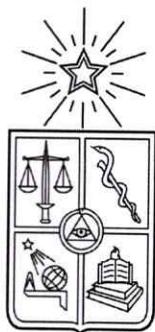


UCH-FC  
MAG-B  
P116  
C 1



**PAPEL Y DETERMINANTES DE LA LONGEVIDAD FLORAL POTENCIAL  
EN *RHODOLIRIUM MONTANUM* PHIL. EN LA CORDILLERA DE LOS  
ANDES DE CHILE CENTRAL**

**Tesis**

Entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de

**Magíster en Ciencias Biológicas**

Facultad de Ciencias

Por

**Diego Andrés Pacheco Sandoval**

Julio, 2016

Director de Tesis Dra.: Mary Kalin Hurley  
Co-Director de Tesis Dr.: Lohengrin Cavieres González



**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE MAGÍSTER**

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

**Diego Andrés Pacheco Sandoval**

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 8  
de junio de 2016

Director de Tesis:

Dra. Mary Kalin Hurley



Co-Director de Tesis:

Dr. Lohengrin Cavieres González

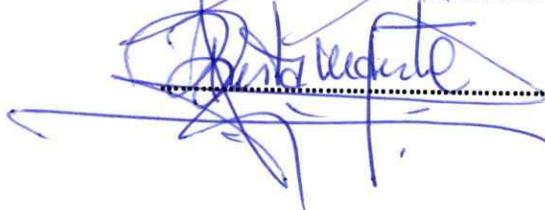
.....

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Alejandra González Vásquez



Dr. Ramiro Bustamante Araya



## DEDICATORIA

A mi madre y a su continuo apoyo.

## BIOGRAFÍA



Nací el 10 de junio de 1989 en una amorosa familia que me permitió desarrollar la curiosidad, cualidad que posteriormente me llevaría a estudiar biología en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. En el año 2013 inicié el Programa de Magíster en Ciencias Biológicas de la misma casa de estudios con el fin de experimentar más de cerca la vida del ecólogo, una de las disciplinas biológicas que más me han atraído debido al contacto directo con la naturaleza. Gracias a esta experiencia desarrollé un profundo interés en la bioestadística, el cual espero cultivar en los años venideros en pos del entendimiento del medio ambiente.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco el financiamiento de CONICYT-PCHA/Magíster Nacional/2013 – 22131579, ICM-MINECON P05-002-IEB, PFB23, y FONDECYT regular 1140541. También debo agradecer el indispensable, y muchas veces desinteresado, apoyo en terreno de Katherinne Rojas, Benjamín Castro, Claudia Scognamillo, Constanza Pinochet, Natalia Beiza, Alejandra Rojas, Laia Mallén, Sofía Valenzuela, Eduardo Pizarro, Valentina Riffo, Daniela Pérez, Valeria Robles, Paula Vidal y, con especial mención, a Mauricio Gorostiaga, Iván López, Nicolás Meza, Felipe Maldonado y Jean Pierre Abrileaut. Por último, agradezco toda la guía prestada por mis tutores en las distintas fases del trabajo y los comentarios y críticas del comité revisor.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
BIOGRAFÍA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	v
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT.....	xv
Introducción.....	1
Hipótesis.....	6
Objetivo general.....	7
Objetivos específicos .....	7
Metodología .....	8
Sitios de estudio.....	8
Modelo de estudio.....	8
Periodo de receptividad estigmática en <i>Rhodolirium montanum</i> .....	9
Evaluación de la presencia de senescencia floral inducida por la polinización... 11	
Longevidad floral potencial floral en poblaciones naturales.....	12
Tasa de visita floral de los polinizadores .....	14

Duración hasta la primera polinización .....	14
Limitación de polen en poblaciones naturales .....	14
Relación entre longevidad floral potencial y tasa de respiración.....	15
Análisis estadísticos .....	17
RESULTADOS .....	24
Periodo de receptividad estigmática en <i>Rhodolirium montanum</i> .....	24
Evaluación de la presencia de senescencia floral inducida por la polinización...	26
Longevidad floral potencial floral en poblaciones naturales.....	27
Tasa de visita floral de los polinizadores .....	31
Duración hasta la primera polinización .....	34
Limitación de polen en poblaciones naturales .....	36
Relación entre longevidad floral y tasa de respiración.....	39
DISCUSIÓN.....	41
Longevidad floral potencial y la temperatura ambiental en el gradiente altitudinal .....	42
Longevidad floral potencial y el periodo de receptividad .....	43
Tasa de visita en el gradiente altitudinal .....	44
Limitación de polen en el gradiente altitudinal.....	45
Longevidad floral potencial y tasa respiratoria .....	46

CONCLUSIONES .....	48
REFERENCIAS .....	50
Anexo .....	55
Anexo 1: El modelo binomial negativo inflado en ceros .....	55
Anexo 2: Tabla.....	56
Anexo 3: Figura. ....	57



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Promedio de las distintas variables medidas y calculadas por temporada y sitio de estudio. ....	28
--	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Flores de *Rhodolirium montanum* Phil. Se muestra un agrupamiento de flores producidas por bulbos clones resultado de reproducción asexual (*genet*). .....12
- Figura 2. Fenología floral de *Rhodolirium montanum* en las temporadas 2013-2014 y 2014-2015. Se muestra la fracción de plantas cuya flor está abierta en relación al total de plantas seguidas de cada sitio de estudio. ....27
- Figura 3. Longevidad floral potencial de *Rhodolirium montanum* en función de la temperatura ambiental a 15 cm del suelo durante el periodo post-antesis de cada flor durante las temporadas 2013-2014 y 2014-2015. ....30
- Figura 5. Microfotografías de fluorescencia mostrando tubos polínicos de *Rhodolirium montanum* creciendo en el estigma desde los granos de polen en distintas proporciones. La anilina azul fluoresce en verde demarcando los tubos polínicos y los granos de polen en naranja debido a su fluorescencia propia..... 24
- Figura 4. Representación de cada clase de la germinación de polen en el total de flores polinizadas un día dado del periodo post-antesis. ....25
- Figura 6. Temperatura media a 15 cm del suelo y tasa de visita floral del periodo de observación en cada sitio de estudio. La línea continua corresponde a la temperatura

media del periodo de observación, mientras que el área coloreada indica la temperatura máxima y la mínima. Los puntos corresponden a la mediana de la tasa de visita. Los extremos de las barras indican el primer y tercer cuartil de la tasa de visita. .... 32

Figura 7. Promedio diario de la tasa de visita floral en función de la temperatura media diaria a 15 cm del suelo. Se promediaron los datos de todos los periodos de observación de un mismo día. Los colores distinguen los datos provenientes de los sitios de estudio. .... 33

Figura 8. Fracción de flores vírgenes en función de los días post-antesis según el estimador de Kaplan-Meier en los tres sitios de estudio. Las líneas punteadas indican un intervalo de confianza de 95%. Los pequeños segmentos en las líneas continuas indican datos censurados. .... 34

Figura 9. Densidad de probabilidad de la razón de semillas maduras por fruto. Cada panel muestra un sitio de estudio. En azul se muestra el tratamiento de suplementación manual de polen y en rojo el tratamiento de control. .... 36

Figura 10. Probabilidad de aborto del fruto de *Rhodolirium montanum* según sitio de estudio y tratamiento experimental predicho por el componente binario del modelo BNIC. Los puntos corresponden a la estimación y las barras de error a su intervalo de confianza de 95%. En el texto están los valores de los contrastes ortogonales para distinguir el efecto del tratamiento en cada sitio de estudio..... 37

Figura 11. Razón de semillas maduras por fruto predicho por el modelo binomial negativo inflado en ceros en cada sitio. Los puntos indican el valor predicho por el modelo y las barras indican el intervalo de confianza de 95%. En rojo se muestra las estimas del tratamiento de control y en azul, el de suplementación de polen. ....38

Figura 12. Longevidad floral en relación con la tasa respiratoria medida en la flor en cada sitio de estudio.....40

## LISTA DE ABREVIATURAS

BNIC: modelo binomial negativo inflado en ceros.

g.l.: Grados de libertad

PRDE: pruebas de reducción de desviación escalda.

PRV: prueba de razón del logaritmo natural de la verosimilitud.

RVc: Razón del logaritmo natural de la verosimilitud con corrección de Bartlett

## RESUMEN

En las zonas alpinas, las bajas y variables temperaturas asociadas con reducidas y cambiantes tasas de visita floral (TV) se esperan que produzcan mayor limitación de polen (LP) en plantas alpinas que en plantas de tierras bajas. Sin embargo, un meta-análisis reciente no revela tal diferencia, lo que sugiere que en zonas alpinas existen rasgos, como un incremento de la longevidad floral potencial (LFP), que podrían compensar las bajas TV a mayores altitudes. Ya que la LFP es afectada plásticamente por la temperatura, se espera un incremento de la LFP. Un incremento de la LFP podría contrarrestar el declive altitudinal de la TV y, por lo tanto, reducir la LP.

El papel de plasticidad de la LFP en aminorar la LP no ha sido estudiado en Chile. Sin embargo, se ha visto experimentalmente que la tasa respiratoria de la flor y la temperatura ambiental se relacionarían con la longevidad floral, pero no hay estudios en poblaciones naturales. Basado en lo anterior, en esta tesis se estudia la LFP, TV, LP y la tasa de respiración en tres poblaciones de *Rhodolirium montanum* Phil. (Amaryllidaceae) localizadas a diferentes altitudes. Se determinó la longevidad estigmática como también el efecto de la polinización sobre la longevidad floral.

Los resultados demuestran que los estigmas son receptivos a lo largo de la vida de la flor. Menores temperaturas se asocian con menores TV. En un año la LFP declinó con la

altitud, sin embargo, en un segundo año no hubo diferencias significantes entre sitios. El gran incremento altitudinal de la LFP en una de las temporadas de floración indica que otros efectos plásticos, como la humedad del suelo, también están en juego. Se encontró LP en las poblaciones de mayor e media elevación, pero no en la de menor elevación. A pesar de haber flores más longevas en sitios más altos en algunos años, esta diferencia altitudinal fue insuficiente para controlar completamente la LP. La tasa de respiración de *R. montanum* no mostró relación con la LFP. Los determinantes de la plasticidad de la LFP en la zona alpina resultan ser más complejos de lo usualmente visualizado en la ecología de montaña, sugiriendo que otros factores ambientales deberían ser considerados en la futura investigación.

## ABSTRACT

In alpine areas, low and variable temperatures associated with reduced and stochastic flower visitation rates (VR) are expected to lead to a higher incidence of pollen limitation (PL) in alpine plants than in lowland plants. However, a recent meta-analysis reveals no difference in the levels of PL between alpine and lowland plants, suggesting that in alpine areas traits such as an increase in potential flower longevity (PFL) might compensate for lower VRs at the higher altitudes. Because PFL is affected plastically by temperature, an altitudinal increase in PFL is expected. An altitudinal increase in PFL could offset the altitudinal decline in visitation rates and therefore reduce PL.

The role of plasticity of PFL in reducing PL over the altitudinal gradient has not been previously studied in Chile. Although, it has been experimentally shown that flower respiration rates and temperature are related to floral longevity, there are no studies in natural populations. Based on the above, in this thesis we studied PFL, VR, PL and flower respiration rates in three populations of *Rhodolirium montanum* Phil. (Amaryllidaceae) located at different altitudes. Stigma longevity was determined as the effect of pollination on flower longevity evaluated.

Results demonstrate stigmas are receptive throughout flower life length. Lower temperatures are associated with decreased VRs. In one year PFL declined with altitude.

## Introducción

Un denominador común de las zonas alpinas es la baja temperatura (Körner 2003). Las bajas temperaturas restringen las tasas de crecimiento de las plantas (Atkin & Day 1990; Bonhomme 2000), limita la actividad de los polinizadores (Corbet et al. 1993; Bergman et al. 1996) y acorta el tiempo disponible para que los frutos y semillas maduren (Inouye et al. 2002). Estudios recientes usando cámaras de espectro infrarrojo con resolución espacial fina, han mostrado que las zona alpinas son muy variables en temperatura a escala local (Scherrer & Körner 2011). Dicha variación se debe a la tasa de enfriamiento adiabático del aire (i.e. la disminución de la temperatura al incrementarse la altitud) y a la compleja topografía de las montañas (Barry 2008). Cómo las poblaciones de especies alpinas que crecen bajo diferentes condiciones térmicas locales logran reproducirse bajo condiciones de temperatura altamente variables es una pregunta fundamental en la ecología de alta montaña.

En relación a la variación térmica en las zonas alpinas, se han descrito diferencias en el ensamble de polinizadores: sobre gradientes altitudinales (Arroyo et al. 1982; Maad et al. 2013), en laderas de exposición opuesta (Rozzi et al. 1997) y en sitios en que la velocidad del viento varía (Torres-Díaz et al. 2007). También se han descrito efectos en las tasas de visita de los polinizadores: a nivel de comunidad (Inouye & Pyke 1988; Arroyo et al. 1985; McCall & Primack 1992), entre especies del mismo género (Blionis & Vokou

2001), entre subespecies de la misma especie (Blionis & Vokou 2002) y entre poblaciones de la misma especie (Bingham & Orthner 1998; Utelli & Roy 2000; Totland & Schulte-Herbrüggen 2003; Maad et al. 2013); generalmente siendo el servicio de polinización más escaso cuando la temperatura local es más baja.

De acuerdo con las bajas tasas de polinización, para las zonas alpinas se ha encontrado casos de limitación de polen (por ejemplo, Muñoz & Arroyo 2006). Sin embargo también hay numerosas casos en donde no lo hay (por ejemplo, Totland 1997). Un meta-análisis reciente concluyó que las zonas alpinas no muestran magnitudes significativamente mayores de limitación de polen que comunidades que se encuentran por debajo de la línea arbórea (García-Camacho & Totland 2009). De la misma manera, recientemente Maad et al. (2013) no encontraron mayor limitación de polen a alturas mayores entre poblaciones de una especie de *Campanula*. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Arroyo & Squeo (1990) que demuestran que la incidencia de incompatibilidad genética no aumenta con la altura en los Andes patagónicos. Los resultados de Arroyo & Squeo (1990) y García-Camacho & Totland (2009) sugieren que las bajas tasas de polinización en la zona alpina no son limitantes o que las plantas alpinas han evolucionado rasgos particulares que compensen las bajas tasas de polinización.

En ese contexto se ha planteado la “hipótesis de aumento de la probabilidad de polinización” (Arroyo et al. 2006), la que propone que las bajas tasas de polinización en las zonas alpinas serían compensadas en las plantas con rasgos que aumenten el atractivo o el periodo de receptividad floral.

Un rasgo relevante en la zona alpina es la longevidad floral potencial, definida como la duración del periodo desde que la flor se despliega (antesis) hasta que se cierra y/o marchita (Ashman & Schoen 1996). Mientras más tiempo una flor virgen pueda mantenerse receptiva al polen, mayor probabilidad habrá que reciba al menos una visita efectiva de los polinizadores (Ashman & Schoen 1996; Rathcke 2003; Müller 1881; Arroyo et al. 1985; Primack 1985). Entonces, si la extensión del periodo de receptividad estigmática se corresponde con la longevidad floral, en esta última podría ponerse a prueba esta hipótesis.

Respecto a la último, existe evidencia correlacional que asocia el incremento de la longevidad floral potencial (i.e. la longevidad de flores vírgenes) con disminución de la temperatura, ya sea en observaciones de campo (Yasaka et al. 1998; Arroyo et al. 2013; Teixido & Valladares 2015), en experimentos de campo donde se ha aumentado la temperatura de flores (Cabezas 2012; Arroyo et al. 2013) y en laboratorio (Hartley et al. 1995; Cevallos & Reid 2000; Lopez & Runkle 2004; Simone et al. 2012).

En consideración de lo anterior, se hace esperable que exista un gradiente altitudinal de longevidad floral producto de la tasa de enfriamiento adiabático. Favorablemente a esta idea se ha documentado que flores a mayores altitudes, y expuestas a polinizadores (longevidad efectiva o realizada), tienden a mantenerse abierta por más tiempo (Primack 1985; Bingham & Orthner 1998; Blionis & Vokou 2002; Giblin 2005; Blionis & Vokou 2001). También se ha documentado mayor longevidad floral en flores expuestas a

polinizadores en poblaciones locales donde la tasas de visita son menores (Lundemo & Totland 2007).

Es necesario destacar que la longevidad floral efectiva puede ser menor que la longevidad floral potencial debido a la presencia en algunas especies de senescencia floral inducida o acelerada por la polinización (Stead 1992). En consecuencia, la *“hipótesis de aumento de la probabilidad de polinización”* debería verificarse en la longevidad floral potencial y no en la efectiva, pues esta última también dependerá del momento de la polinización y de la intensidad específica de la respuesta al polen, y a nivel poblacional, de la tasa de visita floral.

Si la longevidad floral potencial es determinada en parte por la temperatura, la plasticidad en la longevidad podría jugar un rol fundamental en reducir la limitación de polen a nivel local en las especies alpinas que crecen bajo condiciones térmicas variables. Sin embargo, si bien se sabe que flores que se mantienen abiertas por más tiempo pueden compensar tasas de polinización bajas (Arroyo et al. 2013) aún no existen estudios que evalúen si diferencias en la longevidad floral potencial, producto de variación local de la temperatura, puedan contrarrestar la limitación de polen en la **Cordillera de los Andes de Chile.**

Las causas de la plasticidad en la longevidad floral, así como también los procesos fisiológicos que subyacen la variación natural de la longevidad floral potencial son pobremente entendidas. Tal como se encuentran en otros órganos de la planta (Criddle

et al. 1997), se puede esperar que la temperatura ambiental afecte la tasa de desarrollo floral, de tal forma que flores que se desarrollan tengan mayor longevidad floral, siendo de esta forma expuestas durante más tiempo a los polinizadores. A mayores temperaturas las tasas metabólicas serían mayores redundando en un desarrollo floral más rápido debido al gasto de los recursos florales limitados (Meulen-Muisers 2001; Gago & Monteiro 2011). En estudios de floricultura se ha encontrado que la tasa de respiración puede ser correlacionada positivamente con la temperatura y negativamente con la longevidad floral (Cevallos & Reid 2000; Çelikel & Reid 2005; Çelikel et al. 2010). De hecho, en floricultura se ha usado la tasa de respiración como indicador de la rapidez con la cual se produce la senescencia (Reid & Kofranek 1980; Wu et al. 1991; Monteiro et al. 2001). De esta forma la tasa de respiración podría constituir un buen proxy de la tasa de desarrollo de las flores en estudios ecológicos (Monteiro et al. 2001).

En esta tesis se estudia el papel de la longevidad floral de *Rhodolirium montanum* Phil. (= *Rhodophiala rhodolirion* (Baker) Traub) en la relación con la disponibilidad de polinizadores y limitación de polen en la Cordillera de los Andes de Chile central, además se indaga sobre las causas de variación de la longevidad floral en esta especie.

*Rhodolirium montanum* se distribuye de (1800) 2300-3100 (3300) m.s.n.m. en la Cordillera de los Andes de Chile central. Es una planta parcialmente autocompatible, pero sin capacidad de reproducción autónoma (Ladd & Arroyo 2009). En un estudio preliminar basado en pocos individuos, y durante un verano, se constató que no hay limitación de polen en *R. montanum* (Ladd & Arroyo 2009). Además, en un experimento

destinado a predecir los efectos del cambio climático sobre los procesos reproductivos en *R. montanum* se encontró que flores de plantas calentadas experimentalmente redujeron significativamente su longevidad floral potencial en comparación a los controles (Cabezas 2012), sugiriendo que la temperatura tiene un efecto directo sobre la longevidad floral potencial de esta especie. Estos antecedentes convierten a *R. montanum* en un excelente modelo de estudio para indagar en el papel de la longevidad floral potencial en compensar variación local en las tasas de visita de los polinizadores y sus consecuencias en la limitación de polen. Usando poblaciones de distintas altitudes en un gradiente cuya tasa de enfriamiento adiabático está estudiada (Cavieres & Arroyo 1999), nos interesa contestar las siguientes preguntas: 1) ¿Existen diferencias altitudinales en la longevidad floral potencial en *Rhodolirium montanum*?; 2) ¿Es la magnitud de la longevidad floral potencial un buen *proxy* de la receptividad de la flor?; 3) ¿Se reduce la tasa de visita con el aumento de la altitud?; 4) ¿La magnitud de la limitación de polen se mantiene constante en el gradiente altitudinal?; 5) ¿Las flores con tasas respiratorias menores tienen una mayor longevidad floral potencial?

### **Hipótesis**

- La longevidad floral potencial aumentará con la altitud y con la disminución de la temperatura en *Rhodolirium montanum*.
- La longevidad floral potencial será un buen *proxy* de la receptividad estigmática.
- La tasa de visita será menor en los sitios de mayor altitud, más fríos.
- La limitación de polen no diferirá entre sitios de diferente altitud.

- La longevidad floral guardará estrecha relación con la tasa respiratoria de la flor.

### **Objetivo general**

Indagar sobre los determinantes de la longevidad floral potencial de *Rhodolirium montanum* Phil. en su hábitat natural y en el papel que esta juega en aminorar la limitación de polen al compensar diferencias en la tasa de polinización.

### **Objetivos específicos**

- 1) Determinar la longevidad floral potencial a lo largo del gradiente altitudinal en *R. montanum*, y si la longevidad floral potencial es un buen *proxy* de la receptividad estigmática.
- 2) Evaluar la relación entre tasa de visita floral y longevidad floral potencial en sitios caracterizados por diferentes condiciones térmicas.
- 3) Comparar la magnitud de limitación de polen en sitios con tasas de visita diferentes.
- 4) Determinar la relación que la temperatura ambiental y la tasa de respiración tiene con la longevidad floral potencial.

## Metodología

### ***Sítios de estudio***

El estudio se realizó en la Cordillera de Los Andes de Chile central en la zona de Valle Nevado (33°21'-22' S). El primer sitio, sin pendiente, está ubicado en camino a Valle Nevado a 2347 m s.n.m. en el piso vegetacional subandino (sitio CVN), el segundo a 2638 m.s.n.m en una ladera de exposición norte en el camino a Valle Nevado en la transición entre los pisos subandino y altoandino y el tercero en Valle Nevado a 3073 m s.n.m. en el piso altoandino (sitio VN) con exposición suroeste. Cada sitio internamente es homogéneo en pendiente y exposición solar. Según la tasa adiabática de la zona se espera una diferencia en temperatura de aire durante el máximo de floración (enero) de por lo menos 4.4-6.4 °C entre las poblaciones extremas (basados en datos meteorológicos de dos años en la cuenca del río Molina, sector Valle Nevado: Cavieres & Arroyo 1999).

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

*Rhodolirium montanum* Phil. (= *Rhodophiala rhodolirion* (Baker) Traub) es un geófito que crece en la zona andina de los Andes de Chile, entre (1800) 2200- 3200 (3300) m.s.n.m. Florece a finales de diciembre hasta mediados de febrero, después de la senescencia de las hojas. La reproducción puede ser por semillas o vegetativa. A través de reproducción vegetativa pueden formarse agrupamientos de plantas de igual acervo genético, o *genet*,

compuestas de hasta 20 bulbos individuales (Figura 1). Es parcialmente autocompatible, pero no presenta autogamia autónoma (Ladd & Arroyo 2009). Cada individuo produce una flor grande sostenida por un largo pedúnculo. En poblaciones naturales se ha reportado que las flores pueden permanecer abiertas por 7-8 días (Ladd & Arroyo 2009; Cabezas 2012). Las flores son presumiblemente protándricas con las anteras abriendo el primer día, y los estigmas siendo receptivos por al menos 4 días (D. Pacheco observaciones no publicadas). El polinizador principal es la abeja generalista *Megachile saulcyi* (Ladd & Arroyo 2009).

#### ***Periodo de receptividad estigmática en Rhodolirium montanum***

Para determinar el periodo en que el estigma de *R. montanum* permite la germinación del polen y su penetración al estilo, se realizó un experimento durante la temporada de floración 2014-2015 en el cual flores vírgenes cubiertas con bolsas de exclusión de polinizadores se polinizaron manualmente en diferentes días del periodo post-antesis. Luego los estigmas fueron colectados y analizados en laboratorio. Para ello, en los sitios Alto y Bajo se marcaron 70 individuos por sitio, los cuales fueron cubiertos con bolsas de exclusión de polinizadores. Antes de cualquier manipulación, se les asignó un día particular post-antesis, desde el primer día hasta el séptimo (7 grupos de 10 flores), en el cual se les suplementó manualmente polen fresco de plantas del mismo sitio, con la condición de que no perteneciesen al mismo *genet*. En los casos en que la flor cerró antes del día de polinización establecido, estas quedaron sin manipular y fueron considerados como tal en el análisis.

Se colectaron los estigmas y estilos 2 o 3 días luego de la polinización manual para asegurar un tiempo suficiente para la germinación del polen. Se aseguró que al menos la totalidad de la mitad distal del estilo fuese colectada, sin dañar el ovario. Cada muestra fue conservada individualmente en tubos Eppendorf de 0,5 ml en una mezcla de alcohol 70% v/v y ácido acético en una proporción de 3:1.

Para teñir los tubos polínicos se realizó el protocolo de (Martin 1959) modificado. El funcionamiento de esta tinción se basa en el uso de anilina azul decolorada (Regan & Moffatt 1990) que emite a 509 nm al ser excitada por radiación de 370 nm y que se une a la calosa, polisacárido presente en la pared de los tubos polínicos formando tabiques durante su crecimiento y en menor medida en los granos de polen (Currier 1957; Taylor & Hepler 1997).

Cada muestra se trabajó de manera individual a lo largo de una batería de tubos de dos ml. Primero, los pistilos provenientes de la mezcla fijadora se lavaron durante 30 minutos en agua destilada para disminuir su acidez. Luego, con el fin de ablandar el tejido, se mantuvieron en una solución 1M de NaOH durante alrededor de 10 horas. Seguido de esto, las muestras se lavaron nuevamente en agua destilada durante 30 minutos y posteriormente se incubaron en una solución 0,01% p/v de anilina azul y  $K_2HPO_4$  al 0,05M durante dos horas en completa oscuridad. Se esperó que la solución de anilina decolorara antes de sumergir las muestras y así evitar encontrar trazas azules al momento de su observación.

Los pistilos teñidos se posicionaron en un portaobjeto con tres gotas de glicerina y fueron presionados con el cubre objeto para aplastar completamente el tejido. Para su posterior conservación, el borde del cubre objeto se selló con esmalte de uñas incoloro.

Cada muestra fue observada en un microscopio de fluorescencia Nikon Optiphot-2 dotado de una lámpara de alta intensidad Nikon modelo HB-10101AF y un filtro Nikon UV-2A. Para tener un registro y no dañar las muestras por la exposición prolongada a la radiación, se obtuvieron fotografías a partir de una cámara digital Canon Power Shot A610 que fue adaptada y conectada simultáneamente al microscopio y a un computador.

Un solo observador que no conocía la asignación de los tratamientos de la manipulación experimental realizó una estimación visual gruesa usando una escala categórica de la cantidad de tubos polínicos en el tercio distal del estilo, el medial y el proximal. Además, de la misma forma se realizó una estimación de la proporción de granos de polen germinados adheridos al estigma.

#### ***Evaluación de la presencia de senescencia floral inducida por la polinización***

Con el objetivo de evaluar la presencia del mecanismo de senescencia inducida o acelerada por la polinización en *Rhodolirium montanum*, se comparó la longevidad de las flores del experimento anterior. Si existiera senescencia inducida por la polinización, se espera que las flores polinizadas deben tener una longevidad menor que las flores vírgenes. Análogamente, las flores polinizadas tempranamente tendrían que presentar longevidades menores que aquellas polinizadas tardíamente. La longevidad floral se

midió registrando una vez por día el estado de las flores de todas las plantas en la parcela haciendo tres distinciones: 1) yema floral cerrada, 2) flor abierta, 3) flor senescente cerrada. Alternativamente, algunas flores terminaron su periodo de antesis por daño de herbívoros. El método estadístico usado permite manejar también esos casos (ver Análisis estadísticos).

### ***Longevidad floral potencial floral en poblaciones naturales***

Con el objetivo de evaluar la relación entre longevidad floral potencial y temperatura ambiental en sitios de diferente altitud, se trabajó en dos temporadas de floración consecutivas: las correspondientes a los veranos del 2013-2014 y 2014-2015. En la primera temporada se trabajó solo en los sitios Alto y Bajo, mientras que en la segunda se trabajó en los tres sitios de estudio. Se definieron áreas en cada uno de los sitios,



Figura 1. Flores de *Rhodolirium montanum* Phil. Se muestra un agrupamiento de flores producidas por bulbos clones resultado de reproducción asexual (*genet*).



identificándose las flores que allí se produjeron y al *genet* al cual correspondían a lo largo de cada temporada de floración. Todo ello con la finalidad de determinar si la longevidad potencial cambia de acuerdo con la variación natural en la temperatura a lo largo de la estación de floración. En la primera temporada las áreas designadas fueron de 1400 m<sup>2</sup> en el sitio Alto y 300 m<sup>2</sup> en el Bajo. En cambio, durante la segunda temporada se eligieron áreas entre 30 y 65 m<sup>2</sup>. Para evitar la posible senescencia floral inducida por polinización externa, se usaron bolsas de exclusión de polinizadores (cf. Arroyo et al. 2013) desde el estado en donde todas las yemas florales están cerradas hasta la senescencia floral. El estado de las flores se registró diariamente de la forma detallada más atrás. Adicionalmente, en la segunda temporada de floración se midió la altura de cada flor respecto al nivel del suelo. La altura de la flor se definió como la mínima distancia entre la inserción de las brácteas asociadas al escapo y el suelo.

Para poder determinar la relación entre la longevidad potencial con la temperatura, en cada sitio se midió la temperatura ambiental a 15 cm del suelo cada 15 minutos usando 10 registradores de temperatura y humedad relativa (HOBO U23 Pro v2; Onset Computer Corp., Cape Cod, MA, USA) distribuidos regularmente en la parcela durante todo el periodo de observación. Además, durante la temporada 2014-2015 se hizo un perfil de la temperatura del aire en los 20 cm más cercanos al suelo. Para ello se ubicaron registradores en cada sitio de estudio a 5, 10, 15 y 20 cm durante 9 días a partir del 27 de diciembre de 2014.

### ***Tasa de visita floral de los polinizadores***

Con el objetivo de medir la tasa de visita floral, entre el 6 y 21 de enero de 2015, el máximo de floración, dos observadores registraron las visitas florales en *R. montanum* en dos parcelas de 2 x 2 m. Estas fueron montadas diariamente en uno de los sitios según turnos regulares, de manera tal que se observaron 6 días en el sitio Bajo y 5 días en los sitios Medio y Alto. Cada día, entre las 9:00 y las 18:00 horas, se completaron 18 periodos de observación de 20 min con 10 min de descanso y rotación de los observadores. En cada periodo de observación se contó el número de flores abiertas de *R. montanum* y la cantidad de visitas florales, considerando solo aquellas en las que el polinizador tuvo contacto con el estigma.

### ***Duración hasta la primera polinización***

Para evaluar la importancia de la longevidad floral según la efectividad del servicio de polinización, se estimó el tiempo (en días) que transcurre hasta la primera polinización de una flor. Con este fin, se marcaron 60 individuos en cada sitio de estudio durante la temporada 2014-2015. Cada día se registraron tres eventos: 1) antesis, 2) día del primer depósito de polen y 3) cierre de la flor. El depósito de polen fue registrado usando la observación directa del estigma con lupa de mano, de acuerdo con la facilidad de observar los granos de polen de esta manera (Ladd & Arroyo 2009).

### ***Limitación de polen en poblaciones naturales***

Para estimar la limitación de polen, En el máximo de floración de la temporada 2014-2015 se marcó la yema floral de 226, 343 y 329 plantas en los sitios Alto, Medio y Bajo,

respectivamente. Se designó aleatoriamente a la mitad de las flores de cada sitio para suplementarles polen de forma manual aproximadamente en el segundo o tercer día post-antesis, cuando el estigma se ve fresco y las anteras están dehiscentes. La otra mitad (control) se dejó sin manipular expuesta a los polinizadores. Inicialmente, se asignaron los tratamientos a pares de flores cercanas en el terreno y en la misma etapa de desarrollo floral. Sin embargo, la menor abundancia de flores al final de la temporada causó que la separación entre ellas aumentara demasiado, por lo cual en el análisis se optó por agrupar todas las flores por tratamiento. El polen fue recopilado de por lo menos 3 plantas a una distancia mínima de 15 m. Esta metodología permite hacer la suplementación de polen a nivel de planta completa ya que cada planta produce una flor. Los frutos del tratamiento y del control fueron analizados en el laboratorio contabilizando óvulos sin fertilizar, semillas abortadas y semillas maduras. Los ovarios que no se hincharon más allá del grado típico de las flores en su última fase de senescencia, se asumieron como contenedores de cero semillas maduras. La apertura de varios de estos y la comprobación de que no tenían semillas maduras apoyan el supuesto.

### ***Relación entre longevidad floral potencial y tasa de respiración***

Con el objetivo de evaluar la relación entre longevidad floral potencial y tasa de respiración, En los sitios Alto y Bajo durante la temporada de floración 2014-2015 se marcaron aleatoriamente las yemas florales de 30 individuos en el sitio Alto y 35 individuos en el sitio Bajo. Diariamente se registró la longevidad floral de la manera

detallada en secciones anteriores, con la salvedad de que no se usaron bolsas de exclusión de polinizadores para evitar cualquier mínima interferencia de estas en el proceso de respiración. En su lugar, se cubrió el estigma con vaselina sólida el día de su antesis, luego de comprobar con lupa que en su superficie no existiese deposición de polen. En el caso contrario, la flor era descartada y se volvía a marcar aleatoriamente una yema floral cerrada.

En el día de antesis de cada flor se realizó la medición de la tasa respiratoria del tépalo de *R. montanum* usando un analizador de gases infrarrojo portátil (LI-6400XTF; LI-COR, Lincoln, NE, USA) capaz de medir la cantidad de CO<sub>2</sub> producido y vapor de agua liberado. La pinza del instrumento tiene una cámara que permite encerrar hasta 2 cm<sup>2</sup> de una lámina, en este caso de tépalo, de los cuales mide la producción de CO<sub>2</sub>. En el caso de que un área menor de tejido entre a la cámara, los cálculos realizados por el analizador de gases deben ser corregidos por el área efectiva. Debido a la forma y dimensiones de los tépalos de *R. montanum*, estos generalmente presentan dicha dificultad. Por ello, se añadió tinta a las esponjas que permiten el sello hermético de la cámara y determinan el borde de la misma para dejar una marca en el tépalo mostrando el área que efectivamente entró en la cámara. Luego del registro de la tasa respiratoria, los tépalos fueron colectados y el área demarcada fue medida a través de fotografías con el programa ImageJ (Schneider et al. 2012). Por la dificultad de la manipulación en algunas ocasiones se introdujeron dos tépalos al mismo tiempo. En dichos casos, se sumaron las áreas de ambos tépalos que entraron en la cámara mediante el mismo procedimiento.

Las mediciones se hicieron en un flujo de  $500 \mu\text{mol s}^{-1}$  en donde la concentración de  $\text{CO}_2$  se mantuvo en 400 ppm. La radiación fotosintéticamente activa al interior de la cámara fue de cero en todas las mediciones. Una vez alcanzada la estabilidad en la medición, se tomó una medición seguida de una segunda luego de 1 minuto. Cada medición de tasa de respiración es el promedio de 40 segundos, las que a su vez fueron promediadas para tener solo una estimación de la tasa respiratoria por flor.

### ***Análisis estadísticos***

Para analizar la posibilidad de que existan diferencias en la proporción de germinación del polen y la cantidad de tubos polínicos creciendo en el estilo en distintos días del periodo post-antesis y en los distintos sitios (incluyendo su interacción), se desarrolló un modelo de probabilidad continua ajustado con estimación de máxima verosimilitud penalizada (Harrell 2015a) usando el paquete *rms* (Harrell 2015b). Este modelo está recomendado para analizar variables ordinales que correspondan a la discretización de variables continuas (Guisan & Harrell 2011), como lo es la proporción de granos germinados o, como podría asumirse, la cantidad de tubos polínicos. Para determinar si los coeficientes de los factores son significativamente distintos de cero se usaron pruebas de  $\chi^2$  de Wald. Se eligió la proporción de germinación como variable respuesta y la cantidad de tubos polínicos en la sección media del estilo para los modelos ya que son medidas que está en todas las muestras. Debido a que las dos categorías más bajas de esta variable (nada de germinación y poca germinación, nada de tubos polínicos y pocos tubos polínicos) tienen muy baja representación, se unieron en una sola. La

relación entre el día de polinización y la variable respuesta era claramente no lineal por lo que se debieron ajustar factores no lineales. Para ello se usó una *spline* cúbica restringida (o natural) de 4 puntos que permite definir una pendiente distinta pero suavizada según tramos de la variable.

Para evaluar la presencia de senescencia floral inducida por la polinización se realizó un modelo de riesgo proporcional de tiempo discreto gracias al paquete *eha* (Broström 2015). Este método modela la probabilidad de que se produzca el cierre de la flor en un día post-antesis dado. Se usó una estimación no paramétrica de máxima verosimilitud, método que le otorga al modelo el carácter discreto y por el cual se pueden tratar datos de supervivencia con una fuerte proporción de empates (Broström & Lindkvist 2008), tal como se espera en este caso. El supuesto de proporcionalidad de los riesgos se evaluó gráficamente y mediante una prueba basada en residuos de Schoenfeld escalados (Grambsch & Therneau 1994). Como variables independientes se usó el sitio como factor categórico y el día de polinización como variable tiempo-dependiente. Esta metodología permite usar correctamente la información proveniente de flores a las que no se les pudo constatar el día de cierre, conocido como dato censurado en el contexto del análisis de sobrevivencia y manejar el tratamiento de suplementación de polen sin caer en la circularidad de que solo se pueden polinizar tardíamente las flores que son de antemano más longevas.

El análisis de los datos de longevidad floral potencial se realizó usando modelos lineales mixtos con el paquete *lme4* (Bates et al. 2015). Se usó *genet* como factor aleatorio,

controlando de esta forma la pseudoreplicación tanto de origen genético como espacial. En el caso de los modelos que incluyen los datos de ambas temporadas, también se usó la temporada como factor aleatorio. La temperatura media del aire a 15 cm del suelo por flor fue considerada como factor fijo continuo o covariable, mientras que el sitio de origen fue considerado un factor fijo categórico. La significancia estadística de los predictores fijos, incluyendo la interacción entre temperatura y altura de la flor, fue evaluada usando la prueba de razón del logaritmo natural de la verosimilitud (PRV) de los modelos usando el paquete *pbkrtest* (Halekoh & Højsgaard 2014). Al estadístico de la prueba se le aplicó la corrección de Bartlett (RVc, por Razón de verosimilitud corregido) mediante un bootstrap paramétrico de 3000 iteraciones que mejora su aproximación a la distribución  $X^2$  cuando el tamaño de la muestra es pequeño a moderado. Por el contrario, si el tamaño muestral es suficientemente grande el estadístico de la prueba se aproxima al no modificado.

Ya que las flores de menor altura respecto al suelo podrían experimentar temperaturas mayores a las registradas a 15 cm del suelo, se realizó un modelo que busca corregir esta diferencia. Primero, se hizo una estimación gruesa del perfil de temperaturas en los primeros 20 cm del suelo usando un modelo de *spline* natural o cúbica restringida relacionando la temperatura promedio por sitio medida por cada registrador destinado a este propósito y la altura respecto al suelo. Segundo, se calculó la diferencia de temperatura predicha por este perfil entre los 15 cm y la altura promedio de las flores por sitio, la cual se le restó a la temperatura ambiental a 15 cm promedio medido para

cada flor. En este paso se asume que la altura promedio por sitio medida es representativa de ambas temporadas de floración. Por último, aquella temperatura corregida fue usada para modelar la longevidad floral potencial de la forma ya detallada.

Se analizó la tasa de visita floral promedio por día por simplicidad. Esta se comparó entre sitios usando modelos lineales generalizados de intensidad proporcional (Hilbe 2014). Dicho modelo consiste en un modelo para datos discretos cuyos parámetros se hacen proporcionales a una variable de exposición (*offset*). En esto caso se usó el número total de visitas florales por periodo como variable respuesta discreta y el logaritmo natural, la función enlace, de la cantidad de flores por periodo para hacer que los coeficientes calculados expliquen la relación entre la tasa de visita floral y las variables independientes. Se consideraron como variables explicativas el sitio de estudio como factor fijo y la temperatura ambiental a 15 cm del suelo. Al añadir ambas variables explicativas al modelo, se eligió la distribución de Poisson con su correspondiente función de enlace canónica, el logaritmo natural, por ser la distribución más simple recomendada para tratar datos discretos de conteo. Esta distribución supone la igualdad entre el promedio de la tasa de visita a una temperatura dada y su varianza. Se descartó sobredispersión de los datos respecto a la distribución de Poisson usando una prueba de razón de verosimilitud límite (Hilbe 2014). Se realizó un modelo que solo incluyó el sitio de estudio cuya sobredispersión detectada con la prueba mencionada fue controlada usando la distribución binomial negativa. Los modelos fueron ajustados usando el paquete MASS (Venables & Ripley 2002).

Para estimar la duración en días hasta la primera polinización se usó el estimador de sobrevivencia no paramétrico de Kaplan-Meier (Jager et al. 2008). Este método permite usar datos censurados, como los casos en que no se pudo registrar el día de cierre de la flor. El intervalo de confianza de 95% permite la verificación visual de si las curvas de sobrevivencia son distintas o no. Este análisis se realizó usando el paquete *survival* (Therneau 2015).

Para evaluar la limitación de polen en los sitios se comparó la razón entre las semillas maduras producidas y la cantidad total de óvulos (la suma de semillas maduras, semillas abortadas y óvulos) de las flores suplementadas con polen contra las flores sin suplementación (control) usando un modelo binomial negativo inflado en ceros (BNIC) de intensidad proporcional (Hilbe 2014). El modelo está compuesto por un modelo binario y un modelo de conteo. El componente binario modela la probabilidad de que el desarrollo del fruto se aborte, mientras que el modelo de conteo predice la cantidad de semillas producidas por fruto (más detalles en Anexo 1).

La variable respuesta fue la cantidad de semillas y el exponente de los predictores lineales del modelo de conteo es proporcional a la cantidad de total de óvulos, la variable de exposición. Las variables predictoras fueron el sitio de estudio, el tratamiento aplicado y su interacción. La significancia de las variables se determinó por comparaciones de modelos anidados usando la prueba de razón del logaritmo natural de la verosimilitud. Se realizaron contrastes ortogonales para discriminar de mejor forma las diferencias entre tratamiento y control dentro de cada sitio de estudio. El valor p se

corrigió mediante el método de control de la tasa de falso descubrimiento. El análisis se llevó a cabo con la función *zeroinfl* (Zeileis et al. 2008) del paquete *pscl* (Jackman 2015).

Se estudió la relación de la tasa de respiración y la temperatura de la hoja al momento de la medición mediante un modelo exponencial o  $Q_{10}$  (1) y uno de Arrhenius (2):

$$R = Ae^{BT} \quad (1)$$

$$R = Ae^{-E/rT} \quad (2)$$

Donde R es la tasa respiratoria medida, A es una constante llamada pre-exponencial, B es una constante relacionada al coeficiente de temperatura  $Q_{10}$  según  $\ln(Q_{10})/10$ , E es la energía de activación, r es la constante de los gases ideales ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ) y T es la temperatura absoluta. Correspondientemente, estos modelos pueden expresarse como:

$$\ln(R) = \ln(A) + BT \quad (3)$$

$$\ln(R) = \ln(A) - \frac{E}{R} \left( \frac{1}{T} \right) \quad (4)$$

Para ajustar los modelos se usaron modelos lineales generalizados con función de enlace logaritmo natural y distribución normal o gaussiana. Se designó la tasa de respiración como variable respuesta y la temperatura de tépalo como variable independiente en el caso del modelo exponencial, y el inverso de la temperatura del tépalo para el del modelo de Arrhenius. Además, se añadió el sitio de estudio y su interacción con la

covariable de temperatura como factores explicativos. Para evaluar la significancia de los predictores se usaron pruebas de reducción de desviación escada (PRDE), de forma análoga a la PRV.

Aquí se presentan los resultados del modelo exponencial, más sencillo al suponer un  $Q_{10}$  constante, ya que la razón de evidencia (basado en el Criterio de Información de Akaike) entre ambos modelos muestra que el modelo exponencial es 0,97 veces tan probable como el de Arrhenius en minimizar la pérdida de información.

Para evaluar la relación entre longevidad floral y tasa respiratoria y su interacción, se usaron modelos de mínimos cuadrados ordinarios. Los cuales fueron comparados entre sí con pruebas de F.

Se usó el paquete *lsmeans* (Lenth 2015) para calcular contrastes de medias marginales y la predicción de varios de los modelos estadísticos usados. Para todos los análisis se ocupó el software estadístico R (R Core Team 2014), plataforma para todos los paquetes antes mencionados.

## RESULTADOS

### ***Periodo de receptividad estigmática en Rhodolirium montanum***

El número de muestras de estigmas colectadas, preparadas y teñidas fueron 61 en el sitio Alto y 59 en el sitio Bajo (Figura 2). De estas, en 4 muestras del sitio Bajo y solo en 1 del sitio Alto no se encontró germinación del polen. Aunque 4 de estas 5 muestras corresponden a flores polinizadas entre los días 4 y 6, la restante, pertenecientes al sitio Bajo, fue polinizada en su primer día post-antesis (Figura 3). A pesar de lo anterior, en la sección media del estilo se encontró señales de tubos polínicos en todas las muestras salvo una.

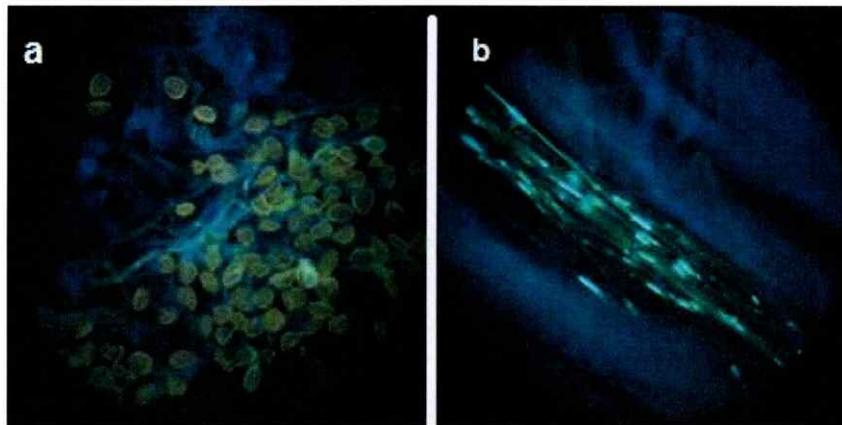


Figura 2. Microfotografías de fluorescencia mostrando tubos polínicos de *Rhodolirium montanum*. En a se muestra la germinación del polen en el estigma y la penetración al estilo, en b se muestran los tubos polínicos elongados en el la mitad distal del estilo. La anilina azul fluoresce en verde demarcando los tubos polínicos y los granos de polen en naranja debido a su fluorescencia propia.

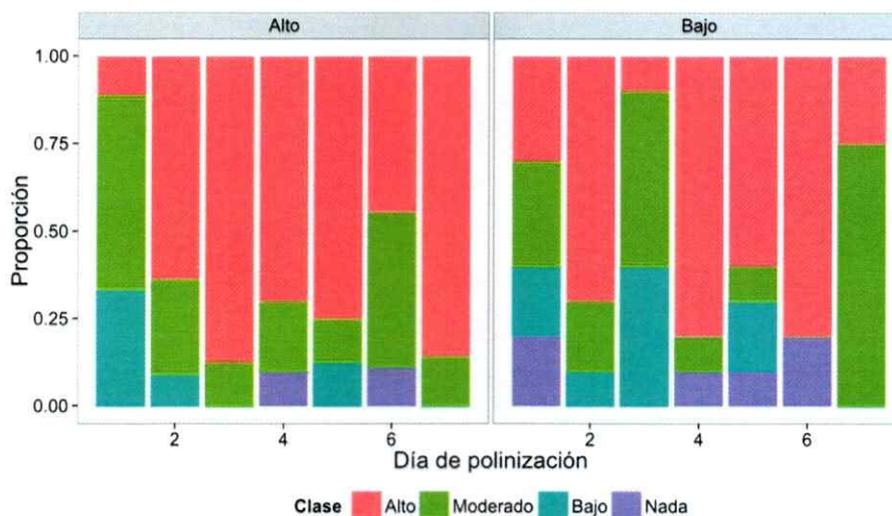


Figura 3. Representación de cada clase de la germinación de polen en el total de flores polinizadas un día dado del periodo post-antesis en los sitios Alto y Bajo.

El modelo de probabilidad continua no muestra relación significativa entre el día en que la flor fue polinizada y la probabilidad de una mayor proporción de germinación ( $X^2=6,97$ ;  $df=6$ ;  $P=0,3232$ ), ni en ninguna de sus interacciones ( $X^2=0,02$ ;  $df=3$ ;  $P=0,9994$ ). Tampoco se encontraron diferencias entre sitios de estudio ( $X^2=2,02$ ;  $df=4$ ;  $P=0,7320$ ). Los resultados fueron análogos al modelar la cantidad de tubos polínicos en la sección medial del estilo: no hay efecto del día de polinización ( $X^2=5,17$ ;  $df=6$ ;  $P=0,5223$ ) ni en sus interacciones ( $X^2<0,01$ ;  $df=3$ ;  $P=0,9999$ ). En otras palabras, se encontró germinación y penetración del polen al estigma en todos los días del periodo post-polinización, sin poder distinguir diferencias graduales a lo largo del periodo. Por lo tanto, la longevidad floral potencial es una buena aproximación al periodo de receptividad de la flor.

### ***Evaluación de la presencia de senescencia floral inducida por la polinización***

Cinco flores cerraron antes del día designado para su polinización en el sitio Alto, mientras que en el sitio Bajo fueron 11. Además, en el sitio Alto 5 flores fueron consumidas por vacas o destruidas por deslizamientos del terreno. En total, se obtuvo datos de 70 flores en el sitio Bajo, de las cuales 59 fueron polinizadas, y 65 flores en el sitio Alto, de las cuales todas pudieron ser polinizadas.

El modelo mostró un efecto significativo del sitio (PRV: RV = 24,76; g.l. = 1; valor  $p \ll 0,001$ ), en donde el sitio Alto tiene 0,4 veces menos riesgo de cerrar que el sitio Bajo. Interesantemente, la polinización incrementó significativamente el riesgo de cierre en 2,5 veces (PRV: RV = 13,951; g.l. = 1; P = 0,002).

### **Longevidad floral potencial floral en poblaciones naturales**

Durante el verano 2013-2014 se registró la longevidad floral de 1143 individuos correspondientes a 235 genets distintos en el sitio Alto, y 292 individuos correspondientes a 219 genets distintos en el sitio Bajo. La floración se inició el mismo día en ambos sitios a pesar de que los sitios estaban separados por 750 m de altitud. Por otro lado, en el sitio Alto tanto el máximo de la floración como su decaimiento se produjo antes (Figura 4).

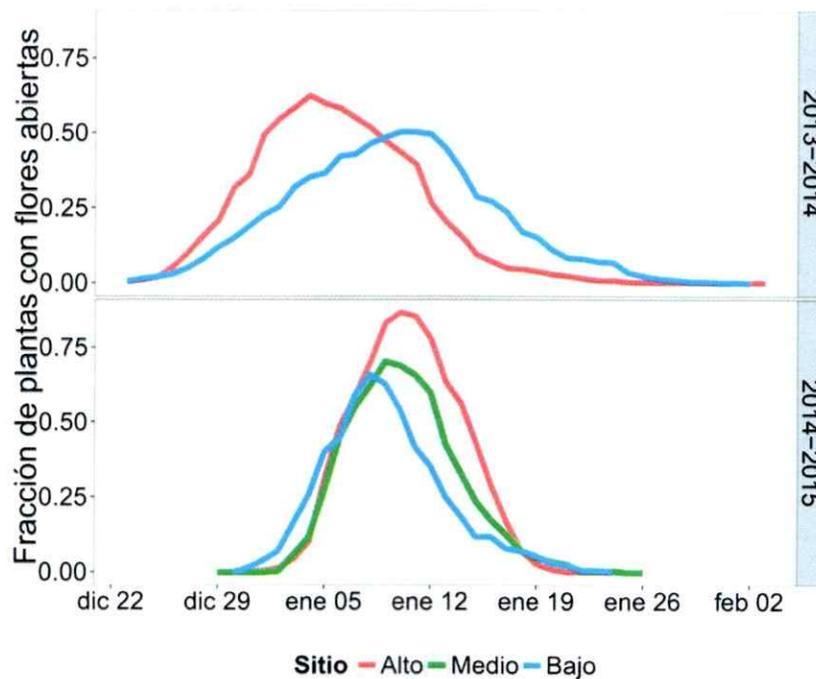


Figura 4. Fenología floral de *Rhodolirium montanum* en las temporadas 2013-2014 y 2014-2015. Se muestra la fracción de plantas cuya flor está abierta en relación al total de plantas seguidas de cada sitio de estudio.

Tabla 1. Promedio de las distintas variables medidas y calculadas por temporada y sitio de estudio.

Temporada	Sitio	Altitud (m s.n.m.)	Altura de la flor (cm)	Temperatura media diaria por flor (°C)	Temperatura media diaria por flor ajustada (°C)	Longevidad floral potencial (días)
2013-2014	Alto	3073		12,6	13,3	8,1 <sup>a</sup>
	Bajo	2347		15,9	16,4	7,9 <sup>a</sup>
2014-2015	Alto	3073	3,9	12,2	13,1	7,8 <sup>a</sup>
	Medio	2638	8,5	16,3	16,4	6,2 <sup>b</sup>
	Bajo	2347	10,3	16,3	16,8	5,5 <sup>c</sup>

<sup>a,b,c</sup> Grupos con las mismas letras denotan diferencias no significativas dentro de una temporada sin usar la temperatura media diaria por flor como covariable ( $P > 0,05$ ).

Durante el verano 2014-2015 se registró la longevidad floral de 227 individuos correspondientes a 72 genets distintos en el sitio Alto, de 223 individuos correspondientes a 64 genets distintos en Medio y de 127 individuos correspondientes a 78 genets distintos en Bajo. El inicio de la floración se dio el mismo día en los sitios Alto y Bajo, mientras que en Medio se dio dos días después (Figura 4). La fracción de flores abiertas en el máximo de floración fue mayor y se mantuvo alta durante más tiempo a medida que aumenta la altitud. La altura de la flor respecto al suelo fue distinta entre sitios (Kruskal-Wallis:  $X^2=344,16$ ;  $P < 0,0001$ ), decreciendo al aumentar la altitud (Tabla 1).

La longevidad floral potencial de *Rhodolirium montanum* promedio fue 8,0 días (desviación estándar, DE, 2,0 días) en la temporada 2013-2014 y de 6,7 días (DE 1,8 días) en la temporada 2014-2015. En la primera temporada la longevidad floral potencial no se diferenció significativamente entre sitios (Contraste de las medias marginales del modelo sin covariables:  $t=0,3$ , g.l.=474,23,  $P=0,7643$ ). Mientras que en la temporada 2014-2015, el promedio por sitio aumentó altitudinalmente de forma significativa (Contrastes de las medias marginales del modelo sin covariables: Alto-Medio  $t=5,634$ , g.l.=166,99,  $P < 0,0001$ ; Alto-Bajo  $t=10,043$ , g.l.=213,12,  $P < 0,0001$ ; Medio-Bajo  $t=4,322$ , g.l.=209,06,  $P < 0,0001$ ), siendo 5,5 días en el sitio Bajo, 6,5 días en el Medio y 7,8 días en el Alto (Tabla 1).

En cuanto a la temperatura del aire a 15 cm del suelo durante el periodo apertura de cada flor (Tabla 1, Figura 5), en la temporada 2013-2014 los 750 m de desnivel entre los sitios están ligados a una disminución promedio de 3,4 °C (IC de 95%: [3,2 °C, 3,5 °C]). Mientras que en la segunda temporada dicha diferencia fue de 4,0 °C (IC de 95%: [3,89 °C, 4,05 °C]), la cual también resultó ser la diferencia entre los sitios Medio y Alto. A pesar de los 200 m de desnivel, no se encontró diferencia entre las medias de los sitios Medio y Bajo (IC de 95%: [-0,068 °C, 0,092°C]) en dicha temporada.

Cuando las temporadas se modelan por separado, la temperatura ambiental a 15 cm del suelo no tuvo efecto significativo en explicar la longevidad floral potencial (2013-2014 PRV:  $RVc = 0,222$ ; g.l. = 1;  $P = 0,8815$ . 2014-2015 PRV:  $RVc = 0,0222$ ; g.l. = 1;  $P = 0,8815$ ).

La interacción entre altura de la flor y la temperatura ambiental a 15 cm del suelo no fue

significativa (PRV: Rvc = 3,4; g.l. = 1; P = 0,06519), no revelando un efecto de la temperatura ambiental sobre la longevidad floral potencial durante la temporada 2014-2015.

Cuando las temporadas se modelaron en conjunto, se encontró un efecto negativo significativo de la temperatura ambiental (PRV: Rvc = 6,87; g.l. = 1; P = 0,008775) estimado de  $-0,149$  días  $^{\circ}\text{C}^{-1}$  (IC de 95% por bootstrap:  $[-0,2349$  días  $^{\circ}\text{C}^{-1}$ ,

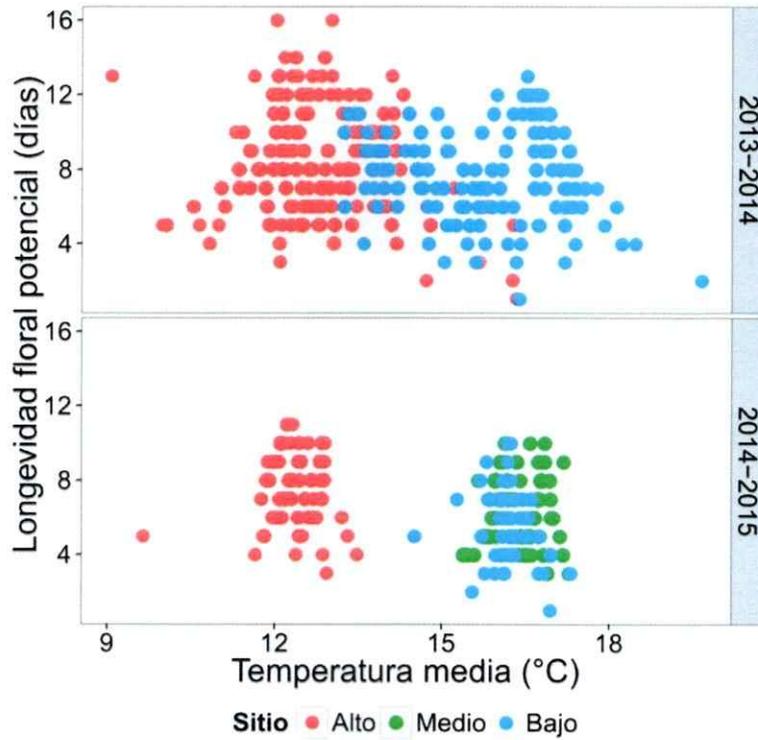


Figura 5. Longevidad floral potencial de *Rhodolirium montanum* en función de la temperatura ambiental a 15 cm del suelo durante el periodo post-antesis de cada flor durante las temporadas 2013-2014 y 2014-2015.

$-0,0924$  días  $^{\circ}\text{C}^{-1}$ ]). Al considerar este efecto, las diferencias entre sitios dejan de ser significativas (PRV:  $\text{RVc} = 0,7293$ ; g.l. = 2;  $P = 0,6945$ ).

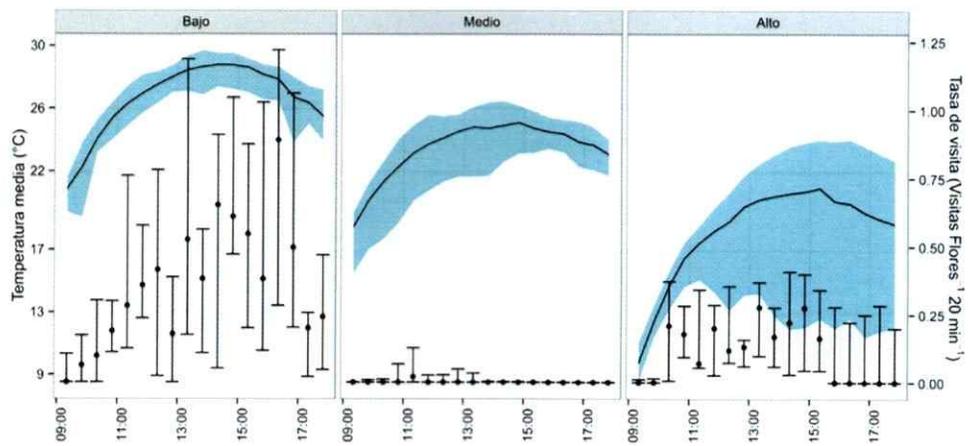
Al ajustar la temperatura ambiental según la altura de la flor (Tabla 1), se produce un aumento promedio de  $0,76$   $^{\circ}\text{C}$ . Dicho incremento no cambia la significancia de los factores en el modelo de longevidad floral potencial y tampoco cambia significativamente el efecto de la temperatura ambiental ( $-0,148$  días  $^{\circ}\text{C}^{-1}$  con un IC de 95% por bootstrap:  $[-0,2395$  días  $^{\circ}\text{C}^{-1}$ ,  $-0,0968$  días  $^{\circ}\text{C}^{-1}$ ]).

#### ***Tasa de visita floral de los polinizadores***

Se produjeron 4377 visitas florales durante los 16 días de registro, correspondientes a 184 horas de observación en total. Las visitas florales de la abeja *Megachile saulcyi* corresponden a un 96,2% del total, mientras que el resto de las visitas corresponden a porcentajes minoritarios de dípteros (3,18%), *Megachile semirufa* (0,32%), otros himenópteros (0,16%), coleópteros (0,11%) y lepidópteros (0,07%). Por lo tanto, la polinización de *Rhodolirium montanum* depende de forma casi exclusiva de la abeja cortadora de hojas, *Megachiles saulcyi*. Cabe destacar que a la abeja se le vio visitando otras especies de la comunidad como *Phacelia secunda* y *Adesmia coronilloides*.

La tasa de visita floral se relacionó con la hora del día y la temperatura del aire a 15 cm del suelo, siendo mayor en el periodo de mayor temperatura alrededor de las 15:00 horas (Figura 6). Mientras la temperatura media del aire a 15 cm disminuyó a medida

que la altitud del sitio de estudio aumenta, la amplitud térmica promedio aumentó en los sitios de mayor altitud.



**Figura 6. Temperatura media a 15 cm del suelo y tasa de visita floral del periodo de observación en cada sitio de estudio.** La línea continua corresponde a la temperatura media del periodo de observación, mientras que el área coloreada indica la temperatura máxima y la mínima. Los puntos corresponden a la mediana de la tasa de visita. Los extremos de las barras indican el primer y tercer cuartil de la tasa de visita.

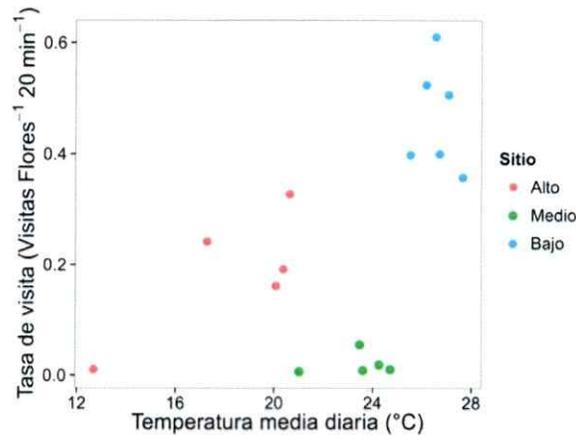


Figura 7. Promedio diario de la tasa de visita floral en función de la temperatura media diaria a 15 cm del suelo. Se promediaron los datos de todos los periodos de observación de un mismo día. Los colores distinguen los datos provenientes de los sitios de estudio.

El promedio diario de la tasa de visita floral fue distinto entre sitios (modelo NB2 con un factor:  $PRV=122,19$ ; valor  $p<0,001$ ). El sitio Bajo presenta una tasa de  $0,47$   $\text{Visitas Flores}^{-1} 20 \text{ min}^{-1}$ , 2,44 veces mayor que el sitio Alto con una tasa de  $0,19$   $\text{Visitas Flores}^{-1} 20 \text{ min}^{-1}$ . Mientras que el sitio Alto presenta una tasa promedio 14,87 veces mayor que el sitio Medio con  $0,013$   $\text{Visitas Flores}^{-1} 20 \text{ min}^{-1}$ . Sin embargo, la diferencia mencionada en los sitios Alto y Bajo se explica al considerar el efecto de la temperatura media diaria a 15 cm (efecto multiplicativo en el modelo de Poisson:  $1,1887$   $^{\circ}\text{C}^{-1}$ ,  $CI_{95\%}$ :  $1,0759$   $^{\circ}\text{C}^{-1}$  -  $1.3133$   $^{\circ}\text{C}^{-1}$ ), ya que esta no fue significativa (Contraste de las medias marginales:  $0,4764$  [ $\text{Visitas Flores}^{-1} 20 \text{ min}^{-1}$ ];  $z=1,136$ ; valor  $p=0,4920$ ) al incluirla en el modelo.

### **Duración hasta la primera polinización**

En el sitio Bajo 3 yemas florales murieron antes de la antesis y una yema se individualizó incorrectamente debido a la extraña ocurrencia de una inflorescencia con dos flores. En el sitio Medio se perdió una muestra porque la flor no tenía estigma por causa desconocida y otra porque sufrió daño en su primer día post-antesis. En el sitio Alto, 4 muestras se perdieron por daño de la flor.

La fracción de flores vírgenes disminuyó por debajo del 50% en los sitios Alto y Bajo luego de un solo día de estar la flor expuesta a polinizadores. En cambio, esto sucedió en el quinto día post-antesis en las flores del sitio Medio. Las diferencias entre el sitio Medio y los sitios Alto y Bajo se agudizaron a lo largo del periodo post-antesis de las flores. En

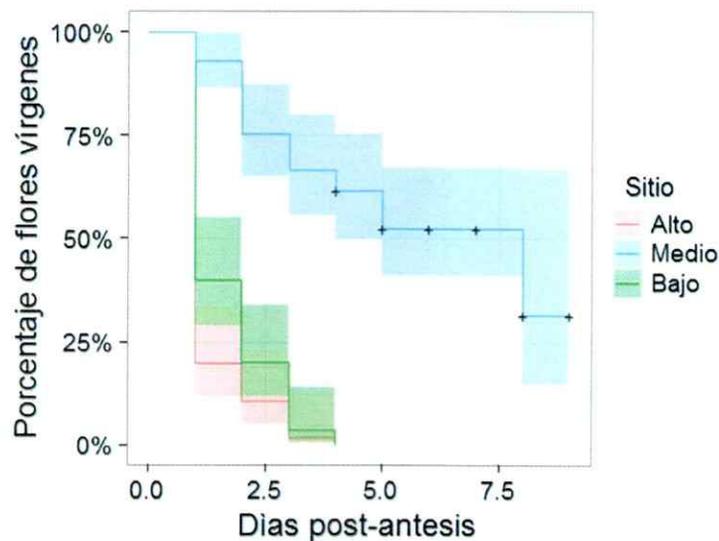


Figura 8. Fracción de flores vírgenes en función de los días post-antesis según el estimador de Kaplan-Meier en los tres sitios de estudio. Las bandas de color indican un intervalo de confianza de 95%. Las pequeñas cruces en las líneas continuas indican datos censurados.

los dos últimos, se polinizó al menos una vez todas las flores al cuarto día, mientras que en el primero un 30% de las flores cerró sin haber recibido polen. Tal como lo muestran los intervalos de confianza del 95% de la duración hasta la primera polinización en la Figura 8, no se encontraron diferencias entre los sitios Alto y Bajos, pero el sitio Medio tuvo un comportamiento particular.

La longevidad efectiva promedio fue 6,2 en el sitio Alto, 5,7 en el Medio y 4,6 en el Bajo, siempre menor que la longevidad floral potencial del sitio correspondiente (Tabla 1), lo que concuerda con la presencia del mecanismo de aceleración de la senescencia floral inducida por la polinización.

### **Limitación de polen en poblaciones naturales**

Se obtuvieron datos para los sitios Alto, Medio y Bajo de 96, 159 y 156 flores respectivamente en el grupo control, y 92, 158 y 147 flores respectivamente en el grupo de suplementación manual de polen.

Una importante proporción de frutos no produjo semillas maduras (Figura 9), lo que justifica el uso del modelo inflado en ceros.

El componente binario del modelo BNIC (Figura 10) indicó que la probabilidad de abortar es aminorada por la suplementación de polen (PRV  $\chi^2=6,262$ ;  $df=2$ ;  $P=0,044$ ) un 46,7% para Alto ( $Z= 2,136$ ;  $P=0,0490$ ), 68,2% para Medio ( $Z= 4,991$ ;  $P<0,0001$ ), con excepción del sitio Bajo cuyo 23,0% de disminución no resulta significativo ( $Z= 0,9988$ ;  $P=0,3179$ ).

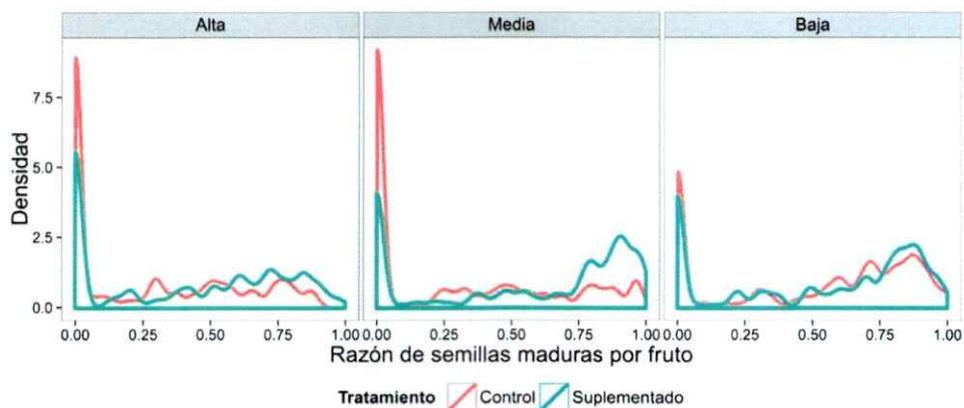


Figura 9. Densidad de probabilidad de la razón de semillas maduras por fruto. Cada panel muestra un sitio de estudio. En azul se muestra el tratamiento de suplementación manual de polen y en rojo el tratamiento de control.

El componente de conteo del modelo BNIC indicó que la razón de semillas maduras por fruto aumenta con la suplementación de polen pero lo hace de manera distinta entre sitios (PRV  $\chi^2= 10,6$ ;  $df=2$ ;  $P=0,005$ ). Hay un incremento no significativo de un 17,5% para el sitio Alto ( $Z=2,079$ ;  $P=0,0564$ ) y una pequeña disminución no significativa de 0,25% en el sitio Bajo ( $Z= 0,0470$ ;  $P=0,9625$ ). En cambio, la suplementación de polen sí produce un

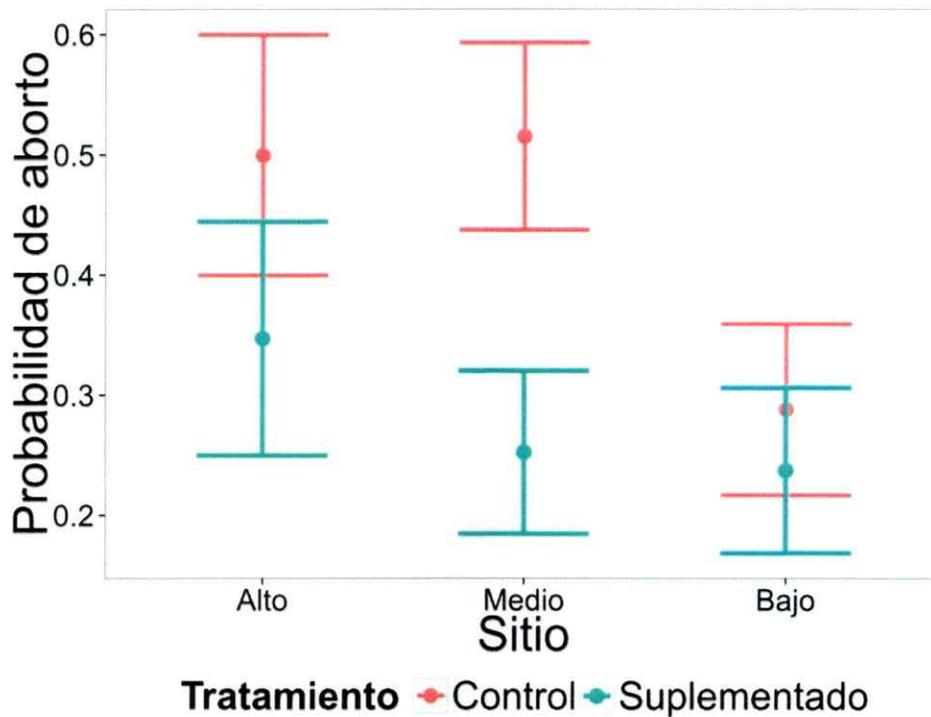


Figura 10. Probabilidad de aborto del fruto de *Rhodolirium montanum* según sitio de estudio y tratamiento experimental predicho por el componente binario del modelo BNIC. Los puntos corresponden a la estimación y las barras de error a su intervalo de confianza de 95%. En el texto están los valores de los contrastes ortogonales para distinguir el efecto del tratamiento en cada sitio de estudio.

incremento significativo ( $Z= 4,406$ ;  $P<0,0001$ ) en la razón de semillas maduras por fruto de 29% en el sitio Medio.

El modelo BNIC en su conjunto (Figura 11), indica que el tratamiento de suplementación de polen aumentó la proporción de semillas por fruto agregando 0,14 semillas/óvulos para el sitio Alto ( $Z= 2,9030$ ;  $P= 0,0055$ ) y 0,28 semillas/óvulos ( $Z= 6,593$ ;  $P<0,0001$ ) para el sitio Medio. Por el contrario, la diferencia de 0.034 entre tratamientos en el sitio Bajo no es significativo ( $Z= 0,7582$ ;  $P=0,4483$ ). Por lo tanto, existe limitación de polen en los sitios Alto y Medio, no así en el de menor altitud.

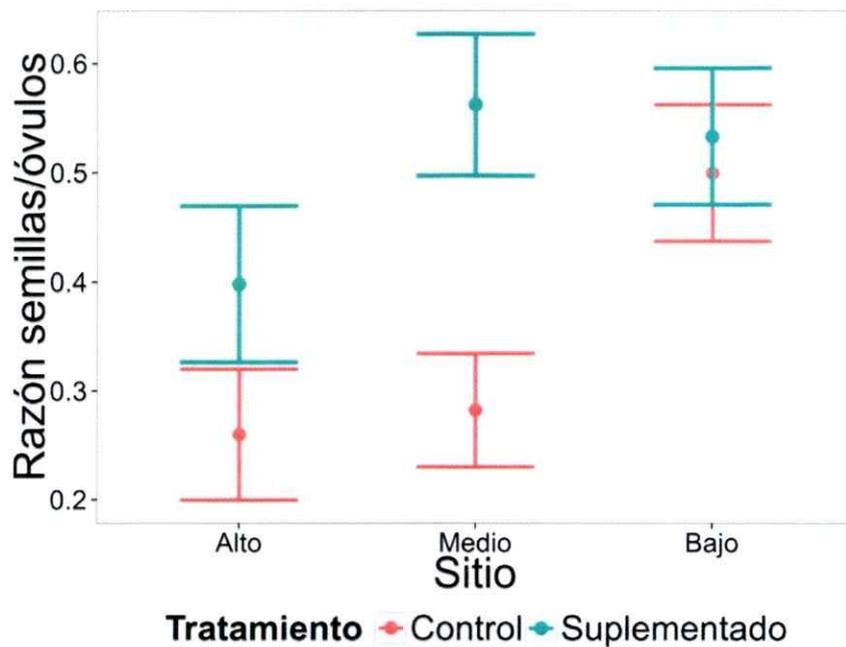


Figura 11. Razón de semillas maduras por fruto predicho por el modelo binomial negativo inflado en ceros en cada sitio. Los puntos indican el valor predicho por el modelo y las barras indican el intervalo de confianza de 95%. En rojo se muestra las estimas del tratamiento de control y en azul, el de suplementación de polen.

### **Relación entre longevidad floral y tasa de respiración**

Se logró medir el intercambio gaseoso de 30 flores en el sitio Alto y 35 flores en el sitio Bajo, perdiéndose 6 flores en total por dificultades de la manipulación que llevaron a la rotura de las flores. De las restantes, se descartaron 12 mediciones correspondientes a 8 plantas distintas que indicaron tasas de respiración negativas. En dos casos no se pudo registrar el día de cierre de la flor pues los tépalos sufrieron un daño tal, producto de la medición, que no se lo pudo verificar.

La media de la tasa respiratoria fue  $0,57 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  con un error estándar de  $0,049 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Del modelo exponencial (Figura 12) se calculó un coeficiente de temperatura  $Q_{10}$  estimado de 1,9, el cual no varió significativamente entre sitios de

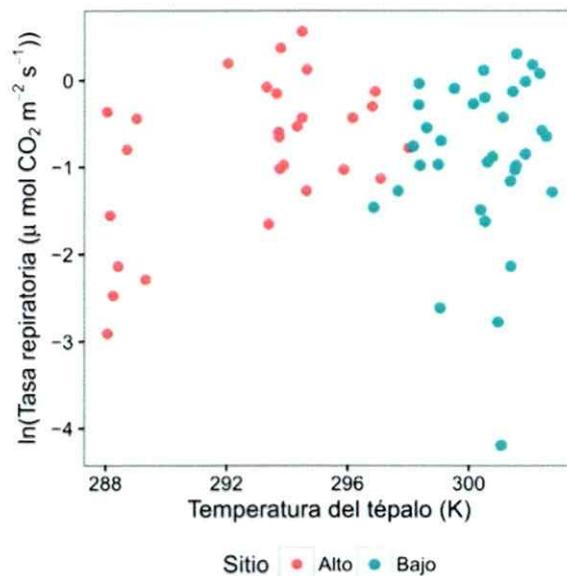


Figura 12. Logaritmo natural de la tasa respiratoria de los tépalos en función de la temperatura del tépalo al momento de la medición

estudio (PRDE: Reducción de la desviación escalada= 0,01652;  $df=1$ ;  $P=0,8977$ ). La constante pre-exponencial A fue 1,73 veces mayor en el sitio Alto que en el Bajo, sin embargo, dicha diferencia no fue significativa ( $Z= 1,836$ ;  $P=0,0664$ ). A pesar de que la temperatura del tépalo al momento de la medición fue mayor en el sitio Bajo, la tasa de respiración no varía significativamente en entre sitios ( $F_{1,60}= 0,1862$ ,  $P= 0,6677$ ).

Ni la tasa respiratoria del tépalo ( $F_{1,56}= 1,8934$ ,  $P= 0,1743$ ) ni su interacción con el factor de sitio de estudio ( $F_{1,56}= 1,2981$ ,  $P= 0,2594$ ) son significativas en explicar la longevidad floral (Figura 13). Tampoco se encuentran diferencia significativa de la longevidad floral entre sitios de estudio ( $F_{1,58}= 0,2743$ ,  $P= 0,6025$ ). La longevidad floral promedio fue de 4,4 días en el sitio Bajo y 4,6 en el sitio Alto, bastante menores que las mediciones de longevidad floral potencial del mismo año (Tabla 1).

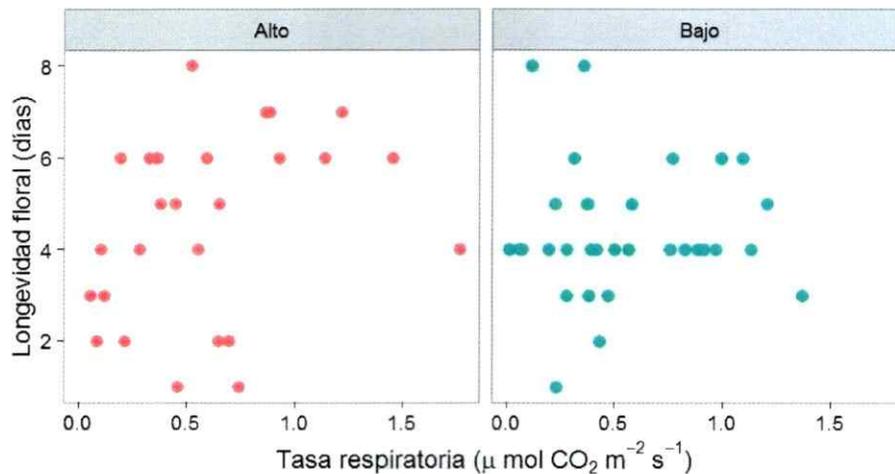


Figura 13. Longevidad floral en relación con la tasa respiratoria medida en la flor en cada sitio de estudio.

## DISCUSIÓN

En esta tesis se evaluó en la especie alpina *Rhodolirium montanum* el papel que presenta el incremento de la longevidad floral potencial sobre la probabilidad de polinización (Arroyo et al. 2006), manteniendo los niveles de limitación de polen en sitios donde existe una menor tasa de visita floral. Por otra parte, se evaluó la contribución de la temperatura ambiental y la tasa respiratoria de los tépalos sobre la longevidad floral de las plantas y la tasa de visita por parte de los polinizadores. Los resultados evidencian que el aumento de la temperatura ambiental estaría relacionado con un aumento de la longevidad floral potencial de *Rhodolirium montanum* y con la disminución de la tasa de visitas florales. Sin embargo, estas variables no muestran una relación completamente consistente con el gradiente altitudinal. Contrariamente a la expectativa inicial, se encontraron diferencias en la magnitud de la limitación de polen y estas diferencias se produjeron incluso en sitios en donde la longevidad floral potencial podría estar aumentando la probabilidad de polinización. Adicionalmente, se demostró la presencia de senescencia acelerada por la polinización y de receptividad estigmática a lo largo de toda la vida de la flor, pero no se encontró variación altitudinal de la tasa respiratoria que explique la variabilidad de la longevidad floral potencial.

***Longevidad floral potencial y la temperatura ambiental en el gradiente altitudinal***

Como se esperaba, en este estudio se encontró un pequeño efecto de la temperatura ambiental sobre la longevidad floral potencial de *Rhodolirium montanum*. El efecto medido en estas poblaciones naturales fue aproximadamente 2,5 veces menor que el encontrado en individuos de *R. montanum* calentadas con *Open Top Chambers* (Cabezas 2012), lo que sugiere la necesidad de considerar otros factores. Sin embargo, a pesar del tamaño del efecto de la temperatura ambiental, este no deja variabilidad significativa entre los sitios de estudio, indicando que la variabilidad altitudinal de la longevidad floral potencial tiene un carácter principalmente plástico.

En concordancia parcial con lo esperado, la longevidad floral potencial presentó un aumento altitudinal durante la segunda temporada de floración, sin embargo, en la primera temporada no hubo cambios significativos. Esto último se podría explicar por la disminución de la altura de la flor conforme aumenta la altitud y el consecuente aumento de la temperatura experimentada por las flores al estar más cerca del suelo. Es decir, dado que existe esta variación fenotípica, el gradiente altitudinal de la temperatura podría estar siendo amortiguado de tal forma de que, aunque exista relación entre esta y la longevidad floral potencial, no pueda ser verificado un gradiente altitudinal de longevidad floral.

Por otro lado, se encontró una marcada disminución de la longevidad floral potencial del sitio Bajo en la segunda temporada respecto a la primera. Esta variación interanual no puede ser explicada por el efecto de la temperatura ambiental ya que esta no aumentó

durante el segundo año. Es por esto que se hace necesario la consideración de otros factores ambientales que podrían ser incluso más importantes que la temperatura en determinar la variación altitudinal de la longevidad floral potencial. La disponibilidad de agua podría cumplir este rol disminuyendo la longevidad floral potencial al incrementarse el estrés hídrico en la planta (van Doorn 1997). Coincidentemente, las precipitaciones durante el año 2013 fueron más abundantes que durante el año 2014 (Dirección General de Aeronáutica Civil & Dirección Meteorológica de Chile 2013, 2015) a la vez que la humedad del suelo en el sitio Bajo durante el segundo verano fue la menor entre los sitios (mediciones preliminares, Anexo 2), podrían explicar la disminución de la longevidad floral potencial en el sitio Bajo durante la última temporada de floración en estudio.

#### ***Longevidad floral potencial y el periodo de receptividad***

El resultado de la evaluación del periodo de receptividad estigmática permite considerar a la longevidad floral potencial como un buen proxy del periodo de receptividad de la flor. Cambios en la magnitud de la longevidad floral serán reproductivamente relevantes solo si están ligados a cambios proporcionales en el periodo de polinización efectiva (Yi et al. 2006), el cual dependerá del periodo de receptividad estigmática. El estigma de *Rhodolirium montanum* tiene la capacidad de inducir el crecimiento de granos de polen durante al menos los primeros 7 días de anthesis, sin poder distinguir cambios de su magnitud. Este periodo representa casi la totalidad del periodo de anthesis promedio de las flores del sitio Alto, las más longevas aquí reportadas, lo que apoya fuertemente el

uso de la longevidad floral potencial como un proxy idóneo para representar el periodo de receptividad floral.

Por otro lado, la senescencia acelerada por la polinización aquí demostrada justifica la necesidad de excluir a los polinizadores para estimar la ventana temporal en que las flores de *Rhodolirium montanum* pueden esperar la llegada de polinizadores. Además, podría significar una favorable transferencia de energía desde la mantención de la flor a otros procesos de la planta (Ashman & Schoen 1997), como también una disminución de agua transpirada por el perigonio (Stead 1992). Este mecanismo podría ser especialmente valioso en presencia de las variables tasas de visita y las cortas temporadas de crecimiento de la zona alpina (Körner 2003) y la aridez veraniega que caracteriza el clima mediterráneo de Chile central (Di Castri & Hajek 1976).

#### ***Tasa de visita en el gradiente altitudinal***

Como era de esperar, la tasa de visita en *Rhodolirium montanum* disminuyó con la temperatura ambiental. Sin embargo, el patrón no siguió estrictamente un gradiente altitudinal a pesar de que la temperatura disminuye con la altura. La distintivamente baja tasa de visita en el sitio Medio puede ser explicada por la menor abundancia de su casi exclusivo polinizador, *Megachile saulcyi*. A diferencia de los otros dos sitios, esta abeja no fue observada nidificando en el sitio Medio. Es posible que dicha ausencia se deba a la muy baja abundancia de *Phacelia secunda* y *Adesmia coronilloides*, especies nectaríferas habitualmente visitadas por *M. saulcyi* en los demás sitios de estudio, probablemente como consecuencia del intenso pastoreo observado en el área. Si dicha

complejidad se hace a un lado, los sitios Alto y Bajo muestran una disminución de la tasa de visita floral y un aumento de la longevidad floral potencial asociado a la temperatura ambiental.

### ***Limitación de polen en el gradiente altitudinal***

Contrariamente a la expectativa de mantención del grado de limitación de polen en sitios de diferente altitud, se encontró limitación de polen en los sitios Alto y Medio, pero no en el Bajo. Mientras que la mayor limitación de polen presente en el sitio Medio puede explicarse por la desaparición de su polinizador principal, y en consecuencia no sería un ejemplo del efecto de la altitud en la tasa de visita, la limitación de polen en el sitio Alto confirma que el aumento de la longevidad floral potencial no compensa totalmente las menores tasas de visita de este sitio más frío. No obstante, los resultados aquí presentados no permiten descartar que el aumento de la longevidad floral potencial pueda generar algún efecto compensatorio parcial de las menores tasas de visita.

Puede resultar paradójica la presencia de limitación de polen en el sitio Alto y no en el Medio al considerar que en ambos la recepción de la primera carga de polen se produce con la misma rapidez. Sin embargo, no solo el aspecto cuantitativo de la limitación de polen debe considerarse, sino que también la calidad del polen recibido. El número de individuos por *genet* aumenta altitudinalmente (Anexo 3) y, por lo tanto, el sitio Alto tendrá mayor probabilidad de geitonogamia. En consecuencia, y dado que *R. montanum* es una planta parcialmente autocompatible, la calidad del polen en los sitios más altos podría ser menor.

### ***Longevidad floral potencial y tasa respiratoria***

No se detectó relación entre la tasa respiratoria y la longevidad floral como era esperado a partir de evidencia de laboratorio. Entonces, este resultado sugiere la consideración de factores adicionales para entender la relación causal entre longevidad floral y temperatura ambiental en poblaciones naturales.

Un fenómeno que podría marcar una diferencia muy importante en las poblaciones naturales es el cambio de la tasa respiratoria a una temperatura dada, ya sea como consecuencia de cambios evolutivos o plásticos. Pues, si a través de dichos procesos la tasa respiratoria se homogeniza a pesar de existir diferencias de temperatura entre sitios, no se podría esperar que este proceso fisiológico medie la relación entre la longevidad floral potencial y el gradiente altitudinal de temperatura. Y sugiriendo esto mismo, la tasa respiratoria fue la misma en ambos sitios a pesar de existir 7 °C de diferencia promedio al momento de las mediciones. Sin embargo, es inconsistente con el efecto de la temperatura encontrado junto a la falta de diferencia del efecto de la temperatura ambiental sobre la tasa respiratoria entre sitios de estudio. La única forma de conciliar estos resultados es suponer que los datos son insuficientes para distinguir los reales efectos en juego. Por lo tanto, es necesario considerar estos resultados con cuidado.

Por último, la baja longevidad floral potencial promedio encontrada en las flores medidas respecto a la vista en la observación de las flores embolsadas indica que existe alguna interferencia producto del método y por lo tanto, este resultado tiene que ser

considerado con cuidado. La más probable fuente de interferencia es la manipulación y extracción de tépalos durante la medición de la tasa respiratoria, pues se ha visto que la estimulación y el daño mecánico puede acelerar la senescencia de las flores (Chehab et al. 2009). Independientemente de la fuente de interferencia, si la intensidad de ésta no fue un factor común a todas las flores, la relación entre longevidad y respiración se verá afectada. Otros métodos menos invasivos de medición de la longevidad floral se deberían desarrollar o aplicar diseños de muestreo alternativos que permitan medir estas dos variables en flores separadas.

## CONCLUSIONES

Este estudio amplía el conocimiento de la biología reproductiva de la especie alpina *Rhodolirium montanum* Phil., siendo el primero en evaluar los efectos compensatorios de la tasa de visita en zonas frías mediante cambios de la longevidad floral potencial, y el rol que en esto juega la dependencia en la temperatura de este rasgo. Los resultados de esta tesis demuestran que esta planta presenta senescencia floral acelerada por la polinización, mecanismo que le permitiría ajustar su longevidad floral según las visitas que recibe la flor y de esta forma ahorrar recursos de mantención de la flor. También, se muestra que existe receptividad estigmática a lo largo de toda la vida de la flor, lo que permite considerar a la longevidad floral potencial como un *proxy* del periodo de receptividad de la flor.

En su conjunto, los resultados de esta tesis muestran que no existe un aumento altitudinal claro de la longevidad floral potencial y que la variabilidad entre sitios es una característica principalmente plástica, en la cual la temperatura cumple un rol, sin encontrar evidencia de efectos selectivos. A pesar del incremento de la longevidad floral potencial, no existe una compensación completa de las bajas tasas de visita asociadas a sitios más fríos. A pesar de esto, aún es esperable que exista algún efecto gradual. En consecuencia, el rol de la longevidad floral potencial sobre el incremento de la probabilidad de recibir polen sigue siendo un factor interesante en el estudio de la

adaptación de la biología reproductiva de *R. montanum* a las condiciones de la montaña. Por otro lado, la tasa respiratoria de los tépalos de *R. montanum* no muestra compensación a las menores temperaturas y no se encontró efecto de esta en explicar la variabilidad de la longevidad floral potencial. Este último resultado, se recomienda considerar con precaución ya que la medición de la respiración interfirió con la determinación de la longevidad floral.

Además, trasciende de este trabajo la importancia de que futuros estudios consideren y evalúen el efecto de la disponibilidad de agua sobre la longevidad floral, ya que la evidencia aquí presentada sugiere un efecto aún más importante que el de la tradicionalmente estudiada temperatura ambiental.

Esta tesis es un aporte al conocimiento de los efectos de la temperatura sobre la biología reproductiva de las plantas de montaña, que resulta de particular interés en el marco del cambio climático que está en curso.

## REFERENCIAS

- Arroyo, M., Primack, R. & Armesto, J., 1982. Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of central Chile. I. Pollination mechanisms and altitudinal variation. *American journal of botany*, 69(1), pp.82–97.
- Arroyo, M.T.K. et al., 2006. Erratic pollination, high selfing levels and their correlates and consequences in an altitudinally widespread above-tree-line species in the high Andes of Chile. *Acta Oecologica*, 30(2), pp.248–257.
- Arroyo, M.T.K. et al., 2013. Temperature-driven flower longevity in a high-alpine species of *Oxalis* influences reproductive assurance. *New Phytologist*, 200(4), pp.1260–1268.
- Arroyo, M.T.K., Armesto, J.J. & Primack, R.B., 1985. Community studies in pollination ecology in the high temperate Andes of central Chile II. Effect of temperature on visitation rates and pollination possibilities. *Plant Systematics and Evolution*, 149, pp.187–203.
- Arroyo, M.T.K. & Squeo, F.A., 1990. Relationships between plant breeding systems and pollination. In S. Kawano, ed. *Biological Approaches and Evolutionary Trends in Plants*. London: Academic Toronto Press, pp. 205–227.
- Ashman, T. & Schoen, D., 1997. The cost of floral longevity in *Clarkia tembloriensis*: an experimental investigation. *Evolutionary Ecology*, 11(1), pp.289–300.
- Ashman, T.-L. & Schoen, D.J., 1996. Floral longevity: fitness consequences and resource costs. In *Floral biology: Studies on floral evolution in animal-pollinated plants*. p. 410.
- Atkin, O.K. & Day, D.A., 1990. A comparison of the respiratory processes and growth rate of selected Australian alpine and related lowland plant species. *Australian Journal of Plant Physiology*, 17, pp.517–526.
- Barry, R.G., 2008. *Mountain Weather and Climate* Third edit. C. U. Press, ed.,
- Bates, D. et al., 2015. lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4.
- Bergman, P., Molau, U. & Holmgren, B., 1996. Micrometeorological impacts on insect activity and plant reproductive success in an Alpine environment, Swedish Lapland. *Arctic and Alpine Research*, 28(2), pp.196–202.
- Bingham, R.A. & Orthner, A.R., 1998. Efficient pollination of alpine plants. *Nature*, 391(6664), pp.238–239.
- Blionis, G. & Vokou, D., 2001. Pollination ecology of *Campanula* species on Mt Olympos, Greece. *Ecography*, 24(3), pp.287–297.
- Blionis, G.J. & Vokou, D., 2002. Structural and functional divergence of *Campanula spatulata* subspecies on Mt Olympos (Greece). *Plant Systematics and Evolution*, 232(1-2), pp.89–105.
- Bonhomme, R., 2000. Bases and limits to using “degree.day” units. *European Journal of Agronomy*, 13(1), pp.1–10.
- Broström, G., 2015. eha: Event History Analysis.

PACHECO DA.

- Broström, G. & Lindkvist, M., 2008. Partial Partial Likelihood. *Communications in Statistics - Simulation and Computation*, 37(4), pp.679–686.
- Cabezas, J.L., 2012. *Simulando el efecto del cambio climático sobre la fenología de la añañuca de cordillera Rhodophiala rhodolirion (Baker) Traub. (Amaryllidaceae)*. Universidad de Chile.
- Di Castri, F. & Hajek, E., 1976. *Bioclimatología de Chile*, Santiago: Ediciones de la Pontificia Universidad Católica de Chile.
- Cavieres, L.A. & Arroyo, M.T.K., 1999. Tasa de enfriamiento adiabático del aire en el Valle del Río Molina, Provincia de Santiago, Chile central (33 S). *Revista Geográfica de Chile Terra Australis*, 44, pp.79–86.
- Çelikel, F.G., Cevallos, J.C. & Reid, M.S., 2010. Temperature, ethylene and the postharvest performance of cut snapdragons (*Antirrhinum majus*). *Scientia Horticulturae*, 125(3), pp.429–433.
- Çelikel, F.G. & Reid, M.S., 2005. Temperature and postharvest performance of Rose (*Rosa hybrida* L. "First Red") and Gypsophila (*Gypsophila paniculata* L. "Bristol Fairy"). *Acta Horticulturae*, 682(2000), pp.1789–1794.
- Cevallos, J.C. & Reid, M.S., 2000. Effects of temperature on the respiration and vase life of Narcissus flowers. *Acta Horticulturae*, 517, pp.335–342.
- Chehab, E.W., Eich, E. & Braam, J., 2009. Thigmomorphogenesis: a complex plant response to mechanostimulation. *Journal of experimental botany*, 60(1), pp.43–56.
- Corbet, S.A. et al., 1993. Temperature and the pollinating activity of social bees. *Ecological Entomology*, 18(1), pp.17–30.
- Criddle, R.S., Smith, B.N. & Hansen, L.D., 1997. A respiration based description of plant growth rate responses to temperature. *Planta*, 201, pp.441–445.
- Currier, H.B., 1957. Callose substance in plant cells. *American Journal of Botany*, 44(6), pp.478–488.
- Dirección General de Aeronáutica Civil & Dirección Meteorológica de Chile, 2013. *Anuario climatológico 2013*, Santiago.
- van Doorn, W.G., 1997. Water relations of cut flowers. *Horticultural Reviews*, 18, pp.1–85.
- Gago, C.M.L. & Monteiro, J. a., 2011. NAA and STS effects on bract survival time, carbohydrate content, respiration rate and carbohydrate balance of potted Bougainvillea spectabilis Willd. *Postharvest Biology and Technology*, 60(3), pp.235–243.
- García-Camacho, R. & Totland, Ø., 2009. Pollen limitation in the alpine: a meta-analysis. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 41(1), pp.103–111.
- Giblin, D.E., 2005. Variation in floral longevity between populations of *Campanula rotundifolia* (Campanulaceae) in response to fitness accrual rate manipulation. *American journal of botany*, 92(10), pp.1714–22.
- Grambsch, P.M. & Therneau, T.M., 1994. Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals. *Biometrika*, 81(3), pp.515–526.
- Guisan, A. & Harrell, F.E., 2011. Ordinal Response Regression Models in Ecology Ordinal response regression models in ecology. , 11(5), pp.617–626.
- Halekoh, U. & Højsgaard, S., 2014. A Kenward-Roger approximation and parametric bootstrap methods for tests in linear mixed models - the R package pbkrtest. *Journal of Statistical Software*, 59(9), pp.1–32.

PACHECO DA.

- Harrell, F.E., 2015a. *Regression Modeling Strategies* Second edi., Cham: Springer International Publishing.
- Harrell, F.E., 2015b. rms: Regression Modeling Strategies.
- Hartley, G. et al., 1995. Effect of interior light and temperature on longevity of *Rhipsalidopsis*. *Acta Hort. (ISHS)*, 405, pp.164–169.
- Hilbe, J.M., 2014. *Modeling count data*, New York: Cambridge University Press.
- Inouye, D.W., Morales, M.A. & Dodge, G.J., 2002. Variation in timing and abundance of flowering by *Delphinium barbeyi* Huth (Ranunculaceae): the roles of snowpack, frost, and La Niña, in the context of climate change. *Oecologia*, 130(4), pp.543–550.
- Inouye, D.W. & Pyke, G.H., 1988. Pollination biology in the Snowy Mountains of Australia: comparisons with montane Colorado, USA. *Australian Journal of Ecology*, 13, pp.191–210.
- Jackman, S., 2015. pscl: Classes and Methods for R Developed in the Political Science Computational Laboratory, Stanford University.
- Jager, K.J. et al., 2008. The analysis of survival data: the Kaplan-Meier method. *Kidney international*, 74(5), pp.560–5.
- Körner, C., 2003. *Alpine plant life: functional plant ecology of high mountain ecosystems* 2nd edn., Berlin: Springer-Verlag.
- Ladd, P.G. & Arroyo, M.T.K., 2009. Comparisons of breeding systems between two sympatric species, *Nastanthus spathulatus* (Calyceae) and *Rhodophiala rhodolirion* (Amaryllidaceae), in the high Andes of central Chile. *Plant Species Biology*, 24(1), pp.2–10.
- Lenth, R., 2015. lsmeans: Least-Squares Means.
- Lopez, R.G. & Runkle, E.S., 2004. The Effect of Temperature on Leaf and Flower Development and Flower Longevity of *Zygopetalum* Redvale "Fire Kiss" Orchid. *HortScience*, 39(7), pp.1630–1634.
- Lundemo, S. & Totland, Ø., 2007. Within-population spatial variation in pollinator visitation rates, pollen limitation on seed set, and flower longevity in an alpine species. *Acta Oecologica*, 32(3), pp.262–268.
- Maad, J., Armbruster, W.S. & Fenster, C.B., 2013. Floral size variation in *Campanula rotundifolia* (Campanulaceae) along altitudinal gradients: patterns and possible selective mechanisms. *Nordic Journal of Botany*, 31(3), pp.361–371.
- Martin, F.W., 1959. Staining and observing pollen tubes in the style by means of fluorescence. *Stain Technology*, 34, pp.125–128.
- McCall, C. & Primack, R.B., 1992. Influence of flower characteristics, weather, time of day, and season on insect visitation rates in three plant communities. *American Journal of Botany*, 79(4), pp.434–442.
- Meulen-Muisers, J. van der, 2001. Postharvest flower development in Asiatic hybrid lilies as related to tepal carbohydrate status. *Postharvest Biology and Technology*, 21(1), pp.201–211.
- Monteiro, J.A., Nell, T.A. & Barrett, J.E., 2001. Postproduction of potted miniature rose: Flower respiration and single flower longevity. *Journal of the american society for horticultural science*, 126(1), pp.134–139.
- Müller, H., 1881. *Alpenblumen, ihre befruchtung durch insekten und ihre anpassungen an dieselben*, Leipzig: W. Engelmann.
- Muñoz, A.A. & Arroyo, M.T.K., 2006. Pollen limitation and spatial variation of reproductive success in the insect-pollinated shrub *Chuquiraga oppositifolia* (Asteraceae) in the Chilean Andes. *Arctic, Antarctic,*

- and *Alpine Research*, 38(4), pp.608–613.
- Primack, R., 1985. Longevity of individual flowers. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16(1985), pp.15–37.
- R Core Team, 2014. R: A language and environment for statistical computing.
- Rathcke, B.J., 2003. Floral longevity and reproductive assurance: seasonal patterns and an experimental test with *Kalmia latifolia* (Ericaceae). *American journal of botany*, 90(9), pp.1328–32.
- Regan, S. & Moffatt, B., 1990. Cytochemical Analysis of Pollen Development in Wild-Type *Arabidopsis* and a Male-Sterile Mutant. *The Plant cell*, 2(9), pp.877–889.
- Reid, M.S. & Kofranek, A.M., 1980. Postharvest physiology of cut flowers. *Chronica Horticulturae*, 20(2), pp.25–27.
- Rozzi, R., Arroyo, M. & Armesto, J., 1997. Ecological factors affecting gene flow between populations of *Anarthrophyllum cumingii* (Papillonaceae) growing on equatorial-and polar-facing slopes in the Andes. *Plant Ecology*, 132, pp.171–179.
- Scherrer, D. & Körner, C., 2011. Topographically controlled thermal-habitat differentiation buffers alpine plant diversity against climate warming. *Journal of Biogeography*, 38(2), pp.406–416.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), pp.671–675.
- Simone, J. et al., 2012. Longevity of *Epidendrum ibaguense* Inflorescences Influenced by the Storage Temperature and Ethylene Inhibitor. *Brazilian archives of biology and technology*, 55(2), pp.205–212.
- Stead, A.D., 1992. Pollination-induced flower senescence: a review. *Plant Growth Regulation*, 11(1), pp.13–20.
- Taylor, L.P. & Hepler, P.K., 1997. Pollen germination and tube growth. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48(1), pp.461–491.
- Teixido, A.L. & Valladares, F., 2015. Temperature-Limited Floral Longevity in the Large-Flowered Mediterranean Shrub *Cistus Ladanifer* (Cistaceae). *International Journal of Plant Sciences*, 176(2), pp.131–140.
- Therneau, T., 2015. A Package for Survival Analysis in S.
- Torres-Díaz, C. et al., 2007. Consecuencias de las variaciones microclimáticas sobre la visita de insectos polinizadores en dos especies de *Chaetanthera* (Asteraceae) en los Andes de Chile central. *Revista chilena de historia natural*, 80(4), pp.455–468.
- Totland, Ø., 1997. Limitations on reproduction in alpine *Ranunculus acris*. *Canadian Journal of Botany*, 75(1), pp.137–144.
- Totland, Ø. & Schulte-Herbrüggen, B., 2003. Breeding system, insect flower visitation, and floral traits of two alpine *Cerastium* species in Norway. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 35(2), pp.242–247.
- Utelli, A. & Roy, B.A., 2000. Pollinator abundance and behavior on *Aconitum lycoctonum* (Ranunculaceae): an analysis of the quantity and quality components of pollination. *Oikos*, 89(3), pp.461–470.
- Venables, W.N. & Ripley, B.D., 2002. *Modern Applied Statistics with S* Fourth Edi., Springer, New York.
- Wu, M., Van Doorn, W. & Reid, M., 1991. Variation in the senescence of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars. I. Comparison of flower life, respiration and ethylene biosynthesis. *Scientia*

PACHECO DA.

*horticulturae*, 48, pp.99–107.

Yasaka, M., Nishiwaki, Y. & Konno, Y., 1998. Plasticity of flower longevity in *Corydalis ambigua*. *Ecological Research*, 13, pp.211–216.

Yi, W. et al., 2006. Stigma development and receptivity in almond (*Prunus dulcis*). *Annals of Botany*, 97(1), pp.57–63.

Zeileis, A., Kleiber, C. & Jackman, S., 2008. Regression models for count data in R. *Journal of Statistical Software*, 27(8), p.-.

## Anexo

### ***Anexo 1: El modelo binomial negativo inflado en ceros***

Cuando una variable de conteo presenta una frecuencia de valores cero mucho mayor a la predicha por la distribución supuesta en un modelo paramétrico, deben considerarse alternativas como el uso de modelos inflados en ceros (Hilbe 2014). Dichos modelos son compuestos por dos partes, ambas capaces de generar ceros: un modelo binomial y un modelo de conteo, cada cual representando mecanismos biológicos subyacentes distintos. El primero modela la probabilidad de que la variable aleatoria tome el valor de cero o que pueda tomar otro valor determinado por el segundo componente.

Entonces la probabilidad de que la proporción de semillas maduras por fruto sea cero está determinada por:

$$Pr(Y = 0) = Pr(Bin = 0) + (1 - Pr(Bin = 0)) * Pr(Conteo = 0)$$

Donde  $Y$  es la proporción de semillas por fruto. Y la probabilidad de que la variable sea mayor o igual a cero es determinada como:

$$Pr(Y \geq 0) = (1 - (Pr(Bin = 0))) + FDP(Conteo)$$

Donde  $FDP(Conteo)$  es la función de densidad de probabilidad propia del modelo de conteo, en el caso de esta tesis es la distribución binomial negativa.

En definitiva, este modelo considera dos fuentes de valores cero distintas: los que provienen del modelo binomial negativo, que corresponden a la probabilidad de que un fruto no sea polinizado, y los ceros provenientes del modelo binomial, que son interpretados como resultado del aborto de los frutos.

**Anexo 2: Tabla.**

Humedad del suelo promedio en los tres sitios de estudio durante la temporada de floración 2014-2015 de *R. montanum*.

Sitios de estudio	N	Contenido volumétrico promedio (%)	EEM	DE
Alto	6	27,4	3,3	8,2
Medio	6	28,8	2,8	6,8
Bajo	21	5,7	0,4	1,6

N: Tamaño de muestra; EEM: Error Estándar de la Media; DE: Desviación estándar.

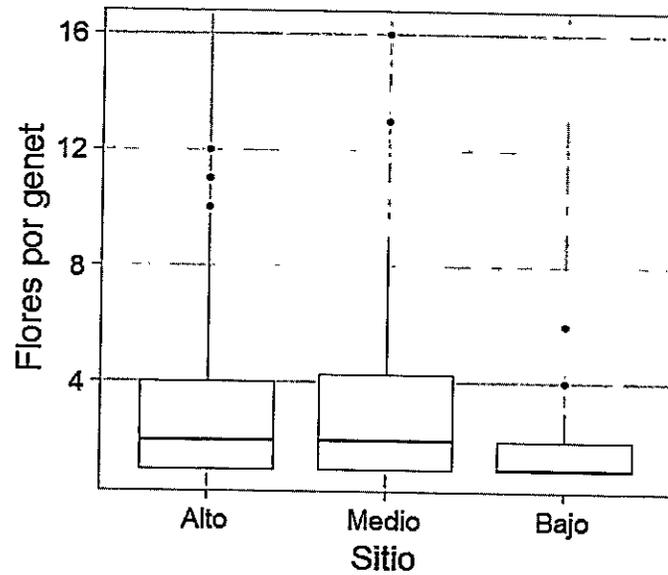
**Anexo 3: Figura.**

Gráfico de cajas del número de flores por *genet* de *R. montanum* en los cuales se midió longevidad floral potencial durante la temporada de floración 2014-2015, por sitio de estudio.