. Posteriormente Darwin (1862) desarrolla la idea que la combinación de ciertas características florales daría cuenta del tipo de polinizador que la visita. De estas ideas surge el término de 'síndrome de polinización', tras observar que ciertos rasgos florales especiales, están asociados con la atracción y utilización de un grupo específico de animales como polinizadores (Delpino 1873-1874). Este concepto permite predecir los visitantes florales de una especie, a través de la observación de rasgos florales como: tiempo de floración, color, aroma, forma, posición floral, tipo de recompensa y guías de néctar (Faegri y van der Pijl 1979). Sin embargo, el concepto recibió algunas críticas, debido a que no describe con éxito la diversidad de fenotipos

florales existentes ni predice con exactitud los polinizadores de las diferentes especies vegetales (Ollerton y col. 2009). Por otro lado, supone que los sistemas de polinización son sistemas especializados, a pesar de su naturaleza generalizada y flexible (Waser y col. 1996; Ollerton 1996). Una manera de conciliar ambas perspectivas fue reconocer que los polinizadores se encuentran agrupados en grupos funcionales o ensambles acotados taxonómicamente (e.g., moscas de lengua larga, abejas colectoras de néctar) (Fenster y col. 2004) y que estos grupos ejercen fuerzas selectivas similares, generando así correlaciones entre los rasgos florales (e.g., tubos de corola largos y estrechos, polen presentado de una cierta manera, o cantidades y concentraciones particulares de néctar) (Waser y col. 1996; Armbruster y col. 1999, 2000; Armbruster 2004).

Los diferentes polinizadores de una especie de planta difieren en su efectividad de polinización, es decir, en su aporte a la reproducción de la planta, debido a dos características del visitante floral; una morfológica, asociada a la capacidad de carga de polen que puede acarrear cada individuo, y otra de comportamiento, relacionada con cuántas veces los individuos visitan legítimamente la planta en un período de tiempo. La efectividad de los visitantes en el proceso de polinización determinará la fuerza de la selección mediada por polinizadores (Benkman 2013; Vanhoenacker y col. 2013; Sletvold y Agren 2014). A pesar que la selección de rasgos florales mediada por polinizadores ha sido ampliamente evaluada, su relación con la efectividad de los diversos polinizadores ha sido menos estudiada en poblaciones naturales (Sletvold y Agren 2016). El resultado

evolutivo común tanto para plantas como para sus polinizadores, es la eficiencia en la explotación de lo que es un recurso valioso o crítico para cada uno. Una manifestación común es el oportunismo y la flexibilidad por parte de los polinizadores hacia las plantas, y viceversa (Kearns y col. 1998). Sin embargo, dado que la selección es un proceso que resulta en un cambio cuantitativo, las características florales serán moldeadas por los polinizadores que visitan más frecuentemente y transfieren polen de manera más efectiva a las plantas (Stebbins 1970).

Por otro lado, se ha observado en sistemas de polinización mixtos (i.e., distintos ensambles de polinizadores en un mismo sistema, como por ejemplo abejas y picaflores) que las diferencias en las preferencias florales (e.g., preferencia por un rango determinado de la distribución de cierto rasgo floral) podrían otorgar la oportunidad de divergencia adaptativa de los rasgos florales, a través de la selección mediada por polinizadores (Schemske y Bradshaw 1999). Es mediante este enfoque de sistemas de polinización mixtos, que el presente trabajo busca dilucidar si existe selección divergente sobre los rasgos florales de la herbácea alto-andina *Erythranthe lutea* (ex *Mimulus luteus*) en una población de Chile central. Estudios previos en esta especie han encontrado diferencias en las preferencias florales ejercidas por cada grupo funcional; los insectos prefiriendo guías de néctar y corolas de mayor tamaño mientras que los picaflores preferirían flores con guías y corolas pequeñas (Medel y col. 2003). Esta tesis busca

responder si la población cumple con el principio del polinizador más eficiente de Stebbins, analizando la eficiencia de cada grupo funcional visitante de *E. lutea*.

Basado en los resultados obtenidos por Medel y col. 2003, este trabajo también busca evaluar si las preferencias florales de los polinizadores de esta especie están ejerciendo fuerzas selectivas divergentes en la población, lo cual podría reflejarse en la selección ejercida por cada grupo funcional.

Objetivo general

Identificar y cuantificar las fuerzas selectivas ejercidas por cada grupo funcional (Abejas y Picaflor) sobre los rasgos florales de *E. lutea*, con el fin de: a) evaluar si los efectos selectivos de ambos grupos son independientes (aditivos) o interactivos (no aditivos) entre sí, y b) evaluar si la selección resultante sobre el fenotipo floral de *E. lutea* se corresponde con la idea del polinizador más eficiente.

Objetivos específicos

1. Reconocer a los polinizadores de la población de *E. lutea* más eficientes en términos de depósito de polen.
2. Cuantificar la fuerza selectiva de cada grupo funcional sobre los rasgos florales de *E. lutea*; área corola, largo tubo floral y área de la guía de néctar y determinar si estos efectos son aditivos o no aditivos.

3. Identificar qué tipo de fuerza evolutiva (disruptiva-estabilizadora) está ejerciendo cada grupo funcional.
4. Analizar si la población responde al principio del polinizador más eficiente de Stebbins.

MATERIALES Y MÉTODOS

Historia natural y sitio de estudio

Erythranthe lutea (Phrymaceae), también conocida como berro amarillo, es una herbácea anual o perenne que crece cercana a flujos de agua y humedales de Chile entre los 0 y 3650 m s.n.m y entre los 29°S y 45°S (Von Bohlen 1995). Esta herbácea presenta flores hermafroditas, solitarias, con una corola amarilla compuesta de cinco pétalos lobulados fusionados en la base y en la mayoría de los casos, presenta una mancha roja en el lóbulo inferior, que actúa como guía de néctar (Medel y col. 2003; Pohl y col. 2006). Estudios previos determinaron que esta guía no refleja en el espectro UV (Botto-Mahan y col. 2004). El período de floración-fructificación ocurre desde mediados de diciembre hasta fines de febrero, con un máximo de floración entre mediados de enero y febrero. Las flores permanecen abiertas por 3,6 días cuando han sido polinizadas y 5,9 cuando no lo han sido (Medel y col. 2003). Esta especie ha sido descrita como auto-compatible, sin embargo, estudios previos muestran que la autopolinización

produce un menor número de frutos por planta y reduce la producción de semillas comparado con lo obtenido por polinización cruzada. Por lo tanto, para asegurar una polinización efectiva, los vectores de polinización son imprescindibles (Medel y col. 2003; Pohl y col. 2006; Carvallo y Medel 2010).

Este trabajo se realizó en una población alto-andina de *Erythranthe lutea* durante dos años consecutivos (temporada de verano de 2016 y 2017). La población está ubicada en Juncal (32°51'S, 70°08'W, 2398 m s.n.m., V región, Chile), 80 km al noreste de Santiago. La vegetación presente corresponde al piso vegetacional subandino (Hoffmann y col. 1998). Este sitio, es cubierto completamente de nieve al menos 3 meses al año, durante la temporada de invierno.

Delimitamos las parcelas de trabajo a través de un cerco que permitió mantener excluido el ganado presente en el sitio (e.g., cabras, caballos y vacas). Fuera de la parcela hubo otras especies de plantas en flor que podrían compartir polinizadores con *E. lutea* (Tabla 1), sin embargo, al ser *E. lutea* la planta más representada en el sitio, es poco probable que cambios en la abundancia relativa de la flora acompañante hayan influido en la tasa de visita de *E. lutea* entre años.

Tabla 1: Composición de las especies de flora acompañante por año. Las cruces indican las especies que se encontraban en flor en el sitio en cada año en el período en que se desarrolló el estudio.

| Especies | 2016 | 2017 |
|---------------------------|------|------|
| <i>Asteraceae</i> | | |
| <i>Achorium intybus</i> | | x |
| <i>Baccharis linearis</i> | | x |

| | | |
|------------------------------------|---|---|
| <i>Baccharis sagittalis</i> | X | X |
| <i>Chuquiraga oppositifolia</i> | X | |
| <i>Mutisia subulata</i> | X | |
| <i>Solidago chilensis</i> | X | X |
| <i>Tanacetum parthenium</i> | X | X |
| Alstroemeriaceae | | |
| <i>Alstroemeria pallida</i> | | X |
| Apiaceae | | |
| <i>Conium maculatum</i> | | X |
| Brassicaceae | | |
| <i>Brassica campestris</i> | X | X |
| Convolvulaceae | | |
| <i>Convolvulus arvensis</i> | X | X |
| Ephedraceae | | |
| <i>Ephedra chilensis</i> | | X |
| Escalloniaceae | | |
| <i>Escallonia sp</i> | X | X |
| Fabaceae | | |
| <i>Medicago sativa</i> | X | X |
| <i>Trifolium sp</i> | | X |
| Geraniaceae | | |
| <i>Geranium berteroanum</i> | X | |
| Juncaceae | | |
| <i>Juncus balticus</i> | X | |
| Lamiaceae | | |
| <i>Stachys philippiana</i> | | X |
| Plantaginaceae | | |
| <i>Plantago sp</i> | | X |
| Scrophulariaceae | | |
| <i>Verbascum thapsus</i> | X | X |
| <i>Veronica anagallis-aquatica</i> | | X |
| <i>Calceolaria thyrsiflora</i> | | X |
| Solanaceae | | |
| <i>Schizanthus hookerii</i> | X | X |
| <i>Solanum crispum</i> | X | X |
| Tropaeolaceae | | |
| <i>Tropaeolum polyphyllum</i> | X | X |

Diseño del estudio

Juncal es una población natural de *E. lutea*, donde sus polinizadores pueden agruparse en dos ensambles; picaflores (P) y abejas (A), los cuales difieren en sus horarios de forrajeo. Los picaflores están activos cuando la luz no llega directamente al parche, es decir, al amanecer y al anochecer. Mientras que las abejas comienzan su forrajeo cuando el sol llega al sitio de estudio (Medel y col. 2003). Esto permitió separar los efectos selectivos de cada ensamble en diferentes parcelas, a través de los siguientes tratamientos:

- Parcela sin picaflores (P-A+): área totalmente cerrada con malla de gallinero de 30 mm, para permitir exclusivamente el libre acceso de las abejas, pero no el de las aves.
- Parcela sin abejas (P+A-): área completamente cerrada con mosquiteros (no permite paso de abejas). La malla utilizada en el techo se retiraba al atardecer y permanecía abierta hasta que el sol llegaba al parche.
- Parcela control (P+A+): área control con postes de soporte y malla limitante para ganado, pero sin mosquiteros ni malla de gallinero. Esto permitió el libre acceso a picaflores y abejas.
- Parcela sin polinizadores (P-A-): área cerrada de manera permanente con mosquiteros para impedir la entrada de cualquier especie de polinizador. Las semillas formadas en esta parcela corresponden a autopolinización de *E. lutea*.

Ensamble de polinizadores y tasas de visita

Registramos la identidad y el número de visitas de cada visitante de *E. lutea* desde el 12 al 22 de enero de 2016 y desde el 21 de diciembre al 2 de enero de 2017). Un número variable de observadores bien entrenados (8-9 observadores en cada período) registraron las visitas en un parche, fuera del área cercada para los tratamientos descritos anteriormente, de un tamaño tal que permitiera observar adecuadamente todas las flores contenidas en él e identificar a sus visitantes. Las visitas se registraron mediante observaciones focales de una hora en días soleados, desde las 07:00 hasta las 12:00 y de 16:00 a 21:00 en un total de 104h 23min en 2016 y 138h 47min en 2017. Una visita se consideró válida cuando el polinizador contactaba una flor e ingresaba en el tubo floral. Estimamos la tasa de visita por flor por hora por especie de polinizador para cada observación focal de una hora y luego calculamos la tasa de visita promedio por especie por año. Además, comparamos los ensambles de polinizadores de ambos años usando el índice de similitud proporcional (Schemske y Bradshaw 1999; Kay y Schemske 2003):

$$PS = 1 - \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n |P_{ai} - P_{bi}|$$

donde, P_{ai} y P_{bi} representan la proporción de la tasa total de visitas realizadas por la especie de polinizador i en los años a y b , respectivamente. El índice varía de 0 a 1, donde cero indica baja similitud entre los años y uno una alta similitud.

Para tener una estimación de la variabilidad del índice, calculamos el intervalo de confianza utilizando 10000 iteraciones de bootstrap.

Deposición efectiva de polen

Con el objetivo de evaluar la intensidad de polinización o efectividad en el depósito de polen por cada visitante floral, medimos el número promedio de granos de polen depositados en estigmas vírgenes (Silander y Primack 1978). Un estigma virgen es aquel en el que no se ha depositado polen (ya sea por autopolinización o debido a polinización cruzada) (Gross 2005). Para asegurar que el estigma fuera virgen, al atardecer removimos las corolas de todas las flores del parche (un parche completamente abierto, diferente de los que se encuentran bajo tratamiento), para en la mañana siguiente trabajar con las flores, todas recién abiertas. Se recolectaron los estigmas visitados por primera vez, registrando la identidad del polinizador y la fecha y hora de la visita. Los estigmas recién cortados se almacenaron en tubos Eppendorf con etanol al 70% para asegurar la fijación de los granos de polen en la superficie del estigma y para evitar la formación de tubos polínicos. La recolección de los estigmas visitados se efectuó desde las 5:30 am, hora en la que comienzan a llegar los primeros polinizadores diurnos, hasta mediodía. No recolectamos estigmas pasado el mediodía, porque a esa hora comenzaba a aumentar el viento en el sitio, lo que

redujo la certeza de que el estigma se mantuviera virgen o tuviera polen depositado por autopolinización.

En el laboratorio, los estigmas recolectados se ablandaron durante 14 h en una solución de NaOH 2 M en un nuevo tubo Eppendorf, y se dejaron lavando con agua destilada durante otras 14 h (rango 12-16 h) en un tubo diferente. Los estigmas se tiñeron con anilina azul al 0,1% en una solución tampón de fosfato 0,07 M ($\text{Na}_2 \text{HPO}_4$) a pH 9 durante 48 h (1 ml de solución en un nuevo tubo Eppendorf). Finalmente, usando pinzas, se sumergió el estigma varias veces en un tubo con 1 ml de agua destilada para eliminar el exceso de tinte y se repitió el procedimiento hasta que no saliera tintura (Kearns e Inouye 1993). Después de eso, se dispuso el estigma en un portaobjetos, se cubrió con un cubreobjetos y fue fijado para su almacenamiento. Cuando el estigma ya se encontraba fijado, se contaron los granos de polen utilizando un microscopio binocular ZEISS modelo Primo Star. Este procedimiento se realizó para ambos años.

Para evaluar el rendimiento de cada polinizador, seguimos la nomenclatura de Ne'eman y col. (2010) y calculamos la efectividad de deposición de polen tras una única visita (D_v). Esto es, el número de granos de polen contados del procedimiento anterior. Por otro lado, se calculó la efectividad de deposición de polen por unidad de tiempo (D_t) multiplicando la tasa de visita promedio por especie, (D_v) y r , siendo r la proporción de flores que tenían sus estigmas receptivos en el parche de observación. Como todas las mediciones fueron realizadas en flores recién abiertas, la fracción de estigmas receptivos al

momento de la observación (r) fue siempre 1. Para efectos de este estudio, el índice D_t resume los dos componentes más importantes del principio de Stebbins, la frecuencia de visitas y la efectividad del polinizador. Además, calculamos D_t general por año, medido como la sumatoria de las D_t de cada especie por año. En los casos en que alguna especie no presentara D_v algún año, pero sí tasa de visita, se usó el D_v del año alternativo para estimar el Depósito de polen por unidad de tiempo (D_t).

Rasgos florales

Seleccionamos aleatoriamente 100 plantas cada año en cada una de las parcelas experimentales: (P-A+), (P+A-), (P+A+) y (P-A-). En cada planta, marcamos y recolectamos 3 flores, a las que les medimos: tamaño de la corola (mm^2), área de la guía de néctar (mm^2) y largo del tubo floral (mm). Las flores que sufrieron florivoría y robo de néctar no fueron consideradas en el estudio. El tamaño de la corola y la guía de néctar, han sido descritos previamente como rasgos relevantes para los insectos y aves polinizadores en la especie focal (Medel y col. 2003). Estos dos rasgos fueron estimados tomando fotos perpendiculares al plano de la flor. Cada imagen incluía una regla graduada como escala para convertir una medida lineal en píxeles, y así, obtener las áreas usando el programa ImageJ (disponible en <http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>). Las mediciones del largo del tubo floral se realizaron en el campo usando un pie de metro (precisión de 0,01 mm). Para cada variable morfológica, utilizamos el valor

promedio de las tres flores por planta. Para evaluar si hubo diferencias en el efecto de los ensambles polinizadores sobre la producción de semillas, se realizó un análisis de varianza para cada año (análisis realizado en R Core Team 2018) y se graficó el número de semillas producidas en cada parcela por año.

Limitación de polen

El principio de Stebbins establece que la evolución de la flor hacia el polinizador más eficiente puede ocurrir cuando el polen está limitado en el ambiente, por lo que realizamos los siguientes tratamientos en 50 flores de diferentes plantas en ambos años:

(1) Suplemento de polen (S): las flores abiertas se polinizaron a mano hasta dejarlas saturadas con una mezcla de polen de anteras de diferentes plantas que estaban separadas por al menos 10 m de la planta focal.

(2) Control (C): las flores abiertas se dejaron sin manipular para ser polinizadas naturalmente. Utilizamos 50 flores de diferentes plantas del análisis de selección para el segundo tratamiento.

Después del período de fructificación, todas las cápsulas marcadas se recogieron para el posterior recuento de semillas en el laboratorio. Los tratamientos se usaron para estimar el índice de limitación de polen: $L = 1 - (C/S)$. Los valores cercanos a cero representan ausencia de limitación del polen en las poblaciones y valores cercanos a uno indican una alta limitación de polen (Larson y Barrett 2000). Además, calculamos el intervalo de confianza usando 10000 iteraciones

de bootstrap (N = 50). Estudios previos han descrito una relación positiva entre el nivel de limitación de polen y la fuerza de la selección fenotípica, lo que sugiere que la atracción a los polinizadores puede ser más importante cuando las plantas se encuentran con limitación de polen (Totland 2001; Hansen y Totland 2006; Trunschke y col. 2017).

Análisis de selección fenotípica

Para evaluar si los rasgos florales estaban bajo selección mediada por polinizadores y si esa selección varía entre años, se estimaron los diferenciales y gradientes de selección estandarizados en cada una de las parcelas en tratamiento. Las variables predictoras incluidas en el análisis fueron: tamaño de la corola, tamaño de la guía del néctar y longitud del tubo de la corola. Cada variable predictoras se estandarizó a promedio = 0 y varianza = 1, para expresar el cambio fenotípico en unidades de desviación estándar y hacer que los resultados fuesen comparables entre años y rasgos. La variable respuesta de nuestro análisis fue el *fitness* relativo femenino estimado como el número promedio de semillas por planta. Al mismo tiempo que los rasgos eran medidos, recolectamos cápsulas de la planta medida y luego en el laboratorio, utilizando el contador de semillas Elmor C1, contamos el número de semillas por cápsula. La estimación del *fitness* relativo por planta (w_i) se relativizó utilizando el cociente entre el *fitness* de la planta (W_i) y el *fitness* promedio de la población ($w_i = W_i / W_{\text{promedio}}$).

La selección total actuando sobre cada rasgo (i.e., la selección que actúa directamente sobre el rasgo más la selección que actúa indirectamente a través de rasgos correlacionados) se estimó usando el diferencial de selección direccional estandarizado (s'). Esta medida se calculó utilizando las pendientes de regresiones lineales simples entre cada carácter estandarizado y el *fitness* relativo (Fenster y Ritland 1994; Alexandersson y Johnson 2002). Luego, estimamos la selección directa e indirecta que actúa sobre los rasgos a través de gradientes de selección estandarizados lineales y no lineales. Los gradientes de selección lineal se calcularon utilizando el modelo lineal multivariado propuesto por Lande y Arnold (1983):

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

donde w_i es el *fitness* relativo, α es el intercepto, β_i representa la pendiente de la relación parcial entre el rasgo z_i y w_i , y ε corresponde al error. El valor de β_i indica la magnitud y dirección de la selección direccional actuando sobre cada rasgo, donde los valores positivos indican que la selección promueve valores mayores de la distribución del rasgo y los negativos promueven los valores inferiores del rasgo. Los gradientes de selección no lineal describen el tipo de selección no lineal que actúa sobre cada rasgo (i.e., selección disruptiva o estabilizadora) y sobre la correlación entre dos rasgos. Estos gradientes (γ_{ii} y γ_{ij}) se estimaron a partir de los coeficientes de segundo orden en:

$$w = \alpha + \sum_{i=1}^n \beta_i z_i + \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n \gamma_{ii} z_i^2 + \sum_{i=1}^n \sum_{i \neq j}^n \gamma_{ij} z_i z_j$$

donde γ_{ij} corresponde a la curvatura de la relación entre el rasgo i y w . Los valores positivos indican una concavidad ascendente y, en consecuencia, representan una selección disruptiva. Los valores negativos resultan de una concavidad hacia abajo y representan una selección estabilizadora. El término γ_{ij} representa la selección actuando sobre la correlación de los rasgos i y j . Los gradientes de selección lineal se estimaron sólo a través del modelo lineal multivariado porque cuando el carácter se aparta de una distribución normal multivariada, z_i y z_i^2 podrían estar inter-correlacionados en el modelo cuadrático (Lande y Arnold 1983). La significación estadística de los gradientes lineales y no lineales se obtuvo a partir de los valores de p del análisis de regresión múltiple. Todos los análisis se realizaron en el programa R (R Core Team 2018).

Para determinar si los efectos selectivos de cada ensamble polinizador eran efectos aditivos, se realizó un análisis de covarianza entre los distintos ensambles y los rasgos evaluados para cada año de muestreo.

RESULTADOS

Ensamble polinizador y tasas de visita

La composición del ensamble polinizador y las tasas de visita para ambos años se muestran en la Tabla 2. Registramos 14 especies de visitantes florales en 2016 y 12 especies en 2017. La composición del ensamble fue relativamente similar entre años con un 65,5% de especies compartidas entre años. Sin embargo, tras incluir las tasas de visitas el índice de similitud proporcional fue de 0,25 (IC: 0,02-0,52), lo que indica una baja similitud entre los años. El visitante con la tasa de visitas más alta varió entre años, siendo en 2016 el esfíngido *Hyles annei* (52,3%) y en 2017 el abejorro *Bombus terrestris* (46,31%) (ver Tabla 2). La presencia de *H. annei* en el ensamble polinizador durante el primer año fue una novedad, ya que no se tenían registros previos de su visita en *E. lutea*.

Tabla 2: Composición del ensamble polinizador y tasas de visita promedio (\pm DS) registradas en *Erythranthe lutea* en el período 2016-2017.

| Especies | Tasas de visita (visitas*flor ⁻¹ *h ⁻¹) x 100 | |
|-----------------------------------|--|--|
| | 2016 | 2017 |
| Hymenoptera | | |
| <i>Bombus dahlbomii</i> | 0,18 \pm 1,05 (1,12%) | 0 |
| <i>Bombus terrestris</i> | 2,06 \pm 5,46 (12,59%) | 2,67 \pm 7,31 (46,31%) |
| <i>Centris chilensis</i> | 0,85 \pm 3,12 (5,20%) | 0,42 \pm 1,67 (7,26%) |
| <i>Centris nigerrima</i> | 3,23 \pm 7,16 (19,74%) | 0,32 \pm 1,54 (5,60%) |
| <i>Corynura chloris</i> | 0 | 0,01 \pm 0,07 (0,19%) |
| <i>Hypodynerus sp</i> | 0,01 \pm 0,04 (0,02%) | 0,02 \pm 0,10 (0,26%) |
| <i>Megachile saulcyi</i> | 1,33 \pm 3,61 (8,14%) | 0,03 \pm 0,13 (0,51%) |
| <i>Megachile semirufa</i> | 0,06 \pm 0,53 (0,39%) | 0,04 \pm 0,25 (0,64%) |
| <i>Svastrides melanura</i> | 0,01 \pm 0,11 (0,07%) | 0 |
| Lepidoptera | | |
| <i>Hyles annei</i> | 8,55 \pm 22,12 (52,26%) | 0 |
| <i>Pseudolucia sp</i> | 0 | 0,01 \pm 0,03 (0,07%) |
| <i>Tatochila sp</i> | 0,02 \pm 0,17 (0,12%) | 0,03 \pm 0,17 (0,47%) |
| <i>Vanessa carye</i> | 0,01 \pm 0,09 (0,07%) | 0,01 \pm 0,04 (0,09%) |
| Diptera | | |
| <i>Scaeva melanostoma</i> | 0,01 \pm 0,05 (0,03%) | 0,01 \pm 0,12 (0,2%) |
| <i>Bombylidae</i> | 0,02 \pm 0,23 (0,13%) | 0 |
| Apodiformes | | |
| <i>Oreotrochilus leucopleurus</i> | 0,02 \pm 0,11 (0,11%) | 2,21 \pm 6,03 (38,4%) |

Valores en negrita en las columnas indican los dos principales visitantes florales de *Erythranthe lutea* para cada año. Entre paréntesis se muestra el porcentaje de visitas aportado por cada especie.

Deposición de granos de polen

La deposición de granos de polen después de una visita única (D_v) y la efectividad de deposición por unidad de tiempo (D_t) se muestran en la Tabla 3. En el primer año, obtuvimos estigmas con polen depositado por siete especies diferentes. Los valores más altos de D_v fueron el abejorro nativo, *Bombus dahlbomii* ($345,75 \pm 404,72$ granos de polen/estigma) y el abejorro exótico *Bombus terrestris* ($158,06 \pm 260,22$ granos de polen/estigma). Sin embargo, los valores más altos de D_t fueron *Centris nigerrima* (6,49) y *Bombus terrestris* (3,26). Mientras tanto, en el segundo año, colectamos estigmas con polen depositado por tres especies diferentes, siendo *Centris chilensis* la que depositó más granos de polen en *E. lutea* ($315,62 \pm 658,18$ granos de polen/estigma), pero después de calcular el D_t , *Oreotrochilus leucopleurus* (5,23) y *Bombus terrestris* (5,10) fueron los polinizadores más efectivos en 2017.

Tabla 3: Efectividad de deposición de polen en una visita única (D_v) y por unidad de tiempo (D_t).

| Especies | Efectividad de deposición por visita única (D_v) | | Efectividad de deposición por unidad de tiempo (D_t) | | Mean |
|-----------------------------------|--|---------------------------|--|-------------|-------------|
| | 2016 | 2017 | 2016 | 2017 | |
| Hymenoptera | | | | | |
| <i>Bombus dahlbomii</i> | 345,8 ± 404,7 (8) | - | 0,64 | - | 0,64 |
| <i>Bombus terrestris</i> | 158,1 ± 260,2 (126) | 191,3 ± 292,7 (39) | 3,26 | 5,10 | 4,18 |
| <i>Centris chilensis</i> | 103,2 ± 207,1 (32) | 315,6 ± 658,2 (13) | 0,88 | 1,32 | 1,1 |
| <i>Centris nigerrima</i> | 201,1 ± 334,8 (101) | - | 6,49 | 0,64* | 3,57 |
| <i>Megachile saulcyi</i> | 112,4 ± 246,6 (52) | - | 1,50 | 0,03* | 0,77 |
| <i>Megachile semirufa</i> | - | 37,0 ± 25,0 (3) | 2,22* | 1,48 | 1,85 |
| <i>Svastrides melanura</i> | 38,4 ± 33,4 (7) | - | 0,01 | - | 0,01 |
| Lepidoptera | | | | | |
| <i>Hyles annei</i> | 1,3 ± 6,2 (44) | - | 0,11 | - | 0,11 |
| <i>Vanessa carye</i> | 0 (1) | 0 (1) | 0 | 0 | 0 |
| Diptera | | | | | |
| <i>Bombylidae</i> | 4 (1) | - | 0,08 | - | 0,08 |
| Apodiformes | | | | | |
| <i>Oreotrochilus leucopleurus</i> | - | 236,5 ± 433,1 (48) | 0,05* | 5,23 | 2,64 |

Guiones en las columnas D_v indican falta de estigmas para el conteo de polen, en la mayoría de los casos debido a la baja abundancia o ausencia del polinizador para tal año. Asteriscos en la columna D_t indican que las estimaciones fueron calculadas con los valores de D_v del año alternativo. Paréntesis en los valores de D_v corresponden al número de estigmas analizados. En negrita se muestran los valores más altos para las columnas D_v y D_t .

Rasgos florales

En la parcela control (P+A+), sólo el tamaño de la corola mostró diferencias significativas entre años, mientras que en la parcela sin picaflores (P-A+), todos los valores promedio de los rasgos fueron significativamente mayores en 2016 que en 2017. En la parcela sin abejas (P+A-) sólo la longitud del tubo floral y el tamaño de la guía de néctar mostraron diferencias significativas entre años. En la parcela sin polinizadores (P-A-), todos los rasgos mostraron diferencias entre años. Todos los rasgos de flores medidos fueron más variables entre plantas que dentro de ellas. (Tabla 4).

Tabla 4: Valores promedio de los rasgos florales, estadígrafos t de Student.

Grados de libertad = 98,199 en todos los contrastes. DE = Desviación estándar.

| Parcela (N=100) | Rasgo floral | 2016 | 2017 | Prueba de T | 2016 | 2017 |
|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------|-------------------|------------------|---------------------|---------------------|
| | | Promedio (DE) | Promedio (DE) | | $F_{98,199}$ (p) | $F_{98,199}$ (p) |
| Control (P+A+) | Largo tubo (mm) | 35,773 (2,234) | 35,472 (2,021) | -1 | 0,013 | <0,001 |
| | Área guía néctar (mm ²) | 61,868 (16,287) | 60,107 (19,239) | -0,699 | 0,011 | <0,001 |
| | Área corola (mm ²) | 892,216 (168,763) | 942,342 (127,050) | 2,373* | 0,028 | <0,001 |
| Sin picaflores (P-A+) | Largo tubo (mm) | 32,709 (2,523) | 30,718 (1,722) | -6,518*** | 0,005 | 0,166 |
| | Área guía néctar (mm ²) | 35,094 (15,108) | 28,838 (11,388) | -3,306** | 0,004 | 0,135 |
| | Área corola (mm ²) | 814,13 (232,05) | 745,803 (222,241) | -2,126* | 0,005 | 0,211 |
| Sin abejas (P+A-) | Largo tubo (mm) | 34,631 (2,247) | 35,694 (2,478) | 3,177** | 0,043 | 0,018 |
| | Área guía néctar (mm ²) | 84,106 (24,507) | 76,519 (14,464) | -2,666** | 0,058 | 0,017 |
| | Área corola (mm ²) | 912,965 (205,416) | 874,392 (131,888) | -1.580 | 0,061 | 0,019 |
| Sin polinizadores (P-A-) | Largo tubo (mm) | 33,362 (2,138) | 32,129 (2,435) | -3,805*** | 0,005 | 0,121 |
| | Área guía néctar (mm ²) | 45,982 (14,709) | 33,537 (15,816) | -5,762*** | 0,004 | 0,132 |
| | Área corola (mm ²) | 968,254 (260,889) | 839,267 (288,624) | -3,315*** | 0,005 | 0,148 |

† p < 0,1; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Análisis de varianza entre ensambles polinizadores y la producción de semillas

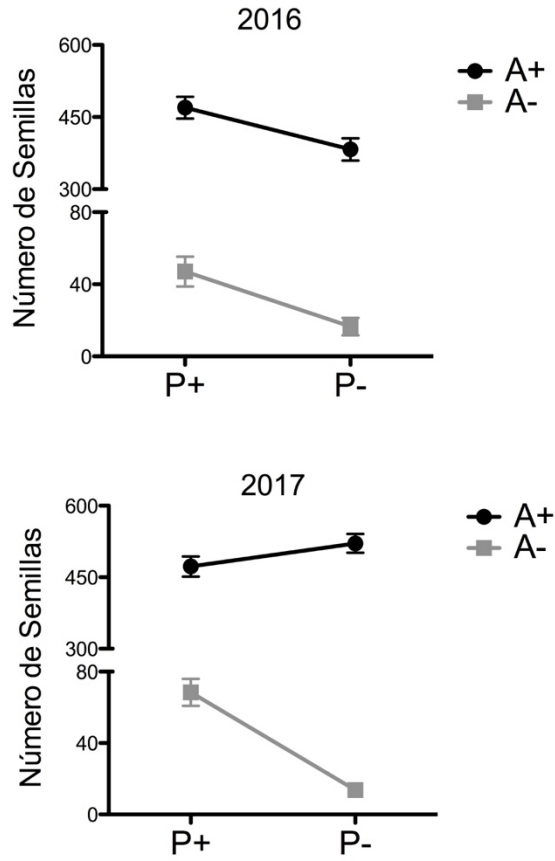
Para el año 2016, los ensambles de abejas y picaflor mostraron un efecto significativo sobre el *fitness* de la planta. Sin embargo, no se observó un efecto interactivo entre ambos ensambles (Tabla 5). Por otro lado, para 2017, el ensamble de abejas mostró ser significativo en el *fitness* de la planta, pero también lo es la interacción entre ambos ensambles. Al graficar la producción de semillas para cada uno de los tratamientos, el efecto no aditivo para 2017 se observa con claridad (Figura 1)

Tabla 5: Resumen del modelo ANOVA de dos vías que describe el efecto de los distintos ensambles polinizadores sobre la producción de semillas.

| | Ensamble polinizador | g.l. | SS | MS | F | <i>p</i> |
|------|----------------------|------|----------|----------|---------|------------|
| 2016 | Abejorro | 1 | 15555859 | 15555859 | 543,999 | < 0,001*** |
| | Picaflor | 1 | 344872 | 344872 | 12,060 | < 0,001*** |
| | Abejorro x Picaflor | 1 | 79576 | 79576 | 2,783 | 0,096† |
| | Residuales | 396 | 11323772 | 28595 | | |
| 2017 | Abejorro | 1 | 20773541 | 20773541 | 913,023 | < 0,001*** |
| | Picaflor | 1 | 936 | 936 | 0,0412 | 0,839 |
| | Abejorro x Picaflor | 1 | 266153 | 266153 | 11,698 | < 0,001*** |
| | Residuales | 396 | 9009983 | 22752 | | |

† $p < 0,1$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

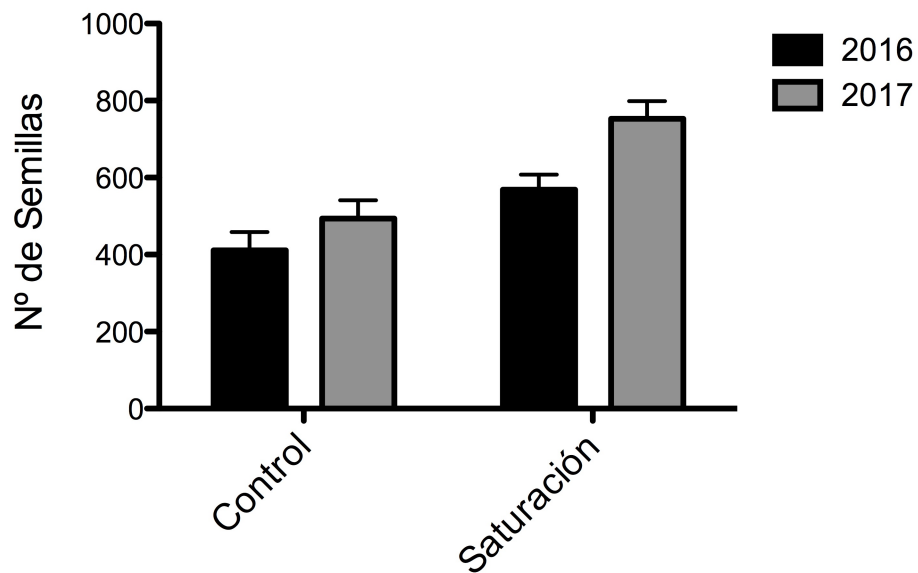
Figura 1: Número de semillas en cada uno de los tratamientos (P+A+) (P+A-) (P-A+) y (P-A-) en ambos períodos de muestreo.



Limitación de polen

El número de semillas obtenidas para cada tratamiento y año se muestran en la Figura 2. El índice de limitación de polen fue $L = 0,28$ (CI = 0,07-0,46) para 2016, y $L = 0,34$ (CI = 0,19-0,48) para 2017. Estos resultados indican que en general la limitación de polen fue baja, aunque mayor en el segundo año del estudio, aumentando en un 21,4%.

Figura 2: Promedio de semillas por planta y tratamiento en cada año.



Análisis de selección fenotípica

En la Tabla 6 se muestran los diferenciales y gradientes de selección estandarizados para cada parcela por año. En la parcela control (P+A+) el diferencial de selección para el tamaño de la corola mostró que la selección total favorecería corolas de mayor tamaño. Este resultado es consistente con los resultados obtenidos para los gradientes de selección lineal sobre este rasgo en ambos períodos (2016-2017). Por su parte, el largo del tubo floral también mostró un gradiente direccional significativo, pero favoreciendo los tubos florales más cortos. En la parcela sin picaflores (P-A+) sólo el largo del tubo floral mostró una selección direccional positiva en el período 2017. En la parcela sin polinizadores (P-A-) se observó un diferencial de selección para el área de la corola, lo que se refleja en ambos años en los gradientes de selección de áreas de corola de menor tamaño. Además, para el año 2017, se observó selección hacia áreas de guía de néctar de mayor tamaño en esta parcela. No se observó ningún gradiente cuadrático o correlacional significativo para ninguna parcela ni año, lo que sugiere que no hubo selección no lineal significativa sobre la población estudiada.

Tabla 6: Diferenciales y gradientes de selección estandarizada para los rasgos florales medidos en cada parcela.

La variable respuesta corresponde a la producción de semillas.

| Parcela | Año | Rasgo i | S _i ' ± EE | β _i ' ± EE | γ _{ii} ' ± EE | Rasgo j | |
|------------------------------------|------|-------------------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | | | | | Área corola | Área guía néctar |
| | | | | | | γ _{ij} ' ± EE | γ _{ij} ' ± EE |
| Control (P+A+) | 2016 | Largo tubo (mm) | - 0,014 ± 0,049 | - 0,066 ± 0,051 | 0,068 ± 1,156 | - 0,046 ± 0,064 | - 0,040 ± 0,048 |
| | | Área corola (mm ²) | 0,116 ± 0,048* | 0,141 ± 0,051** | - 0,622 ± 0,410 | - | - 0,020 ± 0,040 |
| | | Área guía néctar (mm ²) | - 0,018 ± 0,049 | - 0,040 ± 0,049 | 0,402 ± 0,210 | - | - |
| | 2017 | Largo tubo (mm) | - 0,020 ± 0,045 | - 0,130 ± 0,056* | - 1,221 ± 2,09 | - 0,025 ± 0,087 | - 0,083 ± 0,054 |
| | | Área corola (mm ²) | 0,083 ± 0,045† | 0,177 ± 0,057** | 0,734 ± 0,713 | - | - 0,029 ± 0,053 |
| | | Área guía néctar (mm ²) | - 0,048 ± 0,045 | - 0,072 ± 0,057 | 0,265 ± 0,158 | - | - |
| Sin picaflores (P+A-) | 2016 | Largo tubo (mm) | - 0,029 ± 0,062 | - 0,103 ± 0,081 | - 2,957 ± 2,107 | 0,121 ± 0,148 | 0,098 ± 0,187 |
| | | Área corola (mm ²) | 0,050 ± 0,061 | 0,046 ± 0,105 | 0,463 ± 1,101 | - | - 0,069 ± 0,274 |
| | | Área guía néctar (mm ²) | 0,043 ± 0,061 | 0,073 ± 0,117 | - 0,700 ± 0,814 | - | - |
| | 2017 | Largo tubo (mm) | 0,067 ± 0,037 | 0,133 ± 0,045** | - 0,484 ± 1,285 | 0,121 ± 0,172 | - 0,031 ± 0,161 |
| | | Área corola (mm ²) | - 0,035 ± 0,038 | - 0,112 ± 0,096 | - 1,835 ± 1,204 | - | 0,064 ± 0,243 |
| | | Área guía néctar (mm ²) | - 0,033 ± 0,038 | 1,07E-4 ± 0,092 | 0,119 ± 0,724 | - | - |
| Sin abejas (P+A-) | 2016 | Largo tubo (mm) | 0,153 ± 0,178 | 0,140 ± 0,185 | - 10,290 ± 5,972 | 0,318 ± 0,409 | - 0,016 ± 0,362 |
| | | Área corola (mm ²) | 0,058 ± 0,178 | 0,247 ± 0,325 | - 4,398 ± 4,95 | - | 0,915 ± 0,926 |
| | | Área guía néctar (mm ²) | - 0,041 ± 0,179 | - 0,270 ± 0,320 | - 3,615 ± 4,174 | - | - |
| | 2017 | Largo tubo (mm) | 0,063 ± 0,111 | 0,0586 ± 0,115 | - 1,260 ± 3,001 | 0,026 ± 0,177 | - 0,089 ± 0,154 |
| | | Área corola (mm ²) | - 0,142 ± 0,111 | - 0,178 ± 0,145 | - 1,291 ± 2,264 | - | 0,217 ± 0,291 |
| | | Área guía néctar (mm ²) | - 0,0479 ± 0,111 | 0,053 ± 0,148 | - 2,150 ± 1,707 | - | - |
| Autopolinización (P-A-) | 2016 | Largo tubo (mm) | - 0,332 ± 0,296 | - 0,357 ± 0,375 | - 24,336 ± 13,179 | 1,088 ± 0,726 | - 1,319 ± 0,666 |
| | | Área corola (mm ²) | - 0,729 ± 0,288* | - 1,682 ± 0,466*** | 1,903 ± 5,093 | - | 0,025 ± 0,962 |
| | | Área guía néctar (mm ²) | - 0,221 ± 0,297 | 0,951 ± 0,346** | - 0,913 ± 3,421 | - | - |
| | 2017 | Largo tubo (mm) | - 0,113 ± 0,253 | 0,297 ± 0,334 | 6,343 ± 7,048 | 0,0279 ± 1,203 | - 0,150 ± 1,365 |
| | | Área corola (mm ²) | - 0,395 ± 0,250 | - 2,101 ± 0,886* | - 8,109 ± 14,711 | - | - 1,376 ± 4,154 |
| | | Área guía néctar (mm ²) | - 0,243 ± 0,252 | 1,406 ± 0,848 | - 0,593 ± 12,244 | - | - |

† p < 0,1; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001

Análisis de covarianza entre los ensambles polinizadores y los rasgos florales

En el período 2016, las principales fuentes de variación para la producción de semillas fueron los ensambles de abejas, picaflores, el rasgo floral área de corola, y la interacción de ambos ensambles con este rasgo floral.

En cambio, para el 2017, la variación en el número de semillas estuvo dado sólo por el ensamble de abejas y por el efecto interactivo entre ambos ensambles (Tabla 7).

Tabla 7: Efectos de abejas y picaflor sobre el número de semillas para ambos años, utilizando como covariables los rasgos florales: área corola, área guía, largo tubo floral.

| Fuente de variación | g.l. | 2016 | | | | 2017 | | | |
|----------------------------------|------|----------|----------|---------|--------------|----------|----------|---------|------------|
| | | SS | MS | F | p | SS | MS | F | p |
| abejorro | 1 | 15555859 | 15555859 | 554,347 | < 2,2e-16*** | 20773541 | 20773541 | 974,521 | < 2,2e-16* |
| picaflor | 1 | 344872 | 344872 | 122,898 | 0,001 | 936 | 936 | 0,0439 | 0,834 |
| guía | 1 | 1743 | 1743 | 0,062 | 0,803 | 18096 | 18096 | 0,8489 | 0,357 |
| corola | 1 | 154456 | 154456 | 55,042 | 0,019* | 6903 | 6903 | 0,3238 | 0,570 |
| largo tubo | 1 | 20968 | 20968 | 0,747 | 0,388 | 18937 | 18937 | 0,8884 | 0,347 |
| abejorro x picaflor | 1 | 35854 | 35854 | 12,777 | 0,259 | 323579 | 323579 | 151,796 | <0,001*** |
| abejorro x guía | 1 | 14544 | 14544 | 0,518 | 0,472 | 11507 | 11507 | 0,5398 | 0,463 |
| abejorro x corola | 1 | 183797 | 183797 | 65,498 | 0,011* | 29550 | 29550 | 13,862 | 0,240 |
| abejorro x largo tubo | 1 | 82276 | 82276 | 29,320 | 0,088† | 4280 | 4280 | 0,2008 | 0,654 |
| picaflor x guía | 1 | 179 | 179 | 0,006 | 0,936 | 9448 | 9448 | 0,4432 | 0,506 |
| picaflor x corola | 1 | 112645 | 112645 | 40,142 | 0,046 | 42737 | 42737 | 20,049 | 0,158 |
| picaflor x largo tubo | 1 | 4876 | 4876 | 0,174 | 0,677 | 168550 | 168550 | 79,070 | 0,005* |
| abejorro x picaflor x guía | 1 | 249 | 249 | 0,009 | 0,925 | 52825 | 52825 | 24,781 | 0,116 |
| abejorro x picaflor x corola | 1 | 15080 | 15080 | 0,537 | 0,464 | 76058 | 76058 | 35,680 | 0,060† |
| abejorro x picaflor x largo tubo | 1 | 1038 | 1038 | 0,037 | 0,848 | 328070 | 328070 | 153,903 | <0,001*** |
| Residuales | 384 | 10775644 | 28062 | | | 8185596 | 21317 | | |

† $p < 0,1$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

DISCUSIÓN

En este estudio, evaluamos si los polinizadores más eficientes en términos de depósito de polen, se corresponden con las fuerzas selectivas presentes en la población de *E. lutea*, acorde al principio de Stebbins. Con esta finalidad, primero identificamos los ensambles de polinizadores para cada año del estudio y observamos que el 65,5% de las especies polinizadoras son compartidas entre años, sin embargo, al incluir las tasas de visitas para cada año, el índice de similitud proporcional es de 0,25 lo que nos muestra la alta variabilidad de los visitantes florales de *E. lutea* y con esto lo variable que es el sistema completo entre años. Esta alta variabilidad está dada principalmente por el cambio en las tasas de visita y abundancias de la abeja solitaria *Centris nigerrima*, el picaflor chico *Oreotrochilus leucopleurus* y el lepidóptero esfíngido *Hyles annei*.

Durante 2016, la presencia del esfíngido *Hyles annei* fue una novedad, ya que no existían registros previos de esta interacción planta-polinizador. A pesar de la novedad de esta interacción, *H. annei* fue el principal visitante floral para el período 2016 (52,3%). Sin embargo, en 2017 no obtuvimos registros de su presencia en el sitio de estudio. Los registros obtenidos en 2016 podrían explicarse tentativamente por el fuerte evento climatológico 'El niño' registrado en la zona central de Chile para el período 2015-2016, lo que generó un aumento en las lluvias de invierno y un aumento en las temperaturas en los meses de primavera, lo que podría haber influido en la tasa reproductiva de este esfíngido,

al igual que en el de otros ectotermos (Berger y col. 2008; Deutsch y col. 2008). Las observaciones realizadas en campo sugieren que *Hyles annei* podría haber desplazado al picaflor *Oreotrochilus leucopleurus*. Aun cuando el picaflor estuvo presente en el sitio en 2016, tuvo un desempeño casi nulo en las tasas de visita (0,11%) mientras que en el período 2017, cuando *Hyles annei* estuvo ausente, el porcentaje de las tasas de visita realizado por el picaflor llegó a un 38,4%, ubicándolo como el segundo visitante floral más importante de *E. lutea*.

Los servicios de polinización presentes en *E. lutea* son variables entre años, debido principalmente a las intermitentes tasas de visita de cada año, a las distintas efectividades de polinización y además a la variable abundancia de las especies polinizadoras entre años (observaciones personales en el sitio de estudio). De ahí que el mayor depósito tras una visita única sea *Bombus dahlbomii* ($345,75 \pm 404,72$ granos de polen/estigma) en 2016 y *Centris chilensis* ($315,62 \pm 658,18$ granos de polen/estigma) en 2017, ya que para 2017, *B. dahlbomii* no presenta registros de tasas de visita y su abundancia en el sitio fue muy baja. El que ambas especies sean las más eficientes en el depósito de polen tras una visita única (D_v) podría dar cuenta de la historia evolutiva compartida que mantienen estos abejorros nativos con *E. lutea*.

Una vez incluidas las tasas de visitas en el cálculo de eficiencia (D_t), aparecen *Centris nigerrima* (6,49) y *Oreotrochilus leucopleurus* (5,23) como los polinizadores más eficientes para 2016 y 2017, respectivamente. Cabe destacar,

que *H. annei* a pesar de registrar el 52,26% de las tasas de visita no se puede identificar como un polinizador importante para *E. lutea* ya que su depósito de polen alcanza tan solo los 1,3 granos de polen/estigma, por lo cual es más cercano a un robador de néctar más que a un real polinizador (Higashi y col. 1998).

Aun cuando los principales polinizadores se corresponden con especies nativas, tras calcular la efectividad de deposición por unidad de tiempo (D_t) promedio entre ambos años, destaca la estabilidad del abejorro invasor *Bombus terrestris*, lo que lo posiciona como el polinizador más efectivo para *E. lutea* en ambos años (4,18 granos de polen*visita/estigma*flor*hora). Sus tasas de visita mostraron un patrón mucho más constante que lo observado en las especies nativas ($2,06 \pm 5,46$ y $2,67 \pm 7,31$ visitas/flor*hora; \bar{x} , DS). Por otro lado, *B. terrestris* además tiene la capacidad de visitar un mayor número de flores por minuto en comparación con el abejorro nativo *B. dahlbomii* y otras abejas nativas (Ruz y Herrera 2001), por lo que podría compensar su baja eficiencia tras una única visita, visitando muchas más flores que un polinizador nativo en un mismo período de tiempo.

A pesar que se desconoce con exactitud el año en el que se introdujo *B. terrestris* en el sitio de estudio, a juzgar por el tiempo en el que este abejorro se introdujo en Chile, no debería exceder los 20 años. A diferencia de lo observado por Esterio y col. (2013) con respecto a la etapa de establecimiento del proceso

de invasión en el que se encontraba *B. terrestris*, dada la estabilidad observada en el sistema para el abejorro hoy, es probable que esté entre las fases propagación e impacto (Lockwood y col. 2013). Es por esto, que toma mucha importancia el estudio en estos sistemas con interacciones nuevas, ya que el establecimiento de polinizadores exóticos en nuevos entornos a menudo se asocia con riesgos ecológicos y consecuencias perjudiciales poco conocidas para las comunidades locales (Norfolk y col. 2018)

Este estudio demuestra que el ensamble de abejas es el principal responsable de la producción de semillas para ambos años en esta población de *E. lutea*. Dada la baja efectividad de polinización de *H. annej*, y que *O. leucopleurus* estuvo prácticamente ausente en términos de tasas de visita en 2016, es probable que el efecto de la parcela sin abejas (+P-A) sobre el número de semillas corresponda principalmente a la capacidad de autopolinización de *E. lutea*, lo cual se ve reflejado en la baja producción de semillas para ese período (Figura 1). Por el contrario, en 2017 se observa un efecto no aditivo entre ambos ensambles, el cual refuerza el rol protagónico que toma el ensamble de abejas en la producción de semillas, y aún más, cuando el sistema se encuentra en ausencia de picaflores. Es por esto que, para el período 2017 no es posible extraer conclusiones de los efectos de los distintos ensambles polinizadores sobre la producción de semillas por separado.

Los rasgos florales utilizados en los análisis fueron más variables entre que dentro de la población y fueron blanco de selección mediada por polinizadores.

En ambos años de muestreo, en la parcela control (P+A+), los polinizadores fueron más propensos a favorecer la reproducción de plantas con corolas más grandes y en 2017 además, las plantas con tubos florales más cortos. Estudios previos en este sistema, muestran que las abejas visitan corolas 1,25 más grandes que las visitadas por los picaflores (Medel y col. 2003), lo que podría dar cuenta del proceso adaptativo del fenotipo floral hacia el polinizador más eficiente, en este caso, *B. terrestris* seguido por *C. nigerrima*. Otro aspecto de este posible proceso adaptativo es que se promueve la reproducción de flores con tubos más cortos, dada la corta lengua de ambos abejorros (6,3 mm y 8,2 mm, respectivamente) en relación al promedio del largo del tubo floral (33,93 mm) (Medel y col. 2018).

La parcela sin abejas no presentó ningún gradiente significativo, lo cual refuerza la idea que los principales agentes que moldean el fenotipo floral, debido a la influencia que ejercen en la producción de semillas, son las abejas. La presencia o ausencia del picaflor, no representa gran diferencia en el *fitness* de la planta. Esto se evidenció en 2016 cuando prácticamente no hubo visitas por parte del picaflor, y esa parcela funcionó como parcela exclusiva del esfíngido *H. annei*, y en el año 2017, donde la parcela funcionó exclusivamente con *O. leucopleurus*, quien incluso fue el segundo visitante floral más importante para ese período. Sin embargo, esto no se vio reflejado en grandes cambios en la producción de semillas.

CONCLUSIONES

Los polinizadores más eficientes de *E. lutea* tras una única visita fueron los abejorros nativos *B. dahlbomii* y *C. nigerrima* para los años 2016 y 2017, respectivamente. Sin embargo, tras incorporar las tasas de visita (considerando así información sobre la abundancia y las conductas de forrajeo del polinizador), el polinizador más eficiente es el abejorro introducido *B. terrestris*. Esto se vuelve relevante ya que es incierto el efecto de los polinizadores exóticos en guiar procesos de adaptación floral y, por otro lado, la respuesta evolutiva a especies invasoras podría llegar a ocurrir en pocos años (Thompson 1998; Stuart y col. 2014) por lo que entender estas nuevas interacciones es de suma importancia para generar políticas de conservación apropiadas a este contexto.

Para el período 2016, las principales fuerzas selectivas estuvieron dadas por el ensamble de abejas, las cuales favorecieron la reproducción de plantas con flores con corolas de áreas mayores. Para 2017, por otro lado, no es factible separar las fuerzas selectivas ejercidas por cada ensamble, dado que se observa un efecto interactivo entre éstos y el rasgo largo del tubo.

No se identificaron fuerzas evolutivas, ya sean disruptiva o estabilizadora, actuando sobre la población estudiada de parte de ninguno de los ensambles de polinizadores analizados. Sin embargo, se encontró que en ambos años las abejas fueron los polinizadores más importantes, favoreciendo la reproducción de algunas plantas por sobre otras.

La población de *E. lutea* podría estar respondiendo al principio del polinizador más eficiente de Stebbins (en este caso, *B. terrestris*). Sin embargo, puede que no se observe un patrón claro debido a que este principio está ligado con la fuerza de selección mediada por polinizadores, y esta selección no siempre es tan evidente. Para que ocurra, es necesario que la ganancia en *fitness* tras esas especializaciones exceda el costo en *fitness* debido a las desadaptaciones a esos otros polinizadores menos eficientes.

BIBLIOGRAFÍA

Alexandersson, R. y Johnson, S.D. 2002. Pollinator-mediated selection on flower tube length in a hawkmoth pollinated *Gladiolus* (Iridaceae). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 269: 631-636.

Armbruster, W. S., Tuxill, J. D., Flores, T. C., & Vela, J. L. 1999. Covariance and decoupling of floral and vegetative traits in nine Neotropical plants: a re-evaluation of Berg's correlation-pleiades concept. *American Journal of botany*, 86(1), 39-55.

Armbruster, S., Fenster, C. y Dudash, M. 2000. Pollination 'principles' revisited: specialization, pollination syndromes, and the evolution of flowers. *The Scandinavian Association for Pollination Ecology Honours Knut Faegri*, 39: 179-200.

Armbruster, W.S. 2004. Floral integration, modularity, and precision: distinguishing complex adaptations from genetic constraints. *Phenotypic integration: studying the ecology and evolution of complex phenotypes*, 23-49. Oxford University Press, Oxford.

Benkman, C.W. 2013. Biotic interaction strength and the intensity of selection. *Ecology Letters*, 16: 1054-1060.

Berger, D., Walters, R. y Gotthard, K. 2008. What limits insect fecundity? Body size-and temperature-dependent egg maturation and oviposition in a butterfly. *Functional Ecology*, 22: 523-529.

Botto-Mahan, C., Pohl, N. y Medel, R. 2004. Nectar guide fluctuating asymmetry does not relate to female fitness in *Mimulus luteus*. *Plant Ecology*, 174: 347-352.

Carvallo, 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*, 242: 509-522.

Darwin, C. 1862. *On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects: and on the good effects of intercrossing*. London: J. Murray.

Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Huey, R.B., Sheldon, K.S., Ghalambor, C.K., Haak, D.C. y Martin, P.R. 2008. Impacts of climate warming on terrestrial ectotherms across latitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 105: 6668-72.

Delpino, F. 1873–1874. Ulteriori osservazioni e considerazioni sulla dicogamia nel regno vegetale. *Atti della Società Italiana di Scienze Naturali*, vol.16 (pg.151-349). 17: 266–407

Esterio, G., Cares-Suárez, R., 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.

Faegri, K.F. y van der Pijl, L. 1979. The principles of pollination ecology. 3ra Edición. Pregamon press Ltd. *New York*.

Fenster, C.B., Armbruster, W.S., Wilson, P., Dudash, M.R. y Thomson, J.D. 2004. Pollination syndromes and floral specialization. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 35: 375-403.

Fenster, C.B. y Ritland, K. 1994. Evidence for natural selection on mating system in *Mimulus* (Scrophulariaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 155: 588-596.

Gross, C.L. 2005. Pollination efficiency and pollinator effectiveness. *Practical Pollination Biology*, 354-63. (eds. A. Dafni, P. G. Kevan, B. C. Husband), pp. 354–63. Enviroquest, Cambridge (Ontario, Canada).

Hansen, V.I. y Totland, O. 2006. Pollinator visitation, pollen limitation, and selection on flower size through female function in contrasting habitats within a population of *Campanula persicifolia*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique*, 84 3: 412-420.

Higashi, S., Ohara, M., Arai, H. y Matsuo, K. 1988. Robber-like pollinators: overwintered queen bumblebees foraging on *Corydalis ambigua*. *Ecological Entomology*, 13: 411-418.

Hoffmann, A.E., Arroyo, M.T.K., Liberona, F., Muñoz, M. y Watson, J. 1998. *Plantas Altoandinas en la Flora Silvestre de Chile*. Ediciones Fundación Claudio Gay, Santiago, Chile.

Kay, K.M. y Schemske, D.W. 2003. Pollinator assemblages and visitation rates for 11 species of neotropical *Costus* (Costaceae). *Biotropica*, 35: 198-207.

Kearns, C.A., Inouye, D.W. y Waser, N.M. 1998. Endangered mutualisms: the conservation of plant-pollinator interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29: 83-112.

Kearns, C.A. y Inouye, D.W. 1993. *Techniques for pollination biologists*. University press of Colorado.

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

Larson, B.M.H. y Barrett, S.C.H. 2000. A comparative analysis of pollen limitation in flowering plants. *Biological Journal of the Linnean Society*, 69: 503-520.

Lockwood, J.L., Hoopes, M.F. y Marchetti, M.P. 2013. *Invasion ecology*. John Wiley & Sons.

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

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.

Ne'eman, G., Jürgens, A., Newstrom-Lloyd, L., Potts, S.G. y Dafni, A. 2010. A framework for comparing pollinator performance: effectiveness and efficiency. *Biological Reviews*, 85: 435-451.

Norfolk, O., Gilbert, F. y Eichhorn, M.P. 2018 Alien honeybees increase pollination risks for range-restricted plants. *Diversity and Distribution*. 24(5): 705–713

Ollerton, J. 1996. Reconciling ecological processes with phylogenetic patterns: The apparent paradox of plant-pollinator systems. *Journal of Ecology*, 84: 767-769.

Ollerton, J., Winfree, R. y Tarrant, S. 2011. How many flowering plants are pollinated by animals?. *Oikos*, 120: 321-326.

Ollerton, J., Alarcón, R., Waser, N.M., Price, M.V., Watts, S., Cranmer, L. y Rotenberry, J. 2009. A global test of the pollination syndrome hypothesis. *Annals of Botany*, 103: 1471-1480.

Pohl, N., Carvallo, G., Botto-Mahan, C. y Medel, R. 2006. Non-additive effects of flower damage and hummingbird pollination on the fecundity of *Mimulus luteus*. *Oecologia*, 149: 648-655.

R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Ruz, L. y Herrera, R. 2001. Preliminary observations on foraging activities of *Bombus dahlbomii* and *Bombus terrestris* (Hym: Apidae) on native and non-native vegetation in Chile. *Acta Horti* 561: 165-169

Schemske, D.W. y Bradshaw Jr., H.D. 1999. Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*, 96: 11910-11915.

Silander, J.A. y Primack, R.B. 1978. Pollination intensity and seed set in the evening primrose (*Oenothera fruticosa*). *American Midland Naturalist*, 213-216.

Sletvold, N. y Ågren, J. 2014. There is more to pollinator-mediated selection than pollen limitation. *Evolution*, 68: 1907–1918.

Sletvold, N. y Ågren, J. 2016. Experimental reduction in interaction intensity strongly affects biotic selection. *Ecology*, 97: 3091–3098.

Sprengel, C. K. (1793). *Das entdeckte Geheimnis der Natur im Bau und in der Befruchtung der Blumen*. Рипол Классик.

Thompson, J.N. 1998. Rapid evolution as an ecological process. *Trends in Ecology & Evolution*, 13: 329-332.

Stuart, Y.E., Campbell, T.S., Hohenlohe, P.A., Reynolds, R.G., Revell, L.J. y Losos, J.B. 2014. Rapid evolution of a native species following invasion by a congener. *Science*, 346: 463-466.

Stebbins, G.L. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms, I: pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1: 307-326.

Totland, O. 2001. Environment-dependent pollen limitation and selection on floral traits in an alpine species. *Ecology*, 82: 2233-2244.

Trunschke, J., Sletvold, N. y Ågren, J. 2017. Interaction intensity and pollinator-mediated selection. *New Phytologist*, 214: 1381-1389.

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

Vanhoenacker, D., Agren, J. y Ehrlén, J. 2013. Non-linear relationship between intensity of plant-animal interactions and selection strength. *Ecology Letters*, 16: 198–205.

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.