

UCH-FC  
MAG-B  
S 224  
C.1



**Tolerancia de *Eschscholzia californica* en ambientes saturados por cobre: ¿Adaptación local como una respuesta evolutiva?**

**Tesis**

**Entregada A La**

**Universidad De Chile**

**En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos**

**Para Optar Al Grado De**

**Magister en Ciencias Biológicas**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Camila Andrea Sanfuentes Ramos**

**Junio, 2014**

**Director de Tesis: Dr. Ramiro O. Bustamante**

**Co-Director de Tesis: Dr. Lohengrin A. Cavieres**

**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**INFORME DE APROBACION**  
**TESIS DE MAGISTER**

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

**Camila Andrea Sanfuentes Ramos**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 29 de Mayo de 2014.

**Director de Tesis:**

Dr. Ramiro O. Bustamante

**Co-Director de Tesis**

Dr. Lohengrin Cavieres



**Comisión de Evaluación de la Tesis**

Dra. Alejandra González

Dra. María Fernanda Pérez

*Este trabajo está dedicado a Renato*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mis tutores, Dr. Ramiro Bustamante (Universidad de Chile) y Dr. Lohengrin Cavieres (Universidad de Concepción), ya que sin duda fueron un apoyo y guía importante durante estos años.

A las correcciones y sugerencias de la comisión evaluadora, compuesta por la Dra. Alejandra González y la Dra. María Fernanda Pérez.

Finalmente al apoyo y ayuda de mis compañeros de laboratorio de Invasiones Biológicas.

## INDICE

RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	2
INTRODUCCIÓN .....	3
HIPÓTESIS .....	9
OBJETIVOS .....	10
METODOLOGÍA .....	11
RESULTADOS .....	18
DISCUSIÓN .....	27
REFERENCIAS .....	33
ANEXO 1 .....	43
ANEXO 2 .....	45

## RESUMEN

Los efectos acumulativos de ciertos metales en el ambiente constituyen un tema relevante para entender cómo las plantas enfrentan nuevas condiciones ambientales inducidas por la actividad humana. Frente a estas nuevas condiciones, la persistencia de las poblaciones de plantas se podrían deber a plasticidad fenotípica o adaptación local. Las plantas invasoras poseen una rápida evolución de algunos rasgos, ya sea morfológicos o fisiológicos, cuando son principalmente expuestas a ambientes cambiantes o estresantes; esta característica podría ser la que permitiría a que *Eschscholzia californica* colonice lugares altamente contaminado, como es el caso de sitios localizados cerca de intensa actividad minera. Se desconoce si la persistencia de *E.californica* en sitios pobres en nutrientes o con alta concentración de metales, se debe a procesos de adaptación local o simplemente a la capacidad inherente de tolerar estas condiciones. Para contestar esta interrogante, se realizó un experimento de trasplante recíproco en terreno y experimentos de laboratorio para determinar la tolerancia a metales pesados como Cu y así conocer cuáles son los niveles de cobre que puede tolerar la planta. Los experimentos de jardín común indican que no existiría una base genética en la tolerancia al Cu, puesto que en los tratamientos con Cu sin importar la población de origen hubo efectos negativos en el desempeño de los individuos, este efecto fue mayor en niveles extremos de contaminación, no habiendo diferencias entre el origen de las poblaciones. En los experimentos de trasplante recíproco los resultados también fueron negativos en el sitio contaminado, siendo este sitio estresante para ambas poblaciones, incluso al ver los resultados del sitio Pichicuy las plántulas pertenecientes al sitio de Las Ventanas mejoran su desempeño en comparación a su sitio de origen y a plántulas del mismo sitio. Nuestros resultados indican que no existiría una adaptación local en las poblaciones expuestas a cobre y el efecto del cobre afecta negativamente a los individuos de *Eschoscholzia californica* independiente de la población de origen.

## ABSTRACT

The cumulative effects of certain metals in the environment are an important issue to understand how plants face new environmental conditions created by human disturbance. Faced with these new environmental conditions, the persistence of plant populations could be due to phenotypic plasticity or local adaptation. Invasive plants present a rapid evolution of some traits, whether morphological or physiological, where are mainly exposed to stressful or changing environments; this feature could allow that *Eschscholzia californica* colonize highly polluted areas, such as sites localized near mining activities. It is unknown whether the persistence in sites poor in nutrients or with high concentrations of metals in populations of *E.californica* is due to processes of local adaptation or simply the inherent ability to tolerate these conditions. To answer this question, it was conducted an reciprocal transplant field and laboratory experiments (common garden) to determine levels of tolerance to heavy metals such as Cu. The results of common garden experiments indicate that do not exist a genetic basis of tolerance to Cu, regardless the source population it was detected negative effects on the performance of individuals; this effect was greater at the highest levels of copper. At the reciprocal transplant experiments the results were also negative in the contaminated site and this site was stressful for both populations, in Pichicuy seedlings belonging to the contaminated site improve their performance compared to its origin site Our results indicate that there is no local adaptation in the population exposed to Cu and the effect of copper affect negatively to individuals regardless of population origin.



## INTRODUCCIÓN

### *Efectos del Cobre*

Las poblaciones de plantas pueden responder rápidamente en respuesta a cambios en las condiciones ambientales (Bone & Farres 2001). Se ha descrito que poblaciones vecinas a minas de metales pesados han desarrollado tolerancia a éstos en aproximadamente 150 años (Antonovics & Bradshaw, 1970; Wu & Kruckeberg, 1985; Bradshaw & McNeilly, 1991; Nordal et al. 1999; Bone & Farres 2001). Altas tasas evolutivas han sido reportadas para plantas expuestas a metales pesados, herbicidas, ozono atmosférico y a concentraciones de CO<sub>2</sub> (Bone & Farres 2001; Jacquemyn et al. 2012). Por otra parte, se ha encontrado evidencia de cambios evolutivos en rasgos fisiológicos en plantas (e.g. captura y transporte de iones, contenido de proteínas, etc.), incrementando así la resistencia a metales pesados y a herbicidas y, en rasgos morfológicos tales como largo de hoja y biomasa (Jacquemyn et al. 2012).

Diversas especies de plantas poseen un amplio rango de habilidades de tolerar cobre; la tolerancia puede ser resultado de diversos mecanismos para sobrevivencia y crecimiento (Uveges et al. 2002). Se sabe que el cobre interfiere en varios procesos fisiológicos y es un inhibidor efectivo del crecimiento en las plantas (Fernandes & Henriques 1991). Una acumulación de Cu puede generar clorosis, necrosis, disrupción de procesos fotosintéticos y cambios en la homeostasis de nutrientes (Chatterjee & Chatterjee 2000; Cuypers 2000; Yruela 2005; Bes et al. 2010).

Comúnmente, los efectos tóxicos observados en el aparato fotosintético incluyen un descenso de las actividades fotoquímicas, daños en la estructura, composición de las membranas tilacoidales y alteraciones a nivel de pigmentos (Sandman & Börger 1980; Clijster et al., 1991; Ouzounidou 1996; Ciscato et al. 1997). El cobre además está relacionado al transporte de electrones en la fotosíntesis,



siendo un componente de la plastocianina; también es probable que juegue un importante rol en la regulación del PSII mediado por el transporte de electrones (Barón et al. 1995; Ciscato et al. 1997), siendo los procesos fotosintéticos primordiales para el crecimiento y desarrollo de todas las plantas (Taiz & Zeiger 2006).

La variedad de respuestas frente a la acumulación de cobre se pueden expresar a nivel comunitario, debido a que algunas especies serían menos afectadas que otras aumentando así su dominancia; los procesos involucrados en estos cambios de dominancia se deberían a diferencias inter-específicas en capacidad de germinación, probabilidad de establecimiento y/o sobrevivencia de las nuevas plantas frente a ambientes contaminados con cobre (Zobel et al. 1999; Bes et al. 2010).

### ***Respuestas evolutivas en plantas invasoras***

Las especies invasoras, al colonizar nuevas regiones biogeográficas, pueden estar sometidas a presiones selectivas diferentes a las de su rango original (Novak 2007). Una expansión a gran escala en estos nuevos ambientes puede determinar que las especies invasoras experimenten adaptación local frente a las nuevas condiciones locales (Baker 1965; Parker et al. 2003), o bien expresen plasticidad fenotípica, debido a que los invasores ya poseerían atributos (pre-adaptaciones) que les permitiría tomar ventajas de las nuevas condiciones ambientales en un corto plazo (Thuiller et al. 2005). De hecho, se ha encontrado que algunas especies invasoras ya poseen una alta tolerancia al estrés ambiental (i.e. exceso de cationes, salinidad, bajas temperaturas y contaminación), conllevando a la rápida y efectiva expansión de su rango de distribución sin necesidad de evolucionar (Uveges et al. 2002; Kercher & Zedler 2004; Funk & Vitousek, 2007; Zhang et al.

2008). Debido a la inusual combinación de cuellos de botella genéticos y regímenes de cambios en la selección que experimentan las especies invasoras al colonizar nuevos ambientes, éstas son un buen modelo para poner a prueba hipótesis relacionadas con respuestas microevolutivas de las especies al colonizar nuevos ambientes (Thompson 1998; Reznick & Ghalambor 2001; Hän-Fling & Kollmann 2002; Lee 2002; Bossdorf et al. 2005).

Algunos atributos, tales como la distribución de la asignación de energía (e.g. crecimiento, reproducción, defensa y tolerancia al estrés), están sometidos a fuerte selección, debido a que estos atributos están relacionados con las estrategias de asimilación y asignación de recursos como carbono, agua y nutrientes, hacia el crecimiento, la sobrevivencia y la reproducción (Ackerly et al. 2000). Por lo tanto, considerar atributos funcionales i.e. bioquímica del metabolismo, intercambio de gases, estructura de hojas y desempeño fotosintético, son muy importantes, pues modificaciones en estos rasgos podría determinar diferencias en adecuación biológica. Un dato interesante es que alrededor del 80% de los datos relacionados con selección en plantas, estiman rasgos morfológico; en contraste, hay poca información respecto de rasgos fisiológicos, así como también pocos estudios consideran mediciones más integradas del desempeño, como la tasa neta reproductiva o la tasa intrínseca de crecimiento poblacional (Kingsolver et al. 2012).

Clines geográficos en rasgos de historia de vida han sido descubiertos en muchas plantas invasoras, incluyendo *Eschscholzia californica* y *Lythrum salicaria*, las cuales sugieren adaptación local en respuesta a condiciones ambientales (Leger & Rice 2003; Barrett et al. 2008; Prentis et al. 2008). La selección natural puede resultar en adaptación local, permitiendo a los individuos tener un mayor fitness relativo en su hábitat de origen al compararlos con su desempeño en otros hábitats (Kawecki & Ebert 2004). En contraste, y en respuesta a cambios ambientales, las plantas pueden desarrollar plasticidad fenotípica, la cuál es definida como la habilidad de un genotipo de expresar diferentes

fenotipos en distintos ambientes (Pichancourt & Klinken, 2012). Esta plasticidad de rasgos puede expresarse de diversas formas, a través de rasgos plásticos independientes (como cambios en el tamaño de la planta) o a través de reasignaciones entre pares de rasgos (e.g. entre masa de semillas y número de semillas). Las respuestas plásticas pueden verse expresadas a distintos niveles 1) Individuo: mejorando su desempeño (e.g. crecimiento, germinación), 2) Poblacional: afectando directamente su demografía (e.g. sobrevivencia, fecundidad) (Richards et al. 2006; Muth & Pigliucci 2007; Funk 2008; Pichancourt & Klinken 2012).

Un ejemplo clásico de adaptación local es el de la gramínea *Anthoxanthum odoratum*, que crece cercano a zonas mineras con altos niveles de zinc y plomo; se observó que la fenología y la tolerancia a los metales variaba incluso en poblaciones distanciadas a pocos metros entre ellas, dada por la heterogeneidad en que se encontraban los metales en el lugar (Antonovics 2006; Richardson et al. 2014).

### ***Modelo de estudio***

*Eschscholzia californica* Cham. (Papaveraceae) es una especie de hierba nativa del oeste de América del norte, planta invasora en otras partes del mundo, principalmente en climas mediterráneos (Leger & Rice 2003). Crece en un variado rango de hábitats, desde el nivel del mar hasta los 2.000 msnm, desde dunas con suelos bien drenados, hasta abanicos aluviales, terrazas de ríos y laderas (USDA, 2010). Esta especie ha sido introducida en Chile, Tasmania, Nueva Zelandia y Australia, donde ha sido naturalizada (Cook 1962). En Chile se distribuye desde la Región de Atacama hasta la Región del Bío-Bío, creciendo desde la costa hasta por sobre el límite arbóreo, específicamente su rango de distribución va de los 30° a los 38° S y desde los 0 hasta los 2200 msnm (Arroyo et al. 2000). También se ha descrito que crece en ambientes altamente perturbados y comúnmente se encuentra en bordes de carreteras. Presenta una diferenciación significativa entre



las distintas poblaciones en cuanto a morfología y atributos de historia de vida (e.g. fecundidad, supervivencia, atributos florales y vegetativos) a lo largo de su rango geográfico (Leger & Rice 2003).

En sitios cercanos a minas y fundiciones mineras, es común encontrar grandes áreas contaminadas, por cobre y plomo (Ginocchio et al. 2004). En la zona central de Chile existe una gran concentración de actividad minera ubicadas en la costa. En la localidad de “Las Ventanas” (32°46’S; 71°28’O) se ha reportado un alto contenido de Cobre (Cu) total y soluble en el suelo, por sobre los promedios establecidos para suelos agrícolas ( $<100\text{mg kg}^{-1}$ ) (Swedish Environmental Protection Agency), además los suelos presentan valores de pH en el rango de 3,9 a 5,9, considerándose por lo tanto suelos ácidos (Ginocchio et al. 2004; González et al. 2008).

Las condiciones presentadas anteriormente, harían este lugar poco habitable para muchas especies de plantas, sin embargo *Eschscholzia californica* se encuentra en estos sitios y en abundancia (Peña-Gómez & Bustamante 2012). Además, las poblaciones cercanas al sitio contaminado presentan una tasa finita de crecimiento ( $\lambda$ ) mayor a 1 ( $\lambda=1,21$ ), lo cual sugiere ausencia de restricciones demográficas. Por otro lado, González et al. (2008) al caracterizar las concentraciones de Cu en tejidos de distintas especies de plantas, encontró que *E. californica* presentaba una baja acumulación de cobre de  $135 \pm 3,2 \text{ mg kg}^{-1}$ ; así mismo, Ginocchio (1997) encontró el mismo patrón de acumulación con valores entre 45-196  $\text{mg kg}^{-1}$ , siendo considerada como una especie tolerante, siendo este último término definido como la habilidad de crecer en suelos contaminados teniendo un crecimiento óptimo para la planta (Fernandes & Henriques 1991). Todas estas evidencias abren las interrogantes acerca de las causas ecológicas y evolutivas que permiten explicar la presencia y persistencia de esta especie en sitios con alta concentración de metales pesados, en especial Cobre.

El estudio de las respuestas de las plantas invasoras a la presencia de metales pesados es un tema abierto y de escaso desarrollo. Conocer los efectos que podrían tener los metales pesados en plantas invasoras y cuál es la respuesta evolutiva detrás de la tolerancia, es de gran importancia pues podría constituirse una explicación última de su éxito invasor y las estrategias que les permiten sobrevivir a estos ambientes estresantes.

## HIPÓTESIS

La tolerancia a metales pesados observada en *Eschscholzia californica* estaría dada por una adaptación local. Si esto es así, entonces:

- Semillas provenientes de zonas no contaminadas trasplantadas a zonas contaminadas presentarán menor germinación y sobrevivencia de plántulas que semillas plantadas en su lugar de origen. En cambio, las semillas provenientes de zonas contaminadas no se verán afectadas en su desempeño al ser transportadas a una zona no contaminada por Cu.
- Al someter individuos a niveles crecientes de Cu, el desempeño tenderá a decrecer. Este decrecimiento será mayor en individuos provenientes de poblaciones no sometidas a contaminación por Cu.



## **OBJETIVOS**

### **General**

Determinar si la tolerancia al cobre de una población de *Eschscholzia californica* es una respuesta determinada por adaptación local o plasticidad fenotípica.

### **Específicos**

1. Determinar diferencias en contenidos de Cu y nutrientes en sitios con y sin influencia de la actividad minera en Chile central.
2. Caracterizar fenotípicamente, a nivel vegetativo y reproductivo, individuos de sitios con y sin influencia de la actividad minera.
3. Establecer si individuos de origen no contaminado, pueden sobrevivir en las condiciones de contaminación, y si individuos de origen contaminado pueden sobrevivir en sitios que presentan bajos niveles de Cu.
4. Evaluar el efecto de niveles crecientes de Cu sobre el crecimiento, sobrevivencia y reproducción de *E.californica*.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Caracterización de los sitios

Para realizar este estudio se eligieron dos sitios costeros, con condiciones climáticas similares, ambos costeros, uno con alta perturbación industrial y otro sin perturbación industrial aparente, otro de los criterios de elección de los sitios fue que ambos tenían una gran población de *Eschscholzia californica* la cuál se encuentra de manera estable en el lugar.

“Las Ventanas” está ubicada a 32°43’S 71°24’W, se localiza en el valle de Puchuncaví en la costa de Chile central, esta área se caracteriza por ser un sitio altamente contaminado debido a la cantidad de industrias presentes en la zona. Posee un clima de tipo Mediterráneo con lluvias invernales y estación seca prolongada, gran nubosidad y la humedad relativa elevada (Dirección Meteorológica de Chile) (Fig. 1.A). El otro sitio elegido ubicado en la ciudad costera de Pichicuy ubicada a 32°20’S 71°27’W, sitio que no tiene un impacto visible de contaminantes y que actualmente es un área protegida (Fig.1.B). En cada sitio fue explorada un área total de 600 m<sup>2</sup>.

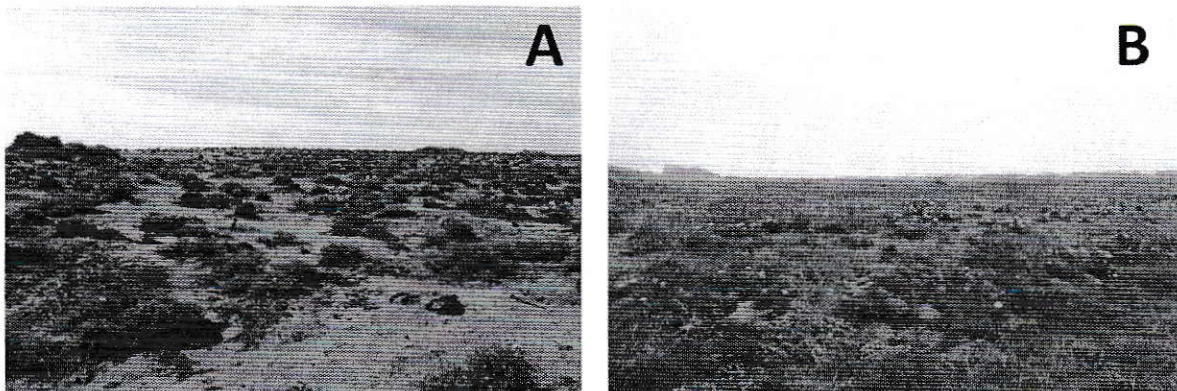


Figura 1. A) Sitio “Las Ventanas” con alta contaminación, B) Sitio Pichicuy sin perturbación aparente.

### 2.1.1. Asignación de biomasa reproductiva y vegetativa en plantas adultas y contenido de Cu

Se colectó la biomasa aérea de 10 plantas de *E.californica* por sitio, esta biomasa se separó entre vegetativa y reproductiva, para luego ser secada por 3 días a 50°C. Además se colectaron 4 vainas por individuo en 10 individuos por sitio, el material se secó a 40°C, luego se pesaron y se contaron las semillas por vaina, promediando las 4 vainas por individuo para obtener un promedio de la producción de semillas por vaina. Además se midió el contenido de Cu foliar de 5 plantas adultas por cada sitio.

### 2.1.2. Vegetación característica

Se caracterizó la vegetación acompañante de *E.californica* en cada sitio, a través de 5 transectas de 30 metros (huincha), separadas cada una por 5 metros, dispuestas paralelamente. Se recolectó el material para la posterior identificación.

### 2.1.3. Variables de suelo

Se colectaron muestras de suelo (5 por sitio) para un análisis completo de fertilidad de suelo, y se midió el Contenido Relativo de Agua (CRA) en cada sitio (6 medidas por sitio) mediante un medidor portátil de humedad de suelo (FieldScout TDR-300; Spectrum Technologies, Inc.).



## 2.2. Cultivo hidropónico y jardín común

En la realización de los experimentos en laboratorio se implementó un cultivo hidropónico. Esta es una técnica de crecimiento de plantas con sus raíces insertas en una solución nutritiva sin suelo (Taiz & Zeiger 2006). Se utilizó un medio inerte para el crecimiento de la planta y una solución nutritiva con todos los elementos esenciales para su adecuado desarrollo (*Detalles de nutrientes presentes Tabla Anexo 2*). Los elementos considerados esenciales para el crecimiento de la mayoría de las plantas son: Carbono, Hidrógeno, Oxígeno, Nitrógeno, Fósforo, Potasio, Calcio, Azufre, Magnesio (macronutrientes) y Hierro, Manganeso, Boro, Zinc, Cobre, Molibdeno, Cobalto y Cloro (micronutrientes). Además hubo un control sobre el pH a través de un pHmetro portátil (HI 8424; Hanna Instruments), cuando las soluciones disminuían el pH este se regulaba con una solución base fuerte de Hidróxido de Potasio (KOH), la temperatura del invernadero fue monitoreada con un termohigrómetro y se utilizó luz natural. Esta técnica se utilizó para determinar las respuestas de *Eschscholzia californica* frente a concentraciones crecientes de Cu, medidas como variables morfológicas, reproductivas y biomasa total en el tiempo (ver *detalle en 2.4.*).

Se hicieron germinar semillas de *Eschscholzia californica* en un medio inerte, para esto se utilizó vermiculita (pH neutro), se sembraron en cada pote 4 semillas, para asegurar la germinación de por lo menos una plántula. Se regaron las plantas con una solución nutritiva para el adecuado crecimiento de ellas, las soluciones de Cu proporcionadas a las plantas fueron separadas en 3 niveles: Control (sin cobre), Nivel 1 (200 ppm) y Nivel 2 (800 ppm), estos niveles fueron establecidos de acuerdo a lo encontrado en terreno (200 ppm encontrados a principio de primavera y 800 encontrados al final del verano). El cobre fue suministrado en la forma de  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$  como fuente de  $\text{Cu}^{2+}$ , en todos los tratamientos, se controló el pH alrededor del punto neutro.



Desde julio de 2013 las plantas se regaron cada 5 días con una cantidad de 100 ml de solución para cada individuo expuesto a cada tratamiento. A fines de primavera, cuando las temperaturas fueron mayores, el riego se realizó día por medio, pero sólo con agua y solución nutritiva, y los tratamientos con cobre continuaron cada 5 días por motivos de cambios en pH o acumulación excesiva de cobre en el sustrato.

Se obtuvo 50 plántulas por cada población de origen (Las Ventanas (A)-Pichicuy (B)) y por nivel de tratamiento (Control-Nivel 1-Nivel 2). Por lo tanto se obtuvo un total de 300 plántulas que se dispusieron de manera aleatoria en cada tratamiento y en el invernadero, para no considerar la luz como una variable que estuviera influenciando las mediciones.

### *2.2.1. Biomasa crítica*

Se midió la biomasa total en el tiempo para plantas de jardín común, para ello se retiraron 5 plantas por tratamiento y por población cada semana. El material separado y rotulado, fue secado por 3 días a 50°C y luego pesado. Estos datos además fueron relacionados con las medidas de supervivencia que se obtuvo en el tiempo, por lo tanto se confeccionó un gráfico en que muestra el punto en el tiempo donde ocurre la mortalidad del 50% de los individuos y cómo se relaciona esto con la biomasa encontrada en ese intervalo de tiempo, realizando un índice de biomasa crítica en que ocurre el 50 % de la mortalidad de la población estudiada.

### *2.3. Experimentos de trasplante recíproco*

Se recolectaron semillas de los dos sitios de estudio, para realizar un experimento de trasplante recíproco (Blanquart et al. 2013). Las semillas ya retiradas de su ambiente natural, fueron

sembradas en su propio sitio y también en el sitio contrastante. En cada sitio se sembraron 100 semillas de cada población (sitio contaminado y no contaminado), por lo tanto se sembró un total de 200 semillas por sitio. Para disponer las semillas en el suelo, se realizaron dos transectas en cada sitio correspondiente a cada población, cada transecta midió 100 metros, se colocaron 20 cuadrantes distanciados a 5 metros, en cada cuadrante fueron sembradas 10 semillas, 2 en cada esquina del cuadrante y en el centro del cuadrante (Fig. 2). Antes de colocar el cuadrante, se retiró la primera capa orgánica del suelo, para evitar contaminación con otras semillas o material vegetal. Durante el transcurso del experimento, se realizó el monitoreo mensual de: germinación de las semillas, establecimiento de las plántulas, variables morfológicas y variables reproductivas (*ver detalle en 2.4.*).

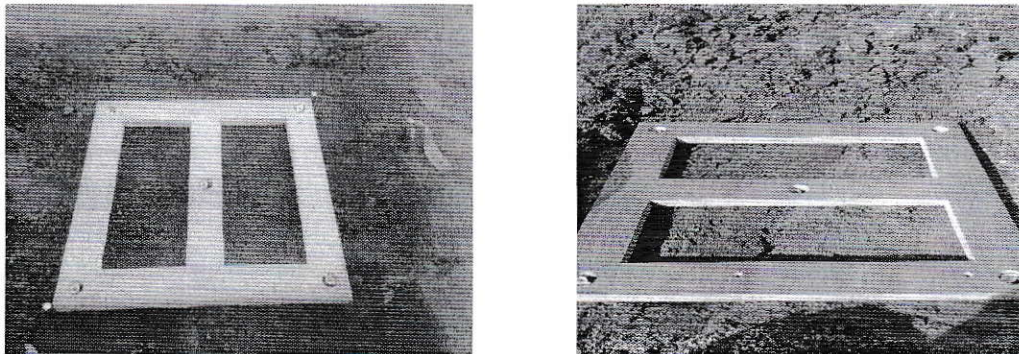


Figura 2. Cuadrantes ubicados en las transectas, con 10 semillas cada uno, 2 por cada orificio del cuadrante. Esto se replicó en las dos poblaciones.

#### *2.4. Medición variables morfológicas y reproductivas*

Se consideró como variables morfológicas y reproductivas a: tiempo de germinación (i.e. número de días en que ocurre la germinación desde que se sembró la semilla), tiempo de aparición de hojas



fotosintéticas (i.e. primera hoja fotosintética completamente desarrollada), número de hojas en el tiempo, altura de la planta (i.e. altura desde la base de la planta hasta la hoja más alta), tiempo de floración (i.e. tiempo transcurrido hasta que aparece el primer botón), número de botones y flores.

#### *2.4. Análisis Estadístico*

Para los parámetros de caracterización de suelo, la comparación entre los sitios contaminado y no contaminado y diferencias en cuanto a asignación de biomasa y producción de semillas se utilizó una prueba de t de Student. Para ver los efectos de la exposición a cada sitio se realizará un análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Para establecer diferencias en el experimento de tolerancia respecto a la exposición a las distintas concentraciones de cobre se aplicó una ANOVA de una vía, verificando siempre la normalidad de los datos. En los análisis de frecuencia acumulada se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Para los análisis de supervivencia se realizó un Test de Kaplan-Meier para establecer los efectos totales de los tratamientos en cada población, y un test de Log-Rank para comparar entre poblaciones por cada tratamiento. Para los análisis citados anteriormente se utilizó el software Statistica 6.0. Para los análisis de tasa de crecimiento de plántulas en jardín común se realizó una Anova de 2 vías con permutaciones (Software R) debido a la naturaleza de los datos. En los análisis de Biomasa Crítica se realizó una ANCOVA 2 vías (2x3) (VassarStats).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Caracterización de sitios y poblaciones

La localidad de muestreo en “Las Ventanas” se caracteriza por una vegetación dominada por *Eschscholzia californica*, asociada mayormente a *Baccharis linearis* y *Convolvulus arvensis*.

En cambio Pichicuy tiene una mayor riqueza de especies al ser un sitio con una menor perturbación. Al igual que el sitio de “Las Ventanas” también existe una población de *E. californica*, aunque no tan abundante, asociada a esta población se pudo encontrar: *Centaurea solstitialis*, *Senecio vulgaris*, *Avena sativa*, *Phacelia secunda*, *Fumaria agraria*, *Alstroemeria sp.*, *Loasa tricolor* y algunas especies de Poaceas.

Los niveles de cobre que existen en Las Ventanas bordean los 400 mg kg<sup>-1</sup>, valor muy superior al rango establecido para suelos agrícolas (0,6-11mg/kg), mientras que en Pichicuy lo niveles de Cobre fueron de 2,4 mg kg<sup>-1</sup>, considerados dentro del rango establecido.

En cuanto al Contenido Relativo de Agua (CRA) existen diferencias significativas entre los espacios libres de vegetación y los espacios bajo las plantas adultas de *E. californica* ( $F_{(1,16)}=4,896$ ,  $p<0,05$ ); se encontraron diferencias significativas entre poblaciones ( $F_{(1,16)}=52,1929$ ,  $p<0,05$ ); se detectó una interacción estadística significativa de ambos factores ( $F_{(1,16)}=5,0349$ ,  $p<0,05$ ) lo cual significa que aún cuando en Las Ventanas no hubo diferencias entre micrositos, este efecto fue significativo en Pichicuy.

Tabla 1. Fertilidad de suelos y Contenido Relativo de Agua (CRA%) de dos poblaciones de Chile Central: Las Ventanas y Pichicuy. \* Representa diferencias significativas entre los sitios (Test de T). El muestreo fue realizado el mes de Octubre de 2013. Símbolos (<) representa valores sobre el límite y (>) valores bajo límite establecido para suelos agrícolas.

Sitio	Las Ventanas (mg/Kg)	Pichicuy (mg/Kg)
N	16,6±0,70*	25,2±0,72*
P	34,4±0,33*	>6,8±0,47*
K	178±11,71*	>52,8±4,11*
Cu	< 398,2 ±19,24*	2,48±0,13*
Fe	52,24±2,92*	22,06±1,24*
Mn	8,84±0,71 <sup>n.s</sup>	11,8±0,61 <sup>n.s</sup>
Zn	29,24±1,49*	>2,06±0,28*
B	>0,54±0,01*	>0,27±0,01*
S	>5,97±0,36 <sup>n.s</sup>	>4,76±0,26 <sup>n.s</sup>
CRA (suelo desnudo)	4,97±0,105 *	1,32±0,209 *
CRA (suelo bajo <i>E.californica</i> )	4,96±0,091 *	3,04±0,235 *

#### Contenido de Cu foliar en plantas adultas

Respecto al contenido de cobre foliar se detectaron diferencias significativas entre poblaciones (t = 7,56, df=8, p<0,05; Fig.3) siendo las hojas de las plantas pertenecientes a Ventanas las que presentaron en promedio más de 8 veces la cantidad de Cu que las hojas de las plantas de Pichicuy.

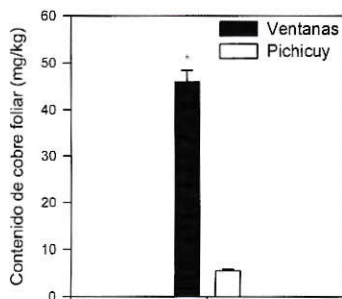


Figura 3. Contenido de Cu en hojas de plantas adultas de *Eschscholzia californica* en las localidades de Ventanas y Pichicuy en Chile Central.

### Asignación de biomasa en plantas adultas

En las plantas adultas de *E.californica* muestreadas en terreno no hubo diferencias significativas referentes a biomasa vegetativa ( $t = 0,09$ ;  $p = 0,926$ ), pero si existieron diferencias en la biomasa reproductiva ( $t = 6,02$ ;  $p < 0,05$ ) entre las dos poblaciones. La población de Pichicuy presentó una mayor asignación a biomasa reproductiva que la población de Las Ventanas. Referente al número y peso de semillas hubo diferencias en cuanto al número de semillas ( $t = 2,7$ ;  $p < 0,05$ ), individuos de Las Ventanas produjeron un mayor número de semillas por vaina comparado con individuos de Pichicuy, en cuanto el peso de las semillas no hubo diferencias significativas entre las poblaciones ( $t = 0,7$ ;  $p = 0,451$ ) (Tabla 2).

Tabla 2. Variables vegetativas y reproductivas de dos poblaciones de Chile Central: Las Ventanas y Pichicuy. \* Representa diferencias significativas entre los sitios (Test de t) y n.s representa que no hay diferencias significativas. El muestreo fue realizado el mes de Noviembre de 2013.

Variable	Las Ventanas	Pichicuy
Biomasa vegetativa	$3,53 \pm 0,36$ <sup>n.s</sup>	$3,40 \pm 0,19$ <sup>n.s</sup>
Biomasa reproductiva	$0,35 \pm 0,01$ *	$0,39 \pm 0,03$ *
Número de semillas (por vaina)	$74,02 \pm 0,975$ *	$44,48 \pm 0,52$ *
Peso de semillas (peso por vaina/nº de semillas de vaina)	$0,0011 \pm 5,23e^{-05}$ <sup>n.s</sup>	$0,0009 \pm 8,86e^{-06}$ <sup>n.s</sup>

### 3.2. Experimentos de Jardín Común

#### *Germinación y supervivencia*

En los experimentos de jardín común con los distintos niveles de contaminación por cobre, no hubo diferencias en cuanto a la germinación; si hubo un retraso en cuanto al máximo de germinación en plantas que se encontraban en el nivel 2 de contaminación (800ppm) con un aumento entre 2-4 días. Del total de semillas puestas a germinar (50 por tratamiento), hubo una alta germinación en todos los tratamientos, incluso en el nivel 1 (200ppm) de contaminación estuvo cercano al 100%. La primera hoja fotosintética se demoró en salir alrededor de 20 días, y el primer botón salió después de 2 meses en las plantas pertenecientes al control, no así en plantas que estaban en los tratamientos con cobre.

En el experimento de jardín común en plantas control no hubo diferencias en cuanto al porcentaje de germinación final (Fig.4). La germinación en general estuvo entre el 70-100% del total de las semillas expuestas a cada tratamiento, y tampoco hubo un efecto de los tratamientos con cobre sobre la germinación, ya que esta no se vio disminuida. (*Detalles de dinámica en el tiempo ver Anexo 1.1*).

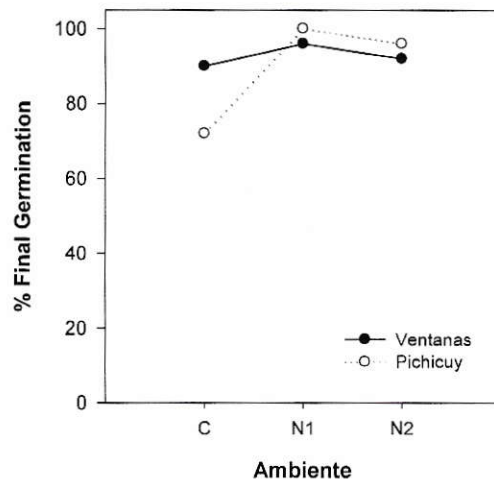


Figura 4. Norma de reacción porcentaje final de germinación en experimento de jardín común, de dos poblaciones de Chile central, en control, nivel 1 de contaminación y nivel 2 de contaminación.



Al comparar la supervivencia de las plantas hubo diferencias significativas en cuanto al efecto de los tratamientos tanto para Ventanas ( $X^2= 186,5260$ ,  $df = 2$ ,  $p <0,05$ ) (Fig.5.A) como para Pichicuy ( $X^2= 171,7877$ ,  $df = 2$ ,  $p <0,05$ ) (Fig.5.B). A pesar que hubo efectos en ambas poblaciones debido a los tratamientos, la población de Las Ventanas fue más sensible, ya que ambas curvas sometidas a contaminación por cobre se ven más separadas del control, en comparación con las curvas de la población de Pichicuy, donde sólo el nivel 2 de contaminación se ve más alejado del control. Al comparar entre poblaciones por cada tratamiento no se encontraron diferencias significativas (LOG – Rank,  $S = 1,882$ ,  $p=0,170$ ), al igual que en el nivel 2 de contaminación (LOG – Rank,  $S=1,552$ ,  $p=0,213$ ). Sin embargo, si hubo diferencias entre las poblaciones en el nivel 1 de contaminación (LOG – Rank,  $S=48,164$ ,  $p <0,001$ ). Este efecto se produjo debido a que el nivel 2 de contaminación fue dañino para ambas poblaciones en igual medida, en cambio en el nivel 1 de contaminación el efecto fue más marcado en individuos provenientes de Las Ventanas.

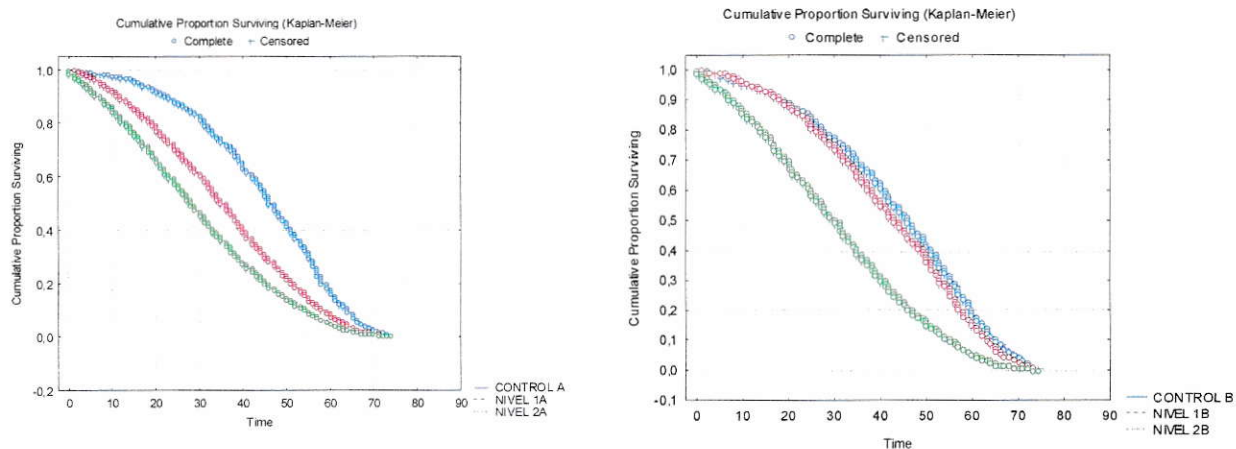


Figura 5. Curvas acumulativas de proporción de supervivencia (Kaplan-Meier) para dos poblaciones (A) Ventanas (B) Pichicuy expuestas a distintos tratamientos con cobre y control (sin cobre).

### Tasa de crecimiento: Altura y Número de hojas

Existe una disminución significativa en el tamaño de las plantas y el número de hojas en comparación con las plantas control (Fig.6). En relación a la altura de las plantas hay diferencias significativas en cuanto al tratamiento ( $p < 0,05$ ) y a la interacción de los factores ( $p < 0,05$ ), no así de la población ( $p = 0,843$ ). Por lo tanto el cobre tiene un efecto negativo en el crecimiento en ambas poblaciones, aunque en el N1 de contaminación este efecto fue diferencial ( $>$ población de Las Ventanas), en cambio en el N2 hubo una disminución de la altura independiente de la población de origen. Por su parte, el número de hojas por individuo sólo fue significativo el efecto del tratamiento ( $p < 0,05$ ), sin diferencias poblacionales en ninguno de los tratamientos ( $p = 0,187$ ) ni en la interacción de los factores ( $p = 0,05$ ) (ANOVA con permutaciones en R).

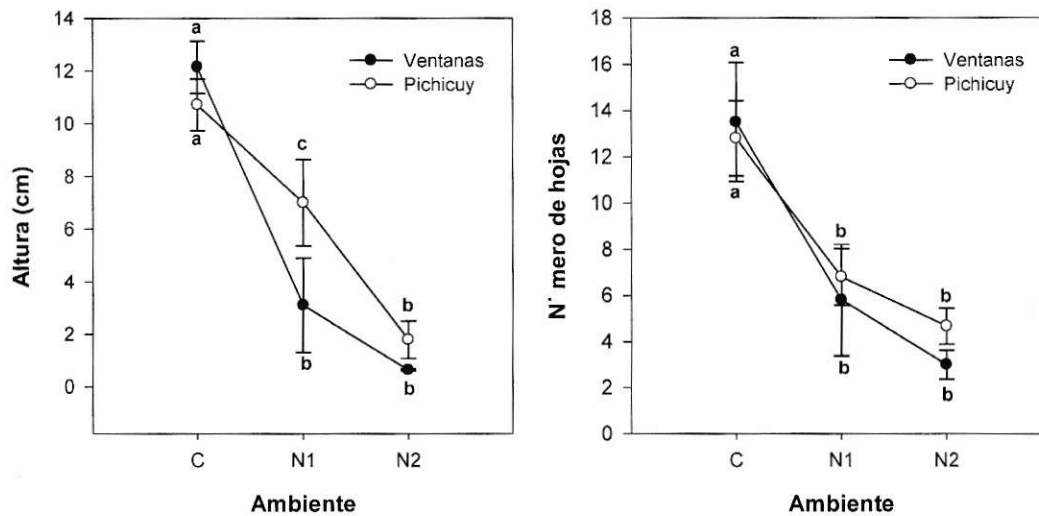


Figura 6. Norma de reacción para rasgos morfológicos: altura y número de hojas de dos poblaciones sometidas a 3 ambientes (tratamientos). Letras significan diferencias significativas (Test Tukey  $p < 0,05$ ).

## Biomasa crítica

Se midió la biomasa crítica de las plantas (Fig.7) (i.e. punto en el tiempo donde ocurre la muerte del 50% de la población, relacionado con la biomasa total del momento), plantas expuestas a nivel 1 de contaminación y en control no llegaron al punto del 50%, en cambio plantas en el nivel 2 llegaron al 50% de mortalidad a un peso seco alrededor del 0,01g, alcanzando como máximo en el periodo de experimento un peso de 0,04g. Poblaciones de nivel 2 de contaminación no llegaron a la biomasa mínima para poder sobrevivir en el tiempo, como lo que ocurrió con las poblaciones sometidas a nivel 1 de contaminación. No existen diferencias significativas debido al origen ( $F=3,35$ ;  $df=1$ ;  $p=0,08$ ) y tampoco en la interacción de los factores ( $F=1,2$ ;  $df=2$ ;  $p=0,319$ ), pero si hubo diferencias debido a los distintos tratamientos ( $F=17,74$ ;  $df=2$ ;  $p<0,05$ ).

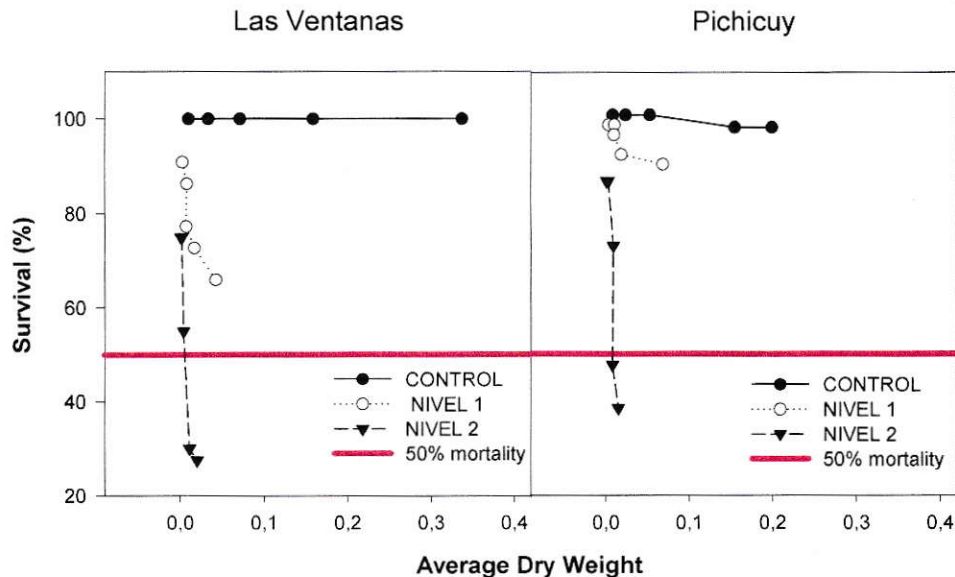


Figura 7. Relación promedio biomasa total (seca) y supervivencia de plantas provenientes de dos poblaciones de Chile central. Sometidas a dos niveles de contaminación por cobre. (A) Control (B) Nivel 1 y Nivel 2 de contaminación. Línea roja señala el 50% de letalidad de la población.

### 3.3 Experimentos de Trasplante recíproco

#### *Germinación y supervivencia*

En el experimento de trasplante recíproco hubo baja germinación, las semillas que tuvieron más éxito fueron las de Ventanas cuando fueron puestas en el sitio sin contaminación (Pichicuy) (26% de germinación), doblando en cantidad a las semillas que provenían de ese mismo sitio (Origen Pichicuy 13%). En general, en el sitio contaminado la germinación fue baja y casi no hubo diferencias en cuanto al origen de las semillas (Origen Ventanas 5%; Origen Pichicuy 4,5%), la germinación en ambos sitios ocurrió alrededor del día 31 (Fig 9.A.). Existiría un efecto de la contaminación en cuanto al porcentaje de germinación, ya que las semillas en ambos casos aumentan su germinación al estar en un sitio libre de contaminación. *(Para ver detalles de dinámica en el tiempo ver Anexo1.2)*

La supervivencia en el sitio de Ventanas fue baja, ya que sólo hubo sobrevivientes hasta el día 30 (Fig.9.B), por lo tanto las plántulas que lograron germinar sólo sobrevivieron un mes, en cambio las plántulas que lograron emerger en Pichicuy un 20% del total de plantas germinadas logró llegar hasta el tercer mes de monitoreo (90 días) (Fig.9.C). En el sitio Ventanas no hubo diferencias en cuanto a supervivencia entre plántulas de poblaciones distintas ( $S=0,000$ ,  $p=1,00$ ), en cambio en el sitio Pichicuy si hubo diferencias en cuanto a la población de origen de la semilla ( $S=4,678$ ,  $p<0,05$ ), con un mayor porcentaje de supervivencia para plántulas provenientes de Ventanas.

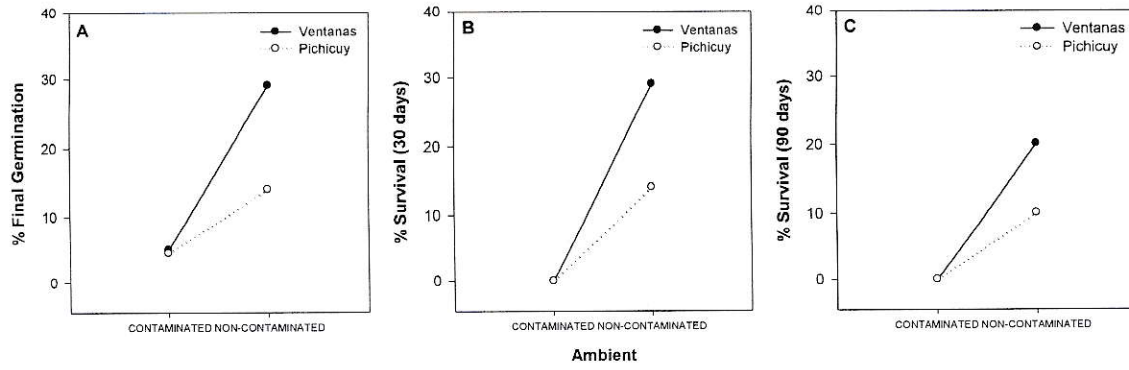


Figura 9. Norma de reacción de trasplante recíproco en dos poblaciones de Chile central (2 ambientes: Contaminado (Ventanas) y No Contaminado (Pichicuy). A) Porcentaje final de germinación de semillas correspondiente a cada población. B): Porcentaje de supervivencia a 30 días en cada población y C) Porcentaje de supervivencia a 90 días en cada población.



#### 4. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican una fuerte contaminación en el sitio de Ventanas, con un exceso de cobre y déficit en varios nutrientes, tal como Boro y Azufre (Tabla 1). El exceso de cobre es en promedio de 398 mg/kg, o sea casi 300 veces mayor al contenido de cobre de suelo en el sitio de Pichicuy (Tabla 1), estos resultados son similares a los encontrados por Ginocchio et al. (2004). Pichicuy también resultó ser un sitio con déficit de nutrientes en relación al índice utilizado para suelos agrícolas, pero aún así presentó una mayor cantidad de especies vegetales. En cuanto al contenido relativo de agua, hubo un mayor contenido de agua en el sitio de Ventanas en comparación al de Pichichuy (Tabla 1), esto también explicado por el tipo de suelo que tiene cada sitio, este último presentaba condiciones más arenosas que el primero, por lo tanto existe una menor retención de la humedad.

El contenido de cobre foliar de plantas adultas encontrado en Ventanas es casi un 40% mayor que las plantas que se encuentran en Pichicuy (Fig.3), el contenido promedio encontrado en las plantas de *E.californica* de Ventanas está dentro del rango encontrado en un trabajo de Ginocchio (1997) para esta misma especie, estos niveles están sobre el rango normal sugerido en tejidos vegetales (8-13 ppm) (Howeler 1983). Tang et al. 1999 encontraron que existe una relación entre el contenido de cobre del suelo y la acumulación de cobre en distintas especies de plantas, esto también ha sido reportado por González et al. (2008) en un trabajo realizado en el valle de Puchuncaví (Chile central) en un sitio cercano a una fundición minera.

Plantas al tener resistencia a algunos tipos de metales presentan costos, uno de estos costos es una menor producción de biomasa en ecotipos resistentes (Lambers et al., 2008), por lo tanto se esperaría encontrar cambios en la asignación reproductiva o vegetativa. En cambio no se encontraron diferencias entre las poblaciones en cuanto a la asignación a biomasa vegetativa, pero



sí hubo un cambio en la asignación de biomasa reproductiva, encontrándose una mayor asignación en individuos de Pichicuy, esto fue acompañado de una mayor producción de semillas por vaina en la población de Las Ventanas, por lo tanto esta población no estaría siendo limitada reproductivamente. Esto también ha sido reportado en un estudio sobre el efecto del cobre en variables reproductivas de *Glaucium flavum* (*Papaveraceae*) donde no encontraron efectos directos en la producción de semillas (Cambrollé et al. 2011).

Por lo tanto, el no encontrar cambios en los rasgos de los individuos de *E.californica* expuestos a cobre, y que aparentemente no presenta limitaciones en plantas adultas, transforman a esta población en un buen modelo de evaluar si estas respuestas evolutivas son debido a adaptación local. Además la variabilidad ambiental presentada entre estos dos sitios, potencian aún más la hipótesis de que exista una adaptación local en la población expuesta a metales pesados.

En cuanto a germinación de las dos poblaciones sometidas a distintos niveles de cobre no hubo diferencias significativas (Fig.6), por lo que no habría un efecto negativo en este atributo. Sólo plantas que no fueron expuestas a cobre lograron florecer, esto indicaría un retardo o inhibición de la floración en plantas sometidas a estrés por cobre, o que no poseían la biomasa mínima en el tiempo asignado para poder destinar recursos a biomasa reproductiva (Fig.7). En cambio, en un trabajo de Jin-hua Gan et al. (2013) encontraron que en la fabaceae *Kummerowia stipulacea* poblaciones expuestas a metales pesados, cuando crecían en tratamiento con cobre invertían más recursos a reproducción que a crecimiento vegetativo, reflejando un trade-off adaptativo en respuesta a una condición estresante.

La producción de biomasa reproductiva está relacionada al crecimiento que tuvieron las plantas en los distintos tratamientos, plantas de ambas poblaciones que estaban en control lograron tener una mayor biomasa a través tiempo y una mayor supervivencia (Fig.9). A pesar que el crecimiento

siempre fue mayor en plantas en control, la población de Ventanas al final del experimento tuvo una mayor producción de biomasa total en comparación a las plantas provenientes de Pichichuy (aprox. 0,4g y 0,2g respectivamente), esto probablemente podría ser debido a diferencias en cuanto a la producción de raíces que podrían haber tenido las plántulas, ya que no hubo diferencias en cuanto a altura de plantas ni en producción de hojas (Fig.6).

En el nivel moderado de Cu (Nivel 1-200ppm), hubo un menor desempeño en cuanto a crecimiento relacionado con la exposición al cobre en comparación con el control, pero aún así lograron una mayor supervivencia en comparación con el Nivel 2 y una mayor biomasa, sin alcanzar el 50% de letalidad de la población (Fig.7). Cabe destacar que hubo una mayor producción de biomasa y mayor crecimiento en plantas provenientes de Pichicuy en el valor intermedio de contaminación, lo que va en contra a lo esperado, ya que no es una población que haya estado antes sometida a contaminación en su medio original, esto se podría relacionar con el mayor crecimiento en altura que hubo en plantas provenientes de Pichicuy (Fig.6), la diferencia en cuanto biomasa total no fue tan marcada como en el control, ya que fue de 0,04g en plantas Ventanas y 0,06 en plantas de Pichicuy.

Sin embargo, plantas sometidas a 800ppm (nivel alto de estrés) no lograron sobrevivir todo el experimento. Esto se atribuye a que no lograron la suficiente biomasa para poder sobrevivir los meses de más calor, hubo un notorio efecto del cobre en la acumulación de biomasa, altura y número de hojas fotosintéticas, llegando a un 50% de letalidad de la población a una biomasa aún insuficiente (cerca a 0,02 g en las dos poblaciones). Este efecto negativo del cobre fue igual para ambas poblaciones, incluso plantas provenientes de Ventanas no presentaron un mejor desempeño en comparación a las plantas de Pichicuy. Esta relación de producción de biomasa y mortalidad ha sido descrita también para la hierba perenne *Polygonum cuspidatum*, muchas plantas no alcanzan a producir la biomasa necesaria en ambientes estresantes, este efecto se exagera en estado de plántula (Maruta 1983).

Los resultados encontrados en los experimentos de jardín común concuerdan con lo encontrado en el trasplante recíproco. De los resultados encontrados en el sitio Ventanas, hubo una baja germinación de las semillas (Tabla 3), sólo alrededor del 5% logró germinar, y de las plantas que lograron germinar, sólo sobrevivieron 30 días (ambas poblaciones). Por lo tanto plantas pertenecientes al mismo sitio no tienen un mejor desempeño que plantas provenientes de otros sitios, no existiría adaptación local en la población de *E.californica* en el sitio contaminado, este mismo efecto negativo sobre el desempeño de plántulas fue encontrado un trabajo de Ginocchio (1996). Esta alta mortalidad luego de la germinación también se presentó en un experimento de trasplante recíproco entre áreas contaminadas y no contaminadas de Mateos-Naranjo et al. (2011) donde todas las plántulas de la poaceae *Spartina densiflora* al crecer en suelo con sedimento contaminado y altamente ácido murieron sólo semanas luego de la germinación, esto lo atribuyeron a una alta biodisponibilidad de metales tóxicos, sin encontrar suficiente evidencia de que *S. densiflora* presente ecotipos tolerantes a metales pesados. En cambio, en el sitio no contaminado, las plantas lograron establecerse, e incluso hubo una mayor supervivencia en plántulas provenientes de Las Ventanas. Se ha descrito que el mecanismo de tolerancia que poseen algunas plantas está asociado a una inversión de recursos en las distintas estrategias que puedan presentar, por lo tanto cuando estas mismas plantas son llevadas a zonas libres de contaminación usualmente tienen un menor crecimiento que las no-tolerantes (Wu & Antonovics, 1978), esto potencia la conclusión que las plantas de Ventanas no estarían adaptadas localmente.

Los resultados indican que Ventanas es un sitio estresante, pero principalmente para los primeros estadíos de *E.californica*. Es de conocimiento que el estado de plántula es considerado el “cuello de botella” en la historia de vida de gran parte de las especies de plantas, debido al pequeño tamaño (insuficiente biomasa), limitaciones en aclimatación, hábitat idóneo, e incluso este efecto es exacerbado frente a eventos estocásticos (Allessio et al. 2008).



Los resultados evidencian que no existiría una adaptación local de *E.californica* en el sitio contaminado. Para esta especie las condiciones del sitio restringen el potencial de supervivencia de las plántulas. Esto además se demuestra en el experimento de jardín común, donde hubo un efecto negativo en todas las plantas expuestas a Cu sin importar el origen de la semilla, esto contrastado con el mejor desempeño que hubo en el control. La población de *E.californica* no estaría adaptada exclusivamente a las condiciones ambientales de Ventanas, presentando importantes limitaciones en los primeros estadios. Esto no apoyaría lo encontrado por Peña-Gómez & Bustamante (2012), donde encontraron que la población de *E.californica* cercana a la zona contaminada presenta una tasa finita de crecimiento ( $\lambda$ ) mayor a 1 ( $\lambda=1,21$ ), considerada una población en proceso de crecimiento y sin restricciones demográficas. Por lo que la persistencia y crecimiento de la población podría estar siendo explicada por otro fenómeno ecológico o la limitación en el estado de plántula no es suficiente como para causar efectos a nivel poblacional.

Una posible explicación a este suceso podría ser la facilitación intra-específica, siendo este proceso muy probable, ya que las posibilidades de facilitación aumentan al no haber procesos de adaptación local en la población (Espeland & Rice 2007).

En terreno durante la estación de primavera, se encontraron reclutas en el sitio de Ventanas sólo alrededor de la “planta-madre”, especialmente sobre la biomasa muerta de esta, en cambio en Pichicuy no existía este patrón, siendo la distribución de las plántulas azarosas (observaciones personales). Ginocchio et al. (2004) evaluando la densidad de plántulas en espacios abiertos y en dos hierbas dominantes (*Baccharis linearis* y *Sphaeralcea obtusiloba*) denominadas nodrizas, encontró que del total de especies que se establecían en el lugar, gran cantidad de plántulas se encontraban cercanas a nodrizas, otorgando mejores condiciones microambientales y mejores condiciones del suelo, considerando que es un sector altamente contaminado.

En un trabajo de Fajardo & McIntire (2011) encontraron facilitación intraespecífica en plántulas de una especie de *Nothofagus*, señalando que esta interacción puede ser dinámica dependiendo del grado de estrés del ambiente, además le otorgan importancia a este tipo de interacciones principalmente en ambientes que no son estables o varían a través de gradientes. Muchas plantas no tienen éxito en ambientes estresantes, por lo que la facilitación tendría un efecto positivo en el desempeño de las plantas, principalmente en especies anuales (Espeland & Rice 2007). Por lo tanto, un posible mecanismo de resistir y sobrevivir en ambientes contaminados con metales pesados que estarían utilizando las plántulas de *E.californica*, sería la facilitación por parte de su “planta madre”, pudiendo sobrellevar las condiciones estresantes, sin afectar el crecimiento poblacional de la especie en el sitio contaminado.

## BIBLIOGRAFIA

Ackerly, D. D., Dudley S.A., Sultan S.E., Schmitt J., Coleman J.S., Randall Linder C., Sandquist D.R., Geber M.A., Evans A.S., Dawson T.E. & Lechowicz M.J. (2000). The evolution of plant ecophysiological traits: recent advances and future directions. *BioScience* 50 (11): 979- 995.

Allesio M., Parker T. & Simpson R. (2008). *Seedling ecology and evolution*. Cambridge University Press, pp.536.

Antonovics, J. & Bradshaw A.D. (1970). Evolution in closely adjacent plant populations. VII Clinal patterns of a mine boundary. *Heredity* 25: 349–362.

Antonovics, J. (2006) Evolution in closely adjacent plant populations X: long-term persistence of prereproductive isolation at a mine boundary. *Heredity* 97, 33–37.

Arroyo MTK, Marticorena C, Matthei O & Cavieres L.A. (2000). Plant invasions in Chile: present patterns and future predictions. In: *Invasive species in a changing world* (HA Mooney & RJ Hoobs, eds), pp. 385-421. Island Press, Washington, DC.

Baker, H.G. (1965). Characteristics and modes of origin of weeds. *The Genetics of Colonizing Species* (eds H.G. Baker & G.L. Stebbins), pp. 147–169. Academic Press, New York.



Baron, M., Arellano, J. B. & Lopez Gorge, J. (1995). Copper and photosystem II: A controversial relationship. *Physiologia Plantarum* 94: 174-180.

Barret S.C.H., Colautti R.I. & Eckert C.G. (2008). Plant reproductive systems and evolution during biological invasion. *Molecular Ecology* 17: 373-383.

Bes C.M., Mench M., Aulen M., Gaste H. & Taberly J. (2010). Spatial variation of plant communities and shoot Cu concentrations of plant species at a timber treatment site. *Plant and soil* 330: 267-280.

Blanquart F., Kaltz O., Nuismer S.L. & Gandon S. (2013). A practical guide to measuring local adaptation. *Ecology letters* 16: 1195-1205.

Bone E. & Farres A. (2001). Trends and rates of microevolution in plants. *Genetica* 112–113: 165–182.

Bossdorf O., Auge H., Lafuma L., Rogers W.E., Siemann E. & Prati D. (2005). Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia* 144: 1-11.

Bradshaw, A.D. & McNeilly T. (1991). Evolution in relation to environmental stress, pp. 11–32 in *Ecological Genetics and Air Pollution*, edited by G.E. Taylor, L.F. Pitelka & M.T. Clegg. Springer-Verlag, Berlin.

Cambrollé J., Mateos-Naranjo E., Redondo-Gómez S., Luque T. & Figueroa M.E. (2011). Growth, reproductive and photosynthetic responses to copper in the yellow-horned poppy, *Glaucium flavum* Crantz. *Environmental and Experimental Botany* 71(1): 57-64.

Chatterjee J. & Chatterjee C. (2000). Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. *Environmental Pollution* 109:69–74.

Ciscato M., Valcke R., Van Loven K., Clijsters H. & Navari-Izzo F. (1997). Effects of in vivo copper treatment on the photosynthetic apparatus of two *Triticum durum* cultivars with different stress sensitivity. *Physiologia Plantarum* 100: 901-908.

Clijsters, H., Van Assche, F. & Gora, L. (1991). Physiological responses of higher plants to soil contamination with metals. - In *Ecological Responses to Environmental Stresses* (J. Rozema and J. A. C. Verkleij, eds), pp. 32-39. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. ISBN 0-7923-0762-3.

Cook, S.A. (1962). Genetic system, variation, and adaptation in *Eschscholzia californica*. *Evolution*, 16, 278–299.

Cuypers A. (2000). Phytotoxic concentrations of copper and zinc induce antioxidative defence in *Phaseolus vulgaris*, cv. Limburgse vroege: a comparative study. PhD dissertation, Limburgs Universitair Centrum, Diepenbeek, Belgium.

Espeland E. K. & Rice K. J. (2007). Facilitation across stress gradients: the importance of local adaptation. *Ecology* 88 (9): 2404-2409.

Fajardo A. & McIntire E.J.B. (2011). Under strong niche overlap conspecifics do not compete but help each other to survive: facilitation at the intraspecific level. *Journal of Ecology* 99: 642-650.

Fernandes J.C. & Henriques F.S. (1991). Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. *Botanical Review* 57:246–273.

Funk J.L. (2008) Differences in plasticity between invasive and native plants from a low resource environment. *Journal of Ecology* 96: 1162–1173.

Funk, J.L. & P.M. Vitousek. (2007). Resource-use efficiency and plant invasion in low-resource systems. *Nature* 446: 1079-1081.

Gan J., Xiong Z., Li J. & Chen D. (2013). Differential response to copper stress in the reproductive resources and allocation of metallophyte *Kummerowia stipulacea*. *Ecotoxicology and environmental safety* 89: 204-211.

Ginocchio R. (2007). Aplicabilidad de los modelos de distribución espacio- temporales de la vegetación en ecosistemas terrestres sujetos a procesos de contaminación ambiental. Tesis presentada al Departamento de Ecología de la Pontificia Universidad Católica de Chile, como uno de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, mención Ecología.

Ginocchio R., Carvallo G., Toro I., Bustamante E., Silva Y. & Sepúlveda N. (2004). Micro-spatial variation of soil metal pollution and plant recruitment near a copper smelter in Central Chile. *Environmental Pollution* 127: 343-352.

González I., Muena V., Cisternas M. & Neaman A. (2008). Acumulación de cobre en una comunidad vegetal afectada por contaminación minera en el valle de Puchuncaví , Chile central. *Revista Chilena de Historia Natural* 81: 279-291.

Hän-Fling B. & Kollmann J. (2002). An evolutionary perspective on biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution* 17:545–546.

Howeler, R.H. (1983). Análisis del tejido vegetal en el diagnóstico de problemas nutricionales algunos cultivos tropicales. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 28 pp.

Jacquemyn H., De Meester L., Jongejans E. & Honnay O. (2012). Evolutionary changes in plant reproductive traits following habitat fragmentation and their consequences for population fitness. *Journal of Ecology* 100: 76-87.

Kawecki T.J. & Ebert D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology letters* 7: 1225-1241.

Kercher, S.M. & J.B. Zedler. (2004). Multiple disturbances accelerate invasion of reed canary grass (*Phalaris arundinacea* L.) in a mesocosm study. *Oecologia* 138: 455-464.

Lambers, H., Chapin F. & Pons T. (1998). *Plant Physiological Ecology*. Springer.



Lee C.E. (2002). Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution* 17:386–391.

Leger, E.A. & Rice, K.J. (2003). Invasive California poppies (*Eschscholzia californica* Cham.) grow larger than native individuals under reduced competition. *Ecology letters* 6: 257-264.

Maruta E. (1983). Growth and survival of current-year seedlings of *Polygonum cuspidatum* at the upper distribution limit on Mt. Fuji. *Oecologia* 60: 316-320.

Mateos-Naranjo E., Andrades-Moreno L. & Redondo-Gómez S. (2011). Comparison of germination, growth, photosynthetic responses and metal uptake between three populations of *Spartina densiflora* under different soil pollution conditions. *Ecotoxicology and environmental safety* 74(7): 2040-2049.

Muth N.Z. & Pigliucci M. (2007) Implementation of a novel framework for assessing species plasticity in biological invasions: responses of *Centaurea* and *Crepis* to phosphorus and water availability. *Journal of Ecology* 95: 1001–1013.

Nordal, I., Haraldsen K.B., Ergon A. & Eriksen A.B. (1999). Copper resistance and genetic diversity in *Lychnis alpina* (Caryophyllaceae) populations on mining sites. *Folia Geobotanica* 34: 471–481.

Novak, S.J. (2007). The role of evolution in the invasion process. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 3671–3672.

Ouzounidou, G. (1996). The use of photoacoustic spectroscopy in assessing leaf photosynthesis under copper stress: Correlation of energy storage to photosystem II fluorescence parameters and redox change of P700. *Plant Science* 113: 229-237.

Parker I.M., Rodriguez J. & Loik M.E. (2003) An evolutionary approach to understanding the biology of invasions: local adaptation and general-purpose genotypes in the weed *Verbascum thapsus*. *Conservation Biology* 17, 59–72.

Peña-Gómez F & Bustamante R.O. (2012). Life history variation and demography of the invasive plant *Eschscholzia californica* Cham. (Papaveraceae), in two altitudinal extremes, Central Chile. *Gayana Botánica* 69(1): 113-122.



Pichancourt J-B. & van Klinken R.D. (2012). Phenotypic plasticity influences the size, shape and dynamics of the geographic distribution of an invasive plant. *PlosOne* 7(2): 1-12.

Prentis P.J., Wilson J.R.U., Dormontt E.E., Richardson D.M. & Lowe A.J. 2008. Adaptive evolution in invasive species. *Trends in plant Science* 13 (6): 288-294.

Reznick D.N. & Ghalambor C.K. (2001). The population ecology of contemporary adaptations: what empirical studies reveal about the conditions that promote adaptive evolution. *Genetica* 112–113:183–198.

Richards C.L., Bossdorf O., Muth N.Z., Gurevitch J. & Pigliucci M. (2006). Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions. *Ecology Letters* 9: 981–993.

Richardson J.L., Urban M.C., Bolnick D.I. & Skelly D.K. (2014). Microgeographic adaptation and the spatial scale of evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 29 (3): 165-176.

Sandmann, G. & Böger, P. (1980). Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. *Plant Physiology*. 66: 797-800.

Taíz L. & Zeiger E. (2006). *Plant Physiology*. The Benjamin-Cummings Publishing Company, Inc., New York. 559p.

Tang S.R., Wilke B.M., Huang C.Y. (1999). The uptake of copper by plants dominantly growing on copper mining spoils along the Yangtze River, the People's Republic of China. *Plant and Soil* 209:225–232.

Thompson J.N. (1998). Rapid evolution as an ecological process. *Trends in Ecology and Evolution* 13:329–332.

Thuiller, W., Lavorel S., Araujo M.B., Sykes M.T., Prentice I.C. (2005). Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:8245–8250.

USDA, NRCS. (2010). The Plants Database (Online database: <http://plants.usda.gov>. 1 January 2010). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA.

Uveges J.L., Corbett A.L., & Mal T.K. (2002). Effects of lead contamination on the growth of *Lythrum salicaria* (purple loosestrife). *Environmental Pollution* 120: 319-323.

Wu, L. & Antonovics J. (1978). Zinc and copper tolerance of *Agrostis stolonifera* L. in tissue culture. *American Journal of Botany* 65: 268-271.

Wu, L. & Kruckeberg A.L. (1985). Copper tolerance in two legume species from a copper mine habitat. *New Phytologist*. 99: 565–570.

Yruea I (2005). Copper in plants. *Brazilian Journal of Physics* 17:145–156.

Zhang Q., Yang R., Tang J & Chen X. (2008). Competitive interaction between the invasive *Solidago canadensis* and native *Kummerowia striata* in lead contaminated soil. *Botanical Studies* 49: 385-391.

Zobel M, Pilt I, Moora M, Pärtel M, Liira J (1999). Small-scale dynamics of plant communities in an experimentally polluted and fungicide-treated subarctic birch-pine forest. *Acta Oecologica* 20:29–37.

## Anexo 1

### 1. Dinámica temporal de frecuencia acumulada de germinación en experimento de jardín común

En el experimento de jardín común en plantas control no hubo diferencias significativas en cuanto a la frecuencia acumulada en el tiempo entre ambas poblaciones (K-S non parametric;  $p < 0,10$ ), aunque hubo una mayor germinación total en las semillas provenientes de Las Ventanas. En el nivel 1 de contaminación la germinación fue más uniforme a lo largo del tiempo, tampoco hubo diferencias significativas entre las poblaciones (K-S non parametric;  $p > 0,10$ ). En el nivel 2 de contaminación no hubo diferencias significativas (K-S non parametric;  $p > 0,10$ ).

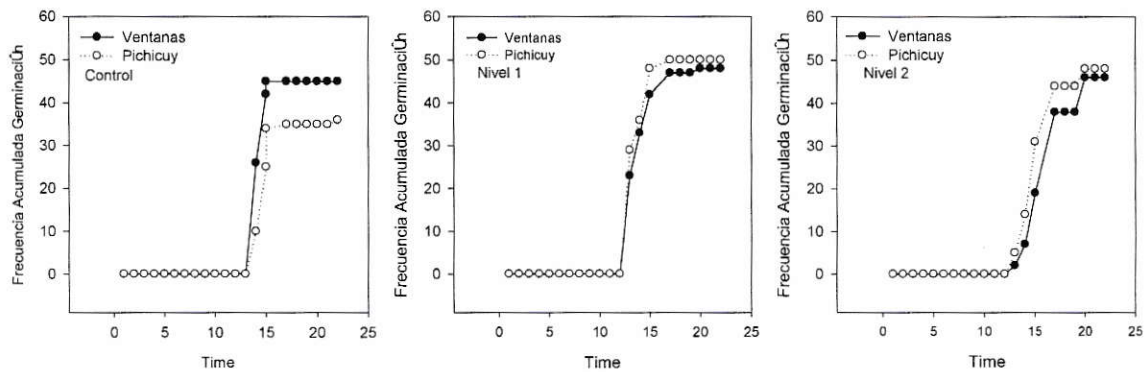


Figura. Frecuencia acumulada de germinaciones en el tiempo (días) de dos poblaciones de Chile central, en control, nivel 1 de contaminación y nivel 2 de contaminación.

## Anexo 1

### 2. Dinámica temporal de frecuencia acumulada de germinación en experimento de trasplante recíproco

En la frecuencia acumulada de germinación en el sitio de Ventanas hubo diferencias significativas (K-S non parametric;  $p < 0,001$ ) entre las dos poblaciones, al igual que en el sitio de Pichicuy (K-S non parametric;  $p < 0,001$ ). Existiría un efecto de la contaminación en cuanto al porcentaje de germinación, ya que las semillas en ambos casos aumentan su germinación al estar en un sitio libre de contaminación.

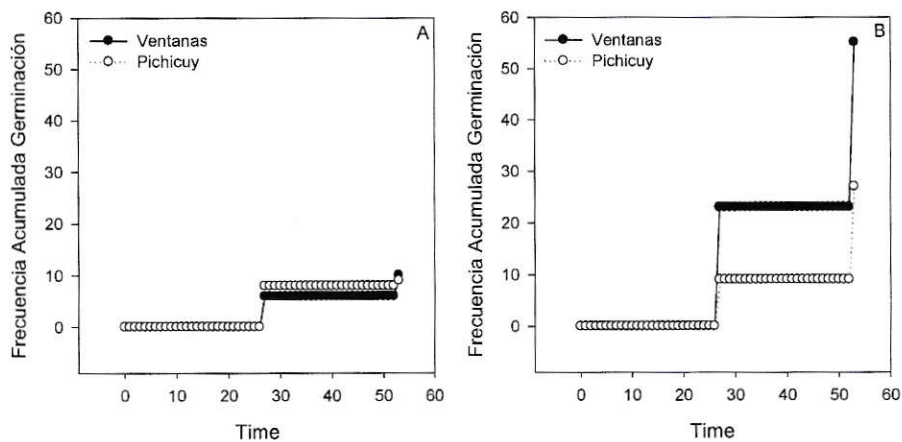


Figura. Frecuencia acumulada de germinaciones en el tiempo (días) en dos sitios (trasplante recíproco). (A) Sitio Ventanas (B) Sitio Pichicuy.





## Anexo 2

1. Composición nutritiva de compuesto comercial utilizado (Phostrogen) en riego de plantas en jardín común

<b>Nutriente</b>	<b>Contenido</b>
Nitrógeno (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> y NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	1 % y 12 %
Ácido fosfórico (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	10,0 %
Óxido de Potasio (K <sub>2</sub> O)	27,0 %
Trióxido de Azufre (SO <sub>3</sub> )	7,5 %
Óxido de Magnesio (MgO)	2,50 %
Hierro (Fe)	0,04 %
Calcio (Ca)	< 0,025 %
Boro (B)	< 0,02 %
Manganeso (Mn)	< 0,02 %
Cobre (Cu)	0,0055 %
Zinc (Zn)	0,0055 %
Molibdeno (Mo)	0,0016 %